



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ต่อ *Aspergillus carbonarius* ที่ผลิตโอคราทอกซินเอ

ชื่อนิสิต นางสาวณัฐนิชา ตันติเจริญการ รหัสนิต 6032315723

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ ผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ต่อ *Aspergillus carbonarius*
ที่ผลิตโอคราทอกซินเอ
โดย นางสาวณัฐนิชา ตันติเจริญการ รหัสบัณฑิต 6032315723
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์
ปีการศึกษา 2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับโครงการฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์

อนันท์ ปาลกะ

.....หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ศาสตราจารย์ ดร. อนันท์ ปาลกะ)

คณะกรรมการสอบโครงการ



.....อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์)

ศุชาดา จันท์ประทีป นภาธร

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศุชาดา จันท์ประทีป นภาธร)

เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอกวิทย์ ลือพร้อมชัย)

อรุทัย ภิญญาคง

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

โครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์

เรื่อง

ผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์
ต่อ *Aspergillus carbonarius* ที่ผลิตโอคราทอกซินเอ

โดย

นางสาวณัฐนิชา ตันติเจริญการ
รหัสประจำตัว 6032315723

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2563

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงการ ผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ต่อ *Aspergillus carbonarius* ที่ผลิตโอคราทอกซินเอ

โดย นางสาวณัฐนิชา ตันติเจริญการ รหัสนิสิต 6032315723

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.ชิวานันท์ เดชอุปกการ ศิริสมบุญ

บทคัดย่อ

ราและสารพิษจากราสามารถปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรตั้งแต่ในแปลงเพาะปลูกตลอดจนถึงขั้นตอนการเก็บรักษา ส่งผลให้คุณภาพของผลผลิตลดลง ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและสุขภาพของผู้บริโภคเป็นอย่างมาก ปัจจุบันยีสต์ปฏิปักษ์เป็นหนึ่งในตัวควบคุมทางชีวภาพที่นิยมใช้ในการลดการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในผลผลิตทางการเกษตร การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อประเมินความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ไอโซเลต Y08 และ Y20 ที่แยกได้จากเมล็ดกาแฟ และผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ยีสต์ผลิตขึ้นต่อการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *Aspergillus carbonarius* F3T1OR4B1 และ *A. carbonarius* TK4.2 ผลการทดลองพบว่า ยีสต์ทั้งสองไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ทั้งสองสายพันธุ์ได้ โดยสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับรา และยีสต์ทั้งสองไอโซเลตสามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของเราได้อย่างมีประสิทธิภาพ (90-100 เปอร์เซ็นต์) โดยยีสต์ไอโซเลต Y20 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญและลดการผลิตโอคราทอกซินเอของเราได้ 96 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ยีสต์ผลิตส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยรา และเมื่อวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ไอโซเลต Y20 ผลิตขึ้น พบเอทานอล, 1-บิวทานอล, 3-เมทิล-, อะซิเตท และเอทิลอะซิเตท เป็นหลัก

Department of microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Project title Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing *Aspergillus carbonarius*

Investigator Miss Natnicha Tanticharoenkarn Student ID 6032315723

Advisor Asst. Prof. Cheewanun Dachoupan Sirisomboon, Ph.D.

Abstract

Fungi and their mycotoxins can be contaminated in agricultural products from field to storage leading to decrease the quality of products and resulting in economic loss and consumer health. At the present, antagonistic yeast is one of the biological control agents used to control fungi and their mycotoxins in agriculture products. The aims of this study were to evaluate of antagonistic activity of yeast isolate Y08 and Y20 isolated from coffee beans and to determine the effect of volatile organic compounds (VOCs) produced by yeast on growth and ochratoxin A (OTA) production of *Aspergillus carbonarius* F3T1OR4B1 and *A. carbonarius* TK4.2. The results showed that both yeast isolates were able to inhibit growth of both *A. carbonarius* strains by producing antifungal metabolites when co-cultured with each fungal strain. Moreover, both yeast isolates were able to produce VOCs that effectively inhibit the growth and OTA production of *A. carbonarius* (90-100 percent). The isolate Y20 showed the highest efficiency to inhibited fungal growth (96 percent) and OTA production (99 percent). In addition, the VOCs produced by yeast effected on morphological changes of *A. carbonarius* hyphae. Ethanol, 1-butanol, 3-methyl-, acetate and ethyl acetate were the main VOCs produced by yeast isolate Y20.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการณ์ ศิริสมบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษาและข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ รวมไปถึงการปรับปรุงแก้ไขและตรวจทานตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัยนี้ ทำให้รูปแบบฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี อีกทั้งยังคอยช่วยเหลือและคอยให้กำลังใจเสมอ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณทุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ที่ดีที่ได้รับจากงบประมาณของภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้ความรู้และคำแนะนำต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องและเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยฉบับนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ ภายในภาควิชา

ขอขอบคุณพี่ ๆ ทั้งศิษย์เก่าและศิษย์ปัจจุบัน และเพื่อนร่วมห้องปฏิบัติการ 1904/14 ที่คอยช่วยเหลือให้คำแนะนำและคำปรึกษาในการทำปฏิบัติการ การใช้เครื่องมือ ตลอดจนการส่งตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลการทดลอง

ขอขอบคุณรุ่นพี่ รุ่นน้องและเพื่อน ๆ ทุกคนในภาควิชาจุลชีววิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อนในกลุ่ม ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำปรึกษาและให้กำลังใจเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณศิลปินเกาหลี โจอูจี และสมาชิกของวงปีสท์และ/หรือไฮไลท์ ที่ประกอบไปด้วย ยุนจุนจุน จางฮยอนซึง ยงจุนฮยอง ยังโยฮอบ ลีกีกวาง และชงดงอุน ที่เป็นแรงใจ แรงผลักดัน และเป็นความผ่อนคลายให้ผู้วิจัยตลอดการศึกษาและการทำวิจัยเสมอมา

ขอขอบคุณสมาชิกในครอบครัวไม่ว่าจะเป็น พ่อ แม่ พี่ชาย และพี่สาว รวมไปถึงญาติ ๆ ทุกฝ่าย ที่คอยให้กำลังใจ คอยส่งเสริมและสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา และสุดท้ายนี้ ขอขอบคุณตัวเองที่มีความพยายามและความอดทน ไม่ย่อท้อต่ออุปสรรคที่ผ่านเข้ามา จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

| | หน้า |
|---|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | ข |
| กิตติกรรมประกาศ..... | ค |
| สารบัญ..... | ง |
| สารบัญรูปภาพ..... | ช |
| สารบัญตาราง..... | ฉ |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| 1.1 สารพิษจากรา..... | 1 |
| 1.2 โอคราทอกซินเอ..... | 2 |
| 1.3 ความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอ..... | 4 |
| 1.4 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ..... | 5 |
| 1.5 การควบคุมการปนเปื้อนสารพิษจากรา..... | 6 |
| 1.6 กลไกการป้องกันเชื้อก่อโรคโดยสารควบคุมทางชีวภาพ..... | 8 |
| 1.7 สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย..... | 9 |
| วัตถุประสงค์..... | 10 |
| บทที่ 2 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการ | |
| 2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง..... | 11 |
| 2.2 เคมีภัณฑ์..... | 12 |
| 2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ..... | 13 |
| 2.4 วิธีดำเนินงานวิจัย..... | 14 |
| 2.4.1. การเตรียมจุลินทรีย์..... | 14 |
| 2.4.2. การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของ <i>A. carbonarius</i> | 14 |
| 2.4.2.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญด้วยวิธี Dual culture..... | 14 |
| 2.4.2.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการสร้างสารยับยั้ง การเจริญเมื่อมีการเลี้ยงร่วมกับราด้วยวิธี agar spot assay..... | 15 |
| 2.4.2.3 การทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของรา ด้วยวิธี agar diffusion assay..... | 16 |

| | |
|--|----|
| 2.4.3 การทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) ของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius</i> | 16 |
| 2.4.3.1 การทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายด้วยวิธี face-to-face..... | 16 |
| 2.4.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโอคราทอกซินเอ..... | 17 |
| 2.4.3.3 การวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์..... | 17 |
| บทที่ 3 ผลการทดลอง | |
| 3.1 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของ <i>A. carbonarius</i> | 18 |
| 3.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับรา..... | 20 |
| 3.3 การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของรา..... | 21 |
| 3.4 การทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) ของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius</i> | 24 |
| 3.4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius</i> | 24 |
| 3.4.2 วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราโดยใช้ Scanning Electron Microscope (SEM) | 27 |
| 3.4.3 การวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์..... | 28 |
| บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง | |
| 4.1 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของ <i>A. carbonarius</i> | 29 |
| 4.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับรา..... | 29 |
| 4.3 การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของรา..... | 30 |
| 4.4 การทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) ของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius</i> | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ต่อ การยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius</i> | 31 |
| 4.4.2 วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราโดยใช้ Scanning Electron Microscope (SEM) | 32 |
| 4.4.3 การวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์..... | 32 |
| เอกสารอ้างอิง..... | 34 |
| ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... | 47 |
| ภาคผนวก ข การเตรียมสารละลาย..... | 48 |
| ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานสารพิษจากรา..... | 49 |
| กราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ..... | 49 |
| โครมาโทแกรมของโอคราทอกซินเอ ที่ retention time (RT) ประมาณ 10 นาที..... | 49 |
| การคำนวณปริมาณโอคราทอกซินเอ..... | 49 |

สารบัญรูปภาพ

| | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของโอคราทอกซิน..... | 3 |
| รูปที่ 2.1 การทดสอบด้วยวิธี Dual culture บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA..... | 15 |
| รูปที่ 3.1 การเจริญของ <i>A. carbonarius</i> F3T1OR4B1 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Dual culture บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... | 19 |
| รูปที่ 3.2 การเจริญของ <i>A. carbonarius</i> TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Dual culture บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... | 19 |
| รูปที่ 3.3 การเจริญของ <i>A. carbonarius</i> F3T1OR4B1 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Agar spot assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... | 20 |
| รูปที่ 3.4 การเจริญของ <i>A. carbonarius</i> TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Agar spot assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... | 21 |
| รูปที่ 3.5 การเจริญของ <i>A. carbonarius</i> F3T1OR4B1 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง mid log phase เพื่อยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... | 22 |
| รูปที่ 3.6 การเจริญของ <i>A. carbonarius</i> F3T1OR4B1 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง late log phase เพื่อยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... | 22 |
| รูปที่ 3.7 การเจริญของ <i>A. carbonarius</i> TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง mid log phase เพื่อยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... | 23 |
| รูปที่ 3.8 การเจริญของ <i>A. carbonarius</i> TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง late log phase เพื่อยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... | 23 |
| รูปที่ 3.9 การเจริญของ <i>A. carbonarius</i> F3T1OR4B1 เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face double petri dish assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... | 25 |
| รูปที่ 3.10 การเจริญของ <i>A. carbonarius</i> TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face double petri dish assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... | 26 |

| | |
|---|----|
| รูปที่ 3.11 ลักษณะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของ <i>A. carbonarius</i> TK4.2 จากกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เมื่อทดสอบผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ไอโซเลท Y20 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... | 27 |
| รูปที่ 3.12 โครมาโทแกรมของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายในสัดส่วนที่มากที่สุดที่ผลิตจากยีสต์ไอโซเลท Y20..... | 28 |

สารบัญตาราง

| | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 1 ข้อกำหนดการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอตามประกาศของคณะกรรมการยุโรป Commission Regulation (EC) No 1881/2006..... | 6 |
| ตารางที่ 3.1 การเจริญของ <i>A. carbonarius</i> F3T1OR4B1 และ <i>A. carbonarius</i> TK4.2 เมื่อเลี้ยง ร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี dual culture บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.... | 20 |
| ตารางที่ 3.2 การยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius</i> F3T1OR4B1 โดยสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สร้างจากยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face double petri dish assay บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... | 25 |
| ตารางที่ 3.3 การยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius</i> TK4.2 โดยสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สร้างจากยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face double petri dish assay บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... | 26 |
| ตารางที่ 3.4 ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ปฏิปักษ์ เมื่อบ่มที่ 25 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน วิเคราะห์โดยเครื่อง GC/MS Chromatograph..... | 28 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 สารพิษจากรา

สารพิษจากรา (Mycotoxins) เป็นสารประกอบเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่ถูกสร้างจากราหลายชนิด เช่น *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria* และ *Stachybotrys* (Sana และคณะ, 2019) องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations หรือ FAO) ระบุว่ามากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทางการเกษตรทั่วโลกพบการปนเปื้อนของสารพิษจากรา การปนเปื้อนที่เกิดขึ้นจะเป็นทางเชื่อมโยงเข้าสู่ห่วงโซ่อาหาร โดยจากผลผลิตทางการเกษตรถูกนำไปเป็นวัตถุดิบในการแปรรูปอาหารต่าง ๆ ตัวอย่างของสารพิษจากรา ได้แก่ อะฟลาทอกซิน (Aflatoxin), ฟุโมนิซิน (Fumonisin), ซีราลีโนน (Zearalenone), ดีออกซินิวาลีนอล (Deoxynivalenol) หรือ โวมิทอกซิน (Vomitoxin), ไตรโคทีซีน (Trichothecene), โอคราทอกซิน (Ochratoxins), พาทุลิน (Patulin), พิอาร์ทอกซิน (PR toxin), ซิโตรนิน (Citrinin), เออร์กอต อัลคาลอยด์ (Ergot Alkaloids) (Whitlow และ Hagler, 2007) โดยสารพิษเหล่านี้สามารถปนเปื้อนได้ตั้งแต่ในแปลงเพาะปลูก ก่อนการเก็บเกี่ยว ระหว่างเก็บเกี่ยว หลังการเก็บเกี่ยว และโดยเฉพาะระหว่างการเก็บรักษา ตลอดจนการบรรจุและการขนส่งผลผลิตทางการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปนเปื้อนในผลผลิตที่ใช้เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ (ชวลิต ตรีภรณ์สวัสดิ์, 2561; ยวเรศ เรืองพานิช และคณะ, 2562)

สารพิษจากราที่ถูกสร้างขึ้นที่มีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของรา ราสายพันธุ์เดียวกัน สามารถผลิตสารพิษได้หลายชนิด หรือราต่างสายพันธุ์กันสามารถสร้างสารพิษชนิดเดียวกันได้ และในราแต่ละสายพันธุ์จะสร้างสารพิษก็ต่อเมื่อมีสภาวะแวดล้อม อุณหภูมิ และความชื้นที่เหมาะสม (Peraica และ Domijan, 2001; รักไทย งามภักดิ์ และคณะ, 2563) โดยสารพิษเหล่านี้ สามารถทนความร้อนได้สูง โดยความร้อนที่ใช้ในการประกอบอาหารสามารถทำลายสารพิษนี้ได้ แต่ไม่สามารถทำลายได้หมดอย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้ การปนเปื้อนของสารพิษจากราที่ได้กล่าวถึงข้างต้นนี้ ส่งผลกระทบต่อสุขภาพทั้งในมนุษย์และสัตว์แบบชนิดเฉียบพลันหรือชนิดเรื้อรังก็ได้ รวมไปถึงก่อให้เกิดปัญหาด้านสาธารณสุข เศรษฐกิจ โดยเฉพาะการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรทั้งทางตรงและทางอ้อม (อำนาจ พัวพลเทพ, 2562)

เมื่อความต้องการอาหารของมนุษย์มากขึ้น ส่งผลให้ต้องมีการเพาะปลูกหรือเลี้ยงสัตว์เจริญเติบโตเร็วขึ้น ทำให้การดูแลคุณภาพผลผลิตไม่เพียงพอ คุณภาพของผลผลิตเพื่อนำไปประกอบอาหารลดลง หรือแม้แต่การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมก็ส่งเสริมให้มีการเจริญของราและส่งเสริมให้ราสร้างสารพิษขึ้น ดังนั้นการปนเปื้อนราและสารพิษของราทำให้การค้าผลผลิตทางการเกษตรจากแหล่งเพาะปลูกหรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์เป็นไปได้ยากขึ้น กล่าวคือ เมื่อผลผลิตได้รับความเสียหายเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อก่อโรคหรือสิ่งไม่พึงประสงค์ ผลผลิตไม่ได้คุณภาพ ทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตที่ต่ำกว่าปกติ (Agha, 2011) ดังเช่นในสัตว์ ทำให้มีอัตราการป่วยและการตายเพิ่มมากขึ้น ทำให้ราคาผลผลิตต่ำลงและมีต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น ซึ่งผลผลิตที่เสียหายในส่วนนี้ส่งผลกระทบทางตรงแก่เกษตรกร (อำนาจ พัวพลเทพ, 2562) นอกจากนี้

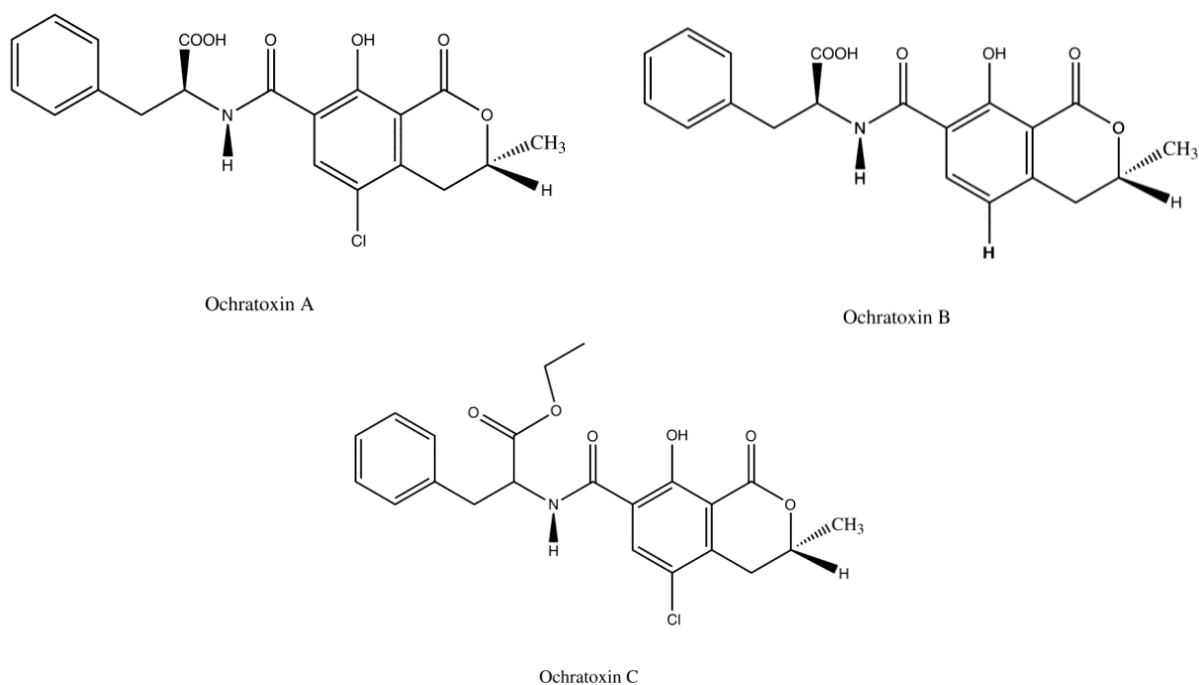
ผู้บริโภคที่ได้รับสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารแม้ว่าจะได้รับในปริมาณน้อย แต่ได้รับต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน อาจทำให้ผู้บริโภคผลผลิตเหล่านี้เสียชีวิตหรือเกิดอาการพิษ (mycotoxicosis) โดยสารพิษจากราสามารถเข้าสู่ร่างกายได้หลายวิธี ได้แก่ การกิน การหายใจ และผ่านการสัมผัสทางผิวหนัง โดยมีอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายเป็นเป้าหมายของสารพิษจากรา (Coppock และ Jacobsen, 2009)

สารพิษจากราสามารถแบ่งตามชนิดของราที่ผลิตได้เป็น 4 กลุ่ม คือ 1) สารพิษจากรากลุ่มแอสเพอร์จิลลัส (*Aspergillus toxins*) ตัวอย่างสารพิษในกลุ่มนี้ ได้แก่ อะฟลาทอกซิน และโอคราทอกซิน เป็นต้น โดยราในกลุ่มนี้ เจริญได้ดีในสภาพอากาศที่ร้อนชื้นและกึ่งร้อนและสร้างสารพิษเมื่อมี อุณหภูมิ 25–39 องศาเซลเซียส ผลผลิตที่มักพบสารพิษจากรากลุ่มแอสเพอร์จิลลัส ได้แก่ ธัญพืช น้ำมัน ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ถั่วเหลือง ถั่วชนิดต่าง ๆ เครื่องเทศ ผลมะเดื่อแห้ง อินทผลัม ส้ม และองุ่น เป็นต้น 2) สารพิษจากรากลุ่มฟูซาริแยม (*Fusarium toxins*) ตัวอย่างสารพิษในกลุ่มนี้ ได้แก่ สารพิษจากรากลุ่มไตรโคทีซิน เช่น ทีทูทอกซิน, ดีออกซินิ วาลีนอล นิวาลินอล ซีราลีโนน และฟูโมนิซิน เป็นต้น สารพิษเหล่านี้พบมากในช่วงที่ธัญพืชกำลังเติบโตและเป็นช่วงก่อนเก็บเกี่ยว และราในกลุ่มนี้เจริญได้ดีในสภาพ อากาศที่มีความชื้นสูงและอุณหภูมิ 5–15 องศาเซลเซียส 3) สารพิษจากรากลุ่มเพนิซิลีียม (*Penicillium toxins*) เช่น โอคราทอกซิน ซีไทรนิน และพาทุลิน ซึ่งพบการปนเปื้อนได้ในเมล็ดธัญพืช ข้าว ข้าวโพด ถั่วลิสง เมล็ดกาแฟ เป็นต้น 4) สารพิษจากรากลุ่มอื่น (Miscellaneous toxins) เช่น เออร์กอต อัลคาลอยด์ ซึ่งสร้างจากรา *Clavisep* spp. เป็นต้น (อำนาจ พัวพล เทพ, 2562)

1.2 โอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซิน (ochratoxins) เป็นสารประกอบเมแทบอลิต์ทุติยภูมิชนิดหนึ่งที่ถูกสร้างด้วยราสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* (Wang และคณะ, 2016) ซึ่งโอคราทอกซินมีอนุพันธ์หลายชนิด ได้แก่ โอคราทอกซินเอ (OTA) โอคราทอกซินบี (OTB) โอคราทอกซินซี (OTC) โอคราทอกซินแอลฟา (OT α) และโอคราทอกซินบีต้า (OT β) เป็นต้น แต่โอคราทอกซินเอเป็นอนุพันธ์ที่รู้จักกันโดยทั่วไป สามารถพบได้บ่อยและพบได้ในทุกพื้นที่ (Pohl และคณะ, 1992)

โอคราทอกซินมีโครงสร้างที่เหมือนกัน คือ โครงสร้างจะประกอบด้วย dihydro-isocoumarin moiety เชื่อมต่อกับ phenylalanine และพันธะ amide นอกจากนี้ โอคราทอกซินเอและโอคราทอกซินซีมีส่วนของ parachlorophenol เหมือนกัน (Koszegi และ Poor, 2016; Azhar และคณะ, 2017) (รูปที่ 1.1)



รูปที่ 1.1 โครงสร้างทางเคมีของโอคราทอกซิน (Azhar และคณะ, 2017)

โอคราทอกซินเอมีสูตรทางเคมี คือ $C_{20}H_{18}ClNO_6$ มีชื่อแบบ IUPAC คือ N-[[[(3R)-5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-3,4-dihydro-1H-isochromen-7-yl]carbonyl]-L-phenylalanine มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 403.8 กรัมต่อโมล โอคราทอกซินเอเป็นผลึกของแข็งสีขาว ไม่มีกลิ่น มีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ ทนความร้อนได้ดี มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 168–173 องศาเซลเซียส ดังนั้น อุณหภูมิที่ใช้ในการประกอบอาหารไม่สามารถทำลายสารพิษชนิดนี้ได้หมดไปอย่างสมบูรณ์ (Vidal และคณะ, 2015) โอคราทอกซินเอสามารถทนอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ใช้ในการฆ่าเชื้อได้ 3 ชั่วโมง (Trivedi และคณะ, 1992) และอุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ไม่สามารถทำลายสารพิษได้ทั้งหมด (Boudra และคณะ, 1995)

โอคราทอกซินเอถูกค้นพบครั้งแรกในราในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* ในปี ค.ศ.1965 ต่อมาพบว่ามียาหลายสายพันธุ์ในสกุล *Aspergillus* ที่สามารถผลิตโอคราทอกซินได้ เช่น *A. alliaceus*, *A. carbonarius*, *A. cretensis*, *A. flocculosus*, *A. foetidus*, *A. glaucus*, *A. melleus*, *A. melleus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. ostianus*, *A. persii*, *A. petrakii*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. sclerotium*, *A. sclerotiorum* และ *A. fresenii* (Visagie และคณะ, 2014) โดยประเทศในเขตร้อนชื้น เช่น ประเทศแถบแอฟริกา ทวีปอเมริกาใต้ และเอเชียใต้ มักพบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอจาก *Aspergillus* เป็นหลัก ในขณะที่ประเทศในแถบที่มีอากาศเย็น เช่น แอภยุโรปเหนือ การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอมีสาเหตุหลักมาจาก *Penicillium* เช่น *P. vilidicatum*, *P. nordicum* และ *P. aurantiogriseum* (Bau และคณะ, 2005)

1.3 ความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเอมีความเป็นพิษต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกายทั้งในมนุษย์และสัตว์ (Malir และคณะ, 2013) เช่น เป็นพิษต่อไต (nephrotoxicity) เป็นพิษต่อระบบประสาท (neurotoxicity) เป็นพิษต่อทารกในครรภ์ (teratogenicity) เป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immunotoxicity) โดยความเป็นพิษโดยที่เพิ่มขึ้นจะเป็นเป็นสารก่อมะเร็ง โอคราทอกซินเอเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้หนูเป็นมะเร็งที่ตับและไต ความรุนแรงของการเกิดพิษขึ้นอยู่กับเพศและสายพันธุ์ (Malir และคณะ, 2013; Hsuuw และคณะ, 2013)

ความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอต่อไต

ไตเป็นอวัยวะเป้าหมายหลักของการออกฤทธิ์ของโอคราทอกซินเอ เช่น ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่ไม่ใช่สัตว์เคี้ยวเอื้อง จากงานวิจัยในทางระบาดวิทยาของ Elling และคณะในปี 1985 ที่ศึกษาในประเทศเดนมาร์ก ฮังการี สแกนดิเนเวียและโปแลนด์ แสดงให้เห็นว่าโอคราทอกซินเอมีบทบาทสำคัญของสาเหตุการเกิดโรคไตหมู่ เป็นต้น นอกจากนี้ โอคราทอกซินเอยังเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรค Balkan Endemic Nephropathy (BEN) (Tanchev และคณะ, 1991) และคาดว่าก่อให้เกิดโรค Tunisian Nephropathy (TCIN) อีกด้วย (Hassen และคณะ, 2004)

ความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอต่อระบบประสาท

โอคราทอกซินเอส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบประสาทได้ จากรายงานจาก Paradells และคณะในปี 2014 พบว่าโอคราทอกซินเอเป็นสาเหตุให้เกิดความเสียหายในระดับสมอง และมีรายงานของ Sava และคณะในปี 2006 พบว่า หนูที่ได้รับโอคราทอกซินเอเข้าไปจะเกิดความเสียหายบริเวณสมอง ส่งผลให้เกิดความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและโปรตีน อีกทั้งยังสามารถจับกับสายดีเอ็นเอ ทำให้สายดีเอ็นเอแยกออกจากกัน ดังนั้น สารพิษชนิดนี้มีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์ประสาทและสามารถเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อประสาท เช่น สมอง หรือจอประสาทตาได้ตลอดเวลา (Bruinink และ Sidler, 1997)

ความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอต่อทารกในครรภ์

จากการทดลองในห้องปฏิบัติการสัตว์ สารพิษชนิดนี้สามารถถ่ายทอดจากแม่สู่ทารกในครรภ์ผ่านทางรกได้ และเป็นสาเหตุที่ทำให้ตัวอ่อนในครรภ์มีอวัยวะและรูปร่างที่ผิดปกติตั้งแต่อยู่ในครรภ์ เช่น แฮมสเตอร์ (Hood และคณะ, 1976) และไก่ (Gilani และคณะ, 1978) นอกจากนี้ ยังทำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด ขากรรไกรล่างผิดปกติ กระดูกสันหลังคด เนื้อเยื่อของอวัยวะที่สำคัญ เช่น ตับ และไตเกิดความผิดปกติ (Malir และคณะ, 2013) สำหรับในมนุษย์โอคราทอกซินเอนอกจากจะสามารถถ่ายทอดจากแม่ไปสู่ลูกแล้ว ยังอาจส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ผิดปกติ (Pfohl-Leskowicz และ Manderville, 2007)

ความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอต่อระบบภูมิคุ้มกัน

เมื่อหนูได้รับโอคราทอกซินเอเข้าสู่ร่างกายก่อให้เกิดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่บกพร่อง โดยจะมีบทบาทในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง T cell และ B cell นอกจากนี้ ยังสามารถยับยั้งไม่ให้เกิดการจับกันของ interleukin 2 (IL2) และตัวรับของมัน (IL2 receptor) (Lea และคณะ, 1989) นอกจากนี้ สารพิษชนิดนี้ยังกีดการทำงานของ Natural Killer (NK) cell โดยไปยับยั้งที่ interferon ที่นำไปใช้ฆ่าสิ่งแปลกปลอมอีกด้วย (Luster และคณะ, 1987) โอคราทอกซินเอสามารถไปกีดการทำงานของไขกระดูก และมีผลกระทบต่อต่อมไทมัส ม้าม และต่อมน้ำเหลือง (Al-Anati และ Petzinger, 2006) สำหรับผลกระทบต่อร่างกายมนุษย์ยังไม่เป็นที่แน่ชัด เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกันอย่างซับซ้อนของชนิดของเซลล์ภูมิคุ้มกันในร่างกาย การติดเชื้ออื่น ๆ แทรกซ้อน (Montagnoli และคณะ, 2006)

มีการคาดว่าโอคราทอกซินเอเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (IARC, 1993) ตามข้อมูลของการก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง เมื่อทดลองนำสารพิษปนเปื้อนในอาหารให้หนูเพศผู้กิน ปรากฏว่าหนูนั้นเป็นเนื้องอกในเซลล์ตับ เนื้องอกในเซลล์ไตและมะเร็งตับ (Huff และคณะ, 1992) Pfohl-Leskowicz และคณะในปี 1998 พบว่า โอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารสามารถชักนำให้หนูเพศเมียเป็นเนื้องอกและมะเร็งตับได้ จากการศึกษาสารพิษในหนูเพศผู้และเพศเมีย แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของปริมาณสารพิษที่ได้รับ โดยยิ่งได้รับสารพิษปริมาณมาก การเกิดเนื้องอกและการเป็นมะเร็งจะเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ของโอคราทอกซินเอกับการเกิดมะเร็งในมนุษย์ที่มากพอ แต่อุบัติการณ์และอัตราการตายจากเนื้องอกในระบบทางเดินปัสสาวะมีความสัมพันธ์กับโรค BEN โดยเฉพาะในแถบบอลข่านในประเทศบัลแกเรีย และประเทศยูโกสลาเวีย (Feier และ Tofana, 2009)

1.4 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ

แหล่งอาหารที่สามารถพบโอคราทอกซินเอได้บ่อย ได้แก่ ธัญพืชและถั่วต่าง ๆ เปียร์ ไวน์ กาแฟ โกโก้ ลูกเกด มะเดื่อฝรั่ง เครื่องเทศ และชา (Ostry และคณะ, 2015) น้ำองุ่น (Cao และคณะ, 2013) อาหารสัตว์ น้านมจากสัตว์ เนื้อสัตว์ ไข่ ผลิตภัณฑ์แปรรูปต่างๆ เช่น ไส้กรอก แฮม เบคอน เป็นต้น หรือสามารถพบได้ในยาสมุนไพร รวมไปถึงเครื่องเทศต่าง ๆ (Skarkova และคณะ, 2013)

การปนเปื้อนหรือสารพิษตกค้างของโอคราทอกซินเอในอาหารชนิดต่าง ๆ ถูกกำหนดด้วยค่าที่แตกต่างกันขึ้นกับ อาหารชนิดนั้น ๆ หรือในแต่ละประเทศ หรือแต่ละองค์การกำหนดไว้ เช่น Codex Committee on Contaminants in Foods (CCCF), Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), world health organization (WHO), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (Joint FAO/WHO Food Standards Programme, 2013), European Food Safety Authority (EFSA), European Commission (EC) (Jack และคณะ, 2017), United States Department of Agriculture (USDA), European Union (EU) (Gerda, 2017) สำหรับประเทศไทยมีสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ที่ดูแลเกี่ยวกับวัตถุพิษ ผลิตภัณฑ์หรืออาหารต่าง ๆ

European Union (EU) ได้กำหนดสารพิษตกค้างหรือค่าการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอามากที่สุดที่เป็นไปได้ของอาหารชนิดต่าง ๆ โดยระบุไว้ใน Commission Regulation (EC) No 1881/2006 (แสดงในตารางที่ 1) ในประเทศไทย มีรายงานการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหารไม่มากนัก แต่พบการปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟ (Noonim และคณะ, 2008) ดังนั้น ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ปีพ.ศ. 2561 และปี พ.ศ.2562 กำหนดการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟอาราบิก้าและโรบัสต้าไว้ไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในปัจจุบัน มีร่างประกาศกระทรวงสาธารณสุขเพิ่มข้อกำหนดการปนเปื้อนที่มากที่สุดในการแปรรูปกาแฟไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เพื่อให้สอดคล้องตามมาตรฐานทั่วไปสำหรับสารปนเปื้อนและสารพิษในอาหารและอาหารสัตว์ (Codex General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed; CODEX STAN 193-1995)

ตารางที่ 1 ข้อกำหนดการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอตามประกาศของคณะกรรมการอาหารยุโรป Commission Regulation (EC) No 1881/2006

| ชนิดของอาหาร | ปริมาณโอคราทอกซินสูงสุด (นาโนกรัมต่อกกรัม) |
|--|---|
| ธัญพืชที่ไม่ผ่านกระบวนการแปรรูป | 5 |
| ธัญพืชที่ผ่านกระบวนการแปรรูปและอาหารที่ใช้ธัญพืชเป็นวัตถุดิบ | 3 |
| องุ่นตากแห้ง (ลูกเกด) | 10 |
| เมล็ดกาแฟคั่ว | 5 |
| กาแฟสำเร็จรูป | 10 |
| ไวน์ที่ผลิตจากองุ่น | 2 |
| น้ำองุ่นหรือน้ำผลไม้ที่ผลิตจากองุ่น | 2 |
| อาหารสำหรับเด็กและเด็กแรกเกิด | 0.5 |
| เครื่องเทศ เช่น พริกป่น พริกปาปริกา | 20 |

ที่มา : ดัดแปลงจาก Malir และคณะ, 2016

1.5 การควบคุมการปนเปื้อนสารพิษจากรา

วิธีในการควบคุมและลดการปนเปื้อนจากราและสารพิษจากราในวัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารและอาหารสัตว์มีหลากหลายวิธี เช่น การจัดการให้ผลผลิตทนต่อการเข้าทำลายจากราตั้งแต่ในแปลงปลูก การควบคุมทางกายภาพ การใช้สารควบคุมทางชีวภาพ รวมไปถึงสารเคมีในช่วงก่อนการเก็บเกี่ยว ระหว่างการเก็บเกี่ยว และหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งวิธีที่ใช้ควบคุมการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราจะต้องไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ รวมถึงสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ ต้องคงคุณค่าทางโภชนาการและไม่ทำให้คุณภาพของวัตถุดิบเสียไป (Karlovsky และคณะ, 2016)

การควบคุมทางกายภาพ

การควบคุมทางกายภาพเป็นวิธีเบื้องต้นในการลดการปนเปื้อนจากภายนอกตั้งแต่ขั้นตอนก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว เช่น การคัดแยกผลผลิตที่เสียหายทิ้ง การล้างทำความสะอาด การใช้รังสี การกรองและการดูดซับสารพิษจากอากาศ (Luo และคณะ, 2018) รวมไปถึงการทำให้แห้ง (Betina, 1989) และการใช้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อ เช่น การผ่านน้ำร้อน การพ่นไอน้ำร้อน หรือการผ่านอากาศที่มีอุณหภูมิสูง (Lurie, 1998) การต้มให้เดือด การหมัก และการคั่ว (Karlovsky และคณะ, 2016) เป็นต้น การให้ความร้อนในระยะเวลาสั้น ๆ สามารถป้องกันการเจริญของราที่อาจก่อให้เกิดการสะสมของสารพิษจากราได้ (Barkai-Golan, 2001)

การควบคุมทางเคมี

การควบคุมทางเคมีมีประสิทธิภาพมากในการควบคุมการปนเปื้อนจากราและสารพิษจากรา แต่ยังมีข้อจำกัดในการใช้สารเคมี เนื่องจากอาจทำให้เกิดสารเคมีตกค้างในสิ่งแวดล้อมและอาหารได้ ทำให้ไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค นอกจากนี้ยังทำให้คุณภาพและคุณค่าทางอาหารเปลี่ยนแปลงไป (Awad และคณะ, 2010; Alberts และคณะ, 2016) หากมีการใช้สารเคมีในการควบคุมราก่อโรคเป็นระยะเวลานาน อาจทำให้ราที่มีความต้านทานต่อสารเคมีมากยิ่งขึ้น (Liu และคณะ, 2013) ในปัจจุบันมีการอนุญาตให้ใช้สารเคมีบางชนิดเพื่อลดการปนเปื้อนสารพิษจากรา โดยสารเคมีต้องไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค จากงานวิจัยของ Quintela และคณะในปี 2012 พบว่า กรดอินทรีย์ชนิดกรดฟอร์มิกหรือกรดโพรพิโอนิกสามารถใช้ลดการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอได้ อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีเหล่านี้ช่วยลดการปนเปื้อนของสารพิษจากราได้ดี แต่ยังคงทำให้โมเลกุลของอาหารเปลี่ยนแปลงไป คุณค่าทางอาหารเปลี่ยนไปจากเดิม และเกิดสารพิษตกค้างจากปฏิกิริยาการกำจัดสารพิษจากรา (Tiwari และคณะ, 2010)

การควบคุมทางชีวภาพ

การควบคุมทางชีวภาพ (Biological control) คือ การควบคุมหรือการกำจัดศัตรูธรรมชาติในทางธรรมชาติ เช่น การกำจัดศัตรูพืช รวมไปถึงการกำจัดศัตรูในผัก ผลไม้ หรือวัตถุดิบต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการประกอบอาหาร หรือการจัดการโรคพืชโดยชีววิธี โดยใช้สิ่งมีชีวิตที่เป็นปฏิปักษ์ของสิ่งมีชีวิตนั้นมากำจัด เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม เช่น การใช้แมลงหรือการใช้จุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ (ศมาพร แสงยศ, 2562; Ouda, 2014; Lacumin และคณะ, 2020) ซึ่งสิ่งมีชีวิตเหล่านี้ เรียกว่า microbial biological control agents หรือสารควบคุมทางชีวภาพ (Kohl และคณะ, 2019)

ในปัจจุบันนี้ มีการศึกษามากมายที่จะแทนการใช้สารเคมีในการลดการปนเปื้อนจากรา เช่น การใช้สารสังเคราะห์หรือสารจากธรรมชาติ การใช้แบคทีเรีย รวมไปถึงศึกษาจีโนมของพืชในด้านการเข้าทำลายจากราที่สามารถผลิตสารพิษได้ (Edlayne และคณะ, 2009) จากงานวิจัยของ Canamas ในปี 2011 แสดงให้เห็นถึงการใช้แบคทีเรีย *Pantoea agglomerans* ร่วมกับสารเติมแต่งในแปลงปลูกส้มสามารถลดการเกิดโรคผลเน่า (green mold) ซึ่งมีสาเหตุจากรา *Penicillium digitatum* ได้ดีกว่าการใช้เชื้อจุลินทรีย์สดเพียงอย่างเดียว และจากรายงานของ Wilson และ Wisniewski ในปี 1989 พบว่า ยีสต์เป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่ใช้

ในการควบคุมการปนเปื้อนจากราอีกทางหนึ่งแทนการใช้สารเคมี เนื่องจากเจริญได้ในอาหารทั่วไป ราคาไม่แพง และสามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย Freimoser และคณะในปี 2019 ได้ยกตัวอย่างยีสต์ 5 ชนิด ที่คาดว่าจะสามารถป้องกันการเกิดโรคแก่พืชได้ ดังนี้ *Candida oleophila*, *Aureobasidium pullulans*, *Metschnikowia fructicola*, *Cryptococcus albidus* และ *Saccharomyces cerevisiae* นอกจากนี้ มียีสต์อีกหลายชนิดที่เป็นปฏิปักษ์ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา เช่น *Kluyveromyces marxianus* (Alasmar และคณะ 2020), *Pichia guilliermondii* (Wisniewski และคณะ, 1991), *Sporidiobolus salmonicolour*, *Yarrowwia lipolytica* (Druvefors และคณะ, 2004) และ *Rhodotorula glutinis* (Li และคณะ, 2016) เป็นต้น

การควบคุมโรคของผลผลิตทางการเกษตรโดยใช้จุลินทรีย์ต้องใช้เชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรคและสามารถพบได้ง่ายตามผิวหน้าของผลิตภัณฑ์หรือตามผลหรือใบของพืช ซึ่งสามารถพบได้ในปริมาณมากทั้งในช่วงก่อนการเก็บเกี่ยว ระหว่างการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว โดยจุลินทรีย์เหล่านี้มักมีหลายกลไกเกิดร่วมกันในการควบคุมโรคพืช เช่น งานวิจัยของ Virgili และคณะในปี 2012 ได้นำยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากผิวแฮม เช่น *Debaryomyces hansenii* มาเลี้ยงร่วมกับรา *Penicillium nordicum* ที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ โดยใส่ NaCl ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย เนื่องจาก NaCl ไปกระตุ้นให้ *D. hansenii* ทำงานได้ดี พบว่ายีสต์ที่คัดแยกได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *P. nordicum*

1.6 กลไกการป้องกันเชื้อก่อโรคของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์

กลไกในการป้องกันการเข้าทำลายเชื้อสาเหตุโรคพืชของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีหลายรูปแบบ เช่น การเป็นปรสิต การสร้างสารปฏิชีวนะ การชักนำให้พืชต้านทานโรค การผลิตเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของเชื้อโรคพืช การผลิตสารพิษและสารระเหย และการแข่งขันเพื่อครอบครองพื้นที่และอาหาร (Medina-Cordova และคณะ, 2016)

Antagonistic yeast หรือยีสต์ปฏิปักษ์ มีกลไกต่าง ๆ ดังที่กล่าวถึงข้างต้น โดยยีสต์บางชนิดมีความสามารถในการควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของราโดยมีการผลิตเอนไซม์ เช่น เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูแคนเนส เอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์โปรติเอส ในการย่อยผนังเซลล์ของรา เนื่องจากผนังเซลล์ราประกอบไปด้วยไคติน ที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ โดยมีเบต้า-1,3-กลูแคนแทรกอยู่ในผนังเซลล์เพื่อเพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์ นอกจากนี้ ยังมีโปรตีนที่ช่วยคงรูปร่างของเซลล์และช่วยควบคุมสารเข้าออกผนังเซลล์ด้วย ในงานวิจัยของ Friel และคณะในปี 2007 ได้ตัดต่อยีนที่สามารถสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูแคนเนสใส่ใน *P. anomala* ทำให้ยีสต์สามารถสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูแคนเนส และยับยั้งการเจริญของ *P. digitatum* เมื่อทดสอบในผลแอปเปิลที่เกิดบาดแผล Yu และคณะในปี 2008 ได้ศึกษาผลของไคตินที่สามารถกระตุ้นให้ *Candida laurentii* สามารถสร้างเอนไซม์ไคติเนสที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *P. expansum* ที่ก่อให้เกิดโรคในลูกแพร์ที่เกิดบาดแผล และในงานวิจัยของ Meng และคณะในปี 2020 ได้ศึกษากลไกการทำงานของไคโตซานบริสุทธิ์ (อนุพันธ์หนึ่งของไคติน) ที่ซื้อจากบริษัท Zhejiang Golden-Shell Pharmaceutical จำกัด ต่อการ

เจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. ochraceus* พบว่า ไคโตซานทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโครงสร้างภายในของราเปลี่ยนไป

นอกจากนี้ ยีสต์ยังมีอิทธิพลสำคัญในการลดการปนเปื้อนสารพิษจากรา เช่น การดูดซับสารพิษที่ราผลิตขึ้นไว้ที่ผนังเซลล์ของยีสต์ ในงานวิจัยของ Piotrowska และ Masek ในปี 2015 ได้ศึกษาส่วนประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ (กลูแคน) ในการดูดซับโอคราทอกซินเอ แสดงให้เห็นว่า *S. cerevisiae* ที่เป็นปฏิปักษ์ต่อราก่อโรคและสารพิษที่สร้างขึ้น สามารถดูดซับสารพิษไว้ที่ผนังเซลล์ และการลดการสังเคราะห์โพลีคีไทด์ที่เป็นส่วนประกอบของสารพิษที่ผลิตจากรา

1.7 สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์

สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (Volatile organic compounds; VOCs) สามารถผลิตได้จากราแบคทีเรีย และยีสต์หรือสิ่งมีชีวิตที่คล้ายยีสต์ ในระหว่างกระบวนการเผาผลาญพลังงาน โดยสารระเหยนี้มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 300 ดอลตัน เป็นสารที่มีความเป็นขี้ดต่ำ ระเหยได้ง่าย สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายนี้มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ที่ผลิต และทำหน้าที่เป็นตัวสื่อสารทางเคมีระหว่างเซลล์และกระตุ้นหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างชนิดได้ (Werner และคณะ, 2016)

สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเป็นหนึ่งในสารที่สามารถต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดี แม้ว่าจะมีการสัมผัสกันโดยตรงระหว่างเชื้อก่อโรคและยีสต์หรือไม่ก็ตาม โดยมีตัวอย่างการศึกษาประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมทางชีวภาพต่อโรคผลองุ่นเน่าหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากราสีเทา *Botrytis cinerea* (อนุเทพ ภาสุระ และ ศศิภาส นุตวงษ์, 2017) ที่ทำการทดลองโดยใช้วิธี dual culture คือ การเลี้ยงยีสต์บริสุทธิ์ที่แยกได้จากผลองุ่นร่วมกับรา *B. cinerea* ที่แยกได้จากรอยแผลโรคราสีเทาบนผลองุ่นในงานอาหารเลี้ยงเชื้อเดียวกัน โดยไม่มีการขีดลากเชื้อ (streak) ให้สัมผัสกันโดยตรง พบว่ายีสต์ปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญของเส้นใยราก่อโรค จากงานวิจัยของ Choinska และคณะ, 2020 ที่ทำการทดลองโดยการเลี้ยงราและยีสต์ในงานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกัน นำมาคว่ำเข้าหากัน แล้วพันด้วยเทปหรือพาราฟิล์มเพื่อป้องกันสารระเหยที่ยีสต์ผลิตออกไปด้านนอก พบว่า ยีสต์สามารถผลิตสารระเหยอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในพืชได้ แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งมากหรือน้อยก็จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์และราที่ถูกลำมาเลี้ยงร่วมกัน นอกจากนี้ ในงานวิจัยของ Zeidan และคณะในปี 2018 ได้ศึกษาความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ *Lachancea thermotolerans* ต่อรา *A. parasiticus* (ผลิตอะฟลาทอกซิน), *P. verrucosum* (ผลิตโอคราทอกซินเอ) และ *F. graminearum* (ผลิตดีออกซินิวาลีนอล) ด้วยวิธี face to face double petri dish พบว่า ยีสต์สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายในการยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์รา รวมไปถึงการลดการผลิตสารพิษเหล่านี้ได้อีกด้วย

ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย

สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ยีสต์ผลิตออกมานั้น อาจเป็นได้ทั้งสารประเภทแอลกอฮอล์ (Alcohols) เช่น เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 3-เมทิล-1-บิวทานอล (3-methyl-1-butanol) ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ (phenylethyl alcohol) สารประเภทเอสเทอร์ (esters) เช่น เอทิลอะซิเตท (ethyl acetate) ไอโซเอมิลอะซิเตท (isoamyl acetate) สารประเภทอัลดีไฮด์ (Aldehydes) เช่น เบนซัลดีไฮด์ (Benzaldehyde) เบนซีนอะซีทัลดีไฮด์ (Benzeneacetaldehyde) สารประเภทคีโตน (ketones) เช่น 2-เฮปทาโนน (2-Heptanone) และแลคโตน (lactones) (Farbo และคณะ, 2018) ซึ่งสารระเหยเหล่านี้ถูกสร้างมาจากยีสต์ปฏิปักษ์ที่อยู่ในจีนัส *Pichia* เช่น *P. caribbica*, *P. guilliermondii*, *P. membranifaciens*, *Wickerhamomyces anomalus* (เมื่อก่อนเป็นใช้ชื่อว่า *P. anomala*) และ *Meyerozyma guilliermondii* (เมื่อก่อนใช้ชื่อว่า *P. guilliermondii*) (Farkas และคณะ, 2012; Lima และคณะ, 2013; Parafati และคณะ, 2015) เป็นต้น และยังมียีสต์อีกหลายจีนัสและสปีชีส์ เช่น *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, (Li และคณะ, 2011) *Metschnikowia pulcherrima*, (Saravanakumar และคณะ, 2008) *Saccharomyces cerevisiae* (Fialho และคณะ, 2010; Nally และคณะ, 2015) *Candida saitoana*, *C. intermedia* (Huang และคณะ, 2011), *Hanseniaspora uvarum*, (Liu และคณะ, 2010), *H. opuniatae* (Ruiz-Moyano และคณะ, 2016) รวมถึงสิ่งมีชีวิตคล้ายยีสต์อย่าง *Aureobasidium pullulans* (ยีสต์สีดำ) ที่สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเราได้ (Di-Francesco และคณะ, 2015; Contarino และคณะ, 2019)

ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ของจิตโสภณ สมัครกาล ในปี พ.ศ. 2561 ได้คัดแยกยีสต์จากเมล็ดกาแฟอาราบิก้าในช่วงต้นของกระบวนการผลิตจากโครงการในพระราชดำริ จากสถาบันวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง จังหวัดเชียงใหม่ และต่อมา พิล้มภา ทองอ่อน (พ.ศ. 2562) ได้คัดเลือกยีสต์ไอโซเลต Y08 และ Y20 มาประเมินความเป็นปฏิปักษ์ต่อรา *Aspergillus flavus* และ *A. carbonarius* แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดของยีสต์ดังกล่าว ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ดังนี้

1. เพื่อศึกษาความเป็นปฏิปักษ์เบื้องต้นของยีสต์ไอโซเลต Y08 และ ยีสต์ไอโซเลต Y20 ต่อการเจริญของ *A. carbonarius*
2. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*
3. เพื่อวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการ

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กรวยกรอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
2. กระดาษกรอง เบอร์ 1 ขนาด 110 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Whatman, USA
3. กระบอกฉีดยา (syring) ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร บริษัท Nipro, USA
4. กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดา ยี่ห้อ Olympus บริษัท อีฟอว์แอล อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, Japan
5. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด รุ่น JSM-IT500HR บริษัท Jeol จำกัด
6. ขวดใส่สารละลาย ขนาด 500 มิลลิลิตร บริษัท Duran, Germany
7. เครื่องชั่ง รุ่น PG6002-5 และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
8. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325 และ ES-315 บริษัท Tomy, Japan
9. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scienceific Industries, USA
10. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
11. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) บริษัท Kubota Laboratory, Japan
12. จานเพาะเชื้อแก้ว (petri dish) บริษัท Pyrex, Germany
13. ชุดกรองสุญญากาศ บริษัท Merk Milipore, USA
 - กรวยกรองแก้ว ปริมาตร 300 มิลลิลิตร
 - กระดาษกรอง ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร
 - ขวดรูปขมพูขนาด 1000 มิลลิลิตร
 - คีบถือกอลูมิเนียม
 - เครื่องปั๊ม
 - จุกสุญญากาศ
14. ชุดแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรมิเตอร์ ยี่ห้อ Agilent 7890B และ Agilent 7633 ALS
 - คอลัมน์ (column) HP-INNOWAX ขนาด 30 x 0.25 มิลลิเมตร, 0.25 ไมโครเมตร
15. ชุดโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)
 - คอลัมน์ (column) C18 ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร รุ่น Luna บริษัท Phenomenex, USA
 - เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence detector) รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
 - เครื่องปั๊ม autosample รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
16. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Mark II ยี่ห้อ Clean บริษัท Lab Service, Thailand
17. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น D06064 บริษัท Memmert, Germany

18. ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประกอบในประเทศไทย
19. ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บริษัท Memmert, Thailand
20. ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Conthem Scientific, New Zealand
21. ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บริษัท Sandenintercool, Thailand
22. ตู้อบแห้ง บริษัท Conthem Scientific, New Zealand
23. ถังมือยาง ยี่ห้อ ศรีตรังโกลฟ์, Thailand
24. ปีกเกอร์ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
25. ปีเปตต์แก้ว ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Qualicolor, Germany
26. แผ่นพาราฟิล์ม บริษัท Menasha, Thailand
27. พาสเจอร์ปีเปตต์แก้ว ขนาด 150 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Volac, UK
28. ไมโครปีเปตต์ขนาด 20, 200, 1000 และ 5000 มิลลิลิตร บริษัท Eppendorf, Germany
29. ไมโครปีเปตต์ทิป (Micropipette tip) ขนาด 200 และ 1000 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Hycon บริษัท Biomed, Thailand
30. หลอดเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Hycon บริษัท Biomed, Thailand
31. หลอดทดลองขนาด 16 × 150 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, Germany
32. หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 13 × 100 และ 16 × 150 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, Germany
33. หัวกรองสำเร็จ ชนิด Polyethersulfon (PES) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Whatman, USA
34. หัวกรองสำเร็จ ชนิด Polytetrafluoroethylene (PTFE) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร บริษัท Lubitech Technologies, China
35. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB14 บริษัท Memmert, Germany
36. อ่างอัลตราโซนิค (ultrasonic bath) รุ่น SONOREX RX 100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany
37. ฮีมาไซโทมิเตอร์ ยี่ห้อ Boeco, Germany

2.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดฟอร์มิก (CH_2O_2) บริษัท Merck, Germany
2. กรดอะซีติก (CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
4. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) บริษัท Ajax Finechem, Australia
5. ผงวุ้น บริษัท Difco Laboratories, USA
6. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
7. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany

8. เมทานอล (CH₃OH) บริษัท Merck, Germany
9. สารละลายมาตรฐานโอคราทอกซินเอ บริษัท Sigma-Aldich, USA
10. อะซีโตนไนไตรล์ (CH₃CN) ยี่ห้อ RCI Labscan บริษัท V.S.CHEM HOUSE, Thailand
11. D-glucose anhydrous บริษัท HiMedia Laboratories, India
12. Malt extract powder บริษัท HiMedia Laboratories, India
13. Peptone บริษัท HiMedia Laboratories, India
14. Potato Dextrose Agar บริษัท Difco Laboratories, USA
15. Tween 80 บริษัท Merck, Germany
16. Yeast extract powder บริษัท HiMedia Laboratories, India

2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ทั้งหมดในงานวิจัยถูกเก็บรักษาที่คลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1. *Aspergillus carbonarius* F3T1OR4B1
2. *Aspergillus carbonarius* TK4.2
3. ยีสต์ไอโซเลต Y08 แยกมาจากเมล็ดกาแฟอาราบิก้าจากสถาบันวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย
4. ยีสต์ไอโซเลต Y20 แยกมาจากเมล็ดกาแฟอาราบิก้าจากสถาบันวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย

2.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

2.4.1 การเตรียมจุลินทรีย์

2.4.1.1 เซลล์ยีสต์แขวนลอย

นำยีสต์ปฏิปักษ์ซึ่งแยกได้จากเมล็ดกาแฟอะราบิกาไอโซเลต Y08 และ Y20 ที่ได้รับมาจากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast-Malt extract (YM) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น นำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้ใช้เป็นหัวเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายลงในอาหารเหลว YM หลอดใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 9 ชั่วโมง และ 9 ชั่วโมง 30 นาที สำหรับยีสต์ไอโซเลต Y08 และ Y20 ตามลำดับ เพื่อให้ได้เซลล์ยีสต์ในช่วงระยะ mid log phase (ฟิล์มภา ต่ออ่อน, 2562) จากนั้น นำยีสต์ปฏิปักษ์ถ่ายลงหลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนยีสต์ที่ได้ด้วยสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) (ภาคผนวก ก) ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนยีสต์ด้วยสารละลาย PBS และจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ให้ความเข้มข้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

2.4.1.2 สปอร์ราแขวนลอย

นำ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 (โนทัย กิตติกำแหง, 2554) และ *A. carbonarius* TK4.2 (พัฒนา ชิตา ธราตลศิริฐิติกุล, 2554) ซึ่งมีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ ที่ได้รับมาจากคลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บสปอร์ราด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ผสมกับ Tween 80 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ นับจำนวนสปอร์ให้ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

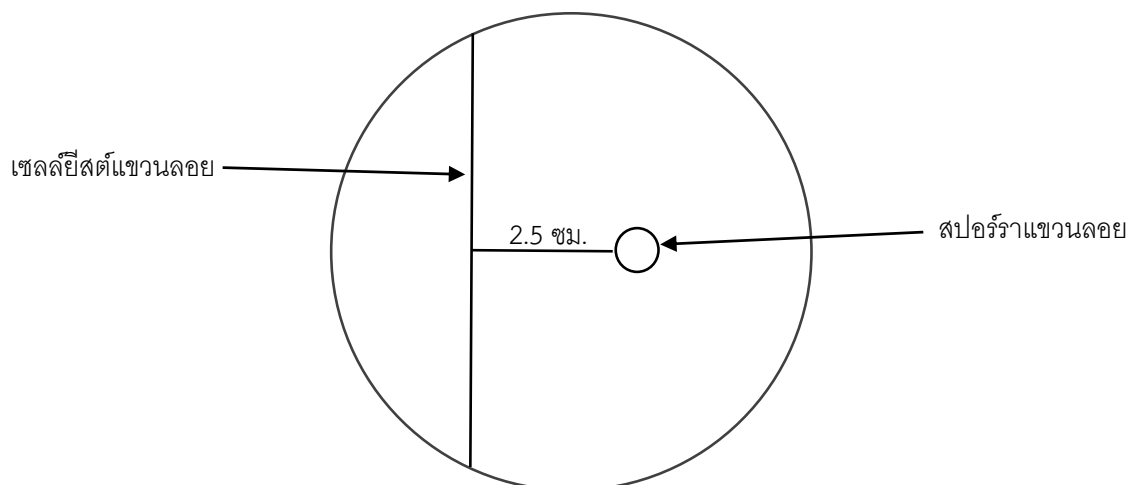
2.4.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius*

2.4.2.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญด้วยวิธี Dual culture (ดัดแปลงมาจาก Pantelides และคณะ, 2015)

นำเซลล์ยีสต์แขวนลอยทั้ง 2 ไอโซเลตจากข้อ 2.4.1.1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราโดยใช้ห้วงเชื้อชิดเซลล์ยีสต์แขวนลอยให้เป็นเส้นตรงลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้สุดขอบทั้ง 2 ด้าน แล้วหยดสปอร์ราแขวนลอยแต่ละชนิดจากข้อ 2.4.1.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ให้ห่างจากรอยชิดยีสต์ 2.5 เซนติเมตร (รูปที่ 2.1) รอให้แห้งสนิท บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน โดยใช้จานอาหาร

เลี้ยงเชื้อ PDA ที่หยดสปอร์ราแวนลอยห่างจากรอยขีด PBS ที่ปราศจากยีสต์เป็นชุดควบคุม จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีรา ณ ที่ 7 ของการบ่ม ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรา ดังนี้

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



รูปที่ 2.1 การทดสอบด้วยวิธี Dual culture บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

2.4.2.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นของยีสต์ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับราด้วยวิธี Agar spot assay (ดัดแปลงมาจาก Sangmanee และ Hognattarakere, 2014)

หยดสารแวนลอยเซลล์ยีสต์แต่ละไอโซเลตจากข้อ 2.4.1.1 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) จำนวน 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน จากนั้น เทอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ผสมด้วยสปอร์ราแวนลอยของราแต่ละชนิดจากข้อ 2.4.1.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ที่มีการเจริญของยีสต์บ่มต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีสปอร์ราแวนลอยเททับลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่ปราศจากสารแวนลอยเซลล์ยีสต์ เป็นชุดควบคุม สังเกตบริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญของรา ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2.4.2.3 การทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี

Agar diffusion assay (ดัดแปลงมาจาก Balouiri และคณะ, 2016)

เลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนถึงช่วง mid log phase (9 ชั่วโมงสำหรับไอโซเลต Y08 และ 9 ชั่วโมง 30 นาที สำหรับไอโซเลต Y20) และ late log phase (12 ชั่วโมงสำหรับไอโซเลต Y08 และ 13 ชั่วโมง สำหรับไอโซเลต Y20) (ฟิลัมภา ทองอ่อน, 2562) แล้วนำไปกรองเพื่อแยกน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ (cell-free supernatant) จากนั้น แบ่งครึ่งหนึ่งไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จะได้น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อน (autocleaved cell-free supernatant) จากนั้น ทดสอบโดยกระจายสปอร์ราแขวนลอยแต่ละชนิดจากข้อ 2.4.1.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วนำไปเจาะหลุมบริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 2 หลุม จากนั้น หยดน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากยีสต์ที่ได้จากช่วง mid log phase และ late log phase ทั้ง 2 แบบ ได้แก่ น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์และน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยหลุมแรกหยดน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อน หลุมที่สองหยดน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ ป่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีการกระจายสปอร์ราแขวนลอย และเจาะหลุมหยดอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เป็นชุดควบคุม สังเกตบริเวณการยับยั้งการเจริญของรา ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2.4.3 การทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) ของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*

2.4.3.1 การทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปลูกด้วยวิธี face to face double petri dish assay (Fiori และคณะ, 2014)

นำเซลล์ยีสต์แขวนลอยจากข้อ 2.4.1.1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายบนอาหาร YPD จากนั้น หยดสปอร์ราแขวนลอยแต่ละชนิดจากข้อ 2.4.1.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA รอให้แห้งสนิท แล้วนำจานอาหารเลี้ยงยีสต์และจานอาหารเลี้ยงราประกบเข้ากัน โดยให้จานอาหารเลี้ยงยีสต์อยู่ด้านล่าง แล้วพันจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองด้วยพาราฟิล์ม 2 ชั้น ป่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ใช้จานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เลี้ยงราประกบด้วยจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่ปราศจากยีสต์เป็นชุดควบคุม ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรา ณ วันที่ 7 ของการป่ม แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเทียบกับชุดควบคุมเช่นเดียวกับข้อ 2.4.2.1 สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีราด้วยตาเปล่า และนำเส้นใยราที่จากชุดควบคุมและชุดทดสอบส่งวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : SEM) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้น เจาะวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณโคโลนีราจำนวน 6 ชิ้น นำไปสกัดและวิเคราะห์ปริมาณโอคราทอกซินเอตามวิธีในข้อ 2.4.3.2

2.4.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโอคราทอกซินเอ (Dachoupakan และคณะ, 2009)

เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณของโคโลนีรา จำนวน 6 ตำแหน่ง ใส่ลงในขวดสกัด โดยชั่งน้ำหนักขวดสกัดทั้งก่อนและหลังใส่ชิ้นวุ้น เพื่อคำนวณหาน้ำหนักของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สกัด ต่อมาเติมเมทานอลผสมกรดฟอร์มิกอัตราส่วน 25 : 1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร แล้วสกัดสารพิษโดยใช้อ่างอัลตราโซนิก เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น กรองสารสกัดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำสารสกัดที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไประเหยด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้น เติมเฟสเคลื่อนที่ (อะซิโตนไตรล : น้ำปอดประจุ : กรดอะซิติก เท่ากับ 49.5 : 49.5 : 1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร แล้วส่งวิเคราะห์ปริมาณโอคราทอกซินเอด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้คอลัมน์ C18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 x 250 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 5 ไมโครเมตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ที่มี excitation wavelength เท่ากับ 333 นาโนเมตรและ emission wavelength เท่ากับ 477 นาโนเมตร มีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยมี retention time ของโอคราทอกซินเอเป็น 10 นาที

2.4.3.3 การวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์

หยดเซลล์ยีสต์แขวนลอยปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อยู่ในขวดบรรจุสารขนาด 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นส่งวิเคราะห์ชนิดของสารอินทรีย์ระเหยง่ายที่ยีสต์สามารถผลิต โดยวิธี Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Headspace GC-MS) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS ยี่ห้อ Agilent 7890B และ Agilent 7633 ALS เชื่อมต่อกับ Agilent 7000C GC/MS Triple Quad MSD model โดยใช้คอลัมน์ HP-INNOWAX ขนาด 30 x 0.25 มิลลิเมตร ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร ใช้ลูบขนาด 1 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยมีอัตราส่วนของ split ratio เท่ากับ 50 : 1 คงที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพาด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเพิ่มเป็น 230 องศาเซลเซียส ต่ออีก 5 นาที โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเท่ากับ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที สำหรับการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลจะวิเคราะห์ในช่วง 33-500 เมตรต่อเฮิร์ต โดยกำหนดแหล่งกำเนิดประจุไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส ใช้พลังงาน 70 อิเล็กตรอนโวลต์เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล โดยกำหนดอุณหภูมิในการถ่ายโอนมวลสารอยู่ที่ 250 องศาเซลเซียส

บทที่ 3

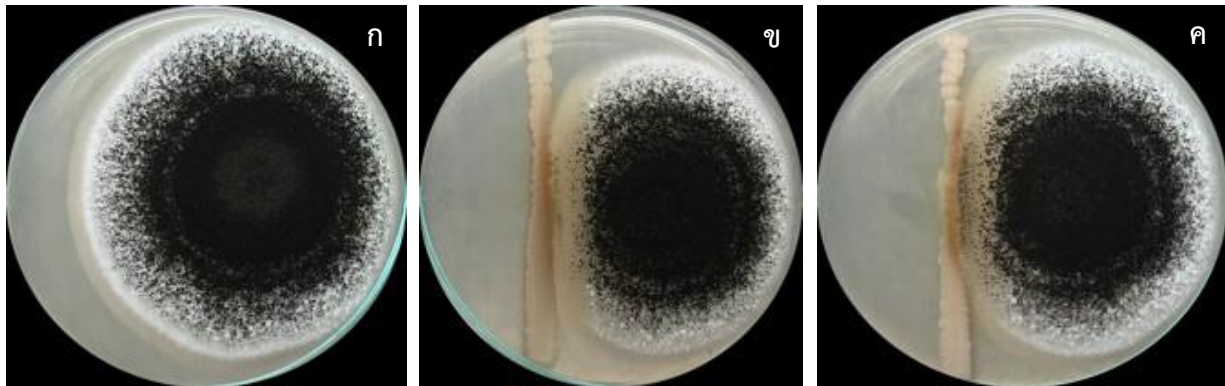
ผลการทดลอง

3.1 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิภักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius*

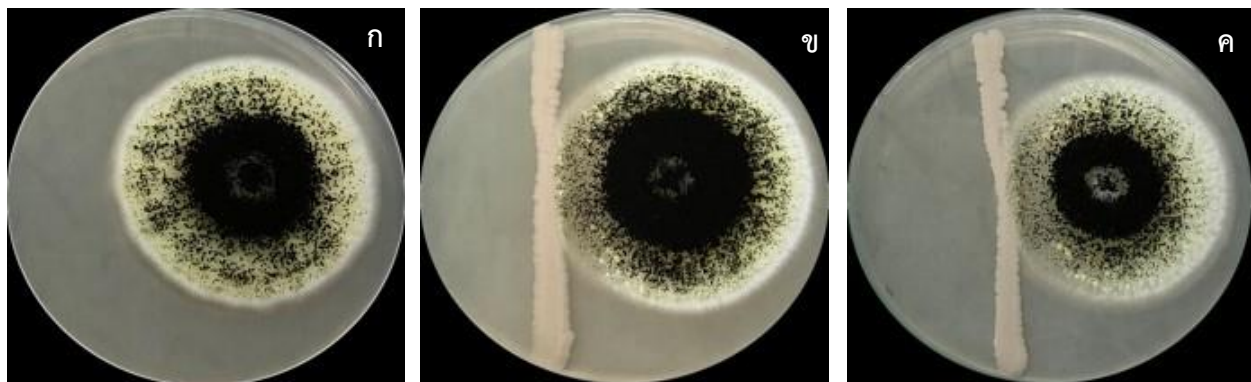
จากการเลี้ยงยีสต์ไอโซเลต Y08 และยีสต์ไอโซเลต Y20 ร่วมกับรา *A. carbonarius* F3T1OR4B1 และ *A. carbonarius* TK4.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธี Dual culture บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อทดสอบความสามารถเบื้องต้นของยีสต์ปฏิภักษ์ในการยับยั้งการเจริญ พบว่ายีสต์ทั้งสองไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของราแต่ละสายพันธุ์ได้ใกล้เคียงกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

A. carbonarius F3T1OR4B1 ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์แต่ละไอโซเลต มีขนาดโคโลนีลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม เมื่อพิจารณาถึงลักษณะเส้นใยราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่า เส้นใยมีสีขาวและสร้างสปอร์สีดำไม่แตกต่างจากชุดควบคุม และพบการเจริญของราเพียงเบาบางและการสร้างสปอร์น้อยลงใกล้บริเวณรอยขีดยีสต์ (รูปที่ 3.1) เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิภักษ์ทั้งสองไอโซเลตในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 พบว่า ยีสต์ทั้งสองไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของราได้เพียงเล็กน้อย (น้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์) โดยยีสต์ไอโซเลต Y20 ยับยั้งการเจริญของราได้ดีกว่า ยีสต์ไอโซเลต Y08 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเท่ากับ 10.76 ± 0.43 เปอร์เซ็นต์ และ 7.11 ± 0.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1)

สำหรับ *A. carbonarius* TK4.2 ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์แต่ละไอโซเลต พบว่ามีขนาดลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และสังเกตเห็นการเจริญและการสร้างสปอร์ของ *A. carbonarius* TK4.2 ในบริเวณรอยขีดยีสต์บางส่วน (รูปที่ 3.2) เมื่อพิจารณาถึงลักษณะเส้นใยราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่า เส้นใยมีสีขาวและสร้างสปอร์สีดำไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ทั้งนี้ ยีสต์ทั้งสองไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของราได้เพียงเล็กน้อย (น้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์) โดยยีสต์ไอโซเลต Y20 ยับยั้งการเจริญของราได้ดีกว่า ยีสต์ไอโซเลต Y08 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเท่ากับ 9.51 ± 0.31 เปอร์เซ็นต์ และ 8.85 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3.1)



รูปที่ 3.1 การเจริญของ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Dual culture บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ (ค) ยีสต์ไอโซเลต Y20



รูปที่ 3.2 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Dual culture บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ (ค) ยีสต์ไอโซเลต Y20

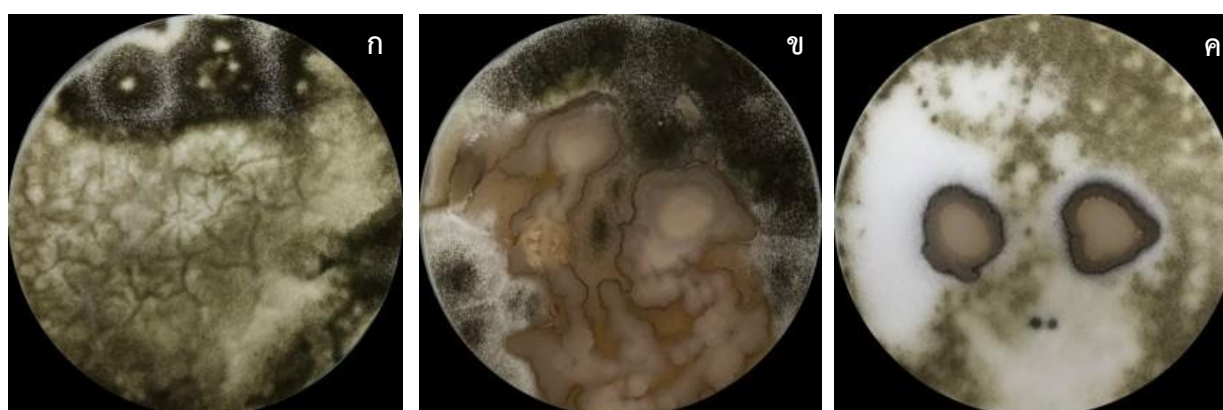
ตารางที่ 3.1 การเจริญของ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 และ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ ยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี dual culture บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

| ชุดทดสอบ | การเจริญของรา <i>A. carbonarius</i> F3T1OR4B1 | | การเจริญของรา <i>A. carbonarius</i> TK4.2 | |
|------------------|---|-------------------------|---|------------------------|
| | เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) | เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง | เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) | เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง |
| ชุดควบคุม | 6.57±0.78 ^a | | 5.76±0.17 ^a | |
| ยีสต์ไอโซเลต Y08 | 6.10±0.39 ^b | 7.11±0.50 ^b | 5.25±0.16 ^b | 8.85±0.06 ^b |
| ยีสต์ไอโซเลต Y20 | 5.86±0.45 ^b | 10.76±0.43 ^b | 5.21±0.22 ^b | 9.51±0.31 ^b |

* ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$)

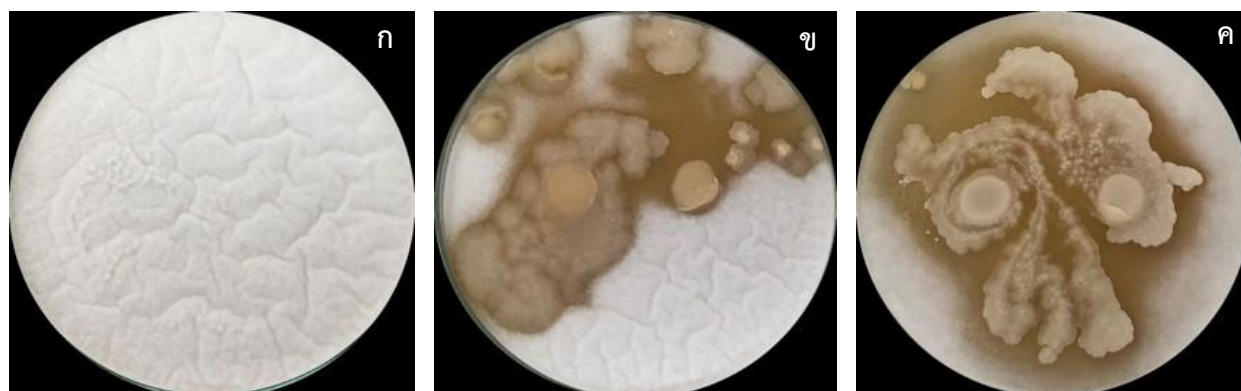
3.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับรา

จากการทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ในการสร้างสารยับยั้งเมื่อเลี้ยงร่วมกับราด้วยวิธี Agar spot assay แล้วสังเกตการเจริญของราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่อยู่ด้านบนของโคโลนียีสต์ปฏิปักษ์แต่ละไอโซเลตที่อยู่บนอาหาร YPD เมื่อบ่มเป็นเวลา 7 วัน พบบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) การเจริญของ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 โดยเฉพาะการเลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y08 มีบริเวณยับยั้งเกิดขึ้นอย่างชัดเจน (รูปที่ 3.3ข) และมีบริเวณกว้างกว่าเมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y20 ที่พบบริเวณยับยั้งเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 3.3ค) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 3.3ก)



รูปที่ 3.3 การเจริญของ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Agar spot assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ (ค) ยีสต์ไอโซเลต Y20

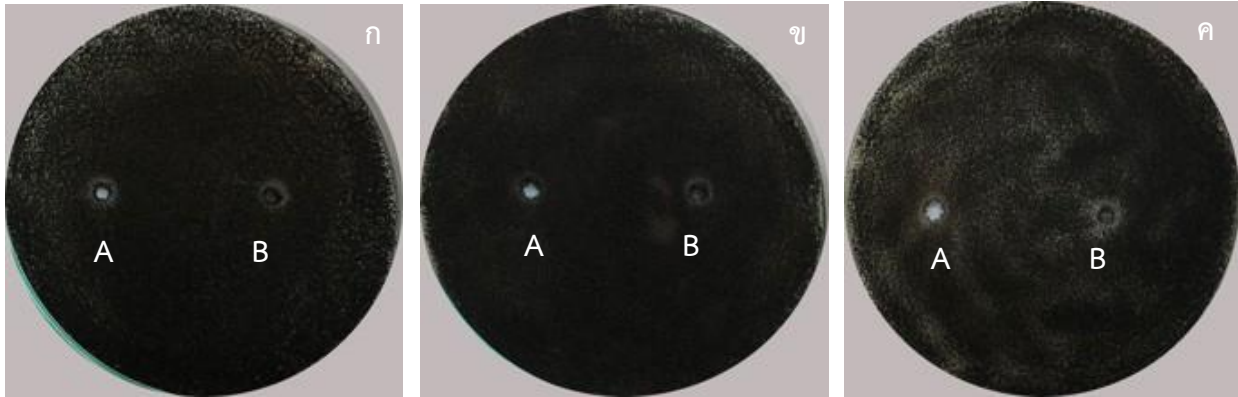
สำหรับ *A. carbonarius* TK4.2 ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y08 สังเกตเห็นบริเวณยับยั้งเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 3.4ข) และพบการเจริญของราที่มากกว่าการเลี้ยงราร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y20 ที่สังเกตเห็นบริเวณยับยั้งชัดเจนและเห็นเป็นวงกว้าง (รูปที่ 3.4ค) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราอย่างเดียว (รูปที่ 3.4ก)



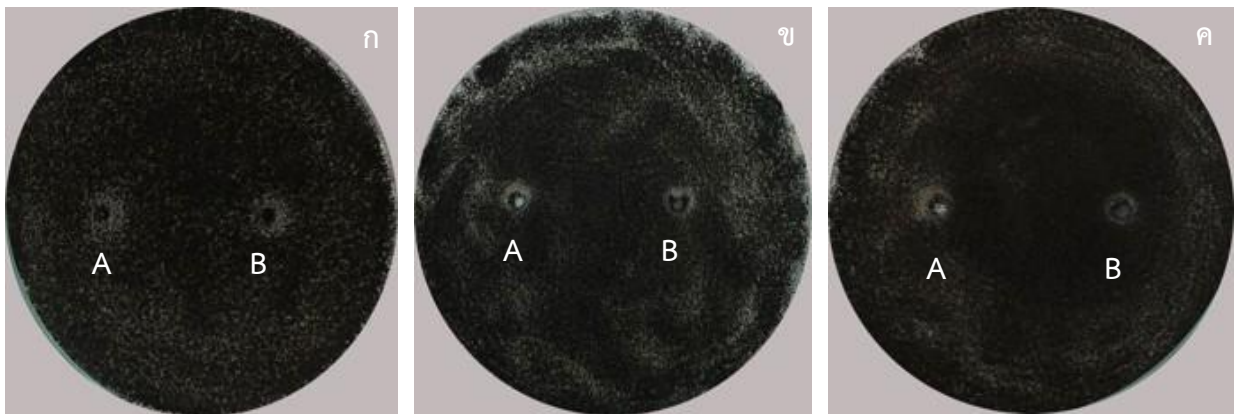
รูปที่ 3.4 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Agar spot assay ป่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ (ค) ยีสต์ไอโซเลต Y20

3.3 การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของรา

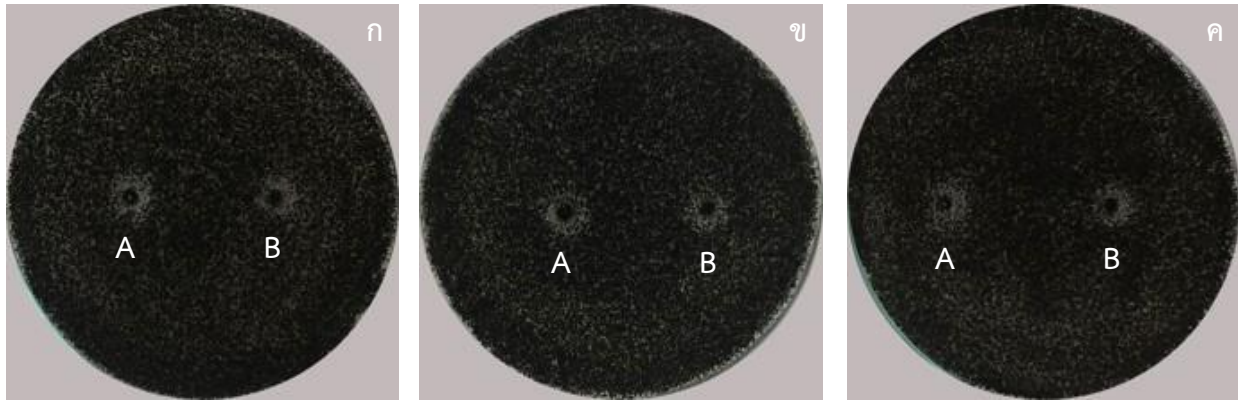
จากผลการทดลองในข้อ 3.2 แสดงให้เห็นถึงยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลตที่ใช้ในการทดสอบสามารถผลิตสารเมแทบอลิต์ที่แพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อมายับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 และ *A. carbonarius* TK4.2 ได้ จึงทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์โดยใช้วิธี Agar diffusion assay โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง mid log phase และ late log phase ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อนสูง ซึ่งผลการทดลองพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ทั้งสองไอโซเลต ในช่วง mid log phase และ late log phase ที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อน ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของรา *A. carbonarius* F3T1OR4B1 (รูปที่ 3.5 และ 3.6) และ *A. carbonarius* TK4.2 (รูปที่ 3.7 และ 3.8) ราในชุดทดสอบเจริญได้ไม่แตกต่างจากราในชุดควบคุม และไม่พบบริเวณยับยั้งรอบหลุมที่ใช้ทดสอบ



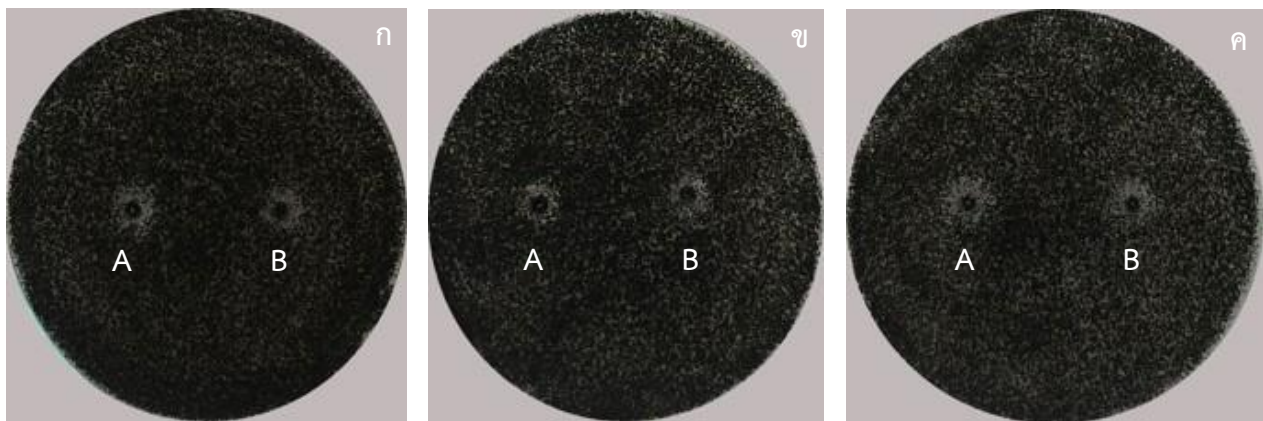
รูปที่ 3.5 การเจริญของ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง mid log phase เพื่อยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion assay หลุม A ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อน หลุม B ทดสอบน้ำด้วยเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว (ข) ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ (ค) ยีสต์ไอโซเลต Y20



รูปที่ 3.6 การเจริญของ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง late log phase เพื่อยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion assay หลุม A ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อน หลุม B ทดสอบน้ำด้วยเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว (ข) ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ (ค) ยีสต์ไอโซเลต Y20



รูปที่ 3.7 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง mid log phase เพื่อยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion assay หลุม A ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อน หลุม B ทดสอบน้ำด้วยเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ (ค) ยีสต์ไอโซเลต Y20



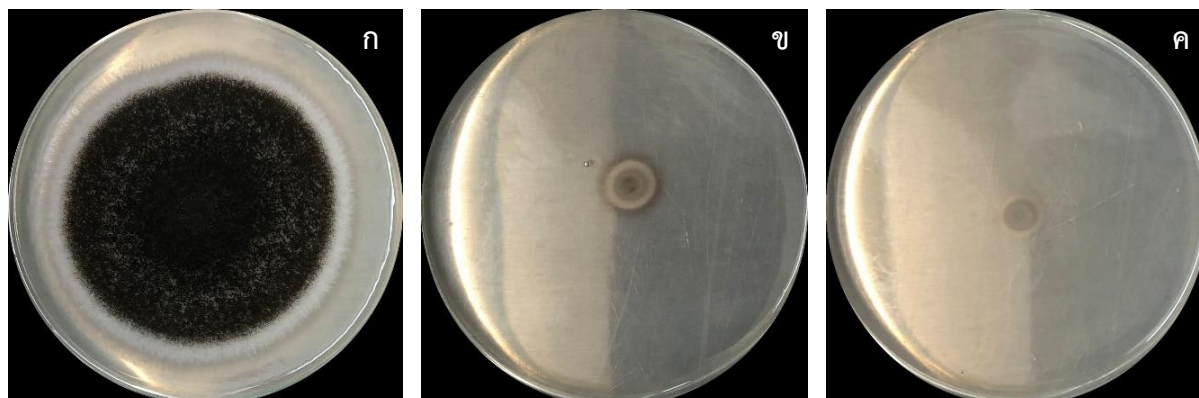
รูปที่ 3.8 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง late log phase เพื่อยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion assay หลุม A ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อน หลุม B ทดสอบน้ำด้วยเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ (ค) ยีสต์ไอโซเลต Y20

3.4 การทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) ของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*

3.4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*

เมื่อนำ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA เลี้ยงร่วมกับยีสต์แต่ละไอโซเลตที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ด้วยวิธี face to face double petri dish assay พบว่า ราที่มีขนาดโคโลนีเล็กลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อพิจารณาถึงลักษณะเส้นใยราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ไม่พบว่าราสร้างเส้นใยสีขาวและสปอร์สีดำ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่ราสร้างเส้นใยสีขาวและสปอร์สีดำ (รูปที่ 3.9) โดยเฉพาะกับการเลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y20 ซึ่งยับยั้งการเจริญได้ดีกว่าการเลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y08 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเป็น 96.09 ± 0.94 และ 89.49 ± 0.26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับปริมาณโอคราทอกซินเอ พบว่า ยีสต์ทั้งสองไอโซเลตสามารถลดการผลิตโอคราทอกซินเอของราได้ใกล้เคียงกัน โดยยีสต์ไอโซเลต Y20 ลดการผลิตโอคราทอกซินเอสูงสุด 99.70 ± 0.39 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ยีสต์ไอโซเลต Y08 สามารถลดการผลิตโอคราทอกซินเอได้เท่ากับ 95.29 ± 0.42 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 3.2) เมื่อนำค่าไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ยีสต์ทั้งสองไอโซเลตยับยั้งการเจริญและลดการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สำหรับ *A. carbonarius* TK4.2 พบว่า โคโลนีของราที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y08 มีขนาดใหญ่กว่าที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y20 เมื่อพิจารณาถึงลักษณะเส้นใยราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA พบว่า ราสร้างเส้นใยสีขาวและสร้างสปอร์สีดำไม่แตกต่างจากชุดควบคุม (รูปที่ 3.10) โดยยีสต์ไอโซเลต Y08 และยีสต์ไอโซเลต Y20 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเป็น 35.40 ± 0.50 เปอร์เซ็นต์ และ 98.88 ± 0.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการผลิตโอคราทอกซินเอ พบว่า ราที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y20 ผลิตโอคราทอกซินเอลดลง 95.53 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ราที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y08 ผลิตโอคราทอกซินเอลดลง 76.33 ± 2.40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 3.3) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำค่าไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ยีสต์ทั้งสองไอโซเลตยับยั้งการเจริญและลดการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

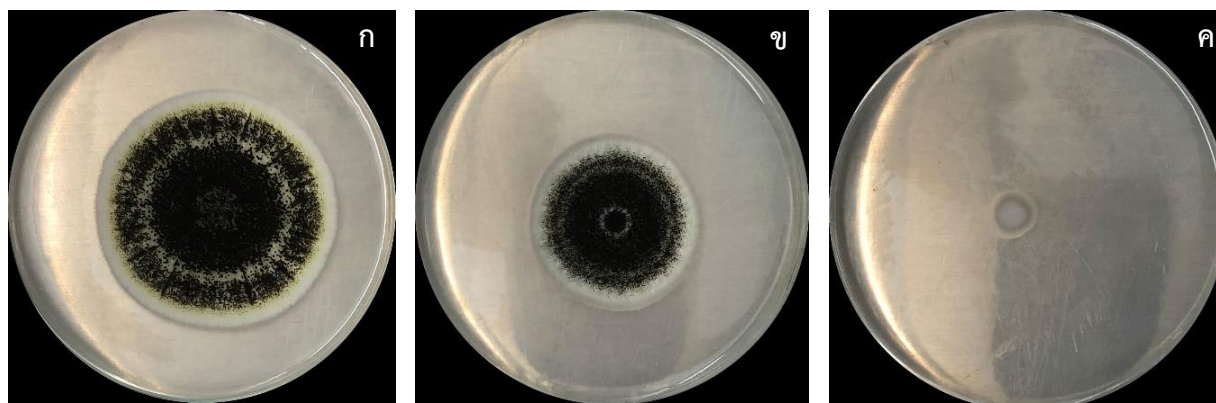


รูปที่ 3.9 การเจริญของ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face double petri dish assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ (ค) ยีสต์ไอโซเลต Y20

ตารางที่ 3.2 การยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 โดยสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สร้างจากยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face double petri dish assay บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

| ชุดทดสอบ | การเจริญของรา | | การผลิตโอคราทอกซินเอ | |
|------------------|-------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| | เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) | เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง | ปริมาณโอคราทอกซินเอ (นาโนกรัมต่อกรัม) | เปอร์เซ็นต์การลดลง |
| ชุดควบคุม | 6.97±0.35 ^a | | 251.99±0.54 ^a | |
| ยีสต์ไอโซเลต Y08 | 1.43±0.26 ^b | 89.49±0.26 ^b | 11.87±1.74 ^b | 95.29±0.42 ^b |
| ยีสต์ไอโซเลต Y20 | 0.83±0.02 ^b | 96.09±0.94 ^b | 0.76±0.07 ^b | 99.70±0.39 ^b |

* ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$)



รูปที่ 3.10 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face double petri dish assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ (ค) ยีสต์ไอโซเลต Y20

ตารางที่ 3.3 การยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 โดยสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สร้างจากยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face double petri dish assay บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

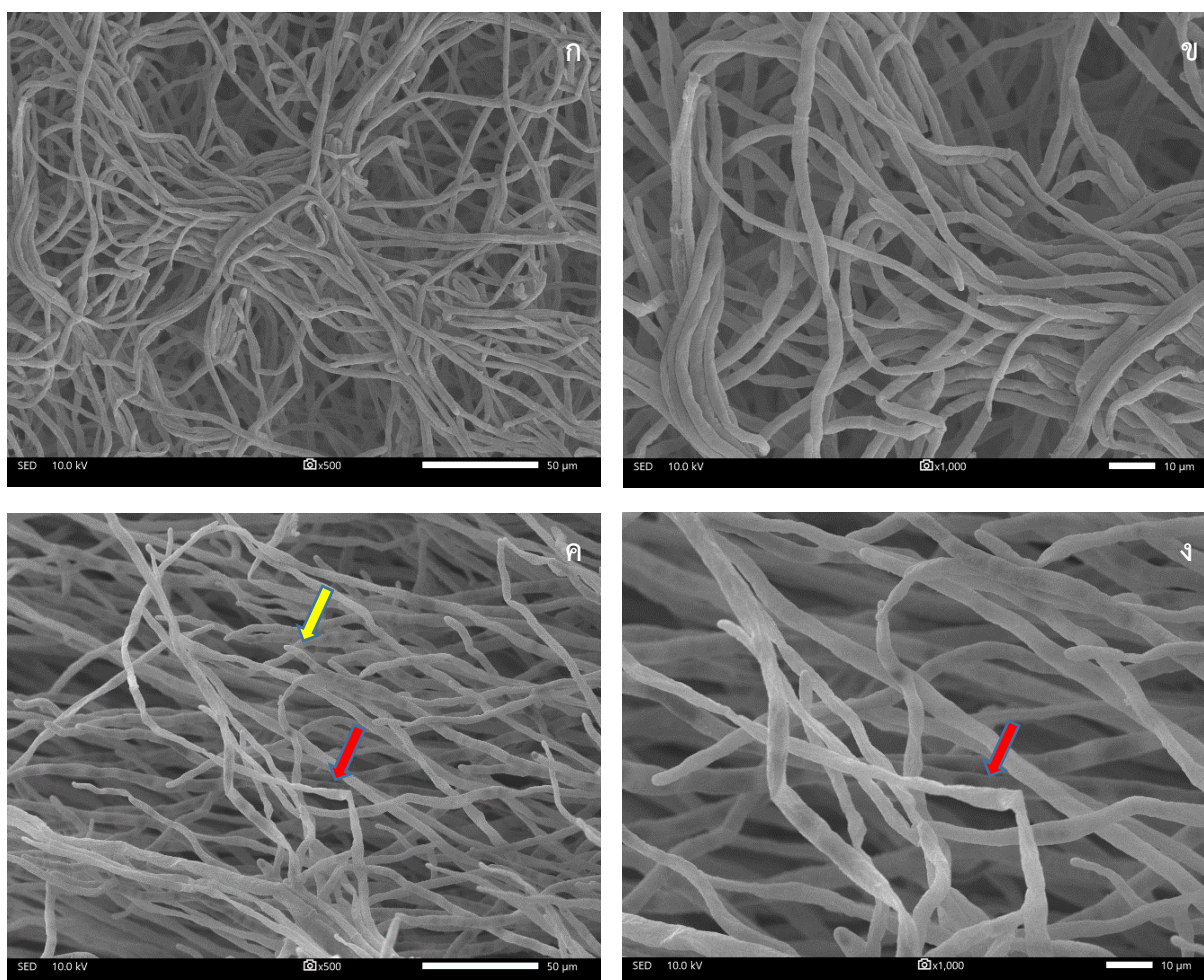
| ชุดทดสอบ | การเจริญของรา | | การผลิตโอคราทอกซินเอ | |
|------------------|-------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| | เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) | เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง | ปริมาณโอคราทอกซินเอ (นาโนกรัมต่อกรัม) | เปอร์เซ็นต์การลดลง |
| ชุดควบคุม | 6.23±0.10 ^a | | 436.00±0.57 ^a | |
| ยีสต์ไอโซเลต Y08 | 4.00±0.05 ^b | 35.40±0.50 ^b | 150.95±1.74 ^b | 76.33±2.40 ^b |
| ยีสต์ไอโซเลต Y20 | 0.70±0.03 ^c | 98.88±0.70 ^c | 19.52±0.07 ^c | 95.53±0.08 ^c |

* ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p > 0.05$)

3.4.2 วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราโดยใช้ Scanning Electron Microscope (SEM)

จากผลการทดลองในข้อ 3.4.1 พบว่ายีสต์ทั้งสองไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรา *A. carbonarius* F3T1OR4B1 และ *A. carbonarius* TK4.2 ได้ใกล้เคียงกัน โดยไอโซเลต Y20 ให้ผลการยับยั้งดีกว่ายีสต์ไอโซเลต Y08 ดังนั้น จึงเลือกบริเวณขอบของโคโลนี *A. carbonarius* TK4.2 ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y20 มาวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) เปรียบเทียบกับราในชุดควบคุมที่กำลังขยาย 500 เท่า และที่กำลังขยาย 1000 เท่า

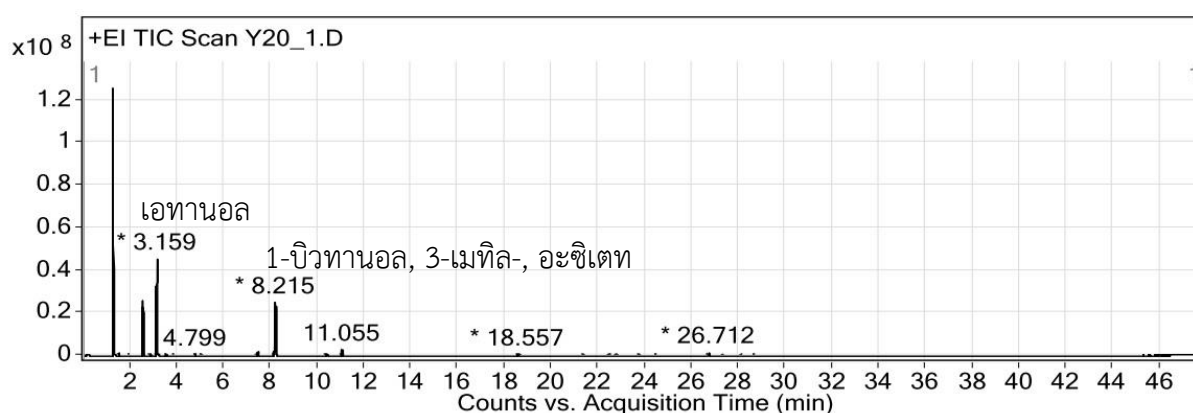
รูปที่ 3.11ค แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีที่กำลังขยาย 500 เท่าของ *A. carbonarius* TK4.2 ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y20 พบบริเวณปลายเส้นใย (ลูกศรสีเหลือง) ได้อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับเส้นใยของราในชุดควบคุม และเห็นเส้นใยมีความลึบแบนผิดปกติ (ลูกศรสีแดง) และที่กำลังขยาย 1000 เท่า (รูปที่ 3.9ง) สังเกตเห็นเส้นใยมีความลึบแบนผิดปกติอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่ายีสต์ไอโซเลต Y20 มีประสิทธิภาพในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK 4.2



รูปที่ 3.11 ลักษณะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของ *A. carbonarius* TK4.2 จากกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เมื่อทดสอบผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ไอโซเลต Y20 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก, ข) ชุดควบคุมที่กำลังขยาย 500 และ 1000 เท่า (ค, ง) ชุดทดสอบที่กำลังขยาย 500 และ 1000 เท่า, ลูกศรสีเหลืองแสดงปลายเส้นใย, ลูกศรสีแดงแสดงลักษณะเส้นใยที่ลึบแบนผิดปกติ

3.4.3 การวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักซ์

จากการทดลองในข้อ 3.4.1 พบว่า ยีสต์ไอโซเลต Y20 สามารถสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีกว่ายีสต์ไอโซเลต Y08 ดังนั้น จึงวิเคราะห์หาชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ยีสต์ไอโซเลต Y20 สร้างขึ้นด้วยวิธี Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Headspace GC-MS) ผลการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายแสดงในรูปที่ 3.12 และตารางที่ 3.4 พบว่า ยีสต์ไอโซเลต Y20 สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้ 10 ชนิด โดยผลิตเอทานอลได้มากที่สุด (retention time, RT เท่ากับ 3.159 นาที) รองลงมาเป็น 1-บิวทานอล, 3-เมทิล-, อะซิเตท (RT เท่ากับ 8.215 นาที) อันดับที่สาม คือ เอทิลอะซิเตท (RT เท่ากับ 2.555 นาที)



รูปที่ 3.12 โครมาโทแกรมของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายในสัดส่วนที่มากที่สุดที่ผลิตจากยีสต์ไอโซเลต Y20

ตารางที่ 3.4 ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ปฏิปักซ์ เมื่อบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน วิเคราะห์โดยเครื่อง GC/MS Chromatography

| สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย | Retention time, RT (นาที) | ยีสต์ไอโซเลต Y20 (RA%) |
|-------------------------------|---------------------------|------------------------|
| อะซีตัลดีไฮด์ | 1.543 | 1.2 |
| เอทิลอะซิเตท | 2.555 | 30.84 |
| บิวทานอล, 3-เมทิล | 2.902 | 0.52 |
| เอทานอล | 3.159 | 100 |
| ไอโซบิวบิล อะซิเตท | 4.799 | 0.66 |
| 1-โพรพานอล, 2-เมทิล | 7.455 | 3.25 |
| 1-บิวทานอล, 3-เมทิล-, อะซิเตท | 8.215 | 49.53 |
| 1-บิวทานอล, 3-เมทิล | 11.055 | 5.34 |
| กรดอะซิติก | 18.557 | 1.23 |
| กรดแอสติค, 2-ฟีนิลเอสเทอร์ | 26.712 | 2.62 |

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius*

จากการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลต Y08 และ Y20 ในการยับยั้งการเจริญโดยใช้วิธี Dual culture พบว่ายีสต์ทั้งสองไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 และ *A. carbonarius* TK4.2 ได้ใกล้เคียงกัน (7-10 เปอร์เซ็นต์) ยีสต์ไอโซเลต Y20 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีกว่ายีสต์ไอโซเลต Y08 (10.76 ± 0.43 และ 9.51 ± 0.31 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 และ *A. carbonarius* TK4.2 ตามลำดับ)

จากผลการทดลอง Dual culture แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ทั้งสองไอโซเลตมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ซึ่งการยับยั้งการเจริญนี้อาจเกิดจากการแย่งชิงสารอาหารและพื้นที่เพื่อการเจริญของยีสต์ เมื่อเวลาผ่านไปหลังจากช่วง 24 ชั่วโมงแรก ยีสต์มีบทบาทสำคัญในการแย่งชิงสารอาหารกับรา ก่อโรคร่วมกับการแย่งชิงพื้นที่การเจริญ เพื่อป้องกันการเน่าเสียของผลผลิตเนื่องมาจากราก่อโรค (Li และคณะ, 2008; Liu และคณะ, 2012) และยังมี การสืบพันธุ์อย่างรวดเร็วและมีกระบวนการเมแทบอลิซึมได้รวดเร็วกว่า จึงทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างของสปอร์ราได้ (Droby และ Chalutz, 1994) การผลิตเอนไซม์ในการย่อยผนังเซลล์ของราเป็นหนึ่งในกลไกที่สำคัญในการยับยั้งการเจริญของรา เช่น งานวิจัยของ Nally และคณะในปี 2015 พบว่า *K. marxianus* BKm128 และ BKm145 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. sterrus* โดยผลิตเอนไซม์ลามินาริเนส เพื่อทำลายผนังเซลล์ของราและผลิต siderophore เพื่อแย่งชิงธาตุเหล็กที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตรวมทั้งสามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูแคนเนสเพื่อยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้อีกด้วย นอกจากนี้ งานวิจัยของ Di-Francesco และคณะในปี 2015 แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตโดย *A. pullulans* ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรค 5 ชนิด (*B. cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *P. expansum*, *P. digitatum* และ *P. italicum*) โดยยับยั้งการเจริญได้มากถึง 88 เปอร์เซ็นต์

4.2 การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับรา

เพื่อให้ทราบว่ายีสต์ยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ได้อย่างไร กลไกแรกที่ทดสอบ คือความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar spot assay โดยสังเกตบริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) ของรบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่อยู่เหนืออาหาร YPD ที่มีการเจริญของยีสต์ปฏิปักษ์ ผลการทดลองพบว่า ยีสต์แต่ละไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 และ *A. carbonarius* TK4.2 แสดงให้เห็นว่ายีสต์ทั้งสองไอโซเลตสามารถสร้างสารแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA มายับยั้งการเจริญของรา *A. carbonarius* ทั้งสองสายพันธุ์ได้

การสร้างสารยับยั้งการเจริญของราเป็นหนึ่งในกลไกสำคัญที่ยีสต์ใช้ในการควบคุมการเจริญของรา งานวิจัยของ Masih และคณะในปี 2001 พบว่าเมื่อเลี้ยง *P. membranifaciens* ร่วมกับ *B. cinerea* บนจาน

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเดียวกัน เกิดบริเวณยับยั้งขึ้นรอบบริเวณโคโลนีของยีสต์และเมื่อเลี้ยงร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวก็ไม่พบการงอกของสปอร์ราเช่นเดียวกัน จึงแสดงให้เห็นว่ายีสต์ปฏิปักษ์สามารถสร้างสารฆ่าราได้ งานวิจัยของ Choudhury และคณะในปี 1994 ได้ทดสอบเมแทบอลิต์สองชนิดที่สร้างจากยีสต์คล้ายรา *Sporothrix flocculosa* ได้แก่ hetadecadienal และ กรด 4-methyl-7,11-heptadecadienoic สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea* และ *Fusarium oxysporum* ได้โดยทำให้การงอกของสปอร์และมวลชีวภาพของราลดลง นอกจากนี้ ในงานวิจัยของ Castoria และคณะในปี 2001 ได้ศึกษากิจกรรมความเป็นปฏิปักษ์ของ *A. pullulans* (ยีสต์ดำ) ต่อราก่อโรคในองุ่น (*B. cinerea*, *P. expansum*, *R. stolonifer* และ *A. niger*) และในแอปเปิล (*B. cinerea* และ *P. expansum*) พบว่ายีสต์ดำสามารถผลิตเอนไซม์ exochitinase [N-acetyl- β -d-glucosaminidase (Nagase)] และ β -1-3-glucanase ออกมานอกเซลล์เพื่อทำลายผนังเซลล์รา

4.3 การทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของรา

จากผลการทดลองข้างต้นทำให้ทราบว่ายีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลตสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ได้ ดังนั้น จึงทดสอบต่อไปว่ายีสต์ปฏิปักษ์ผลิตสารยับยั้งดังกล่าวในช่วงใดของการเจริญ และทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของสารยับยั้งที่ยีสต์ผลิตขึ้น ด้วยการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ทั้งสองไอโซเลตด้วยวิธี Agar diffusion assay โดยใช้ น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง mid log phase และ late log phase ที่ผ่านและไม่ผ่านการให้ความร้อนสูงในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ทั้งสองสายพันธุ์ พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ทั้งสองไอโซเลตในทุกชุดทดสอบ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ *A. carbonarius* ทั้งสองสายพันธุ์ได้ แสดงว่าสารที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของรา อย่างไรก็ตาม ผลจากการทดสอบด้วยวิธี Agar spot assay แสดงให้เห็นว่ายีสต์ทั้งสองไอโซเลตสามารถผลิตสารที่ซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งได้ ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งดังกล่าวจะถูกสร้างขึ้นก็ต่อเมื่อมีการเลี้ยงร่วมกับราเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะในปี 2020 ที่ศึกษาน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ *P. galeiformis* โดยการกรองตะกอนเซลล์ยีสต์ออกแล้วนำเฉพาะน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ไปหยดลงในหลุมที่ถูกเจาะบริเวณกลางอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเพื่อยับยั้งการงอกของสปอร์รา *P. digitatum* ที่ถูกกระจายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเดียวกันนี้ พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ดังกล่าวไม่สามารถยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ราได้ Zhu และคณะในปี 2015 ที่ศึกษาน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* M114 ในการยับยั้งการงอกของสปอร์รา *A. carbonarius* พบว่า เมื่อบ่มราร่วมกับยีสต์ แล้วแยกน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ออกจากตะกอนเซลล์ยีสต์ และนำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ไปบ่มร่วมกับสปอร์ราอีกครั้ง สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้อย่างชัดเจน ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ยีสต์สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ราเมื่อมีการเจริญไปพร้อมกับรา

4.4 การทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) ของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*

4.4.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius*

การทดสอบความเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ด้วยวิธี face to face double petri dish assay โดยการเลี้ยงราบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA จานหนึ่งประกบเข้ากับจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่เลี้ยงยีสต์ไว้อีกจานหนึ่ง เป็นการศึกษากลไกสำคัญอีกประการหนึ่ง คือ การผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา โดยสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา เปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญ และเปอร์เซ็นต์การลดการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 และ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์แต่ละไอโซเลต ซึ่งผลการทดลองพบว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลตสามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราได้อย่างมีประสิทธิภาพมาก (90-100 เปอร์เซ็นต์) และสามารถลดการผลิตโอคราทอกซินเอตั้งแต่ 95-100 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ยีสต์ปฏิปักษ์ไอโซเลต Y20 ให้ผลการยับยั้งการเจริญของราได้ดีกว่ายีสต์ไอโซเลต Y08 ด้วยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเป็น 98.88 ± 0.70 เปอร์เซ็นต์ และลดการผลิตโอคราทอกซินเอได้ 95.53 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์

การสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเป็นหนึ่งในกลไกสำคัญที่ยีสต์ปฏิปักษ์ใช้ในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรค ในงานวิจัยของ Fiori และคณะในปี 2014 ได้ทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Cyberlindnera jadinii* 273, *C. friedrichii* 778, *C. intermedia* 235 และ *L. thermotolerans* 751 ในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* พบว่า ยีสต์ปฏิปักษ์สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายในการป้องกันการงอกของสปอร์ราได้ ในขณะเดียวกัน งานวิจัยของ Ponsone และคณะในปี 2011 ได้ศึกษาประสิทธิภาพของยีสต์ *Kluyveromyces thermotolerans* ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *Aspergillus* section *Nigri* ในองุ่น พบว่า ยีสต์ปฏิปักษ์นี้ยับยั้งการเจริญของราและลดการผลิตโอคราทอกซินเอได้มากถึง 82.5 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ มีงานวิจัยอีกหลายงานที่แสดงให้เห็นว่ามียีสต์ปฏิปักษ์หลายชนิดที่สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายในการควบคุมการเจริญของ *B. cinerea* ได้ทั้งในหลอดทดลองและผลสตรอเบอรี่ เช่น *C. intermedia* (Huang และคณะ, 2011) *W. anomalus*, *Metschnikowia pulcherrimai* (Parafati และคณะ, 2015) รวมไปถึงสิ่งมีชีวิตคล้ายยีสต์ *A. pullulans* (ยีสต์ดำ) ที่สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อลดการเจริญของรา *B. cinerea*, *C. acutatum*, *P. expansum*, *P. digitatum* และ *P. italicum* ได้เช่นกัน (Di-Francesco และคณะ, 2015)

4.4.2 วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราโดยใช้ Scanning Electron Microscope (SEM)

จากผลการทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ไอโซเลต Y08 และยีสต์ไอโซเลต Y20 เพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. carbonarius* F3T1OR4B1 และ *A. carbonarius* TK4.2 พบว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสองไอโซเลตให้ผลการยับยั้งการเจริญและการผลิตไอคราทอกซินเอใกล้เคียงกัน โดยยีสต์ไอโซเลต Y20 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการลดการผลิตไอคราทอกซินเอดีกว่ายีสต์ไอโซเลต Y08 ดังนั้น จึงนำเส้นใยบริเวณขอบของโคโลนี *A. carbonarius* TK4.2 ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ไอโซเลต Y20 มาวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ลักษณะของเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีเราพบว่า เส้นใยมีลักษณะแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัด โดยมีลักษณะสลับแบนผิดไปจากปกติและเห็นบริเวณปลายสุดของเส้นใยได้อย่างชัดเจนในชุดทดสอบ แสดงให้เห็นว่า สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ยีสต์ไอโซเลต Y20 ผลิตขึ้นมีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา ทำให้การพัฒนาของเส้นใยราผิดปกติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Fiori และคณะในปี 2014 ศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ต่อการเจริญและการผลิตไอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* พบว่า *C. friedrichii* 778 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีขนาดของโคโลนีราลดลงและไม่สร้างสปอร์ เมื่อสังเกตลักษณะของเส้นใยราผ่านกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอพบว่า เส้นใยของราบริเวณขอบของโคโลนีมีลักษณะที่ยืดยาวและบางกว่าเส้นใยของราในชุดควบคุมอย่างชัดเจน ในขณะเดียวกันงานวิจัยของ Farbo และคณะในปี 2018 ทดสอบสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตไอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* และ *A. ochraceus* ที่ปนเปื้อนในองุ่น และนำเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของราทั้งสองชนิดมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า ปลายเส้นใยมีการแตกออกผิดปกติต่างจากเส้นใยในชุดควบคุม นอกจากนี้ เส้นใยมีการจับตัวเป็นก้อนและเกิดการบวมแตกในหลายตำแหน่ง

4.4.3 วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์

จากผลการวิเคราะห์หาชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ไอโซเลต Y20 ด้วยวิธี Headspace GC-MS พบว่า ยีสต์ไอโซเลต Y20 สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายหลายชนิด โดยเฉพาะสารประกอบในกลุ่มแอลกอฮอล์โดยผลิตเอทานอลได้มากที่สุด รองลงมาเป็น 1-บิวทานอล, 3-เมทิล-, อะซิเตท และผลิตเอทิลอะซิเตทได้เป็นลำดับที่สาม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Contarino และคณะในปี 2019 ที่ศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์สี่สายพันธุ์ ได้แก่ *W. anomalus* (BS91), *M. pulcherrima* (MPR3), *A. pullulans* (PI1) และ *S. cerevisiae* (BCA61) โดยใช้วิธี SPME-GC-MS พบว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสี่ชนิดนี้ผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้แตกต่างกันออกไป โดยสามารถผลิตสารประกอบกลุ่มแอลกอฮอล์ (เอทิลแอลกอฮอล์, 3-เมทิล-1-บิวทานอล และฟีนีลเอทิล แอลกอฮอล์) และเอสเทอร์ (เอทิลอะซิเตท และไอโซเอมิล อะซิเตท) เป็นหลัก นอกจากนี้ งานวิจัยของ Farbo และคณะในปี 2018 ศึกษาเกี่ยวกับผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ต่อการเจริญและการผลิตไอคราทอกซินเอของ *A. ochraceus* และ *A. carbonarius* พบว่า สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์สามารถลดการ

ผลิตโอคราทอกซินเอของราทั้งสองสายพันธุ์ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยผลิต 2-ฟีนีลเอทานอล เป็นสารประกอบหลัก ในขณะเดียวกัน Zhang และคณะได้ศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย 2-ฟีนีลเอทานอล ในปี 2021 พบว่า 2-ฟีนีลเอทานอล สามารถยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ของ *Monascus purpureus*, *A. oryzae*, *Byssochlamys spectabilis*, *A. niger* นอกจากนี้ 2-phenylethanol ทำให้เส้นใยมีความลึบแบนและเป็นรูต่างจากชุดควบคุมอีกด้วย นอกจากนี้ ผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเหล่านี้เกี่ยวข้องกับ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสเพื่อสังเคราะห์โอคราทอกซินเอในราทั้งสองสายพันธุ์ โดยจะ ไปลดการสังเคราะห์โพลีคีไทด์ ลดการสังเคราะห์นอน-ไรโบโซมอลเปปไทด์ ลดการสังเคราะห์โมโนออกซีจีเนส และยับยั้งการทำงานของยีนควบคุม *laeA* และ *veA* อีกด้วย

จากการทดลองทั้งหมดข้างต้นสรุปได้ว่า ยีสต์ไอโซเลต Y08 และ Y20 มีความสามารถในการยับยั้ง การเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* โดยใช้กลไกสำคัญ คือ การสร้างสารประกอบ อินทรีย์ระเหยง่ายทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัญญาณวิทยาของรา ราเจริญลดลงและส่งผลให้ราผลิต สารพิษได้น้อยลงอย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่ายีสต์ไอโซเลต Y08 และ Y20 มีศักยภาพที่จะพัฒนาให้เป็นตัว ควบคุมทางชีวภาพเพื่อใช้ในการควบคุมราที่ผลิตสารพิษในผลผลิตทางการเกษตรและอาหารในอนาคต อย่างไรก็ตาม สิ่งสำคัญที่ศึกษาต่อไป คือ การระบุชนิดของยีสต์ทั้งสองไอโซเลตเพื่อประเมินความเป็นเชื้อก่อ โรค การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ การศึกษากลไกของ ยีสต์ปฏิปักษ์ในการลดการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* ในระดับการแสดงออกของยีน และการ ทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ดังกล่าวในการยับยั้งการเจริญของราและการผลิตสารพิษจากราในตัวอย่าง ผลผลิตทางการเกษตรหรืออาหารที่มีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนสารพิษจากรา

เอกสารอ้างอิง

- ชวลีศ ตีรุกรุณาสวัสดิ์. (2561). การควบคุมการปนเปื้อนจุลินทรีย์และสารพิษจากเชื้อราในกระบวนการผลิตผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว. [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 12 เม.ย. 2564]. เข้าถึงได้จาก <https://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=2857>
- โนทัย กิตติกำแหง. (2554). การปนเปื้อนราสกุล *Aspergillus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 และโอคราทอกซินเอ ในเมล็ดข้าวไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร : เมล็ดกาแฟโรบัสตา. (2561, 14 พฤศจิกายน). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 135 ตอนพิเศษ 287 ง. หน้า 4-17.
- ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร : เมล็ดกาแฟอะราบิกา. (2562, 8 มกราคม). ราชกิจจานุเบกษา. เล่ม 136 ตอนพิเศษ 6 ง. หน้า 5-17.
- พัฒนชิตา ธาราดลศิริรัฐติกุล. (2554). การปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในองุ่นไวน์ไทย. โครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์, ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ยูเรศ เรืองพานิช. (2562). การจัดการวัตถุดิบอาหารที่มีความเสี่ยงสารพิษจากเชื้อรา เพื่อการป้องกันผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์. [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 28 เม.ย. 2564]. เข้าถึงได้จาก <https://thaimycotoxin.org/wp-content/uploads/2019/10/สารพิษจากเชื้อราเพื่อสุขภาพสัตว์.pdf>
- รักไทย งามภักดิ์, วนิดา แจ่มประจักษ์, วีระ อึ้งสอาด และ นารถยา ชมนารถ. (2563). การเฝ้าระวังสารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบอาหารสัตว์. [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 19 เม.ย. 2564]. เข้าถึงได้จาก http://qcontrol.dld.go.th/images/academic%20article/01_rakthai.pdf
- ศมาพร แสงยศ. (2562). การใช้แมลงควบคุมวัชพืชโดยชีววิธี. [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 18 เม.ย. 2564]. เข้าถึงได้จาก https://issuu.com/valuechain62/docs/____0b8744f2c7bcb2

อำนาจ พัวพลเทพ. (2562). สารพิษจากเชื้อรา: ภัยเงียบในอาหาร. [อินเทอร์เน็ต]. [เข้าถึงเมื่อ 26 ต.ค. 2563]. เข้าถึงได้จาก https://thaimycotoxin.org/wp-content/uploads/2019/06/สารพิษจากเชื้อรา_ภัยเงียบในอาหาร.pdf

อนุเทพ ภาสุระ และ ศศิภาส นุตวงษ์. (2017). ประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิชีวนะในการควบคุมทางชีววิธีต่อโรคผลองุ่นเน่าหลังการเก็บเกี่ยวที่เกิดจากเชื้อราสีเทา *Botrytis cinerea*. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 22 (ฉบับพิเศษ) การประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 9”.

Agha, W.Y., Razzazi-Fazeli, E. & Bohm, J. (2011). Alfatoxin B1 in Affecting Broiler's Performance, Immunity, and Gastrointestinal Tract: A review on history and contemporary issues. *Toxins*, 3, 566-590.

Al-Anati, L. & Petzinger E. (2006). Immunotoxic activity of ochratoxin A. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29(2), 79-90.

Alasmar, R., Ul-Hassan, Z., Zeidan, R., Al-Thani, R., Al-Shamary, N., Alnaimi, H., Migheli, Q. & Jaoua, S. (2020). Isolation of a Novel *Kluyveromyces marxianus* Strain QKM-4 and Evidence of Its Volatilome Production and Binding Potentialities in the Biocontrol of Toxigenic Fungi and Their Mycotoxins. *Acs Omega*, 5, 17637-17645.

Alberts, J.F., van Zyl, W.H. & Gelderblom, W.C.A. (2016). Biologically Based Methods for Control of Fumonisin-Producing *Fusarium* Species and Reduction of the Fumonisin. *Frontiers in Microbiolog*, 7, 548. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00548>

Awad, W.A., Ghareeb, K., Böhm, J. & Zentek, J. (2010). Decontamination and detoxification strategies for the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. *Food Additives and Contaminants*, 27, 510-520.

Azhar, M., Rauf, S., Hayat, A., Catanante, G., & Raza, R. & Marty, J. (2017). Determination of Mycotoxins in Food, 1, 137-168. <https://doi.org/10.1002/9781118992685.ch5>

- Balouiri, M., Sadiki, M. & Ibsouda, S.K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71–79.
- Barkai-Golan, R. (2001). Postharvest diseases of fruits and vegetables. Development and control, pp. 418, (100 AE Amsterdam, Netherlands).
- Bau, M., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., Minguez, S. & Cabanes, F.J. (2005). Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 125-130.
- Betina, V. (1989). Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects. *Bioactive Molecules*, pp. 114–50.
- Boudra, H., Bars, P.L. & Bars, J.L. (1995). Thermostability of Ochratoxin A in Wheat under Two Moisture Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 61. 1156–1158.
- Bruinink, A. & Sidler, C. (1997). The neurotoxic effects of ochratoxin-A are reduced by protein binding but are not affected by l-phenylalanine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 146, 173-179.
- Canamas,T.P., Vinas, I., Usall, J., Casals, C., Solsona, C. & Teixido, N. (2011). Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest application of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. Part I. Study of different formulation strategies to improve survival of cells in unfavourable environmental conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 86–95.
- Cao, J., Kong, W., Zhou, S., Yin, L., Wan, L. & Yang, M. (2013). Molecularly imprinted polymer-based solid phase clean-up for analysis of ochratoxin A in beer, red wine, and grape juice. *Journal of Separation Science*, 36, 1291-1297.
- Castoria, R., de Curtis, F., Lima, G., Caputo, L., Pacifico, S. & de Cicco, V. (2001). *Aureobasidium pullulans* (LS-30), an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its mode of action. *Postharvest Biology and Technology*, 32, 717– 724.

- Chen, O., Yi, L., Deng, L., Ruan, C. & Zeng, K. (2020). Screening antagonistic yeasts against citrus green mold and the possible biocontrol mechanisms of *Pichia galeiformis* (BAF03). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, 3812–3821.
- Choinska, R., Piasecka-Jozwiak, K., Chablowska, B., Dumka, J. & Lukaszewicz, A. (2020). Biocontrol ability and volatile organic compounds production as a putative mode of action of yeast strains isolated from organic grapes and rye grains. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113, 1135–1146.
- Choudhury, S.R., Traquair, J.A. & Jarvis, W.R. (1994). 4-Methyl-7,11-heptadecadienal and 4-methyl-7,11-heptadecadienoic acids: new antibiotics from *Sporothrix flocculosa* and *Sporothrix rugulosa*. *Journal of Natural Products*, 57, 700–704.
- Contarino, R., Brighina, S., Fallico, B., Cirvilleri, G., Parafati, L. & Restuccia, C. (2019). Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. *Food Microbiology*, 82, 70–74.
- Coppock, R.W. & Jacobsen, B.J. (2009). Mycotoxins in animal and human patients. *Toxicology and Industrial Health*, 25, 637-655.
- Dachoupakan, C., Ratomahenina, R., Martinez, V., Guiraud, J.P., Baccou, J.C. & Schorr-Galindo, S. (2009). Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilla isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 14-23.
- Di-Francesco, A., Ugolini, L., Lazzeri, L. & Mari, M. (2015). Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biological Control*, 81, 8–14.
- Droby, S. & Chalutz, E. (1994). Mode of action of biological agents of postharvest diseases. In: Wilson, C.L., Wisniewski, M.E. (Eds.). *Biological Control of Postharvest Diseases – Theory and Practice*, 27, 63–75.

- Druvefors, U. (2004). Yeast biocontrol of grain spoilage mold. (Doctoral dissertation, Swedish University of Agricultural Science, 2004). Retrieved April 27, 2021, from Epsilon Dissertations and Graduate Theses Archive Web site: <http://diss-epsilon.slu.se/archive/00000552/>
- Edlayne, G., Simone, A. & Felicio, J.D. (2009) "Chemical and Biological Approaches for Mycotoxin Control: A Review", *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 1, 155.
- Elling, F., Nielsen, J.P., Lillehoj, E.B., Thomassen, M.S. & Stormer, F.C. (1985). Ochratoxin A-induced porcine nephropathy: enzyme and ultrastructure changes after short-term exposure. *Toxicon*, 23, 247-254.
- Farbo, M.G., Urgeghe, P.P., Fiori, S., Marcello, A., Oggiano, S., Balmas, V., Hassan, Z.U., Jaoua, S. & Migheli, Q. (2018). Effect of yeast volatile organic Ccompounds on ochratoxin A-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus cchraceus*. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 1-10.
- Farkas, Z., Marki-Zay, J., Kucsera, J., Vagvolgyi, Cs., Golubev, W. & Pfeiffer, I. (2012) Characterization of two different toxins of *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) VKMY-159. *Acta Biol Hung*, 63, 277–287.
- Feier, D. & Tofana, M. (2009). Ochratoxin A – Toxicological Aspects. *Bulletin UASVM Agriculture*, 66, 308-312.
- Fialho, M.B., Toffano, L., Pozzobo, P.M., Augusto, F. & Florentino, P.S. (2010). Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the *in vitro* development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World Journal Microbiological Biotechnology*, 26, 925-932.
- Fiori, S., Urgeghe, P.P., Hammami, W., Razzu, S., Jaoua, S. & Migheli, Q. (2014). Biocontrol activity of four non- and low-fermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. *International Journal Food Microbiology*, 189, 45–50.

- Freimoser, F.M., Rueda-Mejia, M.P., Tilocca, B. & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35, 154-163.
- Friel, D., Pessoa, N. M. G., Vandenbol, M. & Jijakli, M. J. (2007). Separate and combined disruptions of two exo-b-1,3-glucanase genes decrease the efficiency of *Pichia anomala* (strain K) biocontrol against *Botrytis cinerea* on apple. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 371-379.
- Gilani, S.H., Bancroft, J. & Reily, M. (1978). Teratogenicity of ochratoxin A in chick embryos. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 46(2), 543-546.
- Hassen, W., Abid-Essafi, S., Achour, A., Guezzah, N., Zakhama, A., Ellouz, F., Creppy, E.E. & Bacha, H. (2004). Karyomegaly of tubular kidney cells in human chronic interstitial nephropathy in Tunisia: respective role of Ochratoxin A and possible genetic predisposition. *Human & Experimental Toxicology*, 23, 339-346.
- Hood, R.D., Naughton, M.J. & Hayes, A.W. (1976). Prenatal effects of Ochratoxin A in hamsters. *Teratology*, 13, 11-14.
- Hsuuw, Y.D., Chan, W.H. & Yu, J.S. (2013). Ochratoxin a inhibits mouse embryonic development by activating a mitochondrion-dependent apoptotic signaling pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 935-953.
- Huang, R., Li, G.Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H.J., Jiang, D.H. & Huang, H.C. (2011). Control of postharvest Botrytis fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology*, 101, 859-869.
- Huff, W.E., Kubena, L.F., Harvey, R.B. & Phillips, T.D. (1992). Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. *Poultry Science*, 71, 64-69.

- IARC. (1993). Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monograph on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *International Agency for Research on Cancer*, 56, 489.
- Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G. & Perrin, I. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research*, 32, 179–205.
- Kohl, J., Kolnaar, R. & Ravensberg, W.J. (2019). Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10, 845.
- Koszegi, T., & Poor, M. (2016). Ochratoxin A: Molecular Interactions, Mechanisms of Toxicity and Prevention at the Molecular Level. *Toxins*, 8, 111.
- Iacumin, L., Arnoldi, M. & Comi, G. (2020). Effect of a *Debaryomyces hansenii* and *Lactobacillus buchneri* Starter Culture on *Aspergillus westerdijkiae* Ochratoxin A Production and Growth during the Manufacture of Short Seasoned Dry-Cured Ham. *Microorganisms*, 8, 1623.
- Lea, T., Steien, K. & Stormer, F.C. (1989). Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia*, 107, 153-159.
- 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, 187–193.
- Li, B.Q., Peng, H.M. & Tian, S.P. (2016). Attachment Capability of Antagonistic Yeast *Rhodotorula glutinis* to *Botrytis cinerea* Contributes to Biocontrol Efficacy. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00601>

- Li, R., Zhang, H., Liu, W. & Zheng, X. (2011). Biocontrol of postharvest gray and blue mold decay of apples with *Rhodotorula mucilaginosa* and possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, 146, 151–156.
- Lima, J.R., Gondim, D.M.F., Oliveira, J.T.A., Oliveira, F.S.A., Goncalves, L.R.B. & Viana, F.M.P. (2013). Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biol Technol*, 83, 58–64.
- Liu, H.M., Guo, J.H., Cheng, Y.J., Liu, P., Long, C.A. & Deng, B.X. (2010). Inhibitory activity of tea polyphenol and *Hanseniaspora uvarum* against *Botrytis cinerea* infections. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 258–263.
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Hershkovitz, V., Tian, S. & Farrell, R. (2012). Increase in antioxidant gene transcripts, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Candida oleophila* following sublethal oxidative stress exposure. *FEMS Microbiology Ecology*, 80, 578–590.
- Luo, Y., Liu, X. & Li, J. (2018). Updating techniques on controlling mycotoxins – a review. *Food Control*, 89, 123-132.
- Lurie, S. (1998). Postharvest heat treatments of horticultural crops. *Horticultural Reviews*, 22, 91–121.
- Luster, M.I., Germolec, D.R., Burlison, G.R., Jameson, C.W., Ackermann, M.F., Lamm, K.R. & Hayes, H.T. (1987). Selective Immunosuppression in Mice of Natural Killer Cell Activity by Ochratoxin A. *Cancer Research*, 47, 2259-2263.
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A. & Novatna, E. (2013). Ochratoxin A: developmental and reproductive toxicity-an overview. *Birth Defects Research*, 98, 493-502.
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J. & Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins*, 8, 191-240.

- Masih, E.I., Slezack-Deschaumes, S., Marmaras, I., Ait Barka, E., Vernet, G., Charpentier, C., Adholeya, A. & Paul, B. (2001). Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Letters*, 202, 227–232.
- Medina-Cordova N., López-Aguilar, R., Ascencio, F., Castellanos, T., Campa-Córdova, A.I. & Angulo, C. (2016). Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). *Biological Control*. 97, 70-79.
- Meng, D., Garba, B., Ren, Y., Yao, M., Xia, X., Li, M. & Wang, Y. (2020). Antifungal activity of chitosan against *Aspergillus ochraceus* and its possible mechanisms of action. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 1063-1070.
- Montagnoli, C., Fallarino, F. & Gaziano, R. (2006). Immunity and tolerance to *Aspergillus* involve functionally distinct regulatory T cells and tryptophan catabolism. *Journal of Immunology*, 176, 1712–1723.
- Nally, M.C., Pesce, V.M., Maturano, Y.P., Assaf, L.A.R., Toro, M.E., de Figueroa, L.I.C. & Vazquez, F. (2015). Antifungal Modes of Action of *Saccharomyces* and Other Biocontrol Yeasts Against Fungi Isolated from Sour and Grey Rots. *International Journal of Food Microbiology*, 204, 91-100.
- 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.
- Ostry, V., Malir, F., Dofkova, M., Skarkova, J., Pfohl-Leszkowicz, A. & Ruprich, J. (2015). Ochratoxin A dietary exposure of ten population groups in the Czech Republic: Comparison with data over the world. *Toxins*, 7, 3608–3635.

- Ouda, S.M. (2014). Biological control by microorganisms and ionizing radiation. *International Journal of Advanced Research*, 2, 314-356.
- Pantelides, L.S., Christou, O., Tsolakidou, M.D., Tsaltas, D. & Loannou, N. (2015). Isolation, identification and in vitro screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes. *Biological Control*, 88, 46-53.
- Paradells, S., Rocamonde, B., Llinares, C., Herranz-Pérez, V., Jimenez, M., Garcia-Verdugo, J.M. Zipancic, I., Soria, J.M. & Garcia-Esparza, M.A. (2015). Neurotoxic effects of ochratoxin A on the subventricular zone of adult mouse brain. *Journal of Applied Toxicology*, 35, 737-751.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C. & Cirvilleri, G. (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, 47, 85–92.
- Peraica, M. & Domijan, A.M. (2001). Contamination of food with mycotoxins and human health. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 52, 23-35.
- Pfohl-Leszkowicz, A. & Manderville, R.A. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 61–99.
- Pfohl-Leszkowicz, A., Pinelli, E., Bartsch, H., Mohr, U. & Castegnaro, M. (1998). Sex- and strain-specific expression of cytochrome P450s in ochratoxin A-induced genotoxicity and carcinogenicity in rats. *Molecular Carcinogenesis*, 23, 76-85.
- Piotrowska, M. & Masek, A. (2015). *Saccharomyces cerevisiae* cell wall components as tools for ochratoxin a decontamination. *Toxins*, 7, 1151-1162.
- Ponsone, M.L., Chiotta, M.L., Combina, Dalcero, M.A. & Chulze, S. (2011). Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 70-77.

- Quintela, S., Villaran, M. C., Lopez de Armentia, I. & Elejalde, E. (2012). Ochratoxin a removal in red wine by several oenological fining agents: Bentonite, eggalbumin, allergen free adsorbents, chitin and chitosan. *Food Additives & Contaminants*, 29, 1168-1174.
- Ruiz-Moyano, S., Martin, A., Villalobos, M.C., Calle, A., Serradilla, M.J., Cordoba, M.G. & Hernandez, A. (2016). Yeasts isolated from figs (*Ficus carica* L.) as biocontrol agents of postharvest fruit diseases. *Food Microbiol*, 57, 45–53.
- Sana, S., Anjum, A.A., Yaqub, T., Nasir, M., Ali, M.A., & Abbas, M. (2019). Molecular Approaches for Characterization of Aflatoxin Producing *Aspergillus flavus* Isolates from Poultry Feed. *Pakistan Veterinary Journal*, 39, 169-174.
- Sangmanee, P. & Hongpattarakere, T. (2014). Inhibitory of multiple antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 40, 224-233.
- Saravanakumar, D., Ciavarella, A., Spadaro, D., Garibaldi, A. & Gullino, M.L. (2008). *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 121–128.
- Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Harbison, R. & Sánchez-Ramos, J. (2006). Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *Neurotoxicology*, 27, 82-92.
- Skarkova ,J., Ostry, V., Malir, F. & Roubal, T. (2013). Determination of Ochratoxin A in Food by High Performance Liquid Chromatography, *Analytical Letters*, 46, 1495-1504.
- Tanchev, Y. & Dorossiev, D. (1991). The first clinical description of Balkan endemic nephropathy (1956) and its validity 35 years later. *IARC Sci Publ*, (115), 21-28. PMID: 1820335.

- Tian, S.P., Yao, H.J., Deng, X., Xu, X.B., Qin, G.Z., & Chan, Z.L. (2006). Characterization and Expression of β -1,3-Glucanase Genes in Jujube Fruit Induced by the Microbial Biocontrol Agent *Cryptococcus laurentii*. *Biological Control*, 97, 260-268.
- Tiwari, B.K., Brennan, C.S., Curran, T., Gallagher, E., Cullen, P.J. & O'Donnell, C.P. (2010). Application of ozone in grain processing. *Journal of Cereal Science*, 51, 248–255.
- Trivedi, A.B., Doi, E. & Kitabatake, N. (1992). Detoxification of Ochratoxin A on Heating under Acidic and Alkaline Conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56, 741-745.
- Vidal, A., Sanchis, V., Ramos, A.J. & Marín S. (2015). Thermal stability and kinetics of degradation of deoxynivalenol, deoxynivalenol conjugates and ochratoxin A during baking of wheat bakery products. *Food Chemistry*, 178, 276–286.
- Virgili, R., Simoncini, N., Toscani, T., Leggieri, M.C., Formenti, S. & Battilani, P. (2012). Biocontrol of *Penicillium nordicum* Growth and Ochratoxin A Production by Native Yeasts of Dry Cured Ham. *Toxins*, 4, 68-82.
- Visagie, C.M., Varga, J., Houbraken, J., Meijer, M., Kocsube, S., Yilmaz, N., Fotedar, R., Seifert, K.A., Frisvad, J.C. & Samson, R.A. (2014). Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Studies in Mycology*, 78, 1–61.
- Wang, Y., Wang, L., Liu, F., Wang, Q., Selvaraj, J.N., Xing, F., Zhao, Y. & Liu, Y. (2016). Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms. *Toxins*, 8, 83
- Werner, S., Polle, A. & Brinkmann, N. (2016). Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 8651–8665.
- Whitlow, L.W., & Hagler, W.M. (2008). Mold and Mycotoxin Issues in Dairy Cattle: Effects, Prevention and Treatment. *WCDS Advances in Dairy Technology*, 20, 195-209.

- Wilson, C. & Wisniewski, M., (1989). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. *Announce Review Phytopathol*, 27, 425–441.
- Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C. & Chalutz, E. (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39, 245-258.
- Yu, T., Wang, L., Yin, Y., Wang, Y. & Zheng, X. (2008). Effect of chitin on the antagonistic activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 44–48.
- Zeidan, R., Ul-Hassan, Z., Al-Thani, R., Balmas, V., Jaoua, S. 2018. Application of low-fermenting yeast *Lachancea thermotolerans* for the control of toxigenic fungi *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium verrucosum* and *Fusarium graminearum* and their mycotoxins. *Toxins*. 10, 242.
- Zhang, H., Du, H. & Xu, Y. (2021). Volatile Organic Compound-Mediated Antifungal Activity of *Pichia* spp. and Its Effect on the Metabolic Profiles of Fermentation Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 87. 20.
- Zhu, C., Shi, J., Jiang, C. & Liu, Y. (2015). Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* *in vitro* and *in vivo* through antagonistic yeasts. *Food Control*, 50, 125-132.

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM (Yeast extract Malt extract)

| | | |
|-----------------|-------|-------------|
| สารสกัดยีสต์ | 3 | กรัมต่อลิตร |
| สารสกัดมอลต์ | 3 | กรัมต่อลิตร |
| เพปโทน | 5 | กรัมต่อลิตร |
| น้ำตาลเดกซ์โทรส | 10 | กรัมต่อลิตร |
| ปลอดประจุ | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายอาหารให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD (Yeast extract Peptone Dextrose)

| | | |
|-------------------------|-------|-------------|
| สารสกัดยีสต์ | 10 | กรัมต่อลิตร |
| เพปโทน | 20 | กรัมต่อลิตร |
| น้ำตาลเดกซ์โทรส | 20 | กรัมต่อลิตร |
| ผงวุ้นสำหรับทำอาหารแข็ง | 15 | กรัมต่อลิตร |
| ปลอดประจุ | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายอาหารให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar)

| | | |
|---|-------|-----------|
| อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDA บริษัท Difco, USA | 39 | กรัม |
| ปลอดประจุ | 1,000 | มิลลิลิตร |

ละลายอาหารให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารละลาย

1. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffered Saline, PBS pH 7.2)

| | | |
|--|------|-----------|
| น้ำปลอดประจุ | 800 | มิลลิลิตร |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 8 | กรัม |
| โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) | 0.2 | กรัม |
| Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O | 1.44 | กรัม |
| KH ₂ PO ₄ | 0.24 | กรัม |

ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เท่ากับ 7.2 จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารแขวนลอยสปอร์รา (Physiological water)

| | | |
|-------------------------|------|-----------|
| น้ำปลอดประจุ | 100 | มิลลิลิตร |
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 0.85 | กรัม |
| สารลดแรงตึงผิว Tween 80 | 1 | มิลลิลิตร |

ละลายโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลอดประจุ แล้วเติม Tween 80 ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

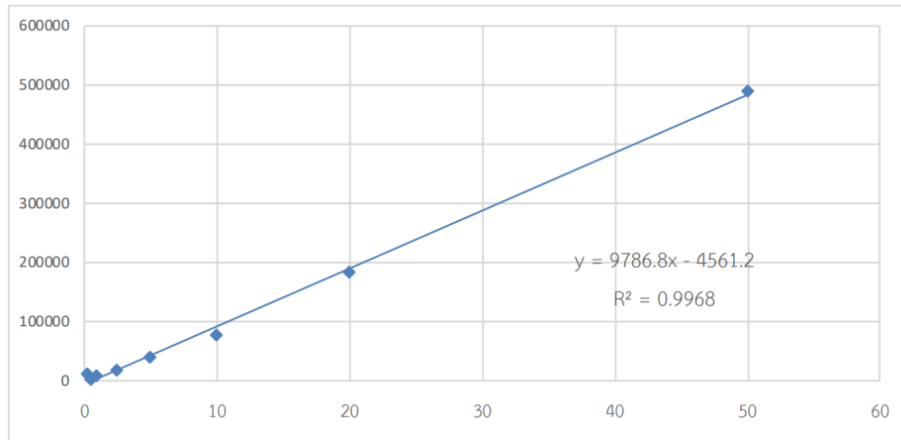
3. เฟสเคลื่อนที่สำหรับไอคราโทกราฟี

| | | |
|----------------------------|-----|-----------|
| อะซีโตไนไตรล์ (HPLC grade) | 495 | มิลลิลิตร |
| น้ำปลอดประจุ | 495 | มิลลิลิตร |
| กรดอะซีติก | 10 | มิลลิลิตร |

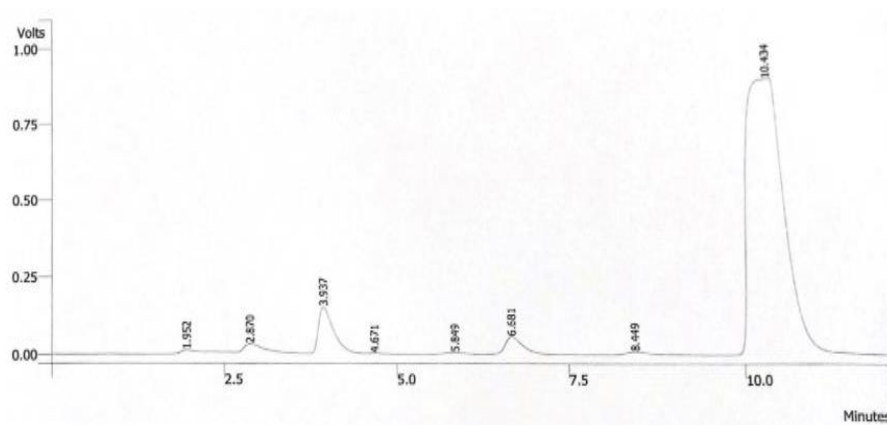
ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยชุดกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐานสารพิษจากรา

กราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ



โครมาโทแกรมของโอคราทอกซินเอ ที่ retention time (RT) ประมาณ 10 นาที



การคำนวณปริมาณโอคราทอกซินเอ

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

โดย A คือ พื้นที่ใต้กราฟ

B คือ สัมประสิทธิ์หน้า X ของกราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ

C คือ เฟสเคลื่อนที่ที่เติมลงในโอคราทอกซินเอที่สกัดได้ (เท่า)

D คือ น้ำหนักวุ้น (กรัม)