

การต้านการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus carbonarius* โดยยีสต์ปฏิปักษ์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2562  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

INHIBITION OF GROWTH AND MYCOTOXIN PRODUCTION OF *Aspergillus flavus* AND  
*Aspergillus carbonarius* BY ANTAGONISTIC YEASTS



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Microbiology and Microbial Technology

Department of Microbiology

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การต้านการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ <i>Aspergillus flavus</i> และ <i>Aspergillus carbonarius</i> โดย ยีสต์ปฏิปักษ์
โดย	น.ส.พิชามณูชु โสมา
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญรณ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวงนิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชูลี ยมภักดี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญรณ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... กรรมการ  
(อาจารย์ ดร.ธัญชุส เกรียงไกรพิพัฒน์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วราภา มหากาญจนกุล)

พิชามณูชู่ โสมา : การต้านการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus carbonarius* โดยยีสต์ปฏิปักษ์. ( INHIBITION OF GROWTH AND MYCOTOXIN PRODUCTION OF *Aspergillus flavus* AND *Aspergillus carbonarius* BY ANTAGONISTIC YEASTS) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบูรณ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกสำคัญในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอของ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus carbonarius* ตามลำดับ โดยใช้ยีสต์ปฏิปักษ์สามชนิด ได้แก่ *Wickerhamomyces anomalus* MSCU 0652, *Saccharomyces cerevisiae* MSCU 0654 และ *Kluyveromyces marxianus* MSCU 0655 จากผลการวิจัยพบว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดสามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราได้อย่างมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน โดยมีกลไกสำคัญ ได้แก่ การสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยรา และเมื่อศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์พบว่า *W. anomalus* MSCU 0652 มีประสิทธิภาพในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* M3T8R4G3 ได้ดีที่สุดเมื่อเจริญบนอาหารที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5 ( $81.27 \pm 1.23$  เปอร์เซ็นต์) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ( $81.38 \pm 1.80$  เปอร์เซ็นต์) และค่าความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ปกติ ( $82.86 \pm 1.14$  เปอร์เซ็นต์) และลดการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดีที่สุดเมื่อเจริญบนอาหารที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 4.5 ( $99.91 \pm 0.01$  เปอร์เซ็นต์) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ( $99.73 \pm 0.21$  เปอร์เซ็นต์) และค่าความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ 0.5 เท่า ( $99.67 \pm 0.12$  เปอร์เซ็นต์) สำหรับ *A. carbonarius* TK4.2 พบว่า *W. anomalus* MSCU 0652 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5 ( $82.42 \pm 2.76$  เปอร์เซ็นต์) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ( $81.20 \pm 2.65$  เปอร์เซ็นต์) และค่าความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ปกติ ( $83.88 \pm 0.32$  เปอร์เซ็นต์) และลดการผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5 ( $99.91 \pm 0.07$  เปอร์เซ็นต์) บ่มที่อุณหภูมิห้อง ( $99.92 \pm 0.01$  เปอร์เซ็นต์) และค่าความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาและเทคโนโลยี ลายมือชื่อนิสิต .....  
 จุลินทรีย์  
 ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....  
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5972024123 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORD: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, Antagonistic yeasts,  
Biological Control, Aflatoxin B<sub>1</sub>, Ochratoxin A

Pichamon Soma : INHIBITION OF GROWTH AND MYCOTOXIN PRODUCTION  
OF *Aspergillus flavus* AND *Aspergillus carbonarius* BY ANTAGONISTIC  
YEASTS. Advisor: Asst. Prof. CHEEWANUN DACHOUPAKAN SIRISOMBOON,  
Ph.D. Co-advisor: Asst. Prof. SUPAT CHAREONPORNWATTANA, Ph.D.

The objective of this study was examined the inhibition of growth and aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus carbonarius*, respectively. By antagonistic yeasts i.e. *Wickerhamomyces anomalus* MSCU 0652, *Saccharomyces cerevisiae* MSCU 0654 and *Kluyveromyces marxianus* MSCU 0655, results showed that all yeast strains could be effectively different fungal inhibition and mycotoxin production. Potential of volatile organic compounds (VOCs) was the main mechanism of action, affecting hyphal morphology. The physical factors were also tested to optimize the production of VOCs harbouring the antagonistic activity. *W. anomalus* MSCU 0652 showed the highest efficiency to inhibit growth of *A. flavus* M3T8R4G3 by production of VOCs at pH 5 (81.27±1.23%), ambient temperature (81.38±1.80%) and 1x YPD concentration (82.86±1.14%). Also, reducing the aflatoxin B<sub>1</sub> production at pH 4.5 (99.91±0.01%), 25°C (99.73±0.21%) and 0.5x of YPD concentration (99.67±0.12%). The growth and OTA production of *A. carbonarius* TK4.2 were inhibited by *W. anomalus* MSCU 0652, the highest percentage of inhibition presented at pH 5 (82.42±2.76%), ambient temperature (81.20±2.65%) and 1x YPD concentration (83.88±0.32%), the lowest ochratoxin A production indicated at pH 5 (99.91±0.07%), ambient temperature (99.92±0.01%) and normal YPD concentration (99.97±0.01%). Moreover, the ability of adsorption and degradation by yeast cell wall were tested.

Field of Study: Microbiology and Microbial

Technology

Academic Year: 2019

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุน จากทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีจากความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความอนุเคราะห์ และให้คำปรึกษาในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงกรุณาตรวจทาน แก้ไข และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ออกมาสมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชุติ ยมภักดี ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรภากา มหากาญจนกุล ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่าง ๆ และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้แล้วเสร็จอย่างสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่คอยชี้แนะและให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนการวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วง

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณนักจิตวิทยา ที่ให้คำปรึกษาด้านสภาพจิตใจ ขอขอบคุณครอบครัว และ ศิลปินเกาหลี ที่เป็นกำลังใจสำคัญอย่างยิ่ง จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์



พิชามณูชु โสมา

## สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูปภาพ.....	ฐ
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ .....	4
บทที่ 2 .....	5
ปริทัศน์วรรณกรรม.....	5
2.1 ราและสารพิษจากรา.....	5
2.2 การปนเปื้อนสารพิษจากราในอาหาร.....	6
2.3 อะฟลาทอกซิน.....	9
2.3.1 ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน .....	10
2.3.2 การปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน .....	13
2.4 โอคราทอกซินเอ .....	18
2.4.1 ความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอ .....	19

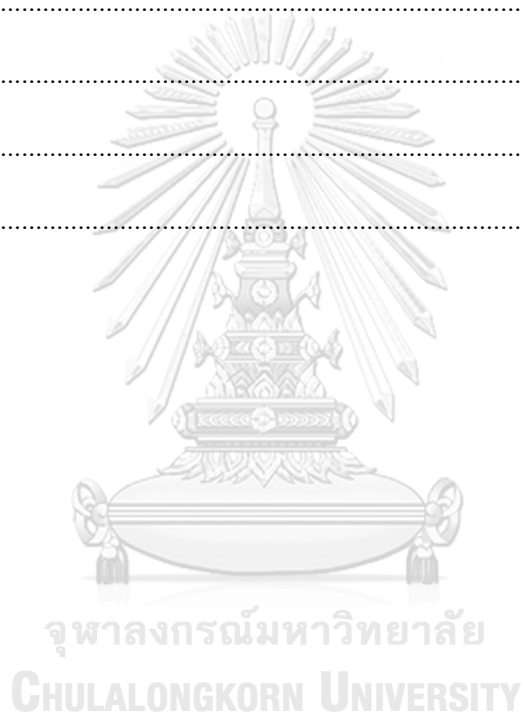
2.4.2 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหาร.....	21
2.5 การควบคุมการปนเปื้อนสารพิษจากรา.....	25
2.5.1 การป้องกันการเจริญของรา.....	25
2.5.2 การลดการปนเปื้อนสารพิษจากรา.....	28
2.6 การควบคุมทางชีวภาพโดยยีสต์ปฏิปักษ์.....	29
2.7 กลไกการควบคุมทางชีวภาพโดยยีสต์ปฏิปักษ์.....	32
2.7.1 การแย่งชิงพื้นที่การเจริญและสารอาหาร.....	32
2.7.2 การสร้างสารยับยั้งการเจริญและย่อยสลายผนังเซลล์ของรา.....	33
2.7.3 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน.....	35
2.7.4 การสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย.....	36
2.8 การดูดซับและการย่อยสลายสารพิษจากราโดยยีสต์ปฏิปักษ์.....	40
บทที่ 3.....	45
อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการ.....	45
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง.....	45
3.2 เคมีภัณฑ์.....	47
3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ.....	48
3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	48
3.4.1. เตรียมจุลินทรีย์.....	48
3.4.1.1 เซลล์ยีสต์แขวนลอย.....	48
3.4.1.2 สปอร์ราแขวนลอย.....	49
3.4.2. การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของ <i>A. flavus</i> และ <i>A. carbonarius</i> .....	49
3.4.2.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญด้วยวิธี Dual culture.....	49
3.4.2.2 การทดสอบความสามารถในการลดการผลิตสารพิษจากรา.....	50



3.4.3. การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเมื่อ เลี้ยงร่วมกับรา.....	51
3.4.4. การทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญและการผลิต สารพิษของรา.....	52
3.4.5. การทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) ของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา....	53
3.4.5.1 การทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย .....	53
3.4.5.2 การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ ปฏิปักษ์ .....	53
3.4.5.3 การวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ .....	54
3.4.6. การทดสอบความสามารถของยีสต์ในการลดการปนเปื้อนสารพิษจากรา.....	55
3.4.6.1 การทดสอบความสามารถในการดูดซับหรือดูดซึมสารพิษจากราด้วยเซลล์ยีสต์ ปฏิปักษ์ .....	55
3.4.6.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารพิษจากราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ ปราศจากเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์.....	57
บทที่ 4 .....	59
ผลการทดลอง .....	59
4.1 ทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจาก ราของ <i>A. flavus</i> และ <i>A. carbonarius</i> .....	59
4.2 ทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับ รา.....	63
4.3 ทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของรา.....	65
4.4 ทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) ของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา .....	68
4.4.1 ทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ .....	68

4.4.2 วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราโดยใช้ Scanning Electron Microscope (SEM).....	72
4.4.3 วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์.....	74
4.4.4 ทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย.....	77
4.4.4.1 ผลของค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ .....	77
4.4.4.2 ผลของอุณหภูมิในการบ่ม .....	85
4.4.4.3 ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD .....	92
4.5 ทดสอบความสามารถของยีสต์ในการลดการปนเปื้อนสารพิษจากรา .....	100
4.5.1 ทดสอบความสามารถในการดูดซับหรือดูดซึมสารพิษจากราของยีสต์ปฏิปักษ์.....	100
4.5.2 ทดสอบการย่อยสลายสารพิษจากราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์ .	102
บทที่ 5 .....	105
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	105
5.1 ทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ <i>A. flavus</i> และ <i>A. carbonarius</i> .....	105
5.2 ทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับรา.....	107
5.3 ทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของรา... 108	
5.4 ทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) ของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา .....	109
5.4.1 ทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ .....	109
5.4.2 วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราโดยใช้ Scanning Electron Microscope (SEM).....	110
5.4.3 วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์.....	111
5.4.4 ทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย.....	113
5.4.4.1 ผลของค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ .....	113

5.4.4.2 ผลของอุณหภูมิในการบ่ม .....	115
5.4.4.3 ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD.....	116
5.5 ทดสอบความสามารถของยีสต์ในการลดการปนเปื้อนสารพิษจากรา .....	118
5.5.1 ทดสอบความสามารถในการดูดซับหรือดูดซึมสารพิษจากราของยีสต์ปฏิปักษ์.....	118
5.5.2 ทดสอบการย่อยสลายสารพิษจากราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์ .	120
บรรณานุกรม.....	124
ภาคผนวก ก.....	151
ภาคผนวก ข.....	153
ภาคผนวก ค.....	155
ประวัติผู้เขียน.....	156



## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตัวอย่างราและสารพิษจากราที่พบการปนเปื้อนในอาหารชนิดต่าง ๆ .....	7
ตารางที่ 2 ร่างประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง มาตรฐานสารปนเปื้อนในอาหารเนื่องจากสารพิษจากรา ตาม CODEX STAN 193-1995 ปี 2017 .....	8
ตารางที่ 3 การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหารจากประเทศต่าง ๆ.....	14
ตารางที่ 4 การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหารจากประเทศไทย .....	15
ตารางที่ 5 ข้อกำหนดการควบคุมปริมาณอะฟลาทอกซินที่พบในอาหารชนิดต่างๆ ได้สูงสุด โดยคณะกรรมการยุโรป (European Commission, EU).....	16
ตารางที่ 6 ตัวอย่างข้อกำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมสูงสุดที่สามารถพบได้ในอาหารประเภทต่าง ๆ ตามข้อกำหนดของแต่ละประเทศ .....	17
ตารางที่ 7 การปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในอาหารของประเทศต่าง ๆ.....	22
ตารางที่ 8 การปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในอาหารของประเทศไทย .....	23
ตารางที่ 9 ปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดที่สามารถพบได้ในอาหารชนิดต่าง ๆ ตามประกาศของคณะกรรมการยุโรป Commission Regulation (EC) No 1881/2006.....	24
ตารางที่ 10 สารควบคุมทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์เพื่อใช้ยับยั้งราก่อโรค .....	27
ตารางที่ 11 สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา .....	37
ตารางที่ 12 การเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ <i>A. flavus M3T8R4G3</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด ด้วยวิธี <i>dual culture</i> บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	61
ตารางที่ 13 การเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ <i>A. carbonarius TK4.2</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด ด้วยวิธี <i>dual culture</i> บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	63
ตารางที่ 14 การยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ <i>A. flavus M3T8R4G3</i> โดยสารประกอบอินทรีย์ระเหยได้ที่สร้างจากยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี <i>face to face double petri dish assay</i> บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน .....	70

ตารางที่ 15 การยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 โดยสารประกอบอินทรีย์ระเหยได้ที่สร้างจากยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face double petri dish assay* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ..... 72

ตารางที่ 16 ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ปฏิปักษ์ เมื่อบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน วิเคราะห์โดยเครื่อง *GC/MS Chromatography* ..... 77

ตารางที่ 17 การดูดซับหรือดูดซึมอะฟลาทอกซินบี 1 โดยเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว *YPD* ที่เติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ..... 101

ตารางที่ 18 การดูดซับหรือดูดซึมโอคราทอกซินเอโดยเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว *YPD* ที่เติมสารละลายมาตรฐานโอคราทอกซินเอ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน..... 102

ตารางที่ 19 การย่อยสลายอะฟลาทอกซินบี 1 ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว *YPD* ที่เติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ..... 103

ตารางที่ 20 การย่อยสลายโอคราทอกซินเอด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว *YPD* ที่เติมสารละลายมาตรฐานโอคราทอกซินเอ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ..... 104

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินแต่ละชนิด (X. Zhang et al., 2014) .....	10
รูปที่ 2 โครงสร้างของโอคราทอกซินชนิดต่าง ๆ (Köszegi & Poór, 2016).....	19
รูปที่ 3 องค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ (Anwar et al., 2017).....	41
รูปที่ 4 การทดสอบด้วยวิธี Dual culture .....	50
รูปที่ 5 วิธีการเจาะรูอาหารเลี้ยงเชื้อจากโคโลนีราเพื่อสกัดสารพิษจากรา .....	51
รูปที่ 6 ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการดูดซับหรือดูดซึมสารพิษจากราด้วยเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์ .....	56
รูปที่ 7 ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารพิษจากราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์.....	58
รูปที่ 8 การเจริญของ <i>A. flavus</i> M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี dual culture บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) <i>W. anomalus</i> MSCU 0652, (ค) <i>S. cerevisiae</i> MSCU 0654 และ (ง) <i>K. marxianus</i> MSCU 0655 .....	60
รูปที่ 9 การเจริญของ <i>A. carbonarius</i> TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี dual culture บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) <i>W. anomalus</i> MSCU 0652, (ค) <i>S. cerevisiae</i> MSCU 0654 และ (ง) <i>K. marxianus</i> MSCU 0655 .....	62
รูปที่ 10 การเจริญของ <i>A. flavus</i> M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Agar spot assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) <i>W. anomalus</i> MSCU 0652, (ค) <i>S. cerevisiae</i> MSCU 0654 และ (ง) <i>K. marxianus</i> MSCU 0655 .....	64
รูปที่ 11 การเจริญของ <i>A. carbonarius</i> TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Agar spot assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) <i>W. anomalus</i> MSCU 0652, (ค) <i>S. cerevisiae</i> MSCU 0654 และ (ง) <i>K. marxianus</i> MSCU 0655 .....	65

รูปที่ 12 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง mid log phase เพื่อยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion กลุ่ม A ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ กลุ่ม B ทดสอบน้ำด้วยเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *W. anomalus* MSCU 0652 (ค) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (ง) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ *K. marxianus* MSCU 0655..... 66

รูปที่ 13 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง late log phase เพื่อยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion กลุ่ม A ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ กลุ่ม B ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *W. anomalus* MSCU 0652 (ค) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (ง) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ *K. marxianus* MSCU 0655..... 67

รูปที่ 14 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง mid log phase เพื่อยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion กลุ่ม A ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ กลุ่ม B ทดสอบน้ำด้วยเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *W. anomalus* MSCU 0652 (ค) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (ง) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ *K. marxianus* MSCU 0655 ..... 67

รูปที่ 15 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง late log phase เพื่อยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion กลุ่ม A ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ กลุ่ม B ทดสอบน้ำด้วยเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *W. anomalus* MSCU 0652 (ค) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (ง) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ *K. marxianus* MSCU 0655 ..... 68

รูปที่ 16 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิบัติด้วยวิธี face to face double petri dish assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) *W. anomalus* MSCU 0652, (ค) *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ (ง) *K. marxianus* MSCU 0655..... 69

รูปที่ 17 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิบัติด้วยวิธี *face to face double petri dish assay* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) *W. anomalus* MSCU 0652, (ค) *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ (ง) *K. marxianus* MSCU 0655..... 71

รูปที่ 18 ลักษณะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 จากกล้อง *Scanning Electron Microscope (SEM)* เมื่อทดสอบผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของ *W. anomalus* MSCU 0652 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก, ข) ชุดควบคุมเมื่อเลี้ยงราเพียงอย่างเดียวที่กำลังขยาย 500 และ 1000 เท่า (ค, ง) ชุดทดสอบเมื่อเลี้ยงาร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 ที่กำลังขยาย 500 และ 1000 เท่า ลูกศรชี้เหลืองแสดงลักษณะเส้นใยของราที่เกิดรอยหยักและโป่งพอง ..... 73

รูปที่ 19 ลักษณะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของ *A. carbonarius* TK4.2 จากกล้อง *Scanning Electron Microscope (SEM)* เมื่อทดสอบผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของ *W. anomalus* MSCU 0652 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก, ข) ชุดควบคุมเมื่อเลี้ยงราเพียงอย่างเดียวที่กำลังขยาย 500 และ 1000 เท่า (ค, ง) ชุดทดสอบเมื่อเลี้ยงาร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 ที่กำลังขยาย 500 และ 1000 เท่า ลูกศรชี้เหลืองแสดงลักษณะเส้นใยของราที่ลึบแบนผิดปกติ..... 74

รูปที่ 20 โครมาโทแกรมของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายในสัดส่วนที่มากที่สุดที่ผลิตจากยีสต์ปฏิบัติทั้งสามชนิด..... 76

รูปที่ 21 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิบัติด้วยวิธี *face to face* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงยีสต์ที่แตกต่างกัน (ก-ง) ชุดควบคุม (จ-ซ) เลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 ..... 79

รูปที่ 22 การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิบัติด้วยวิธี *face to face double petri dish assay* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงยีสต์ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว) ..... 80

รูปที่ 23 การลดการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิบัติด้วยวิธี *face to face double petri*



*dish assay* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงยีสต์ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)..... 80

รูปที่ 24 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงยีสต์ที่แตกต่างกัน (ก-ง) ชุดควบคุม (จ-ซ) เลี้ยงร่วมกับ *W.* .... 83

รูปที่ 25 การยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงยีสต์ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)..... 84

รูปที่ 26 การลดการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงยีสต์ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)..... 84

รูปที่ 27 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* และบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน โดย (ก-ค) ชุดควบคุม (ง-ฉ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 37 (ช-ฉ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU (ญ-ฎ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 ..... 86

รูปที่ 28 การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)..... 87

รูปที่ 29 การลดการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)..... 87

รูปที่ 30 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* และบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน โดย (ก-ค) ชุดควบคุม (ง-ฉ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 (ช-ฉ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (ญ-ฎ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 ..... 90

- รูปที่ 31 การยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)..... 91
- รูปที่ 32 การลดการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว) ..... 91
- รูปที่ 33 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บนอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดย (ก-ค) ชุดควบคุม (ง-ฉ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *W. anomalous* MSCU 0652 (ช-ฉ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (ญ-ฎ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 ..... 94
- รูปที่ 34 การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face double petri dish assay* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)..... 95
- รูปที่ 35 การลดการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face double petri dish assay* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)..... 95
- รูปที่ 36 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บนอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดย (ก-ค) ชุดควบคุม (ง-ฉ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *W. anomalous* MSCU 0652 (ช-ฉ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (ญ-ฎ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 ..... 98
- รูปที่ 37 การยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว) ..... 99

รูปที่ 38 การลดการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ *YPD* ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว โดยมีความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ *YPD* ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว..... 99



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารพิษจากรา (mycotoxins) เป็นเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากราสายใยหลายชนิดซึ่งเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์ (Zain, 2011) ปัจจุบันมีสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารและอาหารสัตว์เป็นจำนวนมาก เช่น อะฟลาทอกซิน (aflatoxins) โอคราทอกซิน (ochratoxins) ไทรโคทีซีน (trichothecenes) ซีราลีโนน (zearalenone) และฟูโมนิซิน (fumonisins) เป็นต้น (Vettorazzi & Cerain, 2016) สารพิษจากราส่งผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์หลายประการ เช่น กระตุ้นอาการภูมิแพ้ ทำให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะต่าง ๆ รวมถึงเกิดความผิดปกติของทารกในครรภ์ และเป็นสารก่อมะเร็ง (Bennett & Klich, 2003)

อะฟลาทอกซิน (aflatoxins) เป็นหนึ่งในสารพิษจากราที่พบการปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรทั่วโลก ผลิตจากราในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* เช่น *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. nomius* (Z. Liu, Gao, & Yu, 2006) อะฟลาทอกซินแบ่งออกเป็นหลายชนิด ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี 1, บี 2, จี 1, จี 2, เอ็ม 1 และเอ็ม 2 (บิณฑวิหค, 2546) พบการปนเปื้อนในอาหารหลายชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าว ธัญพืช นม และผลไม้แห้งหลายชนิด The International Agency for Research on Cancer (IARC) จัดให้อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารที่ก่อมะเร็งในมนุษย์ (Murphy, Hendrich, Landgren, & Bryant, 2006) สารพิษจากราในสกุล *Aspergillus* ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ได้แก่ โอคราทอกซินเอ (ochratoxin A) ผลิตจากราในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* เช่น *A. ochraceus* และราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* เช่น *A. carbonarius* และ *A. niger* รวมทั้งราในสกุล *Penicillium* เช่น *Penicillium verrucosum* (Gupta, 2007) โอคราทอกซินเอปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรจำพวกธัญพืชเป็นหลัก (Vega et al., 2009) นอกจากนี้ ยังพบการปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟ ไวน์ เครื่องเทศ และเนื้อสัตว์ (Wolff et al., 2000) ในปี 1993 IARC ได้จัดให้อุคราทอกซินเออยู่ในกลุ่ม 2B คือ สารที่อาจก่อมะเร็งได้ในมนุษย์ (IARC., 1993)

การลดการปนเปื้อนสารพิษจากราในผลผลิตทางการเกษตรสามารถทำได้ทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว วิธีการชีวภาพเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน โดยเฉพาะการ

ใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ เช่น แบคทีเรีย รา และยีสต์ ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา (Janisiewicz & Korsten, 2002) ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เป็นที่นิยมใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพอย่างมาก เนื่องจากไม่สร้างสารพิษและไม่ก่อให้เกิดอาการภูมิแพ้ที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ (Droby & Chalutz, 1994) นอกจากนี้ ยีสต์ยังมีสารพันธุกรรมที่คงที่ สามารถเจริญได้ในภาวะที่หลากหลาย ต้องการสารอาหารที่ไม่ซับซ้อน และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งราได้ดีแม้ใช้ความเข้มข้นต่ำ (Wilson & Wisniewski, 1989) จากงานวิจัยในปี 2012 ของ Amando และคณะ รายงานว่า *Saccharomyces cerevisiae* เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. parasiticus* (M.R. Armando, Dogi, Rosa, Dalcerro, & Cavaglieri, 2012) และในปี 2013 รายงานว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ RC008 และ RC016 สามารถใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* และ *Fusarium gramineum* และลดการผลิตโอคราทอกซินเอ ซีราลีโนน และดีออกซินิวาลีนอลได้ (M. R. Armando et al., 2013)

ยีสต์มีกลไกสำคัญที่สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา ได้แก่ การแย่งพื้นที่ การเจริญและสารอาหาร การสร้างเมแทบอลิต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง และการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย จากงานวิจัยของ Zhu และคณะในปี 2015 พบว่า ยีสต์ที่คัดแยกจากองุ่นบางสายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* และ *A. ochraceus* จากการแย่งพื้นที่การเจริญกับราในการทดสอบโดยใช้องุ่น (Zhu, Shi, Jiang, & Liu, 2015) Janisiewicz และคณะ (2000) พบว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ซึ่งคัดแยกได้จากแอปเปิ้ลชนิดต่าง ๆ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aerobasidium pullulans* และ *Penicillium expansum* เมื่อเลี้ยงร่วมกันในน้ำแอปเปิ้ลที่มีการจำกัดสารอาหาร โดยยีสต์สามารถใช้กรดอะมิโนได้เร็วกว่าและยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้ (Janisiewicz, Tworkoski, & Sharer, 2000)

จากงานวิจัยของ Parafati และคณะ (2015) ศึกษาการควบคุมทางชีวภาพของ *S. cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* และ *A. pullulans* ต่อการเจริญของ *Botrytis cinera* ที่ทำให้เกิดโรคก้านเน่าในองุ่น พบว่า *A. pullulans* และ *W. anomalus* สามารถสร้างเอนไซม์  $\beta$ -1,3 กลูคาเนส ย่อยเพกทินและโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของรา (Parafati, Vitale, Restuccia, & Cirvilleri, 2015) Gil-Serna และคณะ (2011) ได้ศึกษาการกลไกของ *Debaryomyces hansenii* CYC 1244 ที่ลดการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. westerdijkiae* ที่พบปนเปื้อนในพริกปาปริก้า ด้วยการผลิตเอนไซม์บางชนิดที่มีผล

ยับยั้งยีน *pks* และ ยีน *p450-B03* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตโอคราทอกซินเอของรา โดยไปขัดขวางกระบวนการแสดงออกของยีน (Gil-Serna, Patiñoa, Cortés, M.T., & C., 2011)

จากรายงานของ Hua และคณะ (2014) ได้ศึกษาสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตได้จาก *Pichia anomala* ต่อการเจริญและการแสดงออกของยีนที่สร้างอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* ที่ปนเปื้อนอยู่ในเมล็ดแอลมอนต์ พบว่ายีสต์สามารถสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิดฟีนิล-2-เอทานอล ซึ่งมีผลยับยั้งการสร้างสปอร์ สามารถลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างอาร์เอ็นเอและโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของอะฟลาทอกซินจาก *A. flavus* นอกจากนี้ ผนังเซลล์ของยีสต์ยังสามารถดูดซับสารพิษจากราได้ (S.S.T. Hua, Beck, Sarreal, & Gee, 2014) Fialho และคณะ (2010) พบว่า *S. cerevisiae* สามารถสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญของ *Guignardia citricarpa* ที่ทำให้เกิดโรคจุดดำบนผลมะนาวได้มากถึง 87.2 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจาก *S. cerevisiae* เป็นสารจำพวกแอลกอฮอล์และเอสเทอร์ (Fialho, Toffano, Pozzobo, Augusto, & Florentino, 2010)

นอกจากนี้ ยีสต์ยังสามารถลดการปนเปื้อนของสารพิษจากราได้ เช่น จากรายงานของ Bejaoui และคณะ (2004) ได้ศึกษาความสามารถในลดการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอของ *S. cerevisiae* และ *S. bayanus* ที่ได้จากกระบวนการผลิตไวน์โดยแบ่งเป็นเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต และเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อนและเติมกรดไฮโดรคลอริกลงไป พบว่า ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อนและเติมกรดลงไปสามารถดูดซับโอคราทอกซินเอจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารโอคราทอกซินเอมาตรฐานได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ ความร้อนสามารถทำลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์และกรดสามารถย่อยพันธะไกลโคซิดิกที่เชื่อมหน่วยย่อยของพอลิแซ็กคาไรด์ทำให้มีพื้นที่ในการจับกับโอคราทอกซินเอได้มากขึ้น และเป็นการเพิ่มรูพรุนให้กับผนังเซลล์ทำให้มีตำแหน่งในการดูดซับสารพิษได้มากขึ้น (Bejaoui, Mathieu, Taillandier, & Lebrhi, 2004) และจากรายงานของ Péteri และคณะ (2007) พบว่า *Phaffia rhodozyma* สามารถสร้างเอนไซม์จำพวกคาร์บอกซีเพปติเดสซึ่งย่อยสลายโอคราทอกซินเอได้ด้วยการเปลี่ยนโครงสร้างของโอคราทอกซินเอให้อยู่ในรูปโอคราทอกซินอัลฟาที่มีความเป็นพิษน้อยลง (Peteri, Teren, Vagvolgyi, & Varga, 2007)

กวิณ เจริญรงค์ (2556) (เจริญรงค์, 2556) ได้คัดแยกยีสต์จากไซเลจข้าวโพด และ พีรพล มารุ่งเรือง (2559) (มารุ่งเรือง, 2559) นำยีสต์ที่คัดแยกได้มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินและโอคราทอกซินเอของ *A. flavus* และ *A. carbonarius* ตามลำดับ

พบว่ายีสต์ 3 ชนิด ได้แก่ *Wickerhamomyces anomalus* MSCU 0652, *Saccharomyces cerevisiae* MSCU 0654 และ *Kluyveromyces marxianus* MSCU 0655 สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราทั้งสองชนิดได้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดของยีสต์ที่ใช้ในการยับยั้งดังกล่าว ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกของยีสต์ปฏิปักษ์ที่คัดแยกได้จากไซเลจข้าวโพดต่อการต้านการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* และ *A. carbonarius*

## 1.2 วัตถุประสงค์

- 1) เพื่อศึกษาความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ที่คัดแยกได้จากไซเลจข้าวโพดต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* และ *A. carbonarius*
- 2) เพื่อศึกษากลไกหลักที่สำคัญของยีสต์ปฏิปักษ์แต่ละชนิดที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา *A. flavus* และ *A. carbonarius*
- 3) เพื่อศึกษาปัจจัยของสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อกลไกสำคัญของยีสต์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา *A. flavus* และ *A. carbonarius*

## บทที่ 2

### ปรีทัศน์วรรณกรรม

#### 2.1 ราและสารพิษจากรา

ราสายใย (filamentous fungi) หลายชนิด สามารถผลิตเมแทบอลิต์ทุติภูมิที่มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตอื่น เรียกว่า สารพิษจากรา (mycotoxins) (Niessen, 2018) ราสายใยที่สามารถผลิตสารพิษ (mycotoxigenic fungi) พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติและสามารถเจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น ในดิน เศษซากพืชซากสัตว์ เป็นต้น ปัจจุบันมีการค้นพบสารพิษจากรามากกว่า 500 ชนิด โดยมีสารพิษจากราที่มีความสำคัญ เช่น อะฟลาทอกซิน (aflatoxins) โอคธาทอกซิน (ochratoxins) ไทรโคทีซีน (trichothecenes) ซีราลีโนน (zearalenone) และฟูโมนิซิน (fumonisins) เป็นต้น (Haque et al., 2020) สารพิษจากราดังกล่าว สามารถปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร จึงเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ เช่น ทำให้เกิดอาการภูมิแพ้ มีความเป็นพิษต่ออวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น ตับ ไต เป็นต้น นอกจากนี้ สารพิษจากราหลายชนิดถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของสารก่อมะเร็ง (กลุ่ม 1) หรือสารที่อาจก่อมะเร็งได้ในมนุษย์ (กลุ่ม 2B) (CAST, 2003)

สารพิษจากรา (mycotoxins) มาจากคำว่า “myco” รวมกับ “toxin” ซึ่งมีรากศัพท์จากภาษากรีกคำว่า “mykes” หมายถึงรา และ “toxikon” ซึ่งหมายถึงสารพิษ (IARC., 1993) สารพิษจากราเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 700 ดาลตัน แต่สามารถออกฤทธิ์ได้แม้มีความเข้มข้นน้อย (Haschek & Voss, 2013) แม้ว่าในปัจจุบันจะมีการค้นพบสารพิษจากราหลากหลายชนิด แต่มีเพียงประมาณ 50 ชนิด เท่านั้นที่มีการศึกษาลักษณะสำคัญต่าง ๆ อย่างละเอียด ซึ่งมีสมบัติทางเคมีและความเป็นพิษที่แตกต่างกัน ได้แก่ โครงสร้างโมเลกุลของสารพิษ วิธีการสังเคราะห์สารพิษจากรา และผลกระทบต่อมนุษย์และสัตว์ที่แตกต่างกัน โครงสร้างของสารพิษจากราส่วนใหญ่จะถูกจัดอยู่ในพวกเปปไทด์แบบวงแหวน (cyclopeptides) กรดซีโตแบบสายยาว (polycetoacids) เทอปีน (terpenes) และ เมแทบอลิต์ของไนโตรเจน (nitrogenous metabolites) (Ferrante, Sciacca, & Gea, 2012)

โรคหรือลักษณะอาการที่เกิดจากสารพิษจากรา เรียกว่า mycotoxicosis ซึ่งส่งผลกระทบต่อหลายระบบในร่างกายขึ้นอยู่กับอวัยวะเป้าหมายของสารพิษจากรานั้น ๆ โดยทั่วไปแล้วมักพบการระบาดของโรคที่เกิดจากสารพิษจากราได้ในประเทศเขตร้อนได้มากกว่าเขตอื่น ๆ เนื่องจากปัจจัยทาง



สิ่งแวดล้อม เช่น ความชื้นและอุณหภูมิ มีความเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารพิษของรา (Peraica & Domijan, 2001) นอกจากนี้ ปัจจัยอื่น ๆ เช่น ระบบการจัดการที่ไม่มีประสิทธิภาพ ทำให้เกิดความเสียหายของผลผลิตทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งช่วยส่งเสริมให้ราเจริญและสร้างสารพิษได้ มนุษย์และสัตว์สามารถรับเอาสารพิษจากราเข้าสู่ร่างกายได้หลายวิธี ได้แก่ การกิน การหายใจ และผ่านการสัมผัสทางผิวหนัง โดยมีอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายเป็นเป้าหมายของสารพิษจากรา (Coppock & Jacobsen, 2009) กลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษจากรามีทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง โดยแบบเฉียบพลันสามารถทำให้เกิดอันตรายต่อชีวิตได้ในระยะเวลาอันสั้น และแบบเรื้อรังจะทำให้เกิดการสะสมของสารพิษจากราบริเวณอวัยวะเป้าหมาย เช่น ตับ ปอด ไต ระบบประสาทส่วนกลาง และระบบภูมิคุ้มกัน จนเกิดเป็นอาการของโรค ได้แก่ ระบบภูมิคุ้มกันผิดปกติ เป็นพิษต่อระบบประสาท เป็นพิษต่อผิวหนัง เป็นสาเหตุของโรคมะเร็ง จนนำไปสู่การเสียชีวิตในที่สุด (Bennett & Klich, 2003)

## 2.2 การปนเปื้อนสารพิษจากราในอาหาร

ราที่ผลิตสารพิษสามารถเจริญและผลิตสารพิษในอาหารได้หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 1 ดังนั้น ทั่วโลกจึงให้ความสนใจและตระหนักถึงผลเสียต่อสุขภาพอนามัยที่จะมีผลตามมา องค์การอนามัยโลกได้มีข้อกำหนดเกณฑ์มาตรฐานการปนเปื้อนในอาหารหลากหลายชนิด ((FAO), 2004) ซึ่งในปัจจุบันกว่า 77 ประเทศทั่วโลก ได้มีข้อกำหนดปริมาณสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารเพื่อควบคุมปริมาณสารพิษจากราในผลผลิตทางการเกษตรทั้งนำเข้าและส่งออก (van Egmond, Schothorst, & Jonker, 2007)

สำหรับในประเทศไทยนั้น มีปริมาณการปนเปื้อนของสารพิษจากราที่ตรวจพบได้ในอาหารหลายชนิด ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง เนื้อสัตว์ นมวัว เครื่องเทศ ถั่วต่างๆ และเมล็ดกาแฟ เป็นต้น (Songsermsakul, 2015) ดังนั้น ในประเทศไทยจึงมีกฎหมายเพื่อเป็นข้อกำหนดร่วมกันเกี่ยวกับปริมาณสารพิษจากราสูงสุดที่สามารถพบได้ในวัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารและอาหารสัตว์ และมีร่างข้อกำหนดเกี่ยวกับมาตรฐานสารปนเปื้อนจากเชื้อราขึ้น เพื่อปรับปรุงให้ครอบคลุมสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารหลากหลายชนิด โดยอ้างอิงจาก คณะกรรมาธิการของโครงการมาตรฐานอาหาร FAO/WHO และกำหนดปริมาณสารพิษจากเชื้อราปนเปื้อนสูงสุดตาม GENERAL STANDARD FOR

CONTAMINANTS AND TOXINS IN FOOD AND FEED; CODEX STAN 193-1995 ปี 2017 ดัง  
แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ตัวอย่างราและสารพิษจากราที่พบการปนเปื้อนในอาหารชนิดต่าง ๆ

สารพิษจากรา	ตัวอย่างของราที่ผลิต สารพิษ	ตัวอย่างอาหารที่พบ การปนเปื้อน	ประเทศที่พบการ ปนเปื้อน	อ้างอิง
อะฟลาทอกซินบี 1และบี 2	<i>A. flavus</i>	ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี	ตุรกี บราซิล	(Mahato et al., 2019
	<i>A. parasiticus</i>	แอลมอนต์ พริก แป้ง	สหรัฐอเมริกา ยุโรป	
	<i>A. nomius</i>	ข้าวโพด ถั่วต่างๆ	อินเดีย ญี่ปุ่น จีน	
	<i>A. astellatus</i>	ผลไม้แห้ง เครื่องเทศ	ไต้หวัน มาเลเซีย	
อะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 และเอ็ม 2	<i>A. flavus</i>	นม และผลิตภัณฑ์	ตุรกี เซอร์เบีย กรีซ	(Iqbal, Jinap, Pirouz, & Faizal, 2015)
	<i>A. parasiticus</i>	จากนม	อิหร่าน อิตาลี จีน	
	<i>A. nomius</i>			
ฟูโมนิซิน	<i>F. verticillioides</i>	ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์	เซอร์เบีย	(Scott, 2012)
	<i>F. proliferatum</i>	ข้าวฟ่าง ข้าวโอ๊ต	แอฟริกาใต้ ญี่ปุ่น	
	<i>F. ramigenum</i>	ขนมปังที่ทำจากข้าว- สาลี ข้าวโพด	สหรัฐอเมริกา อิตาลี	
	<i>F. oxysporum</i>		สเปน บราซิล อา เจนตินา เยอรมัน	
โอคราทอกซินเอ	<i>A. ochraceus</i>	เมล็ดกาแฟ ธัญพืช	โปแลนด์ เกาหลี	(Duarte, Pena, & Lino, 2010)
	<i>A. carbonarius</i>	ถั่วเหลือง องุ่น	ญี่ปุ่น เอธิโอเปีย	
	<i>P. verrucosum</i>	เครื่องเทศ เปียร์ ไวน์ โกโก้ ผัก เนื้อสัตว์ ซีส	โครเอเชีย	
ดีออกซิวัลลีโนล	<i>F. graminearum</i>	ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว	แคนาดา อินเดีย จีน	(Mishra, 2020)
	<i>F. culmorum</i>	บาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ธัญพืชต่างๆ เปียร์	โปรตุเกส เซอร์เบีย อินเดีย บราซิล	

ตารางที่ 1 ตัวอย่างราและสารพิษจากราที่พบการปนเปื้อนในอาหารชนิดต่างๆ (ต่อ)

สารพิษจากรา	ตัวอย่างของราที่ผลิตสารพิษ	ตัวอย่างอาหารที่พบการปนเปื้อน	ประเทศที่พบการปนเปื้อน	อ้างอิง
ซีราลีโนน	<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i>	ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ธัญพืช ผลไม้อบแห้ง เปียร์ เนื้อสัตว์	สวีตเซอร์แลนด์ สหราชอาณาจักร อาเจนตินา บราซิล สหรัฐอเมริกา	(Zinedine, Soriano, Moltó, & Mañes, 2007)
พาทุลิน	<i>P. expansum</i> <i>P. antarcticum</i>	แอปเปิ้ล แพร์ องุ่น เซอร์รี่ พลัม ส้ม บลูเบอร์รี่ สตอเบอร์รี่ ผลไม้ประเภทแต่ง	ออสเตรเลีย ออสเตรีย บราซิล แคนาดา ฝรั่งเศส อิหร่าน อิตาลี ญี่ปุ่น	(da Sliva et al., 2007)

ตารางที่ 2 ร่างประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง มาตรฐานสารปนเปื้อนในอาหารเนื่องจากสารพิษจากรา ตาม CODEX STAN 193-1995 ปี 2017

ชนิดของสารพิษจากรา	ชนิดของอาหารที่พบการปนเปื้อน	ปริมาณสูงสุดที่กำหนด (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
อะฟลาทอกซินทั้งหมด	บราซิลนัต พิสทาซิโอ เมล็ดถั่วลิสง แอลมอนด์ เฮเซลนัต พริกแห้ง	15
	บราซิลนัต พิสทาซิโอ แอลมอนด์ เฮเซลนัต พว้อมบริโภค	10
	น้ำมันและไขมัน น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันมะพร้าว และอาหารอื่นๆ	20
อะฟลาทอกซินเอ็ม 1	น้ำมันจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิดที่ไม่ผ่านการปรุงแต่ง	0.5
ดีออกซินิวาลีนอล	แบ่งที่ได้จากเมล็ดและเกล็ดของข้าวสาลี ข้าวโพด หรือข้าวบาร์เลย์	1,000

ตารางที่ 2 ร่างประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง มาตรฐานสารปนเปื้อนในอาหารเนื่องจากสารพิษจากรา ตาม CODEX STAN 193-1995 ปี 2017 (ต่อ)

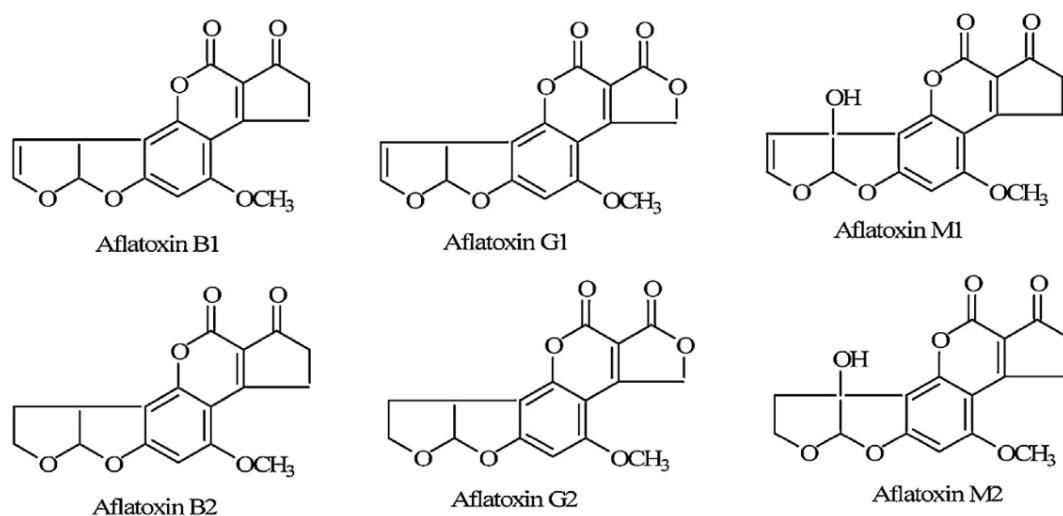
ชนิดของสารพิษจากรา	ชนิดของอาหารที่พบการปนเปื้อน	ปริมาณสูงสุดที่กำหนด (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
ฟูโมนิซินบี 1 และบี 2	เมล็ดข้าวโพดดิบ	4,000
โอคราทอกซินเอ	ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรย์ ข้าวสาลีแบบดิบ	5
	พริกแห้งและพริกป่น	30
	เมล็ดกาแฟดิบ	20

ที่มา : ดัดแปลงจากร่างประกาศกระทรวงสาธารณสุข (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2561)

### 2.3 อะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่ผลิตจากราสายใยในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* เช่น *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. nomius* เป็นต้น (Payne & Brown, 1998) ราเหล่านี้เจริญและผลิตอะฟลาทอกซินได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในสภาวะแวดล้อมหลากหลาย รวมทั้งในผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด (Bayman & Cotty, 1993) *A. flavus* เป็นราที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินที่สำคัญที่สุด และพบการปนเปื้อนของราชนิดนี้ในอาหารมนุษย์และสัตว์หลายประเภท เช่น ข้าว แป้งสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ไร่ข้าว ถั่วต่าง ๆ เครื่องเทศต่าง ๆ รวมทั้งผลไม้แห้ง (Haschek & Voss, 2013) อะฟลาทอกซินถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1960 จัดเป็นอนุพันธ์ในกลุ่มบิสฟูรานพอลิไซคลิกเมแทบอไลต์ โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มหลัก ตามลักษณะการเรืองแสงภายใต้รังสียูวี ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี 1 ( $C_{17}H_{12}O_6$ ) และ อะฟลาทอกซินบี 2 ( $C_{17}H_{14}O_6$ ) ซึ่งเรืองแสงสีน้ำเงินภายใต้รังสียูวี อะฟลาทอกซินจี 1 ( $C_{17}H_{12}O_7$ ) และอะฟลาทอกซินจี 2 ( $C_{17}H_{14}O_7$ ) ซึ่งเรืองแสงสีเขียวภายใต้รังสียูวี (Asao et al., 1963) นอกจากนี้ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถเปลี่ยนอะฟลาทอกซินบี 1 และบี 2 ให้เป็นอนุพันธ์ใหม่ คือ อะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ( $C_{17}H_{12}O_7$ ) และอะฟลาทอกซินเอ็ม 2 ( $C_{17}H_{14}O_7$ )

ตามลำดับ ด้วยกระบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกาย (Wacco, Wendiro, Vuzi, & Hawumba, 2014) ทั้งนี้ อะฟลาทอกซินบี 1 มีความเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์มากที่สุด เนื่องจากเป็นอะฟลาทอกซินชนิดที่สามารถทำให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง และยังจัดเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์และสัตว์หลายชนิด (Baird et al., 2006) โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินแต่ละชนิด (X. Zhang et al., 2014)

### 2.3.1 ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินทำให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายของมนุษย์และสัตว์แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับอวัยวะเป้าหมาย ปริมาณ และระยะเวลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินเข้าสู่ร่างกาย (Dhanasekaran, Shanmugapriya, Thajuddin, & Panneerselvam, 2011) ดังนั้น หากได้รับอะฟลาทอกซินเข้าสู่เซลล์ในปริมาณมากในช่วงเวลาสั้น ๆ อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบฉับพลัน แต่หากได้รับอะฟลาทอกซินเข้าไปสะสมในร่างกายปริมาณเล็กน้อยและมีระยะเวลาในการสะสมยาวนานอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบเรื้อรัง และกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด (Wogan, 1966)

ในปี 1993 สำนักงานวิจัยมะเร็งระหว่างประเทศ หรือ International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้ทดสอบโอกาสการเกิดมะเร็งเนื่องจากได้รับอะฟลาทอกซินเมื่อทดลองในกลุ่มของสัตว์ตัวอย่างพบว่า อะฟลาทอกซินบี 1 และจี 1 ทำให้เกิดมะเร็งในกลุ่มสัตว์ทดลอง

และในปี 2002 IARC ได้จัดอะฟลาทอกซินปี 1 เป็นสารก่อมะเร็งกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ ต่อมาในปี 2012 มีการศึกษาความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินในมนุษย์ โดยอะฟลาทอกซินนั้นสามารถทำให้เกิดมะเร็งในเซลล์ตับของมนุษย์ ซึ่งเป็นผลมาจากอะฟลาทอกซินมีความเป็นพิษต่อการแสดงออกของยีน TP53 และทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ผิดปกติจนเกิดการกลายพันธุ์และเป็นเซลล์มะเร็ง (Ostry, Malir, Toman, & Grosse, 2017) ดังนั้น IARC จึงกำหนดให้อะฟลาทอกซินทุกชนิดเป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่มที่ 1 ซึ่งมีความสำคัญมากที่สุดเพราะเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (IARC, 2012) ทั้งนี้ อะฟลาทอกซินปี 1 เป็นอะฟลาทอกซินชนิดที่มีความรุนแรงมากที่สุด เพราะนอกจากจะทำให้เกิดมะเร็งในตับหรือ Hepatocellular carcinoma (HCC) แล้ว ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันและภาวะการขาดสารอาหารเนื่องจากเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อในลำไส้เล็กส่งผลให้การดูดซึมสารอาหารของร่างกายแย่งลง และทำให้ร่างกายเจริญเติบโตช้าที่สุดในที่สุด (Rushing & Selim, 2019)

ผลกระทบจากการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินโดยเฉพาะอะฟลาทอกซินปี 1 ในอาหารที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ ภาวะการขาดแคลนสารอาหาร ซึ่งส่งผลทั้งในมนุษย์และสัตว์ จากรายงานของ de Vries และคณะ (1990) พบว่า ประชากรวัยเด็กในประเทศแถบแอฟริกาโดยเฉพาะเด็กที่เป็นโรคขาดโปรตีนอย่างรุนแรงชนิดมาราสมัสและควาซิออร์กอร์ มักพบปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ปนอยู่ในเลือดสูงกว่าปกติ โดยพบว่าอะฟลาทอกซินปี 1 เป็นสารเมแทบอลไลต์หลักในผู้ป่วยโรคมาราสมัสและความชิออร์กอร์ (de Vries, Maxwell, & Hendrickse, 1990) เช่นเดียวกับงานวิจัยในประเทศเคนย่า ไนจีเรีย แอฟริกาใต้ ที่พบว่าผู้ป่วยจากโรคขาดโปรตีนรุนแรงมีระดับของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ปนเปื้อนในร่างกายสูง จึงสรุปได้ว่า การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินปี 1 ที่เกิดขึ้น มีความสัมพันธ์กับภาวะการขาดแคลนสารอาหารของร่างกายอย่างรุนแรง เนื่องจากอะฟลาทอกซินปี 1 สามารถทำลายเนื้อเยื่อของผนังลำไส้เล็ก ทำให้เกิดความผิดปกติในการดูดซึมสารอาหาร (Lampugh & Hendrickse, 1982) (Tchana, Moundipa, & Tchouanguep, 2010)

นอกจากนี้ การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินปี 1 ในร่างกาย ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตลดลง เด็กที่มีการเจริญเติบโตช้าหรือมีภาวะแคระแกร็นมาจากการมีอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในเลือด ซึ่งสามารถรับเข้าสู่ร่างกายตั้งแต่อยู่ในครรภ์มารดาที่พบอะฟลาทอกซินในเลือด (Abdulrazzaq, Osman, Yousif, & Al-Falahi, 2003) ส่งผลให้ทารกที่คลอดออกมามีปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ในเลือดสูงด้วย นอกจากนี้ การได้รับอะฟลาทอกซินปี 1 เข้าสู่ร่างกายตั้งแต่ในวัยแรกเกิดมีความสัมพันธ์

ต่อการเจริญเติบโตแบบผิดปกติ โดยอะพลาทอกซินปี 1 เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการเจริญเติบโตลดลงซึ่งพบในเด็กในช่วงอายุมากกว่า 3 ปี ขึ้นไป (Shuaib et al., 2010) ทั้งนี้ สาเหตุสำคัญที่ทำให้อะพลาทอกซินปี 1 ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโต เนื่องมาจากอะพลาทอกซินปี 1 สามารถทำลายเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้เล็ก ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ร่างกายไม่สามารถดูดซึมสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้ จึงทำให้เกิดภาวะแคระแกรนในที่สุด (Campbell, Elia, & Lunn, 2003)

อะพลาทอกซินปี 1 มีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย ทำให้เกิดการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายต่ำลง จากงานวิจัยของ Turner และคณะ, 2003 พบว่า อะพลาทอกซินปี 1 ลดความสามารถในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายได้ โดยทดสอบกับเด็กที่มีอะพลาทอกซินปี 1 ปนเปื้อนอยู่ในกระแสเลือด ซึ่งส่งผลให้ระดับของ IgA ที่ตรวจจากน้ำลายมีระดับที่ลดลง นอกจากนี้ ยังส่งผลให้ CD3<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> T cell และ B cell ซึ่งมีส่วนสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมีจำนวนลดลง เป็นผลให้เกิดการติดเชื้อจากภายนอกได้ง่ายขึ้น (Turner, Moore, Hall, Prentice, & Wild, 2003) และพบว่า ในผู้ป่วยที่มีการปนเปื้อนของอะพลาทอกซินปี 1 ในร่างกายมีโอกาสที่จะติดเชื้อ HIV ได้ง่ายกว่าคนที่ไม่มีการปนเปื้อนของอะพลาทอกซินปี 1 (Y. Jiang et al., 2005)เช่นเดียวกับสัตว์ที่มีการปนเปื้อนของอะพลาทอกซินปี 1 ในกระแสเลือดพบว่า อะพลาทอกซินปี 1 ลดความสามารถในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายสัตว์ได้ (Qian et al., 2014)

อะพลาทอกซินเอ็ม 1 สามารถปนเปื้อนได้ในน้ำนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเฉพาะหากพบการปนเปื้อนในน้ำนมของมนุษย์ ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของทารก อาจส่งผลกระทบต่อพัฒนาการทางร่างกายของเด็กได้ (Gong, Watson, & Routledge, 2016) จากงานวิจัยของ Mahdavi และคณะ (2010) ได้เก็บตัวอย่างน้ำนมของหญิงให้นมบุตรจากในเมืองและชนบทจากประเทศอิหร่านพบว่า หญิงชนบท 20 คน จาก 91 คน มีอะพลาทอกซินเอ็ม 1 ปนเปื้อนในน้ำนม และตรวจพบการสะสมของอะพลาทอกซินเอ็ม 1 ในทารกหลังคลอด นอกจากนี้ อะพลาทอกซินเอ็ม 1 มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของทารกด้านความสูงมากกว่าน้ำหนักตัวอย่างมีนัยสำคัญ (Mahdvi, Nikniaz, Arefhosseini, & Jabbari, 2010)

ความเป็นพิษของอะพลาทอกซินปี 1 ที่สะสมในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น วัว อาจส่งผลกระทบต่อระบบการทำงานของร่างกายหลายประการทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง เช่น เบื่ออาหาร เกิดความเครียด น้ำหนักตัวลดลง เชื้องซึม ท้องร่วง ภูมิคุ้มกันของร่างกายลดลง และส่งผลให้คุณภาพและปริมาณของน้ำนมที่ผลิตได้ลดลง นอกจากนี้ ยังสัมพันธ์กับความเข้มข้นของอะพลาทอกซินเอ็ม 1 ใน

น้ำนมที่ปนเปื้อนตามปริมาณความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 ที่สะสมในร่างกายของวัวอีกด้วย (Dhanasekaran et al., 2011)

### 2.3.2 การปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน

ราในสกุล *Aspergillus* สามารถเจริญในสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศที่หลากหลาย จึงพบปัญหาการปนเปื้อนของราที่ผลิตอะฟลาทอกซินได้ทั่วโลก (Klich, 2007) และพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ในอาหารหลายประเภท โดยเฉพาะในธัญพืชต่าง ๆ เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ถั่ว เมล็ดฝ้ายและเครื่องเทศ นอกจากนี้ ยังพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในผลไม้สด เช่น ส้ม แอปเปิ้ล อินทผาลัม และผลไม้แห้ง เช่น มะเดื่อแห้ง ลูกเกด เป็นต้น (Al-Jaal, Salama, Al-Qasmi, & Jaganjac, 2019) ในประเทศที่กำลังพัฒนาและด้อยพัฒนา เช่น อินเดียและเอธิโอเปีย มักพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารจนเกิดการปนเปื้อนเป็นวงกว้างไปทั่วประเทศ เป็นผลให้ประชากรในประเทศนั้นบร้อยเสียชีวิตจากพิษของอะฟลาทอกซินบี 1 แบบเฉียบพลัน (Probst, Njapau, & Cotty, 2007) เช่นเดียวกับประเทศกำลังพัฒนา เช่น บราซิล อิหร่าน ตุรกี และประเทศไทย พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในอาหารได้ทั่วไปในระดับต่ำ ซึ่งส่งผลให้เกิดความเสี่ยงในการได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 เข้าสู่ร่างกายจนมีการออกฤทธิ์แบบเรื้อรังในที่สุด (Shepherd, 2003) ตัวอย่างอาหารและปริมาณอะฟลาทอกซินที่พบการปนเปื้อนในประเทศต่าง ๆ และประเทศไทย แสดงในตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ



ตารางที่ 3 การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหารจากประเทศต่าง ๆ

ประเทศ	ชนิดของ อะฟลาทอกซิน	อาหาร	ปริมาณ อะฟลาทอกซินที่พบ (ไมโครกรัมต่อ กิโลกรัม)	อ้างอิง
กรีซ	อะฟลาทอกซินเอ็ม 1	นม	0.005 – 0.02	(Tsakiris et al., 2013)
เกาหลีใต้	อะฟลาทอกซินรวม	เนยถั่ว	7.03 – 7.68	(Chun et al., 2007)
จีน	อะฟลาทอกซินบี 1	ข้าว	0.10 - 136.80	(Sun et al., 2011)
ตุรกี	อะฟลาทอกซินบี 1	แอลมอนต์	1.00 - 13.00	(Gürses, 2006)
ไต้หวัน	อะฟลาทอกซินรวม	ธัญพืช	0.0 – 4.8	(Yu et al., 2011)
บราซิล	อะฟลาทอกซินรวม	ถั่วลิสง	0.60 - 31.50	(Milhome et al., 2014)
ฟิลิปปินส์	อะฟลาทอกซินรวม	มะพร้าว	5 – 32.5	(Rustia et al., 2011)
มาเลเซีย	อะฟลาทอกซินรวม	พริกไทย	0.1 – 25.8	(Jalili et al., 2010)
เวียดนาม	อะฟลาทอกซินรวม	ข้าว	0.0 – 29.8	(Nguyen et al., 2007)
สหรัฐอเมริกา	อะฟลาทอกซินบี 1	เครื่องเทศ	น้อยกว่า 2.00	(Singh & Cotty, 2017)
อิหร่าน	อะฟลาทอกซินเอ็ม 1	โยเกิร์ต	0.006 - 0.021	(Bahrami, Shahbazi, & Nikousefat, 2016)
อินเดีย	อะฟลาทอกซินบี 1	ข้าวโพด	48.00 - 383.00	(Mudili et al., 2014)
อินโดนีเซีย	อะฟลาทอกซินรวม	ซอสถั่วลิสง	0.5 – 19.5	(Saparmo et al., 2011)
เอธิโอเปีย	อะฟลาทอกซินรวม	ถั่วลิสง	15.00 – 11,900.00	(Chala, Mohammed, Ayalew, & Skinnes, 2013)

ตารางที่ 4 การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหารจากประเทศไทย

ชนิดของอะฟลาทอกซิน	อาหาร	ปริมาณอะฟลาทอกซินที่พบ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
อะฟลาทอกซินรวม	ข้าว	0.16
	ข้าวเหนียว	25.43
	พริกป่น	14.18
	พริกแห้ง	6.62
	ถั่วลิสง	1.43
อะฟลาทอกซินบี 1	อาหารสัตว์	15.35

ที่มา : ดัดแปลงจา (Tansakul, Limsuwan, Bohm, Hollmann, & Razzazi-Fazeli, 2013; Tulayakul & Konishi, 2017)

ทั้งนี้ การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหารนั้นเป็นเรื่องที่ควบคุมได้ยากอันเนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิและความชื้น ซึ่งราที่ผลิตอะฟลาทอกซินเจริญและผลิตอะฟลาทอกซินที่ความชื้นแตกต่างกันออกไป เช่น *A. flavus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซิน คือ 35 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่ค่าวอเตอร์แอกทิวิตีเท่ากับ 0.95 และ *A. parasiticus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตที่ 33 องศาเซลเซียส และเจริญได้ดีที่ค่าวอเตอร์แอกทิวิตีเท่ากับ 0.99 ดังนั้น ราที่ผลิตอะฟลาทอกซินมีการแพร่กระจายมากที่สุดในประเทศแถบแอฟริกาและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Y. Liu & Wu, 2010)

สำหรับในประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดมาตรการควบคุมผลิตภัณฑ์อาหารที่นำเข้าและส่งออก เพื่อป้องกันการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน โดยเฉพาะอะฟลาทอกซินบี 1 โดยมีการควบคุมที่เข้มงวดในขั้นตอนการเก็บวัตถุดิบ ซึ่งจะช่วยลดการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ในขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยวได้อย่างดี อย่างไรก็ตาม เพื่อควบคุมการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหาร หลายประเทศจึงมีข้อกำหนดและกฎหมายเพื่อควบคุมปริมาณการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหาร เช่น ข้อกำหนดของคณะกรรมการยุโรปหรือ European Commission (EU) ที่มีข้อตกลงเพื่อควบคุมการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินที่ใช้ร่วมกันในประเทศสมาชิกและอีกหลายประเทศ ดังแสดงในตารางที่ 5 และ 6 (EU, 2006b)

สำหรับในประเทศไทยมีกฎหมายที่ใช้ควบคุมปริมาณสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหาร ซึ่งบัญญัติไว้ในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 ในหัวข้อมาตรฐานสารอาหารที่มีสารปนเปื้อน โดยระบุไว้ว่าห้ามให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินทุกชนิดในอาหารเกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ปัจจุบันได้มีร่างประกาศกระทรวงสาธารณสุขขึ้น เพื่อเตรียมใช้กำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินที่มีความหลากหลายของชนิดอาหารมากยิ่งขึ้น ได้แก่ แอลมอนด์ พิสทาชิโอ ถั่วบราซิล เฮเซลนัท ห้ามให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินเกิน 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เมล็ดข้าวโพดที่ผ่านการทำให้แห้ง และพริกแห้ง ห้ามให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินทุกชนิดเกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม น้ำมันและไขมัน น้ำมันถั่วลิสง น้ำมันมะพร้าว และอาหารอื่น ๆ ห้ามมีเกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2561) นอกจากนี้ ยังมีข้อกำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ ตามประกาศของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยห้ามมีอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในข้าวโพดทั้งแบบผลและเมล็ดซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการทำอาหารสัตว์เกิน 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2537)

**ตารางที่ 5** ข้อกำหนดการควบคุมปริมาณอะฟลาทอกซินที่พบในอาหารชนิดต่างๆ ได้สูงสุด โดยคณะกรรมการยุโรป (*European Commission, EU*)

ชนิดของอาหาร	ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม สูงสุด (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
ถั่วลิสง เมล็ดพืชที่ใช้ผลิตน้ำมัน แอลมอนด์ พิสทาชิโอ เฮเซลนัท ที่ผ่านกระบวนการทางกายภาพก่อนผลิตเป็นอาหาร	15
ผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง เมล็ดพืชที่ใช้ผลิตน้ำมัน พร้อมบริโภครวม	4
ผลิตภัณฑ์จากแอลมอนด์ พิสทาชิโอ เฮเซลนัท พร้อมบริโภครวม	10
ผลไม้แห้งที่ผ่านกระบวนการทางกายภาพก่อนผลิตอาหาร	10
ผลไม้แห้งและผลิตภัณฑ์จากผลไม้แห้งพร้อมบริโภครวม	4

**ตารางที่ 5** ข้อกำหนดการควบคุมปริมาณอะฟลาทอกซินที่พบในอาหารชนิดต่างๆ ได้สูงสุด โดย คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission, EU) (ต่อ)

ชนิดของอาหาร	ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม สูงสุด (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
ธัญพืชทุกชนิดและผลิตภัณฑ์จากธัญพืช	4
ข้าวและข้าวโพดที่ใช้ประกอบอาหาร	10
เครื่องเทศ เช่น พริกต่าง ๆ พริกป่น พริกไทย ขิง ขมิ้น จันทน์เทศ	10
ธัญพืชที่ใช้ผลิตอาหารสำหรับเด็ก	0.10
อาหารที่ผลิตขึ้นเพื่อใช้ทางการแพทย์	0.10
นมดิบ นมที่ผ่านการให้ความร้อน และผลิตภัณฑ์จากนม	0.05 (AFM <sub>1</sub> )

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

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

**ตารางที่ 6** ตัวอย่างข้อกำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมสูงสุดที่สามารถพบได้ในอาหารประเภทต่าง ๆ ตามข้อกำหนดของแต่ละประเทศ

ประเทศ	ประเภทของอาหาร	ปริมาณอะฟลาทอก ซินรวม สูงสุดที่ยอมรับได้ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
เกาหลีใต้	ธัญพืชและผลิตภัณฑ์จากธัญพืช ผลไม้แห้ง	15
แคนาดา	ถั่วและผลิตภัณฑ์จากถั่ว	15
จีน	ข้าวโพดและผลิตภัณฑ์จากข้าวโพด	20
ชิลี	อาหารทุกชนิด	5

**ตารางที่ 6** ตัวอย่างข้อกำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินรวมสูงสุดที่สามารถพบได้ในอาหารประเภทต่าง ๆ ตามข้อกำหนดของแต่ละประเทศ (ต่อ)

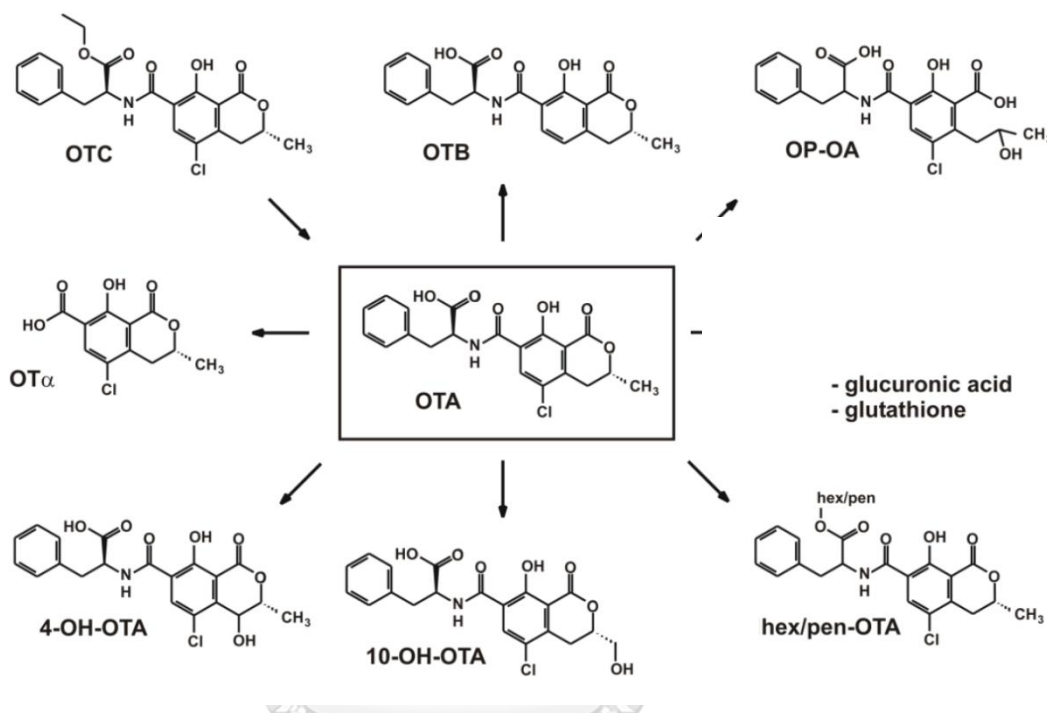
ประเทศ	ประเภทของอาหาร	ปริมาณอะฟลาทอกซินรวม สูงสุดที่ยอมรับได้ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
ญี่ปุ่น	อาหารทุกชนิด	10
ฟิลิปปินส์	อาหารสำหรับมนุษย์	20
มาเลเซีย	อาหารทุกชนิด	35
เม็กซิโก	ธัญพืชและผลิตภัณฑ์จากธัญพืช	20
สหภาพยุโรป	ถั่วต่าง ๆ ธัญพืช ผลไม้แห้ง ที่เป็นวัตถุดิบประกอบอาหาร	4
สหรัฐอเมริกา	อาหารทุกชนิด ยกเว้น นม	20
สิงคโปร์	อาหารทุกชนิด	5
อินเดีย	อาหารทุกชนิด	30
อินโดนีเซีย	อาหารทุกชนิด	35
ฮ่องกง	ถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง	20

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก (Ismail et al., 2018)

## 2.4 โอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่เป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์ ผลิตจากราสายในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* เช่น *A. carbonarius* และ *A. niger* *Aspergillus* section *Circumdati* เช่น *A. ochraceus* และ *A. melleus* (Chulze, Magnoli, & Dalcerro, 2006) รวมทั้ง ราในสกุล *Penicillium* เช่น *P. verrucosum* และ *P. nordicum* (Castella et al., 2002) โอคราทอกซินแบ่งได้หลายชนิด ตามลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่แสดงในรูปที่ 2 เช่น โอคราทอกซินเอ (OTA) โอคราทอกซินบี (OTB) โอคราทอกซินซี (OTC) โอคราทอกซินแอลฟา (OT $\alpha$ ) และ 4-ไฮดรอกซีโอคราทอกซินเอ (4-OH OTA) เป็นต้น ซึ่งโครงสร้างโมเลกุลจะประกอบไปด้วยอนุพันธ์ของพอลิคีไทด์ และมีส่วนของไดไฮโดรไอโซคูมารินเชื่อมต่อกับพันธะเอมีนกับแอล-ปีตา-ฟีนิลอะลานีน ซึ่งจะแตกต่างกันออกไปแล้วแต่ชนิดของโอคราทอกซิน (Ringot, Chango, Schneider, & Larondelle, 2006)

โอคราทอกซินเอเป็นชนิดที่มีความเป็นพิษมากที่สุด ถูกค้นพบครั้งแรกว่าผลิตจาก *A. ochraceus* สูตรโมเลกุลของโอคราทอกซินเอ คือ  $C_{20}H_{18}O_6NCl$  มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 403.82 กรัมต่อโมล รูปร่างเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น ทนต่อความร้อน สามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่มีขั้ว



รูปที่ 2 โครงสร้างของโอคราทอกซินชนิดต่าง ๆ (Köszegi & Poór, 2016)

#### 2.4.1 ความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเอสามารถเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์และสัตว์ผ่านระบบทางเดินอาหาร จากการรับประทานอาหารที่มีสปอร์ของราที่สามารถสร้างโอคราทอกซินเอได้ หรือจากอาหารที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอโดยตรง (Duarte, Lino, & Pena, 2012) นอกจากนี้ ยังสามารถแพร่เข้าสู่ร่างกายของมนุษย์และสัตว์ผ่านระบบทางเดินหายใจได้ โดยปนเปื้อนมาจากราที่เจริญได้ในที่อยู่อาศัยที่มีความชื้น และที่ปะปนมากับฝุ่นละออง (Hope & Hope, 2012) โอคราทอกซินเอเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์โดยเฉพาะเป็นพิษต่อไตซึ่งเป็นอวัยวะเป้าหมายหลัก กัดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (EFSA, 2006) และถูกจัดเป็นสารที่อาจก่อมะเร็งในมนุษย์ กลุ่ม 2B (IARC., 1993) นอกจากนี้ โอครา

ทอกซินเอสามารถยับยั้งกระบวนการต่าง ๆ ที่สำคัญในร่างกาย เช่น กระบวนการสังเคราะห์โปรตีน และสามารถทำลาย DNA ในเซลล์ได้ (Pfohl-Leskowicz & Manderville, 2007)

เมื่อร่างกายได้รับโอคราทอกซินเอเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมากจะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อไตมากที่สุดเนื่องจากไตเป็นอวัยวะเป้าหมายหลักในการออกฤทธิ์ของโอคราทอกซินเอ โดยจะส่งผลต่อรูปร่างและการทำงานของไต ซึ่งเซลล์ในบริเวณท่อหน่วยไตส่วนต้นมีความไวต่อโอคราทอกซินเอมากที่สุด (Jung & Endou, 1989) ซึ่งจะทำให้ร่างกายมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ปัสสาวะมีปริมาตรมากขึ้น มีไนโตรเจนในกระแสเลือดจากการทำงานที่ผิดปกติของการดูดกลับสารของท่อหน่วยไต เช่นเดียวกับมีกลูโคสและโปรตีนปนอยู่ในปัสสาวะ (Gupta, Srivastava, & Lall, 2018) ผลกระทบของร่างกายจากการสะสมของโอคราทอกซินเอในไตเป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดความเสียหายของเซลล์ในระยะยาว โดยในระยะแรกจะทำให้ความเข้มข้นของกลูโคสและเอนไซม์ต่างๆ ในปัสสาวะ ตลอดจนการลดลงของคอเลสเตอรอลและโปรตีนในน้ำเลือด หลังจากนั้นจะทำให้เกิดภาวะโปรตีนเป็นพิษและพบเม็ดเลือดขาวในปัสสาวะ ซึ่งอาการเหล่านี้นำไปสู่การเกิดเซลล์มะเร็งในไตและอาจลุกลามไปถึงตับในที่สุด (Pavlovic, 2013) ซึ่งสามารถพบได้ในเพศหญิงมากกว่าเพศชาย (O'Brien & Dietrich, 2005)

โอคราทอกซินเอส่งผลต่อการทำงานของระบบประสาทของสัตว์ได้ จากรายงานของ Sava และคณะ ในปี 2006 พบว่า หนูที่ได้รับโอคราทอกซินเอเข้าสู่ร่างกายจะเกิดความเสียหายขึ้นบริเวณสมองถึง 6 ตำแหน่งที่สำคัญ ส่งผลให้เกิดความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน การยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ DNA และโปรตีน รวมทั้งโอคราทอกซินเอยังสามารถจับกับสาย DNA ทำให้สาย DNA ขาดออกจากกัน (Sava, Reunova, Velasquez, Harbison, & Sanchez-Ramos, 2006) สำหรับผลกระทบต่อมนุษย์พบว่า ปริมาณโอคราทอกซินเอที่เข้าสู่ร่างกายมีความสัมพันธ์กับการตายของเซลล์ อันเนื่องมาจากเซลล์มีความเป็นพิษและก่อให้เกิดการลดจำนวนลงของไมโทคอนเดรียในเซลล์ ซึ่งสามารถนำไปสู่โรคที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาท เช่น โรควิลสันและพาร์กินสัน เป็นต้น (X. Zhang et al., 2009)

การได้รับโอคราทอกซินเอเข้าสู่ร่างกายยังก่อให้เกิดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่บกพร่องจากการทดลองในสัตว์พบว่า โอคราทอกซินเอสามารถทำลายอวัยวะที่มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ต่อมไทมัส ม้าม และท่อน้ำเหลือง (Al-Anati & E., 2006) รวมทั้ง ไชกระดูกซึ่งเป็นบริเวณที่ผลิตเซลล์ภูมิคุ้มกันในร่างกาย จึงทำให้เซลล์ภูมิคุ้มกันในร่างกายมีจำนวนน้อยลง (Boorman et al., 1984) สำหรับผลกระทบต่อร่างกายของมนุษย์ยังไม่เป็นที่แน่ชัด เนื่องจากมีความเกี่ยวข้องกัน

อย่างซับซ้อนของชนิดของรากับเซลล์ภูมิคุ้มกันในร่างกาย และการติดเชื้ออื่น ๆ แทรกซ้อน (Montagnoli et al., 2006)

โอคราทอกซินเอมีผลต่อพัฒนาการของตัวอ่อนในครรภ์ของสัตว์ เช่น หนู กระจ่าง และไก่ ทำให้อวัยวะภายในและโครงสร้างของร่างกายพัฒนาอย่างผิดปกติ รวมทั้ง เกิดภาวะทารกหัวบาตร ขากรรไกรล่างผิดปกติ กระดูกสันหลังคด เนื้อเยื่อของอวัยวะสำคัญ เช่น ตับ และไต เกิดความผิดปกติ (Malir, Ostry, Pfohl-Leszkowicz, & Novatna, 2014) สำหรับในมนุษย์ โอคราทอกซินเอที่สะสมในหญิงตั้งครรภ์สามารถถ่ายทอดไปยังทารกได้ และอาจส่งผลกระทบต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของทารกที่ผิดปกติจนเกิดการกลายพันธุ์ได้ในที่สุด (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007)

#### 2.4.2 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหาร

โอคราทอกซินเอสามารถพบการปนเปื้อนได้ในอาหารทั่วไปหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์จาก ธัญพืช ถั่วต่าง ๆ ไวน์ เบียร์ กาแฟ โกโก้ ลูกเกด มะเดื่อฝรั่ง เมล็ดฟักทอง เครื่องเทศ และชา (Ostry et al., 2015) จากรายงานของคณะกรรมการยุโรป หรือ EU พบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในอาหารและวัตถุดิบที่ใช้ผลิตอาหารสัตว์ ได้แก่ ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง ถั่วเหลือง เป็นต้น ในประเทศสมาชิกหลายประเทศ ตั้งแต่ 1-100 นาโนกรัมต่อกรัม (EU, 2016) นอกจากนี้ โอคราทอกซินเอสามารถสะสมในร่างกายของสัตว์ที่เป็นอาหารของมนุษย์ และเกิดการสะสมในตับ และเลือด ดังนั้น จึงพบโอคราทอกซินเอปนเปื้อนได้ในผลิตภัณฑ์ที่มาจากเนื้อสัตว์ เช่น สุนัข เป็นต้น (Aish, Rippon, Barlow, & Hattersley, 2004) และตรวจพบการปนเปื้อนในอาหารจำพวกนมและเนยแข็งได้เช่นเดียวกัน (Mata et al., 2015; Solfrizzo, Piemontese, Gambacorta, Zivoli, & Longobardi, 2015) ในประเทศไทยสามารถพบโอคราทอกซินเอปนเปื้อนได้ในเมล็ดกาแฟชนิดโรบัสต้า และอะราบิกา รวมทั้งในธัญพืช เช่น ลูกเดือย เมล็ดบัว ข้าวกล้อง (Songsermsakul, 2015) ตัวอย่างการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในอาหารทั่วโลกและประเทศไทย แสดงในตารางที่ 7 และ 8 ตามลำดับ



ตารางที่ 7 การปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในอาหารของประเทศต่าง ๆ

ประเทศ	อาหาร	ปริมาณ โอคราทอกซินเอที่พบ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	อ้างอิง
เกาหลีใต้	ข้าวบาร์เลย์	0.0 – 0.9	(Park, Chung, & Kim, 2005)
คูเวต	เมล็ดกาแฟ	0.6 – 4.5	(Dashti, 2005)
โครเอเชีย	ถั่วอบแห้ง	0.0-0.2	(Domijan et al., 2005)
จีน	น้ำองุ่น	0.3 – 0.5	(Cao et al., 2013)
ชิลี	ข้าวสาลี	0.0 – 2.1	(Vega et al., 2009)
ญี่ปุ่น	ข้าวไรย์	0.0 – 1.59	(Kumagai et al., 2008)
ตุรกี	แป้งสาลี	0.025 – 10.5	(Aydin, Gunsen, & Demirel, 2008)
ไนจีเรีย	เมล็ดโกโก้	1.0 – 277.50	(Dongo, Bandyopadhyay, Kumar, & Ojiambo, 2008)
เบลเยียม	ข้าวสาลี	39.0 – 823.0	(Tangni & Pussemier, 2006)
เวียดนาม	ข้าว	0.0 – 26.2	(Trung, Bailly, Querin, Lebars, & Guerre, 2001)
อิตาลี	ไวน์	0.05 – 0.35	(Quintela, Villaran, Lopez de Armentia, & Elejalde, 2012)
อินเดีย	เครื่องเทศ	10.0 – 102.0	(Devi et al., 2001)
เอธิโอเปีย	ธัญพืช	54.1 – 2106.0	(Ayalew, Fehrmann, Lepschy, Beck, & Abate, 2006)

ตารางที่ 8 การปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในอาหารของประเทศไทย

อาหาร	ปริมาณ โอคราทอกซินเอที่พบ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	อ้างอิง
ลูกเด็ย	0.71	(Puncha, Suprasert, & Chulamorakot, 2000)
เมล็ดบัว	0.82	(Suprasert & Chulamorakot, 2001)
เมล็ดกาแฟอาราบิก้า	0.6 – 5.5	(Noonim, Mahakarnchanakul, Nielsen, Frisvad, & Samson, 2008)
เมล็ดกาแฟโรบัสต้า	1.3 - 27	(Noonim et al., 2008)
ข้าวกล้อง	0.29	(Chinnaphuti & Aukkasarakul, 2009)

ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมเป็นตัวแปรสำคัญในการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในอาหารแต่ละชนิด โดยเฉพาะอุณหภูมิและความชื้น ที่ทำให้ราเจริญและผลิตโอคราทอกซินเอ (Maga, Sanchis, & Aldred, 2004) ทั้งนี้ จากรายงานของ Mega และ Aldred (2005) พบว่า ราแต่ละชนิดสามารถเจริญและผลิตโอคราทอกซินเอได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและชนิดของอาหาร เช่น ัญพืชที่เจริญเติบโตในภูมิภาคเขตร้อน มักพบการปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus* ในขณะที่ ภูมิภาคเขตนานา มักพบการเจริญของราในสกุล *Penicillium* (Mega & Aldred, 2005)

แต่ละประเทศทั่วโลกมีข้อกำหนดปริมาณการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในอาหารสำหรับใช้ภายในประเทศและมีข้อกำหนดสากลที่ใช้ร่วมกัน ทั้งนี้ คณะกรรมาธิการยุโรปหรือ European Commission (EU) ได้มีข้อกำหนดปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดที่สามารถปนเปื้อนในอาหารได้ ซึ่งระบุไว้ใน Commission Regulation (EC) No 1881/2006 (EU, 2006b) ดังแสดงในตารางที่ 9 นอกจากนี้ ยังมีข้อกำหนดปริมาณโอคราทอกซินเอในอาหารสัตว์ซึ่งถูกระบุไว้ใน Commission Recommendation 2006/576/EC (EU, 2006a) ระบุว่า ัญพืชที่ถูกใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ต้องมีโอคราทอกซินเอไม่เกิน 0.25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม อาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์ปีกและสุกร ต้องมีโอคราทอกซินเอไม่เกิน 0.01 และ 0.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ เนื่องจากในประเทศไทยยังคงมีรายงานการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในอาหารน้อยมาก และมักพบการปนเปื้อน

โอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้น ในประเทศไทยจึงได้มีข้อกำหนดปริมาณโอคราทอกซินเอที่สามารถพบได้ในเมล็ดกาแฟ โดยมีประกาศจากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ในปี พ.ศ. 2551 กำหนดให้พบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟชนิดอะราบิกาและโรบัสตาได้เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2551a, 2551b) ในปัจจุบัน ได้มีร่างประกาศกระทรวงสาธารณสุขขึ้นเพื่อเตรียมใช้แทนข้อกำหนดเก่า โดยระบุให้ในเมล็ดกาแฟห้ามปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดเกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และในอาหารอื่น ๆ เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรย์ และข้าวสาลี ห้ามปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดเกิน 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2561)

**ตารางที่ 9** ปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดที่สามารถพบได้ในอาหารชนิดต่าง ๆ ตามประกาศของ คณะกรรมาธิการยุโรป Commission Regulation (EC) No 1881/2006

ชนิดของอาหาร	ปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุด (นาโนกรัมต่อกกรัม)
ธัญพืชที่ไม่ผ่านการบวกรูป	5
ธัญพืชที่ผ่านการบวกรูป และอาหารที่ใช้ธัญพืชเป็น วัตถุดิบ	3
เมล็ดกาแฟคั่ว	5
กาแฟสำเร็จรูป	10
ผลไม้แห้งที่ใช้ผลิตไวน์	10
ไวน์แดง หรือไวน์ที่ผลิตจากองุ่น	2
น้ำองุ่น หรือน้ำผลไม้ที่ผลิตจากองุ่น	2
องุ่นที่ผ่านการหมักสำหรับผลิตเป็นเครื่องดื่ม	2
อาหารสำหรับเด็กและเด็กแรกเกิด	0.5
ผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์สำหรับเด็กแรกเกิด	0.5
เครื่องเทศ เช่น พริกป่นและพริกปาปริกา	20

ที่มา : ดัดแปลงจาก (Malir, Ostry, Pfohl-Leszkowicz, Malir, & Toman, 2016)

## 2.5 การควบคุมการปนเปื้อนสารพิษจากรา

ปัจจุบันปัญหาการปนเปื้อนสารพิษจากราในอาหาร ยังคงเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจและสุขภาพของผู้คนทั่วโลก ทั้งนี้จึงต้องมีวิธีการจัดการและควบคุมการปนเปื้อนดังกล่าว วิธีการควบคุมการปนเปื้อนสารพิษจากราที่ดีที่สุด ได้แก่ การป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของสารพิษจากรา หรือปนเปื้อนราที่สามารถผลิตสารพิษได้ การลดการปนเปื้อนสารพิษจากรา และการตรวจสอบและติดตามเพื่อหาโอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนสารพิษจากรา (Wagacha & Muthomi, 2008) ซึ่งการใช้วิธีควบคุมการปนเปื้อนสารพิษจากราจะต้องไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ รวมถึงสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ ต้องคงคุณค่าทางโภชนาการและไม่ทำให้คุณภาพของวัตถุดิบเสียไป (Karlovsy et al., 2016) การปนเปื้อนของราและสารพิษจากราอาจแบ่งออกเป็น 2 วิธีหลัก ได้แก่ การป้องกันการเจริญของรา และการลดการปนเปื้อนของราและสารพิษจากรา

### 2.5.1 การป้องกันการเจริญของรา

การป้องกันการเจริญของราในผลผลิตทางการเกษตรเริ่มตั้งแต่ในแปลงเพาะปลูก ขั้นตอนก่อนเก็บเกี่ยวจนกระทั่งขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งสิ่งสำคัญในการป้องกันการปนเปื้อนของรา คือ การควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อการเจริญของรา ได้แก่ ปริมาณน้ำและเวลาในการเก็บเกี่ยวผลผลิต การทำแห้งในทันทีและการควบคุมไม่ให้ผลผลิตเสียหายระหว่างการเก็บรักษาผลผลิต จะช่วยให้ราไม่สามารถเจริญได้ (Mohapatra, Kumar, Kotwaliwale, & Singh, 2017) หลักการปฏิบัติที่ดี (Good Agricultural practices; GAPs) เป็นหลักการเพื่อกำหนดข้อปฏิบัติสำหรับจัดการกับแปลงเพาะปลูกให้สามารถปลูกพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ และวางแผนเพื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตอย่างปลอดภัย สามารถกำจัดศัตรูของพืช เช่น แมลงและวัชพืชต่าง ๆ รวมทั้ง ลดการปนเปื้อนของราที่ก่อโรคในพืช และราที่สามารถผลิตสารพิษได้ (Wu, 2008) นอกจากนี้ หลักการเก็บผลผลิตที่ดี (Good Storage practices; GSPs) เพื่อกำหนดปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาผลผลิตไม่ให้เกิดความเสียหายหลังการเก็บเกี่ยว รวมทั้งหลักการจัดการที่ดี (Good Manufacturing Practices; GMPs) ในการคัดแยกหรือจัดการกับผลผลิตที่ไม่มีคุณภาพหรือเน่าเสีย เพื่อป้องกันการเจริญของรา (Westhuizen et al., 2010) การใช้ระบบ HACCP หรือ Hazard Analysis Critical Control Point ซึ่งเป็นการป้องกันอันตรายของผู้บริโภคที่อาจได้รับจากการบริโภคอาหารที่อาจเกิดขึ้นจากหลายสาเหตุ รวมทั้ง การปนเปื้อนของราและสารพิษจากราผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการแปรรูป (Aldred, Magan, & Olsen, 2004)

ปัจจุบันมีวิธีการเพื่อกำจัดการปนเปื้อนของราในขั้นตอนก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว ได้แก่ วิธีการทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ

### วิธีทางกายภาพ

วิธีการทางกายภาพเป็นขั้นตอนพื้นฐานที่สำคัญในการลดการปนเปื้อนราจากภายนอกในขั้นตอนก่อนการเก็บเกี่ยว เช่น การคัดแยกผลผลิตที่เสียหายทิ้ง การทำให้แห้ง และการใช้ความร้อนเพื่อฆ่าเชื้อ (Betina, 1989) การใช้ความร้อนเพื่อทำลายสปอร์และเส้นใยของรา บริเวณผิวหนังนอกของผลผลิต โดยให้ความร้อนในระยะเวลาสั้น ๆ สามารถป้องกันการเจริญของราที่อาจก่อให้เกิดการสะสมของสารพิษจากราได้ (Barkai-Golan, 2001) วิธีการให้ความร้อนในระยะเวลาสั้นสามารถคงความสดและคุณภาพของผลผลิตไว้ได้ โดยอาจใช้วิธีการผ่านน้ำร้อน การพ่นไอน้ำร้อน หรือการผ่านอากาศที่มีอุณหภูมิสูง เป็นต้น (Lurie, 1998) เช่นเดียวกับ การทำความสะอาดผิวหนังนอกและคัดแยกส่วนที่เสียหายออกจากผลผลิต (Lešnik, Cencič, Vajs, & Simončič, 2008) รวมทั้ง การลอกเปลือกด้านนอกซึ่งเป็นแหล่งสะสมของราก่อโรค สามารถลดการปนเปื้อนของราได้ (Laca, Mousia, Diaz, Webb, & Pamdiella, 2006)

### วิธีทางเคมี

วิธีการทางเคมีสามารถควบคุมและป้องกันการเจริญของราได้ แต่ยังมีข้อจำกัดในเรื่องความปลอดภัยจากการใช้สารเคมี และการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพหรือคุณค่าทางอาหารของผลผลิต (Anwar, Muhammad, Awais, & Akhtar, 2017) ปัจจุบันมีการใช้สารฆ่าราเพื่อลดการปนเปื้อนของราในผลิตทางการเกษตรหลายชนิด เช่น สารในกลุ่ม ไตรเอโซล ได้แก่ โพรพิโคนาโซล ไตรติโคนาโซล ไมโคลบูทานิล สารในกลุ่มสไตริบูลิริน ได้แก่ ฟลูออกซาสโตริบูลิริน ไตรโฟลซีสโตริบูลิริน สารในกลุ่มพอลิออกซิน ได้แก่ พอลิออกซินดี และสารในกลุ่มเพอร์ออกไซด์ ได้แก่ ไฮโดรเจนไดออกไซด์ เป็นต้น (Burpee, 2006) อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนมาใช้สารฆ่าราทางเลือกที่สามารถผลิตได้จากธรรมชาติ และการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชสามารถลดการปนเปื้อนของราได้ นอกจากนี้ การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืช ทำให้พืชสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของราได้เอง (Marín, Sanchis, & Ramos, 2011)

### วิธีทางชีวภาพ

วิธีการทางชีวภาพถูกนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของราในขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยใช้ควบคู่ไปกับวิธีการทางชีวภาพและวิธีการทางเคมี (Castoria, Wright, & Droby, 2008) การควบคุมทางชีวภาพ เป็นวิธีการทางชีวภาพที่กำลังได้รับความนิยมในปัจจุบัน ซึ่งหมายถึงการใช้ประโยชน์จากสารที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตเพื่อลดผลกระทบที่ส่งผลต่อผลผลิตทางการเกษตรและช่วยส่งเสริมภูมิคุ้มกันต้านทานต่อโรคของพืช (Vinale et al., 2008) นอกจากนี้ สารที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตนี้ช่วยลดการเจริญเติบโตของวัชพืชและเชื้อก่อโรคได้ (Lemcomte, Albouvette, Edel-Hermann, Robert, & Steinberg, 2016) สารที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิตนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า สารควบคุมทางชีวภาพ (Biocontrol agent: BCAs) ซึ่งถูกนำมาใช้แทนสารเคมีสังเคราะห์ สารควบคุมทางชีวภาพ อาจเป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยเฉพาะราที่ก่อโรคในพืช ดังแสดงในตารางที่ 10

**ตารางที่ 10** สารควบคุมทางชีวภาพที่ผลิตจากจุลินทรีย์เพื่อใช้ยับยั้งราก่อโรค

สารควบคุมทางชีวภาพ	จุลินทรีย์ที่ผลิตสารควบคุมทางชีวภาพ	ราก่อโรคที่ถูกยับยั้งโดยสารควบคุมทางชีวภาพ
Aspire	<i>Candida oleophila</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Penicillium</i> sp.
Shemer	<i>Metschnikowia fructicola</i>	<i>B. cinerea</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp.
BoniProtect	<i>Aureobacsidium pullulans</i>	<i>B. cinerea</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Monilinia</i> spp.
BOTRY-Zen	<i>Ulocladium</i> sp.	<i>B. cinerea</i>
PomaVita	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Erwinia amylovora</i>

ที่มา : ดัดแปลงจาก (H. Zhang, Mahunu, Castoria, Yang, & Apaliya, 2018)

## 2.5.2 การลดการปนเปื้อนสารพิษจากกรา

เมื่อเกิดการปนเปื้อนสารพิษจากกราในขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยว สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีการทางกายภาพ ทางเคมี และทางชีวภาพ วิธีการลดการปนเปื้อนของสารพิษจากกราให้อยู่ในระดับตามที่กฎหมายกำหนด (Bullerman & Bianchini, 2007)

### วิธีทางกายภาพ

วิธีการทางกายภาพเป็นการลดการปนเปื้อนของสารพิษจากกราโดยใช้การคัดแยกผลผลิต การล้างทำความสะอาดผลผลิต การใช้รังสี การกรองและการดูดซับ (Luo, Liu, & Li, 2018) นอกจากนี้ยังสามารถใช้การต้มให้เดือด การหมัก และการคั่ว เป็นต้น (Karlovsky et al., 2016) การคัดเอาผลผลิตที่เสียหายหรือเสื่อมคุณภาพออก หรือการตัดแต่งเพื่อนำส่วนที่เน่าเสียออกจากผลผลิตสามารถลดการปนเปื้อนของสารพิษจากกราได้หลายชนิด เช่น พาทุลิน พูโมนิซิน และอะฟลาทอกซิน เป็นต้น (Beretta, Gaiaschi, Galli, & Restani, 2000; Brogglia et al., 2002) เช่นเดียวกับการชะล้างผลผลิตด้วยน้ำ สามารถช่วยลดการปนเปื้อนสารพิษจากกราบางส่วนเนื่องจากสารพิษจากกราบางชนิดสามารถละลายน้ำได้ จึงถูกชะล้างออกจากพื้นผิวของผลผลิต (Scudamore & Banks, 2004) นอกจากนี้อาจใช้ตัวทำละลายอื่น ๆ เพื่อช่วยละลายสารพิษจากที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้สามารถลดการปนเปื้อนสารพิษจากกราได้อย่างมีประสิทธิภาพ

### วิธีทางเคมี

วิธีการทางเคมีมีประสิทธิภาพอย่างมากในการลดการปนเปื้อนของสารพิษจากกรา เช่น สารเคมีที่เป็นฤทธิ์เป็นเบส สารออกซิไดซ์ กรดอินทรีย์หลายชนิด เป็นต้น (Luo et al., 2018) ซึ่งการใช้สารเคมีเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยาเคมีได้หลายกระบวนการเพื่อลดการปนเปื้อนสารพิษจากกรา แต่ยังคงต้องคำนึงถึงความปลอดภัยต่อสุขภาพทั้งมนุษย์และสัตว์ ทำให้การใช้สารเคมีบางชนิดถูกห้ามใช้ในการลดการปนเปื้อนสารพิษจากกราในอาหาร (He, Zhou, Young, Boland, & Scott, 2010) ในปัจจุบันมีการอนุญาตให้ใช้สารเคมีบางชนิดเพื่อลดการปนเปื้อนสารพิษจากกรา โดยต้องเป็นสารเคมีที่ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ เช่น กรดอินทรีย์ (Luo et al., 2018) จากงานวิจัยพบว่า กรดอินทรีย์ชนิดกรดฟอร์มิกหรือกรดโพทิโอนิกสามารถใช้ลดการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอได้ (Quintela et al., 2012) นอกจากนี้ การใช้แอมโมเนียและโอโซนสามารถลดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินและไตรโค

ที่ขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Savi, Piacentini, Bittencourt, & Scussel, 2014; Young, Zhu, & Zhou, 2006) ถึงแม้ว่าการใช้สารเคมีเหล่านี้จะช่วยลดการปนเปื้อนของสารพิษจากราได้ดี แต่สารเคมีเหล่านี้ทำให้โมเลกุลของอาหารเปลี่ยนไป คุณค่าทางอาหารเปลี่ยนไปจากเดิม และเกิดสารพิษตกค้างจากปฏิกิริยาการกำจัดสารพิษจากรา (Tiwari et al., 2010)

### วิธีทางชีวภาพ

วิธีการทางกายภาพและการใช้สารเคมีสามารถลดการปนเปื้อนสารพิษจากราได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตาม ยังมีข้อจำกัดในการใช้วิธีการเหล่านี้อยู่หลายประการ เช่น สารตกค้างจากการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดสารพิษจากรา หรือต้นทุนในการใช้เครื่องมือหรือสารเคมีต่าง ๆ (Aiko & Mehta, 2015) ดังนั้น วิธีการทางชีวภาพจึงเป็นวิธีที่ลดข้อจำกัดด้านการใช้สารเคมี ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม และลดต้นทุนการใช้เครื่องมือในการลดการปนเปื้อนของสารพิษได้ โดยการใช้จุลินทรีย์หรือเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์เพื่อย่อยสลายสารพิษจากรา (Taylor & Draughon, 2011) ปัจจุบันได้นำวิธีการทางชีวภาพมาปรับใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อลดการปนเปื้อนสารพิษจากรา เช่น อุตสาหกรรมผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยการใช้ยีสต์ในกระบวนการหมัก สามารถลดการปนเปื้อนของสารพิษจากรา เช่น โอคราทอกซินเอ ฟูโมนิซิน และพาทูลินได้ (Juodeikiene et al., 2012) และในการหมักไซเลจหรือข้าวโพดอาหารสัตว์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก ได้แก่ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย สามารถลดการปนเปื้อนของสารพิษจากราและเปลี่ยนสารพิษจากราให้อยู่ในรูปที่ไม่เป็นพิษได้ (Dalié, Deschamps, & Richard-Forget, 2010) โดยอาศัยการเปลี่ยนโครงสร้างของสารพิษจากราให้อยู่ในรูปของสารใหม่ที่ไม่เป็นพิษต่อคนและสัตว์ ด้วยเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ผ่านกระบวนการย่อยสลาย เช่น แอซิติเลชัน ไกลโคซิเลชัน การสลายพันธะ ไฮโดรไลซิส ดีอะมิเนชัน และดีคาร์บอกซิเลชัน เป็นต้น (Hathout & Aly, 2014)

### 2.6 การควบคุมทางชีวภาพโดยยีสต์ปฏิปักษ์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาณาจักรฟังไจเช่นเดียวกับพวกเห็ดและรา ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกยูแคริโอตที่มีเซลล์เดียวที่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ยีสต์ทำให้เกิดกระบวนการหมัก และถูกใช้ในการเก็บถนอมอาหารบางชนิด นอกจากนี้ เมแทบอลิต์ที่



ยีสต์ผลิตขึ้นมีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ รวมทั้งไม่ทำลายผลผลิตทางการเกษตรอีกด้วย (Wisniewski et al., 2007)

ยีสต์ปฏิปักษ์ที่เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพสามารถพบได้ทั่วไปเปรียบเสมือนเชื้อประจำถิ่นบนผิวของผลไม้หลายชนิด จึงมักถูกนำมาใช้ประโยชน์เพื่อเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยว นอกจากนี้ ยังพบได้ในดินและน้ำทะเลบริเวณส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ใบและราก เป็นต้น (J. Liu, Sui, Wisniewski, Droby, & Liu, 2013) ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิสูง ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ ขาดแคลนสารอาหาร และค่าความเป็นกรด-เบสที่ไม่เหมาะสม (Abadias, Teixido, Usall, Vinas, & Magan, 2001; Mokiou & Magan, 2008) Wilson และ Wisniewski (1989); Barkai-Golan (2001) ได้อธิบายคุณลักษณะสำคัญของยีสต์ปฏิปักษ์ว่า ยีสต์ปฏิปักษ์จะต้องมีลักษณะทางพันธุกรรมคงที่มีประสิทธิภาพในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพแม้มีความเข้มข้นของยีสต์ต่ำ เจริญได้ในอาหารที่ไม่ซับซ้อนและราคาถูก ดำรงชีวิตได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น อุณหภูมิสูงหรือต่ำ ปริมาณออกซิเจนจำกัด เป็นต้น สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้หลายชนิด สามารถเก็บรักษาและนำไปใช้ได้ โดยสามารถใช้ร่วมกับวิธีควบคุมการปนเปื้อนแบบอื่นที่ใช้อยู่แล้วทั่วไป ทนต่อสารฆ่าแมลง เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ไม่ก่อให้เกิดโรคในผลผลิต และไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยต้องไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และไม่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ (Barkai-Golan, 2001; Wilson & Wisniewski, 1989)

ข้อดีของการใช้ยีสต์เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ คือ 1) ยีสต์สามารถเจริญได้บนพื้นผิวที่แห้งและมีช่วงชีวิตยาวนาน 2) ผนังเซลล์ด้านนอกของยีสต์ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ ทำให้สามารถทนอยู่ได้บนพื้นผิวของพืชหรือผลผลิตทางการเกษตร และช่วยลดการเจริญของราก่อโรคได้ 3) ยีสต์สามารถใช้สารอาหารและเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังได้รับผลกระทบเพียงเล็กน้อยจากสารปราบศัตรูพืช (Sharma, Singh, & Singh, 2009)

งานวิจัยหลายฉบับได้ศึกษาความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ที่ใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคพืชได้ จากงานวิจัยของ Hernández-Montiel และคณะ (2010) ได้ศึกษาความสามารถของยีสต์ *Debaryomyces hansenii* ที่คัดแยกจากน้ำทะเลและเปลือกของผลมะนาวแม้ชกกันพบว่า *D. hansenii* สามสายพันธุ์ได้แก่ DhhBCS06, LL1 และ LL2 สามารถลดการเกิดโรคเน่าเสียจากราในผลมะนาวแม้ชกกันหลังจากเก็บเกี่ยวผลผลิตได้มากถึง 80

เปออร์เซินต์ (Hernández-Montiel, Ochoa, Troyo-Diéguez, & Larralde-Corona, 2010) งานวิจัยของ Pantelides และคณะ (2015) ได้คัดแยกยีสต์ที่พบบนผิวของผลองุ่นและทำการระบุสายพันธุ์ได้ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus magnus*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida zeylanoides*, *Candida sake*, *Rhodotorula mucillaginosa* และ *Pseudozyma aphidis* ยีสต์ 33 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 55 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus tubingensis* ซึ่งก่อโรคในผลองุ่น และมียีสต์ 28 สายพันธุ์ ที่สามารถลดการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอซึ่งผลิตจาก *A. tubingensis* โดย *A. pullulans* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด (Pantelides, Christou, Tsolakidou, Tsaltas, & Ioannou, 2015) งานวิจัยของ Zhang และคณะ (2017) พบว่า *Pichia membranaefaciens* และ *Kloeckera apiculata* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *Monilinia fructicola* ซึ่งก่อให้เกิดโรคเน่าในผลลูกพลัมหลังการเก็บเกี่ยว โดยยีสต์ทั้งสองชนิดสามารถลดการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยราได้อย่างมีนัยสำคัญ (J. Zhang et al., 2017)

ตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ต่อราที่ผลิตสารพิษจากรา เช่น จากงานวิจัยของ De Felice และคณะ (2007) พบว่า *A. pullulans* มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* ที่ปนเปื้อนบริเวณผิวด้านนอกของผลองุ่นที่มีรอยแผล เมื่อทดสอบในสภาวะแวดล้อมที่เอื้อต่อการเจริญของรา นอกจากนี้ ยังสามารถเปลี่ยนโมเลกุลของโอคราทอกซินเอให้อยู่ในรูปโอคราทอกซินแอลฟา ที่มีความเป็นพิษน้อยกว่า (de Felice et al., 2008) ในปี 2012 Niknejad และคณะ ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1, ปี 2, จี 1 และจี 2 จากราในสกุล *Aspergillus* โดยใช้ *Candida parapsilosis* พบว่า ยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญของราได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อทดสอบที่ความแตกต่างของอุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่ม นอกจากนี้ ยีสต์สามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินได้ตั้งแต่ 54-99 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้สูงที่สุด (99.59 เปอร์เซ็นต์) (Niknejad et al., 2012) และงานวิจัยของ Cubaiu และคณะ (2012) ศึกษาความสามารถของ *S. cerevisiae* DISAABA1182 ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* และ *A. ochraceus* ในกระบวนการผลิตไวน์พบว่า ยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดได้ทั้งในระดับ *in vitro* และ *in vivo* และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตโอคราทอกซินเอของราทั้งสองชนิดได้ (Cubaiu, Abbas, Dobson, Budroni, & Migheli, 2012)

## 2.7 กลไกการควบคุมทางชีวภาพโดยยีสต์ปฏิปักษ์

การศึกษากลไกการควบคุมทางชีวภาพโดยยีสต์ปฏิปักษ์นั้นมีความสำคัญ ซึ่งจะทำให้สามารถพัฒนาศักยภาพในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของยีสต์ที่ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในพืชและผลผลิตทางการเกษตรอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ ยังใช้เป็นมาตรฐานในการค้นหายีสต์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ยีสต์มีกลไกสำคัญหลายประการในการยับยั้งการเจริญของราก่อโรค ได้แก่ การแย่งชิงพื้นที่การเจริญและสารอาหาร การสร้างเอนไซม์ เช่น เบต้า-1,3 กลูคาเนส และไคติเนสเพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของรา การสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืช และการเป็นปรสิตโดยตรงต่อราก่อโรค (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006)

### 2.7.1 การแย่งชิงพื้นที่การเจริญและสารอาหาร

กลไกของยีสต์ปฏิปักษ์ในการควบคุมและยับยั้งการเจริญของราที่สำคัญ ได้แก่ การแย่งชิงพื้นที่การเจริญและสารอาหาร ยีสต์สามารถลดการเน่าเสียของผลผลิตทางการเกษตรซึ่งมีสาเหตุมาจากราที่ปนเปื้อนในบริเวณผิวที่มีรอยแผล (Droby, Chalutz, Wilson, & Wisniewski, 1989) เนื่องจากยีสต์มีการสืบพันธุ์เพื่อการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว จึงทำให้เพิ่มจำนวนเซลล์ได้ในอัตราที่เร็วและมากกว่าราก่อโรค ซึ่งลดจำนวนลงตามพื้นที่ในการเจริญที่ลดลงไปด้วย จากงานวิจัยของ EL-Ghaouth และคณะในปี 1998 พบว่า เมื่อใช้ยีสต์ *Candida saitona* ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น  $10^8$  CFUต่อมิลลิลิตร สามารถควบคุมการเจริญของ *Penicillium expansum* ที่ก่อให้เกิดโรคในผลแอปเปิ้ล (El-Ghaouth, Wilson, & Wisniewski, 1998) นอกจากนี้ การใช้ยีสต์ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่มากขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราเพิ่มขึ้นตามไปด้วย จากงานวิจัยของ Droby และคณะ (1991) พบว่า *Pichia guiliermondii* สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea* ที่ก่อโรคในผลแอปเปิ้ล และ *Penicillium digitatum* ที่ก่อโรคในผลองุ่น ได้ดีที่สุดเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของยีสต์สูงถึง  $10^{10}$  CFUต่อมิลลิลิตร ยีสต์มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ดังนั้น การแย่งชิงพื้นที่การเจริญกับราก่อโรคจึงเป็นกลไกสำคัญที่ยีสต์ปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ (Droby, Chalutz, & Wilson, 1991) หลังจากผ่าน 24 ชั่วโมงแรกไปแล้ว ยีสต์มีบทบาทสำคัญในการแย่งชิงสารอาหารกับราก่อโรค ร่วมกับการแย่งชิงพื้นที่การเจริญเพื่อป้องกันการเน่าเสียของผลผลิตอันเนื่องมาจากราก่อโรค (Li, Zhou, & Tian, 2008; J. Liu et al.,

2012) จากการที่ยีสต์สามารถใช้สารอาหารในกระบวนการหมักเพอริซิมได้รวดเร็วกว่ารา จึงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการงอกของสปอร์ราที่ก่อโรคได้ในที่สุด (Droby & Chalutz, 1994) จากงานวิจัยของ Castoria และคณะ (2001) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของ *Aureobasidium pullulans* LS-30 พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. expansum*, *A. niger* และ *Rhizopus stolonifer* ซึ่งก่อโรคในผลองุ่น นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea* ซึ่งก่อโรคเน่าในแอปเปิ้ลได้โดยอาศัยกลไกการแย่งชิงพื้นที่การเจริญและสารอาหารเป็นหลัก ตรงบริเวณของผลองุ่นและแอปเปิ้ลที่มีบาดแผล (Castoria et al., 2001) งานวิจัยของ Brown และคณะในปี 2000 พบว่า *Candida oleophila* สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. digitatum* ซึ่งก่อโรคในผลส้มได้ โดยอาศัยการแย่งชิงสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตเป็นกลไกสำคัญในการป้องกันการเกิดโรคเน่าเสียหายจากราในผลส้ม (Brown, Davis, & Chambers, 2000) งานวิจัยของ de Felice และคณะ (2008) พบว่า *A. pullulans* สายพันธุ์ AU14-3-1 และ AU18-3B มีประสิทธิภาพในการเป็นปฏิปักษ์ต่อ *A. carbonarius* เมื่อทดสอบกับพื้นผิวองุ่นที่เกิดบาดแผล โดยจุ่มในอาหารเลี้ยงยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ สามารถป้องกันการติดเชื้อได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งเกิดจากการเพิ่มจำนวนที่รวดเร็วของยีสต์ทำให้แย่งชิงพื้นที่การเจริญและสารอาหารจากราได้ (de Felice et al., 2008) และงานวิจัยของ Afsah-Hejri ปี 2013 พบว่า ยีสต์ที่คัดแยกจากต้นถั่วพิทาชิโอ ได้แก่ *Pseudozyma fusiformata*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula fragaria*, *Cryptococcus hungaricus* และ *Rhodotorula hinula* สามารถยับยั้งการเจริญการงอกของสปอร์และการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* ได้ โดย *P. fusiformata* สามารถลดการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุด 84.6 เปอร์เซ็นต์ และ *C. albidus* สามารถลดน้ำหนักแห้งรวมของราได้มากที่สุด (77.9 เปอร์เซ็นต์) ทั้งนี้ การลดลงของน้ำหนักแห้งและการงอกสปอร์ราอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการแย่งชิงอาหารของยีสต์กับรา (Afsah-Hejri, 2013)

#### 2.7.2 การสร้างสารยับยั้งการเจริญและย่อยสลายผนังเซลล์ของรา

การสร้างสารยับยั้งการเจริญและผลิตเอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์ของรา เป็นกลไกสำคัญอย่างหนึ่งในการยับยั้งการเจริญของรา Masih และคณะ (2001) รายงานว่า *Pichia membranifaciens* ที่เลี้ยงร่วมกันกับ *B. cinerea* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเดียวกัน จะเกิดบริเวณยับยั้งขึ้นรอบบริเวณโคโลนีของยีสต์ และเมื่อเลี้ยงร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวก็ไม่พบการงอกของสปอร์ราเช่นเดียวกัน จึงแสดงให้เห็นว่ายีสต์ปฏิปักษ์สามารถสร้างสารฆ่าราได้ (E.I. Masih et al., 2001) จากงานวิจัยของ

Choudhury และคณะในปี 1994 ได้ทดสอบเมแทบอลิต์สองชนิดที่สร้างจากยีสต์คล้ายรา *Sporothrix flocculosa* ได้แก่ hetadecadienal และ กรด 4-methyl-7,11-heptadecadienoic สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea* และ *Fusarium oxysporum* ได้ โดยทำให้การงอกของสปอร์และมวลชีวภาพของราลดลง (Choudhury, Traquair, & Jarvis, 1994) เช่นเดียวกับ กรดไขมันเอสเทอร์ที่ผลิตจาก *Tilletiopsis pallescens* ที่ความเข้มข้น 130 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Podosphaera xanthii* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคราน้ำค้างได้ และยับยั้งการเจริญของ *F. oxysporum*, *Phoma* sp. และ *Pythium aphanidermatum* ได้ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Urquhart & Punja, 2002) นอกจากนี้ ยังมีรายงานการผลิตสาร siderophore จากยีสต์ สารชนิดนี้สามารถยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในพืชซึ่งมักผลิตจากแบคทีเรีย จากงานวิจัยของ Calvente และคณะ (2001) พบว่า *Rhodotorula* sp. สามารถผลิตกรด rhodotorulic ซึ่งเป็น siderophore ที่สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราก่อโรคในพืชได้หลายชนิด (Calvente, de Orellano, Sansone, Benuzzi, & Sanz de Tosetti, 2011)

นอกจากนี้ สารยับยั้งที่ยีสต์ผลิตได้บางชนิด สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของราก่อโรคได้ จากงานวิจัยของ Wisniewski และคณะ (1991) พบว่า *P. guilliermondii* สามารถจับกับเส้นใยของ *B. cinerea* และ *Penicillium* ทำให้เส้นใยของราเกิดการเว้าเข้าด้านในและย่อยสลายผนังเซลล์บางส่วนไปในที่สุด (Wisniewski et al., 1991) เช่นเดียวกับ *Candida saitoana* ซึ่งสามารถจับกับเส้นใยของ *B. cinerea* แล้วทำให้ผนังเซลล์มีลักษณะบวมขึ้นได้ (El-Ghaouth et al., 1998) ต่อมาในปัจจุบันพบว่า การที่ยีสต์ปฏิปักษ์สามารถทำลายผนังเซลล์ของราได้ เป็นผลมาจากยีสต์สามารถสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของรา องค์ประกอบของผนังเซลล์รา ประกอบด้วยไคติน ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของผนังเซลล์ และ  $\beta$ -1,3-กลูแคน ซึ่งแทรกอยู่ในสายพอลิแซ็กคาไรด์ทำหน้าที่ในการเพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์รา นอกจากนี้ ยังประกอบด้วยโปรตีนที่ช่วยในการคงรูปร่างของเซลล์และควบคุมสารที่ผ่านเข้าออกผนังเซลล์ด้วย เอนไซม์ที่ยีสต์สามารถผลิตได้ และมีส่วนสำคัญในการย่อยสลายผนังเซลล์ของรา ได้แก่  $\beta$ -1,3-กลูคาเนส, ไคติเนส และโปรติเอส งานวิจัยของ Masih และ Paul (2002) พบว่า เอนไซม์  $\beta$ -1,3-กลูคาเนส ที่สร้างจาก *P. membranifaciens* สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea* ในผลองุ่นได้ (E. I. Masih & Paul, 2002) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Friel และคณะ (2007) ได้ตัดต่อยีนที่สามารถสร้างเอนไซม์  $\beta$ -1,3-กลูคาเนส ใส่ใน *P. anomala* ทำให้ยีสต์สามารถสร้างเอนไซม์  $\beta$ -1,3-กลูคาเนส และยับยั้งการเจริญของ *P. digitatum*

เมื่อทดสอบในผลแอปเปิ้ลที่ทำให้เกิดบาดแผล (Friel, Pessoa, Vandenbol, & Jijakli, 2007) ในปี 2008 Saravanakumar และคณะพบว่า *Metschnikowia pulcherrima* MACH1 สามารถสร้างเอนไซม์โคติเนสเมื่อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับในน้ำแอปเปิ้ล ซึ่งส่งผลให้สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea* ที่ก่อโรคในแอปเปิ้ลได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Saravanakumar, Ciavarella, Spadaro, Garibaldi, & Gullino, 2008) Yu และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลของโคตินที่สามารถกระตุ้นให้ *Candida laurentii* สามารถสร้างเอนไซม์โคติเนสที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของ *P. expansum* ที่ก่อให้เกิดโรคในผลลูกแพร์ที่เกิดบาดแผล (Yu, Wang, Yin, Wang, & Zheng, 2008) นอกจากนี้ในปี 2014 Banani และคณะ ได้ตัดต่อยีนที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสของ *A. pullulans* PL5 ใส่ใน *Pichia pastoris* KM71 และทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในผลแอปเปิ้ล ได้แก่ *Monilinia fructicola*, *B. cinerea*, *Alternaria alternata* และ *P. expansum* พบว่า *P. pastoris* สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสและยับยั้งการงอกของสปอร์ *M. fructicola* และ *B. cinerea* ได้ดี และทำให้เส้นใยของราวมขึ้นเมื่อสังเกตใต้กล้องจุลทรรศน์ (Banani et al., 2014) งานวิจัยของ Tayel และคณะ (2013) ทดสอบความสามารถของ *P. anomala* ในการผลิตเอนไซม์โคติเนสและ  $\beta$ -1,3-กลูคาเนส ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านการเจริญของรา และทดสอบผลของเอนไซม์ต่อการเจริญของเส้นใยรา *A. flavus* พบว่า ยีสต์สามารถผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้ดี เมื่อบ่มร่วมกับ *P. anomala* และสังเกตลักษณะของเส้นใยราผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า เมื่อบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เส้นใยของราที่มีรูปร่างที่ผิดปกติ เกิดการแตกออกของเซลล์อย่างชัดเจน (Tayel, El-Tras, Moussa, & El-Agamy, 2013)

### 2.7.3 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน

ยีสต์ปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้เจ้าบ้าน เช่น พืชและผลผลิตทางการเกษตร โดยเฉพาะบริเวณที่เกิดบาดแผล ทำให้เกิดกระบวนการป้องกันตัวเองหรือการเสริมภูมิคุ้มกันในพืช ยีสต์สามารถกระตุ้นให้ผิวของผลผลิตทางการเกษตรต่อต้านการติดเชื้อราที่ก่อโรคได้โดยการสร้างสารยับยั้งบางชนิดหรือซ่อมแซมส่วนที่เสียหาย (Spadaro & Droby, 2016) โดยยีสต์ปฏิปักษ์สามารถกระตุ้นให้พืชสามารถสร้างสารยับยั้ง เช่น phenylalanine ammonia-lyase (PAL) phytoalexins peroxidase (POD) และ ethylene เป็นต้น (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006) นอกจากนี้

ยังกระตุ้นให้เจ้าบ้านสามารถสร้างโคตินเนสและ  $\beta$ -1,3-กลูคาเนส ซึ่งย่อยสลายผนังเซลล์ของราก่อโรคได้ จากงานวิจัยของ El-Ghaouth และคณะ (1998) พบว่า *Cryptococcus saitoana* สามารถกระตุ้นให้เซลล์เจ้าบ้านของผลแอปเปิ้ล เกิดการสร้างเอนไซม์โคตินเนสและสามารถสร้างสารป้องกันเซลล์ต่อ *P. expansum* (El-Ghaouth et al., 1998) เช่นเดียวกับ *A. pullulans* ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -1,3-กลูคาเนส, โคตินเนส และเพอร์ออกซิเดส ในผลแอปเปิ้ลที่เกิดบาดแผล ส่งผลให้เกิดกระบวนการป้องกันการติดเชื้อของเซลล์ต่อ *P. expansum* (Ippolito, El-Ghaouth, Wilson, & Wisniewski, 2000) Yao และ Tian (2005) ศึกษาการถูกกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนไซม์โคตินเนส,  $\beta$ -1,3-กลูคาเนส, PAL และ POD ในผลลูกพีช โดย *Cryptococcus laurentii* และมีการเติมกรดเมทิลแจสมอนิกซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการป้องกันของเซลล์ได้ดีกว่ากระตุ้นด้วยยีสต์เพียงอย่างเดียว (Yao & Tian, 2005)

#### 2.7.4 การสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย

การสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเป็นหนึ่งในกลไกสำคัญของยีสต์ที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของราได้ ซึ่งสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายนี้สามารถสร้างได้จากยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดรวมทั้งพืช สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเป็นเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 300 ดาลตัน มีสภาพขั้วไฟฟ้าต่ำและความดันไอสูง ซึ่งปัจจัยที่ทำให้เกิดการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายนั้นขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมและอัตราการเจริญเติบโต (Korpi, Jarnberg, & Pasanen, 2009) นอกจากนี้ การสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายนั้นมีลักษณะที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ของจุลินทรีย์นั้น ๆ โดยอาจใช้เพื่อเป็นสารสื่อประสานระหว่างเซลล์ หรือเพื่อใช้เป็นสัญญาณในการยับยั้งการเจริญเติบโต (Kai et al., 2009) ปัจจุบันได้มีการนำความสามารถในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์มาใช้ในการควบคุมทางชีวภาพ ตัวอย่างของยีสต์ที่สามารถสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญของราแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา

ชนิดของยีสต์	ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ ระเหยง่ายที่ยีสต์สร้างขึ้น	ชนิดของราที่ยับยั้ง	อ้างอิง
<i>S. cerevisiae</i> CR-1	เอทานอล 3-เมทิล-1-บิวทานอล 2-เมทิล-1-บิวทานอล ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์	<i>G. citricarpa</i>	(Fialho et al., 2010)
<i>Candida intermedia</i>	1, 3, 5, 7-ไซโคลออกเตทราอิน 3-เมทิล-1-บิวทานอล	<i>B. cinerea</i>	(Huang et al., 2011)
<i>Sporidiobolus pararoseus</i> YCXT3	2-เอทิล-1-เฮกซานอล	<i>B. cinerea</i>	(Huang et al., 2012)
<i>P. anomala</i> WRL-076	2-ฟีนิลเอทานอล	<i>A. flavus</i>	(S.S.T. Hua et al., 2014)
<i>Kloeckera apiculata</i>	2-ฟีนิลเอทานอล กรด 2-ฟีนิลแอสติติก ฟีนิลแล็กเตต ฟีนิลไพรูเวต	<i>P. italicum</i>	(P. Liu et al., 2014)



ตารางที่ 11 สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา (ต่อ)

ชนิดของยีสต์	ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ยีสต์สร้างขึ้น	ชนิดของราที่ยับยั้ง	อ้างอิง
<i>A. pullulans</i>	2-ฟีนิล 1-บิวทานอล-3-เมทิล 1-บิวทานอล-2-เมทิล 1-โพรพานอล-2-เมทิล	<i>B. cinerea</i> <i>C. acutatum</i> <i>P. expansum</i> <i>P. digitatum</i>	(Di Francesco, Ugolini, Lazzeri, & Mari, 2015)
<i>C. sake</i> 41E	3-เมทิลบิวทิล เฮกซานเอต 3-เมทิลบิวทิล เพนทานเอต 2-เมทิลโพรพิล เฮกซานเอต เพนทิลเฮกซานเอต	<i>B. cinerea</i> <i>P. expansum</i>	(Arrate, Garmendia, Rossini, Wisniewski, & Vero, 2017)
<i>S. cerevisiae</i> ACBL-52	3-เมทิล-1-บิวทานอล 2-เมทิล-1-บิวทานอล	<i>P. digitatum</i>	(de Souza, Kupper, & Augusto, 2018)
<i>Lachancea thermotolerans</i> 751	2-ฟีนิลเอทานอล	<i>A. carbonarius</i> MPVA56	(Farbo et al., 2018)
<i>W. anomalus</i>	2-ฟีนิลเอทานอล ไอโซบิวทานอล	<i>B. cinerea</i>	(Oro, Feliziani, Ciani, Romanazzi, & Comitini, 2018)
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	ฟีนิลเอทิล แอลกอฮอล์ อีเทอร์, บิส(p-tert-บิวทิลฟีนอล)	<i>C.gloeosporioides</i>	(Zhou, Li, Zeng, & Shao, 2018)

ตารางที่ 11 สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของรา (ต่อ)

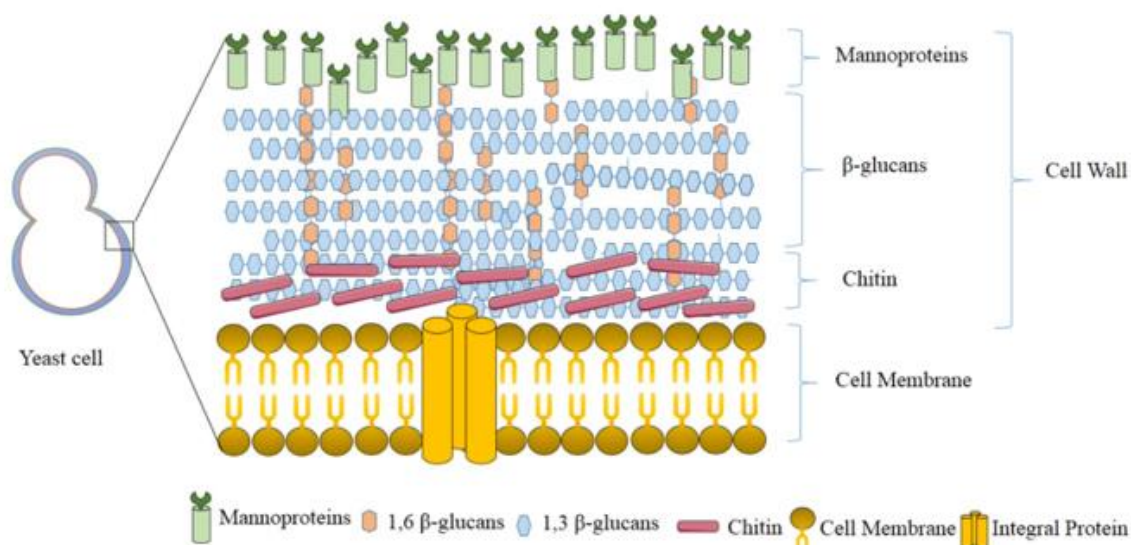
ชนิดของยีสต์	ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ยีสต์สร้างขึ้น	ชนิดของราที่ยับยั้ง	อ้างอิง
<i>C. intermedia</i> 253	2-ฟีนิลเอทานอล	<i>A. carbonarius</i> MPVA566	(Tilocca, Balmas, Hassan, Jaoua, & Migheli, 2019)
<i>Candida nivariensis</i> DMKU-CE18	1-เพนทานาล	<i>A. flavus</i> A39	(Jaibangyang, Nasanit, & Limtong, 2020)

Di Francesco และคณะ (2015) ได้ทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สร้างจาก *A. pullulans* L1 และ L8 เพื่อยับยั้งการเจริญของรา 5 ชนิด ได้แก่ *B. cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *P. expansum*, *P. digitatum* และ *Penicillium italicum* พบว่าสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้ดีเมื่อทดสอบในระดับห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้ เมื่อทดสอบในผลแอปเปิ้ลและผลส้มที่มีการเติมราลงไปร่วมกับการใช้สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์พบว่าสามารถลดการเจริญของราลงได้ 88 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์พบว่า เป็นสารประกอบประเภท 2-ฟีนิล, 1-บิวทานอล-3-เมทิล, 1-บิวทานอล-2-เมทิล และ 1-โพรพานอล-2-เมทิล เป็นต้น (Di Francesco et al., 2015) de Souza และคณะ (2018) ศึกษาการควบคุมทางชีวภาพโดยการใช้ *S. cerevisiae* 8 สายพันธุ์ และ *Candida stellimalicola* ACBL-08 และทดสอบการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อระบุชนิดของสายประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายดังกล่าว ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของ *P. digitatum* จากการทดสอบพบว่า สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ยีสต์สามารถสร้างได้ และแสดงคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งการเจริญของรา ได้แก่ เอทิล โพรพิโอเนต, 3-เมทิล-1-บิวทานอล, 2-เมทิล-1-บิวทานอล, เอทิล บิวทิเรต, 3-เมทิลบิวทิล อะซีเตต, 3-เมทิลบิวทิล โพรพิโอเนต, n-เพนทิล บิวทิเรต, ฟีนิล เอทิล แอลกอฮอล์ และ 2-ฟีนิลเอทิล อะซีเตต (de Souza et al., 2018) งานวิจัยของ

Jaibangyang และคณะ (2020) ทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของ ยีสต์ปฏิปักษ์ที่คัดแยกได้จากใบของต้นข้าว ข้าวโพด และอ้อย ในประเทศไทย ในจำนวนยีสต์ที่คัด แยกได้ 49 ชนิด พบว่า *Candida nivariensis* DMKU-CE18 สามารถยับยั้งการเจริญและการงอก ของสปอร์รา *A. flavus* A39 ได้มากที่สุด และวิเคราะห์หาสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของ *C. nivariensis* DMKU-CE18 พบว่า มีความใกล้เคียงกับ 1-pentanal มากที่สุด (Jaibangyang et al., 2020) จากงานวิจัยของ Farbo และคณะ (2018) พบว่า *Lachancea thermotolerans* 751 สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีผลทำให้เส้นใยของ *A. carbonarius* MPVA566 และ *A. ochraceus* MPVA703 มีการสะสมของไซโทพลาสซึมที่ปลายเส้นใยเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดการ บวมออก เนื่องจากภาวะเซลล์ด้านในแตก และเส้นใยของรามีความผิดปกติแตกต่างจากชุดควบคุม อย่างชัดเจน นอกจากนี้ สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ สามารถยับยั้งการผลิตโอครา ทอกซินเอของราทั้งสองชนิดได้อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหย ง่ายที่ผลิตจาก *L. thermotolerans* 751 พบว่า สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายหลักที่ผลิตได้ ได้แก่ 2-ฟีนิลเอทานอล (Farbo et al., 2018)

## 2.8 การดูดซับและการย่อยสลายสารพิษจากราโดยยีสต์ปฏิปักษ์

การดูดซับสารพิษจากราโดยยีสต์ปฏิปักษ์เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่มีประสิทธิภาพและลดปัญหา การปนเปื้อนสารพิษจากราในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรได้ ทำได้โดยการดูดซับด้วยตัวเซลล์ หรือการใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากยีสต์เพื่อย่อยสลายสารพิษจากรา (Gao et al., 2018) การดูดซับสารพิษ จากราโดยยีสต์ปฏิปักษ์ มีประสิทธิภาพในการช่วยลดปริมาณสารพิษจากราที่ปนเปื้อนเนื่องจากผนัง เซลล์ของยีสต์ประกอบไปด้วยโปรตีน ไขมัน และพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเป็นองค์ประกอบสำคัญของ กลูแคนและแมนแนน (รูปที่ 3) ซึ่งทำให้ผนังเซลล์ของยีสต์สามารถจับกับสารพิษจากราในบริเวณของ หมู่ฟังก์ชันบนผนังเซลล์ของยีสต์ (Ringot et al., 2007) จากงานวิจัยของ Yiannikouris และคณะ (2004) พบว่า *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์ ที่มีอัตราส่วนของกลูแคนและแมนแนนแตกต่างกัน สามารถดูดซับซีราลีโนนได้ไม่เท่ากัน ผนังเซลล์ของยีสต์ที่มีอัตราส่วนของกลูแคนมากสามารถจับกับซี ราลีโนนได้มากกว่า (Yiannikouris et al., 2004)



รูปที่ 3 องค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ (Anwar et al., 2017)

Armando และคณะ (2012) พบว่า *S. cerevisiae* RC012 และ RC016 สามารถดูดซับ โอคราทอกซินเอและซีราลีโนนได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อทดสอบในสภาวะที่ใกล้เคียงกับระบบ ทางเดินอาหาร ซึ่งส่งเสริมให้สามารถจับกับสารพิษจากราได้ดียิ่งขึ้น (M.R. Armando et al., 2012) และงานวิจัยของ Goncalves และคณะ (2015) พบว่า *S. cerevisiae* ที่ผ่านการให้ความร้อน สามารถดูดซับอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดีเมื่อทดสอบในบัฟเฟอร์ PBS โดยมีประสิทธิภาพในการดูดซับ มากถึง 99% ภายใน 5 นาที หลังจากเติมอะฟลาทอกซินบี 1 ลงในบัฟเฟอร์ PBS ซึ่งมียีสต์ที่ผ่านการ ให้ความร้อนแขวนลอยอยู่ (Goncalves, Rosim, de Oliveira, & Corassin, 2015)

ผนังเซลล์ของยีสต์สามารถดูดซับสารพิษจากราได้ ซึ่งเป็นผลมาจากองค์ประกอบของผนัง เซลล์ยีสต์ รวมถึงสภาพขั้วไฟฟ้า ความสามารถในการละลายน้ำ และประจุไฟฟ้าของผนังเซลล์ยีสต์ และสารพิษจากราที่มีความเพาะต่อการสร้างพันธะระหว่างกัน (Piotrowska & Masek, 2015) Zhu และคณะ (2015) พบว่า โปรตีนภายในเซลล์ที่สร้างจาก *Rhodospiridium paludigenum* สามารถ ย่อยสลายพาทูลินได้ โดยเปลี่ยนโมเลกุลของพาทูลินให้กลายเป็นกรดดีออกซีพาทูลินิก (DPA) เมื่อ เปรียบเทียบกับการทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ยีสต์พบว่า ไม่สามารถย่อยสลายพาทูลินได้ จึงสรุปได้ว่า โปรตีนภายในเซลล์ยีสต์มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายพาทูลิน และเอนไซม์จะถูกกระตุ้นให้ย่อย สลายได้ก็ต่อเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารพิษจากราเท่านั้น (R. Zhu et al., 2015)

งานวิจัยของ Shetty และคณะ (2007) ทดสอบความสามารถในการดูดซับอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* 18 สายพันธุ์ ซึ่งคัดแยกจากอาหารหมัก เช่น แป้งหมักและเบียร์ พบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ A18 สามารถดูดซับอะฟลาทอกซินปี 1 ได้ดีที่สุด และเมื่อให้ความร้อนกับเซลล์ยีสต์เพิ่มมากขึ้น ผนังเซลล์ของยีสต์สามารถจับกับอะฟลาทอกซินปี 1 ได้ดียิ่งขึ้น และพบว่า เซลล์ยีสต์ที่ไม่มีชีวิตสามารถดูดซับอะฟลาทอกซินปี 1 ได้มากที่สุดถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ เนื่องจากความร้อนสามารถทำให้ผนังเซลล์ของยีสต์เกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งส่งผลให้บริเวณที่ใช้จับกับอะฟลาทอกซินปี 1 มีประสิทธิภาพในการดูดซับได้ดียิ่งขึ้น (Shetty, Hald, & Jespersen, 2007) จากงานวิจัยของ Peteri และคณะ (2007) ศึกษาการย่อยสลายสารพิษด้วยเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Phaffia rhodozyma* CBS5905 พบว่า สามารถย่อยสลายโอคราทอกซินเอได้มากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์ที่ผลิตจากยีสต์เป็นสารประกอบประเภทคาร์บอกซีเพปทิเดส อยู่ในกลุ่มของเมทัลโลโปรตีเอส ซึ่งมีส่วนสำคัญในการเปลี่ยนโมเลกุลของโอคราทอกซินเอให้อยู่ในรูปโอคราทอกซินแอลฟาที่มีความเป็นพิษน้อยกว่า (Peteri et al., 2007)

กวิน เจริญยงค์ (2556) ได้คัดแยกจุลินทรีย์จากไซเลจข้าวโพดประกอบด้วย ยีสต์สายพันธุ์ B1, B2, B3 และ B4 และแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ AN2 และ AN3 ซึ่งต่อมา พีรพล มารุ่งเรือง (2559) นำยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อระบุสายพันธุ์ของยีสต์ พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ B1 และ B2 คือ *Wickerhamomyces anomalus* MSCU 0652 และ MSCU 0653 ตามลำดับ ยีสต์สายพันธุ์ B3 คือ *S. cerevisiae* MSCU 0654 และยีสต์สายพันธุ์ B4 คือ *Kluyveromyces marxianus* MSCU 0655 และได้ศึกษาการปฏิบัติเบื้องต้นของยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* และ *A. carbonarius* พบว่ายีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราทั้งสองชนิดได้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดของยีสต์ที่ใช้ในการยับยั้งดังกล่าว

*W. anomalus* มีลักษณะโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีขาวจนถึงสีครีม โคลอนีมีลักษณะนูนโค้งไปจนถึงเป็นพู โดยทั่วไปมักสร้างสารระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะ (Kurtzman, 2008) สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในพืช ดิน ผลไม้ สัตว์ และในกระบวนการหมักอื่น ๆ (Huang et al., 2012) *W. anomalus* สามารถเจริญได้ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ค่าความเป็นกรด-เบสสูง ค่าวอเตอร์แอกทิวิตีต่ำ และในสภาวะไร้อากาศ (Fredlund, Druvefors, Boysen, Lingsten, & Schnurer, 2002) ปัจจุบันได้มีการใช้ประโยชน์จาก *W. anomalus* เพื่อเป็นสารป้องกันทางชีวภาพ

ในอาหารสัตว์ สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นหลายชนิด และสามารถลดความเข้มข้นของไฟเตตที่สามารถจับกับแร่ธาตุสำคัญ เช่น เหล็ก และสังกะสี ซึ่งจะทำให้ร่างกายขาดแร่ธาตุในที่สุด (Olstorpr & Passoth, 2010) นอกจากนี้ *W. anomalous* ยังถูกนำมาทดสอบความสามารถในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ เช่น ถูกใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตเพื่อยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในแอปเปิ้ล และสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีในระหว่างการเก็บรักษาผลผลิต ซึ่งมีปริมาณออกซิเจนน้อย (Kurtzman, 2008)

*S. cerevisiae* มักรู้จักกันในชื่อ baker's yeast หรือยีสต์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ มีลักษณะโคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นโคโลนีทรงกลม สีขาวขุ่น สามารถพบได้ทั่วไปในผลไม้สุกในทางเดินอาหารและผิวหนังของแมลงรวมทั้งสัตว์เลือดอุ่น นอกจากนี้ ยังพบในดินและแหล่งน้ำตามธรรมชาติ (Vaughan-Martini & Martini, 1993) *S. cerevisiae* ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมในการผลิตอาหารและเครื่องดื่มอย่างแพร่หลาย เช่น ขนมนปัง โกลีไวน์ เบียร์ ไชเดอร์ สุราประเภทต่าง ๆ รวมถึงเครื่องดื่มแอลกอฮอล์หลายชนิดที่ผลิตจากผลไม้ น้ำผึ้ง และใบชา (Stewart, 2014) นอกจากนี้ในปัจจุบันยังได้มีการพัฒนาให้สามารถใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ สามารถใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในการลดการปนเปื้อนสารพิษจากราในกระบวนการหมักเครื่องดื่มประเภทไวน์ได้ (Freimoser, Rueda-Mejia, Tilocca, & Migheli, 2019) และมีการจำหน่าย *S. cerevisiae* เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพทางการค้า เช่น Romeo® และ cerevisae® (EFSA., 2015)

*K. marxianus* มีลักษณะโคโลนีเมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นทรงกลม ค่อนข้างโปร่ง โคโลนีมีสีครีมไปจนถึงสีน้ำตาลและอาจพบโคโลนีสีชมพูได้ พบได้ในอาหารและเครื่องดื่มหลายชนิด โดยเฉพาะ ผลิตภัณฑ์จากนม รวมทั้งในเนื้อเยื่อของพืชและแมลง (Lachance, 2011) *K. marxianus* สามารถผลิตเอนไซม์ที่สำคัญได้หลายชนิด เช่น  $\beta$ -กาแลกโตซิเดส อินนูลิเนส และแพคตินเนส (Lachance, 1998) นอกจากนี้ ยังสามารถผลิตแลคโตสจากกระบวนการหมักได้ จึงถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตและแปรรูปนม และสามารถผลิตเอทานอลได้จากหางนมเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ รวมทั้ง ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งของโพลิโกนิวคลีโอไทด์ เพื่อให้เป็นวัตถุดิบปรุงแต่งในอาหารและเป็นโพลีไอดีทที่สำคัญ (Fonseca, Heinzle, Wittmann, & Gombert, 2008) อย่างไรก็ตาม มีเพียงงานวิจัยบางฉบับที่ระบุถึงความสามารถของ *K. marxianus* ที่คัดแยกจากธรรมชาติ ในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพเพื่อยับยั้งการเจริญของราก่อโรคในผลผลิตทางการเกษตร (Geng, Zhang, Hu, Chen, &

Qu, 2011) จากงานวิจัยของ Geng และคณะ (2011b) พบว่า *K. marxianus* เมื่อเลี้ยงร่วมกับ โขเดียมไบคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถส่งเสริมความสามารถในการเป็นปฏิปักษ์ของยีสต์ต่อ *P. digitatum* ที่ก่อโรคในผลส้มได้ (Geng, Chen, et al., 2011)

ดังนั้น งานวิจัยฉบับนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์สามชนิด ได้แก่ *W. anomalus* MSCU 0652, *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ *K. marxianus* MSCU 0655 และศึกษากลไกสำคัญของยีสต์แต่ละชนิด รวมทั้งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญที่มีผลต่อการยับยั้ง การเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* และ *A. carbonarius*



### บทที่ 3

#### อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการ

##### 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กรวยกรอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
2. กระดาษกรอง เบอร์ 1 ขนาด 110 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Whatman, USA
3. กระดาษกรองชนิดใยแก้ว (Microfibre filters) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร ขนาดรูพรุน 1.5 ไมโครเมตร บริษัท Vicam, Sweden
4. กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 1, 10 และ 20 มิลลิลิตร บริษัท Nipro, USA
5. กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดา ยี่ห้อ Olympus บริษัท อีฟอ์แอล อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, Japan
6. กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ ยี่ห้อ Olympus บริษัท อีฟอ์แอล อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, Japan
7. ขวดวัดปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร บริษัท Kimax, USA
8. ขวดใส่สารละลาย ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Duran, Germany
9. เครื่องชั่ง รุ่น PG6002-5 และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
10. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325 และ ES-315 บริษัท Tomy, Japan
11. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries, USA
12. เครื่องเปลี่ยนอากาศเป็นแก๊สไนโตรเจน ยี่ห้อ Peak scientific, UK
13. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
19. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centifuge) บริษัท Kubota Laboratory, Japan
20. จานเพาะเชื้อแก้ว (petri dish) บริษัท Pyrex, Germany
21. จานเพาะเชื้อพลาสติกปลอดเชื้อ (sterile petri dish) บริษัท Greiner bio-one, Austria
22. ชุดกรองสูญญากาศ บริษัท Merk Milipore, USA
  - กรวยกรองแก้ว ปริมาตร 300 มิลลิลิตร
  - กระดาษกรอง ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร



- ขวดรูปชมพู่ ขนาด 1000 มิลลิลิตร
- คีบล็อกออลูมิเนียม
- เครื่องปั๊ม
- จุกสุญญากาศ

23. ชุดโครมาโทกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

- คอลัมน์ (column) C18 ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครลิตร รุ่น Luna บริษัท Phenomenex, USA
  - คอลัมน์ (column) C18 ขนาด 150 x 4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครลิตร รุ่น Luna บริษัท Phenomenex, USA
  - เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence detector) รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
  - เครื่องปั๊ม autosample รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
24. ตู้แช่แข็ง รุ่น Mark II ยี่ห้อ Clean บริษัท Lab Service, Thailand
25. ตู้แช่แข็ง รุ่น V6-T ขนาด 2 x 4 ฟุต บริษัท Lab Micro, Thailand
26. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส บริษัท Sandenintercool, Thailand
27. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น D06064 บริษัท Memmert, Germany
28. ตู้บ่มเชื้อ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประกอบในประเทศไทย
29. ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บริษัท Sandenintercool, Thailand
30. ตู้อบแห้ง บริษัท Conthem Scientific, New Zealand
31. ถังมือยาง ยี่ห้อ ศรีตรังโกลฟ์, Thailand
32. ปีกเกอร์ ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
33. ปิเปตต์แก้ว ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Qualicolor, Germany
34. แผ่นพาราฟิล์ม บริษัท Menasha, Thailand
35. พาสเจอร์ปิเปตต์แก้ว ขนาด 150 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Volac, UK
36. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 20, 200, 1000 และ 5000 มิลลิลิตร บริษัท Eppendorf, Germany

37. ไมโครปิเปตต์ทีป (Micropipette tip) ขนาด 200 และ 1000 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Hycon บริษัท Biomed, Thailand
38. สไลด์ ขนาด 25.6 × 76.2 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Sali Brand, China
39. หลอดเซนทรีฟิวจ์ 50 มิลลิลิตร บริษัท SPL Life Sciences, Korea
40. หลอดเซนทรีฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Hycon บริษัท Biomed, Thailand
41. หลอดทดลองขนาด 10 × 100 และ 22 × 200 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, Germany
42. หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 10 × 100 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, Germany
43. หัวกรองสำเร็จ ชนิด Polyethersulfon (PES) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Whatman, USA
44. หัวกรองสำเร็จ ชนิด Polytetrafluoroethylene (PTFE) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร บริษัท Lubitech Technologies, China
45. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB14 บริษัท Memmert, Germany
46. อ่างอัลตราโซนิค (ultrasonic bath) รุ่น SONOREX RX 100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany
47. ฮีมาไซโทมิเตอร์ ยี่ห้อ Boeco, Germany

### 3.2 เคมีภัณฑ์

1. กรดทาร์ตริก (CHOHCOOH)<sub>2</sub> บริษัท Ajax Finechem, Australia
2. กรดฟอร์มิก (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) บริษัท Merck, Germany
3. กรดอะซีติก (CH<sub>3</sub>COOH) บริษัท Merck, Germany
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
5. โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO<sub>3</sub>) บริษัท Merck, Germany
6. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaHPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O) บริษัท Ajax Finechem, Australia
7. ผงวุ้น บริษัท Difco Laboratories, USA
8. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck, Germany
9. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) บริษัท Merck, Germany
10. เมทานอล (CH<sub>3</sub>OH) บริษัท Merck, Germany
11. สารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 บริษัท Sigma-Aldich, USA

12. สารละลายมาตรฐานไอคราทอกซินเอ บริษัท Sigma-Aldich, USA
13. อะซีโทไนไตรล์ (CH<sub>3</sub>CN) ยี่ห้อ RCI Labscan บริษัท V.S.CHEM HOUSE, Thailand
14. D-glucose anhydrous บริษัท HiMedia Laboratories, India
15. Malt extract powder บริษัท HiMedia Laboratories, India
16. Peptone บริษัท HiMedia Laboratories, India
17. Potato Dextrose Agar บริษัท Difco Laboratories, USA
18. Potato Dextrose Broth บริษัท Difco Laboratories, USA
19. Tween 80 บริษัท Merck, Germany
20. Yeast extract powder บริษัท HiMedia Laboratories, India

### 3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

1. *Aspergillus carbonarius* TK4.2
2. *Aspergillus flavus* M3T8R4G3
3. *Kluyveromyces marxianus* MSCU 0655
4. *Saccharomyces cerevisiae* MSCU 0654
5. *Wickerhamomyces anomalus* MSCU 0652

จุลินทรีย์ที่ใช้ทั้งหมดในงานวิจัยถูกเก็บรักษาที่คลังจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะ  
วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

### 3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.4.1. เตรียมจุลินทรีย์

##### 3.4.1.1 เซลล์ยีสต์แขวนลอย

นำยีสต์ปฏิปักษ์ *W. anomalus* MSCU 0652, *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ *K. marxianus* MSCU 0655 เลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast Malt extract (YM) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้น นำโคโลนีเดี่ยวที่คัดแยกได้เตรียมเป็นหัวเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และถ่ายลงในอาหาร

เหลว YM หลอดใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดย *W. anomalous* และ *K. marxianus* บ่มเป็นเวลา 9 ชั่วโมง 30 นาที และ *S. cerevisiae* บ่มเป็นเวลา 8 ชั่วโมง เพื่อให้ยีสต์เจริญจนถึงช่วง mid log phase (มารุ่งเรือง, 2559) จากนั้น นำยีสต์ไปพักถ่ายลงหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนยีสต์ที่ได้ด้วยสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) (ภาคผนวก ก) ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้น ละลายตะกอนยีสต์ด้วยสารละลาย PBS และนับจำนวนยีสต์ด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ให้มีความเข้มข้น  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

#### 3.4.1.2 สปอร์ราแขวนลอย

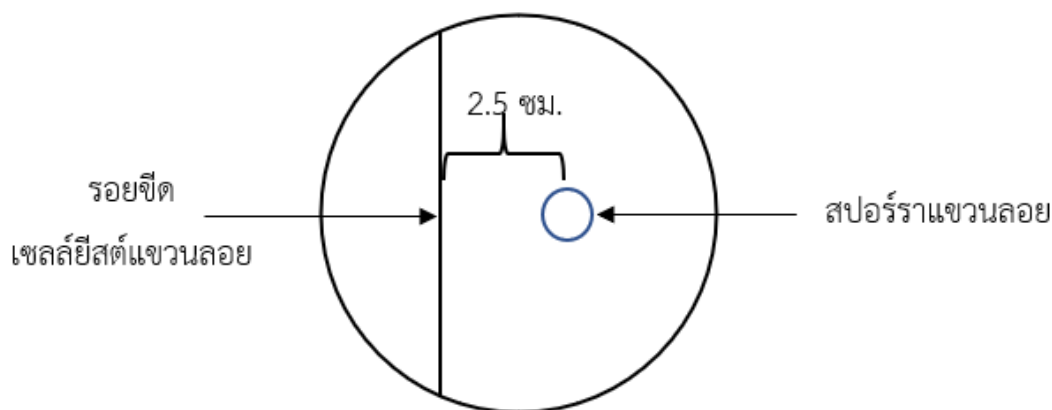
นำ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซิน (กิตติกำแหง, 2554) และ *A. carbonarius* TK4.2 ที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอ (ธราดลศิริรัฐติกุล, 2554) เลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บสปอร์ราด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ Tween 80 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ปราศจากเชื้อ นับจำนวนสปอร์ให้มีความเข้มข้น  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร

#### 3.4.2. การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิสัมพันธ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของ *A. flavus* และ *A. carbonarius*

##### 3.4.2.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญด้วยวิธี Dual culture

นำเซลล์ยีสต์แขวนลอยทั้ง 3 ชนิดจากข้อ 1.1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Dual culture ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Pantelides และคณะ (2015) (Pantelides et al., 2015) โดยใช้ห้วงเชื้อเชื้อยีสต์แขวนลอยให้เป็นเส้นตรงลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วหยดสปอร์ราแขวนลอยจากข้อ 1.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ให้ห่างจากรอยยีสต์ 2.5 เซนติเมตร (รูปที่ 4) รอให้แห้งสนิท บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้จานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ชิต PBS ที่ปราศจากยีสต์ และหยดสปอร์ราแขวนลอยห่างจากรอยยีสต์ 2.5 เซนติเมตร เป็นชุดควบคุม วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีรา ณ วันที่ 7 ของการบ่ม ทำการทดลอง 2 ซ้ำ แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราดังนี้

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

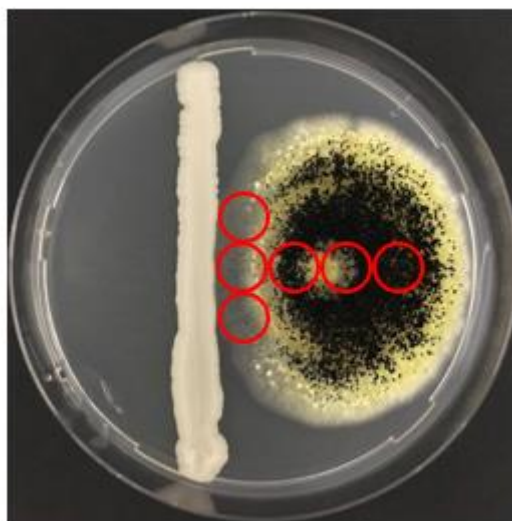


รูปที่ 4 การทดสอบด้วยวิธี Dual culture

#### 3.4.2.2 การทดสอบความสามารถในการลดการผลิตสารพิษจากรา

หลังจากวัดการเจริญของราในข้อ 3.4.2.1 นำรามาสกัดสารพิษจากราตามวิธีของ Dachoupakan และคณะ, 2009 (Dachoupakan et al., 2009) โดยเจาะวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณของโคโลนีราดังแสดงในรูปที่ 5 จำนวน 6 ชิ้น ใส่ขวดสกัด ซึ่งน้ำหนักขวดสกัดทั้งก่อนและหลังใส่ชิ้นวุ้นเพื่อคำนวณหาน้ำหนักของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้น เติมนเมทานอลเพื่อสกัดอะฟลาทอกซินปี 1 หรือ เติมนเมทานอลผสมกรดฟอร์มิกอัตราส่วน 25:1 เพื่อสกัดโอคราทอกซินเอ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร แล้วสกัดสารพิษโดยใช้อ่างอัลตราโซนิก เป็นเวลา 15 นาที แล้วกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำสารสกัดปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไประเหยด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้น เติมนเฟสเคลื่อนที่สำหรับอะฟลาทอกซิน (อะซีโทไนไตรล์ : น้ำปอดประจุ : เมทานอล เท่ากับ 20:60:20) หรือเฟสเคลื่อนที่สำหรับโอคราทอกซินเอ (อะซีโทไนไตรล์ : น้ำปอดประจุ : กรดอะซีติก เท่ากับ 49.5:49.5:1) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร แล้วส่งวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินและโอคราทอกซินเอด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 โดยใช้คอลัมน์ C18 ขนาด 150 x 4.6 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ที่มี excitation wavelength

( $\lambda_{exc}$ ) เท่ากับ 365 นาโนเมตร และ emission wavelength ( $\lambda_{em}$ ) เท่ากับ 435 นาโนเมตร และมีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดย retention time (RT) ของอะฟลาทอกซินบี 1 เท่ากับ 7 นาที และวิเคราะห์โอคราทอกซินเอโดยใช้คอลัมน์ C18 ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตรวจวัดด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ที่มี  $\lambda_{exc}$  เท่ากับ 333 นาโนเมตร และ  $\lambda_{em}$  เท่ากับ 477 นาโนเมตร และมีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดย retention time (RT) โอคราทอกซินเอเท่ากับ 10 นาที โดยมีค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้ (Limit of Detection; LOD) และค่าปริมาณต่ำสุดที่สามารถวัดได้โดยมีความแม่นยำและความเที่ยงตามที่กำหนด (Limit of Quantitation; LOQ) ของอะฟลาทอกซินบี 1 เท่ากับ 0.89 และ 2.71 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และค่า LOD และ LOQ ของโอคราทอกซินเอเท่ากับ 0.63 และ 1.92 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ



รูปที่ 5 วิธีการเจาะรูอาหารเลี้ยงเชื้อจากโคโลนีราเพื่อสกัดสารพิษจากรา

### 3.4.3. การทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับรา

เตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอยทั้ง 3 ชนิดจากข้อ 1.1 ทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งต่อการเจริญของยีสต์ปฏิปักษ์เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *A. flavus* และ *A. carbonarius* ด้วยวิธี Agar spot assay ดัดแปลงมาจาก Sangmanee และ Hogpattarakere (2014) (Sangmanee & Hongpattarakere, 2014) โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast extract Peptone Dextrose

หรือ YPD (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้น หยอดสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้น เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ผสมด้วยสปอร์ราแขวนลอยปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ที่มีการเจริญของยีสต์ บ่มต่อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สังเกตบริเวณที่มีการยับยั้งการเจริญของรา ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

#### 3.4.4. การทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา

เลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนถึงช่วง mid log phase (8 ชั่วโมง สำหรับ *S. cerevisiae* MSCU 0654, 9 ชั่วโมง 30 นาที สำหรับ *K. marxianus* MSCU 0655 และ *W. anomalus* MSCU 0652) ซึ่งมีอัตราการเจริญของยีสต์สูงที่สุด และ late log phase (16 ชั่วโมง สำหรับ *S. cerevisiae* MSCU 0654, 18 ชั่วโมงสำหรับ *K. marxianus* MSCU 0655 และ *W. anomalus* MSCU 0652) (มารุ่งเรือง, 2559) ซึ่งเป็นช่วงการเจริญที่เหมาะสมต่อการสร้างเมแทบอลิต์ทุติยภูมิ แล้วกรองเพื่อแยกน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ (cell-free supernatant) แบ่งครึ่งหนึ่งไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ได้น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อน (autocleaved cell-free supernatant) จากนั้น ทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion assay ดัดแปลงมาจาก Balouiri และคณะ (2016) โดยกระจายสปอร์ราแขวนลอยปริมาตร 100 ไมโครลิตร บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วนำไปเจาะหลุมจำนวน 2 หลุม จากนั้น หยดน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากยีสต์ทั้ง 2 แบบ ได้แก่ น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ และน้ำเลี้ยงปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยด้านซ้ายหยดน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อน ด้านขวาหยดน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีการกระจายสปอร์ราแขวนลอยและเจาะหลุม หยดอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญของรา ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.4.5. การทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) ของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา

3.4.5.1 การทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย

ทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face double petri dish assay ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Fiori และคณะ (2014) (Fiori et al., 2014) โดยนำเซลล์ยีสต์แขวนลอยทั้ง 3 ชนิด จากข้อ 3.4.1.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กระจายบนอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD จากนั้น หยดสปอร์ราแขวนลอยจากข้อ 1.2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA รอให้แห้งสนิท แล้วนำจานอาหารเลี้ยงยีสต์และจานอาหารเลี้ยงราประกบเข้ากัน โดยให้จานอาหารเลี้ยงราอยู่ด้านบนแล้วพันจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองด้วยพาราฟิล์มบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ใช้จานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่เลี้ยงราเพียงที่ประกบด้วยจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่ปราศจากยีสต์เป็นชุดควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรา ณ วันที่ 7 ของการบ่ม แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเทียบกับชุดควบคุม สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโคโคนีด้วยตาเปล่า แล้วนำเส้นใยราที่บริเวณยับยั้งชัดเจน ไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : SEM) เปรียบเทียบกับเส้นใยราในชุดควบคุม ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากนั้น เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อตรงกลางโคโคโคนีจำนวน 6 ซึ้น นำไปสกัดและวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอตามวิธีในข้อ 3.4.2.2

3.4.5.2 การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์

การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.4.5.1 โดยกำหนดปัจจัยของสิ่งแวดล้อม 3 ปัจจัย ได้แก่

1. ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 3.5, 4, 4.5 และ 5 ซึ่งมาจากค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจ ที่เป็นแหล่งคัดแยกยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด (Kung & Ranjit, 2001)



2. อุณหภูมิที่ใช้การบ่ม ที่ 25, 37 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. carbonarius* และ *A. flavus* ตามลำดับ (Lahouar, Marin, Crespo-Sempere, Said, & Sanchis, 2016; Passamani et al., 2014)

3. อัตราส่วนความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ปกติ, ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD 0.5 เท่า และความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD 0.1 เท่า (ภาคผนวก ก)

คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเทียบกับชุดควบคุม และวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 และโอคราทอกซินเอตามวิธีในข้อ 2.2

#### 3.4.5.3 การวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดบรรจุสารขนาด 20 มิลลิลิตร จากนั้นหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอยจากข้อ 3.4.1.2 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้น ส่งวิเคราะห์ชนิดของสารอินทรีย์ระเหยง่ายที่ยีสต์สามารถผลิตได้โดยวิธี Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Headspace GC-MS) ที่ ศูนย์ เครื่องมือ วิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC/MS ยี่ห้อ Agilent 7890B และ Agilent 7633 ALS เชื่อมต่อกับ Agilent 7000C GC/MS Triplr Quad MSD model โดยใช้คอลัมน์ HP-INNOWAX ขนาด 30 x 0.25 มิลลิเมตร ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร ใช้รูปขนาด 1 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยมีอัตราส่วนของ split ratio เท่ากับ 50:1 คงอยู่ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส มีแก๊สฮีเลียมเป็นตัวพาด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเพิ่มเป็น 230 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเท่ากับ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที สำหรับการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลจะวิเคราะห์ในช่วง 33-500 เมตรต่อเฮิร์ต โดยกำหนดแหล่งกำเนิดประจุไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 230 องศาเซลเซียส ใช้พลังงาน 70 อิเล็กตรอนโวลต์ วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยกำหนดอุณหภูมิในการถ่ายโอนมวลสารที่ 250 องศาเซลเซียส

### 3.4.6. การทดสอบความสามารถของยีสต์ในการลดการปนเปื้อนสารพิษจากรา

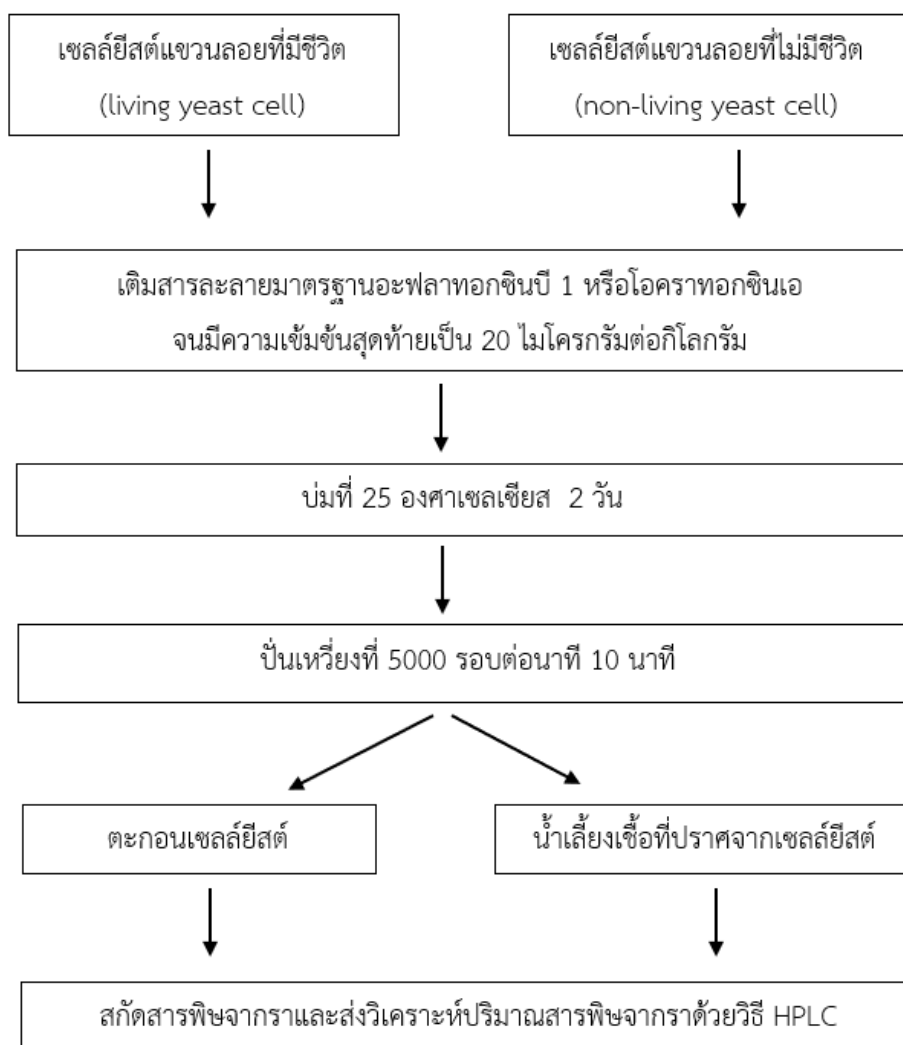
#### 3.4.6.1 การทดสอบความสามารถในการดูดซับหรือดูดซึมสารพิษจากราด้วยเซลล์ยีสต์

##### ปฏิบัติ

ทดสอบความสามารถในการดูดซับหรือดูดซึมสารพิษจากรา โดยการเตรียมหัวเชื้อยีสต์ในอาหารเหลว YPD บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส จนการเจริญถึงช่วง mid log phase (8 ชั่วโมง สำหรับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ 9 ชั่วโมง 30 นาที สำหรับ *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655) (มารุ่งเรือง, 2559) จากนั้น นำยีสต์ไปปฏิบัติปล่อยลงหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนยีสต์ที่ได้ด้วยสารละลาย PBS ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.2 (ภาคผนวก ก) ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้น ละลายตะกอนยีสต์ด้วยสารละลาย PBS และนับจำนวนยีสต์ด้วยฮีมาไซโทมิเตอร์ โดยเตรียมเป็นเซลล์ยีสต์แขวน 2 แบบ ได้แก่ ชุดทดสอบเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่มีชีวิต (living yeast cell) ความเข้มข้น  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษจากรา และชุดทดสอบเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (non-living yeast cell) มีความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เท่ากับ  $10^{10}$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการดูดซึมสารพิษจากรา โดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น เติมเซลล์ยีสต์แขวนลอยทั้งสองแบบปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 หรือโอคราทอกซินเอลงไปให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน โดยใช้หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่เติมสารพิษจากราเป็นชุดควบคุม

หลังจากนั้น นำชุดทดสอบไปแยกตะกอนเซลล์ยีสต์และส่วนของน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากเชื้อออกจากกันด้วยเครื่องเซนทริฟิวจ์จำนวน 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ซึ่งน้ำหนักตะกอนเซลล์ยีสต์ที่แยกได้ แล้วสกัดสารพิษจากราออกจากตะกอนเซลล์ยีสต์โดยเติมสารสกัดอะฟลาทอกซินบี 1 และสารสกัดโอคราทอกซินเอ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ปั่นเซลล์ด้วยเครื่อง vortex เพื่อให้เซลล์ยีสต์แตก เป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำส่วนที่กรองปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไประเหยสารสกัดด้วยแก๊สไนโตรเจน และเติมเฟสเคลื่อนที่สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร ส่งวิเคราะห์สารพิษจากราด้วยเครื่องโครมาโท กราฟิสมรรถนะสูง (HPLC) สำหรับน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่แยกออกจากจากตะกอน นำไปสกัดสารพิษจากรา

โดยนำตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดสีกัด แล้วเติมสารสกัดสำหรับอะฟลาทอกซินบี 1 หรือโอคราทอกซินเอ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สกัดสารพิษจากราโดยใช้อ่างอัลตราโซนิก เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำส่วนที่กรอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไประเหยสารด้วยแก๊สไนโตรเจน จากนั้น เติมเฟสเคลื่อนที่สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร แล้วส่งวิเคราะห์สารพิษจากราด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) แผนภาพขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการดูดซับหรือดูดซึมสารพิษจากราแสดงในรูปที่ 6

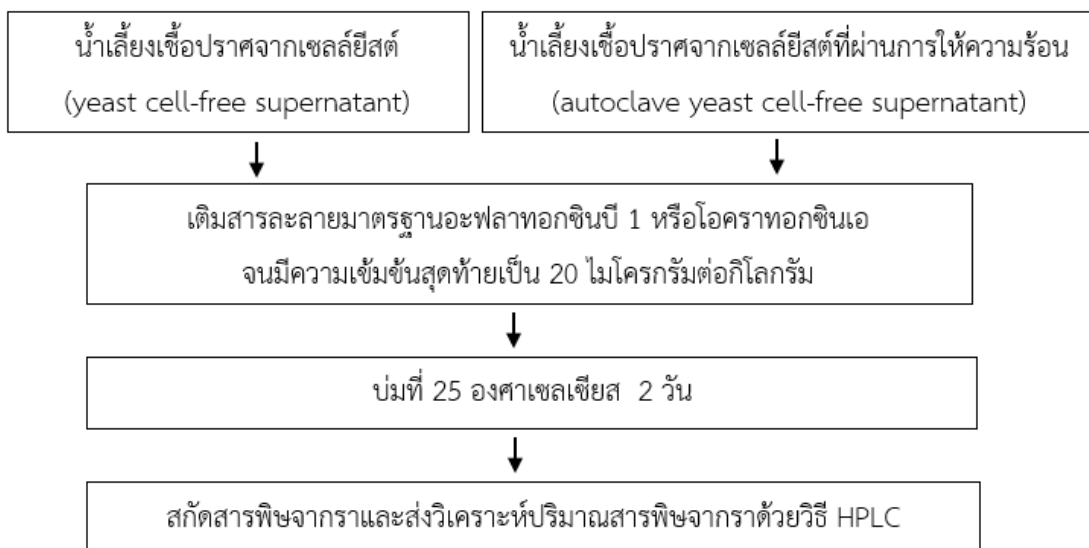


รูปที่ 6 ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการดูดซับหรือดูดซึมสารพิษจากราด้วยเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์

### 3.4.6.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารพิษจากราดด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์

เลี้ยงยีสต์ปฏิปักษ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนถึงการเจริญช่วง mid log phase (8 ชั่วโมง สำหรับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ 9 ชั่วโมง 30 นาที สำหรับ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655) (พีรพลมารุ่งเรือง, 2559) นับจำนวนเซลล์ยีสต์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ให้มีความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เท่ากับ  $10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วกรองผ่านหัวกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิลิตร ขนาดของรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร ได้น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ (yeast cell-free supernatant) และเตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อีกชุดหนึ่ง นำไปกรองผ่านหัวกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิลิตร ขนาดของรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ได้ชุดทดสอบน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อน (autoclave yeast cell-free supernatant) จากนั้น เติมนสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 หรือโอคราทอกซินเอ ลงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ทั้งสองชุด ทดสอบให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน โดยใช้หลอดอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่เติมนสารพิษจากราเป็นชุดควบคุม

หลังจากนั้น นำไปสกัดสารพิษจากราปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดสกัด เติมนสารสกัดสำหรับอะฟลาทอกซินบี 1 หรือโอคราทอกซินเอ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สกัดสารพิษจากราโดยใช้อ่างอัลตราโซนิก เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำส่วนที่กรอง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไประเหยสารด้วยแก๊สไนโตรเจน จากนั้น เติมนเฟสเคลื่อนที่สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร ขนาดรูพรุน 0.22 ไมโครเมตร แล้วส่งวิเคราะห์สารพิษจากราดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีสมรรถนะสูง (HPLC) แผนภาพขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารพิษจากราแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 ขั้นตอนการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารพิษจากราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์



## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

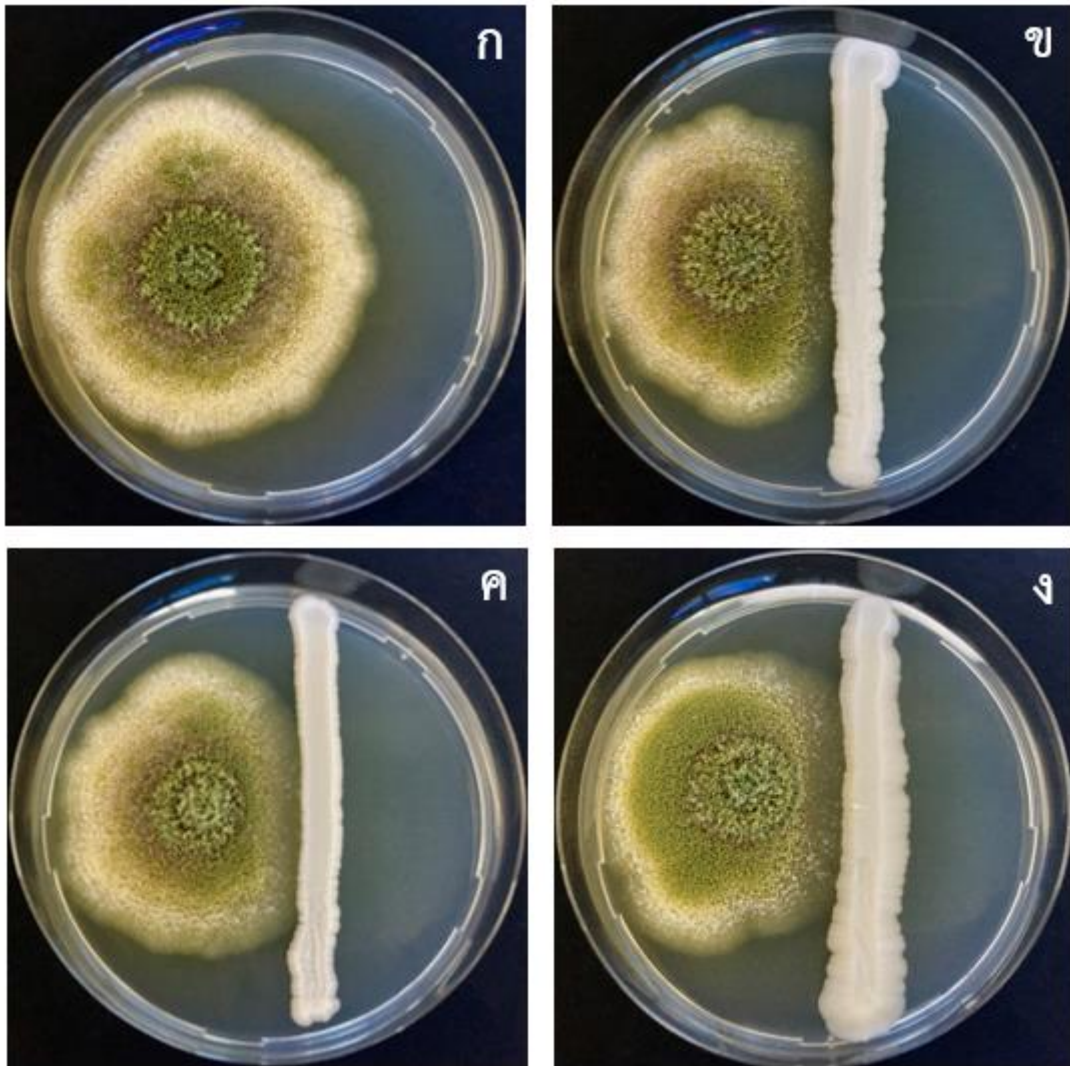
#### 4.1 ทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* และ *A. carbonarius*

จากการนำ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่มีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และ *A. carbonarius* TK4.2 ที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ มาเลี้ยงร่วมกับ *W. anomalous* MSCU 0652, *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ *K. marxianus* MSCU 0655 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธี dual culture บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราพบว่า ยีสต์แต่ละชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของราและการสร้างสารพิษจากราทั้งสองชนิดได้แตกต่างกัน

*A. flavus* M3T8R4G3 มีขนาดโคโลนีที่เล็กลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว ซึ่งสามารถสังเกตเห็นบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้นได้ใกล้กับรอยขีดของยีสต์ทั้งสามชนิดที่ใช้ทดสอบ (รูปที่ 8) เมื่อพิจารณาจากลักษณะของโคโลนีราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่า *A. flavus* M3T8R4G3 สร้างเส้นใยราสีขาวและสร้างสปอร์ที่มีสีเขียว ซึ่งไม่แตกต่างจากราในชุดควบคุม ทั้งนี้ยีสต์ทั้งสามชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของราได้เพียงเล็กน้อย (น้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์) โดย *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด ด้วยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเท่ากับ  $22.83 \pm 3.67$  เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12) สำหรับการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 พบว่า *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ทั้งสามชนิดผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดย *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดีที่สุด ด้วยเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ  $43.03 \pm 3.63$  เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 12)

*A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดพบว่า รามีขนาดของโคโลนีเล็กลงเพียงเล็กน้อยและสร้างสปอร์สีดำซึ่งไม่แตกต่างจากราในชุดควบคุม อย่างไรก็ตามสามารถสังเกตเห็นบริเวณยับยั้งการเจริญของราได้อย่างชัดเจนใกล้กับบริเวณรอยขีดยีสต์ *W. anomalous* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 (รูปที่ 9) เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 พบว่า ยีสต์ทั้งสามชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของราได้เพียงเล็กน้อย (น้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์) โดย *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด ( $21.31 \pm 2.79$  เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 13)

สำหรับการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่า ราผลิตโอคราทอกซินเอลดลง โดย *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถลดการผลิตโอคราทอกซินเอของราได้ดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของโอคราทอกซินเอเท่ากับ  $30.36 \pm 1.54$  เปอร์เซ็นต์

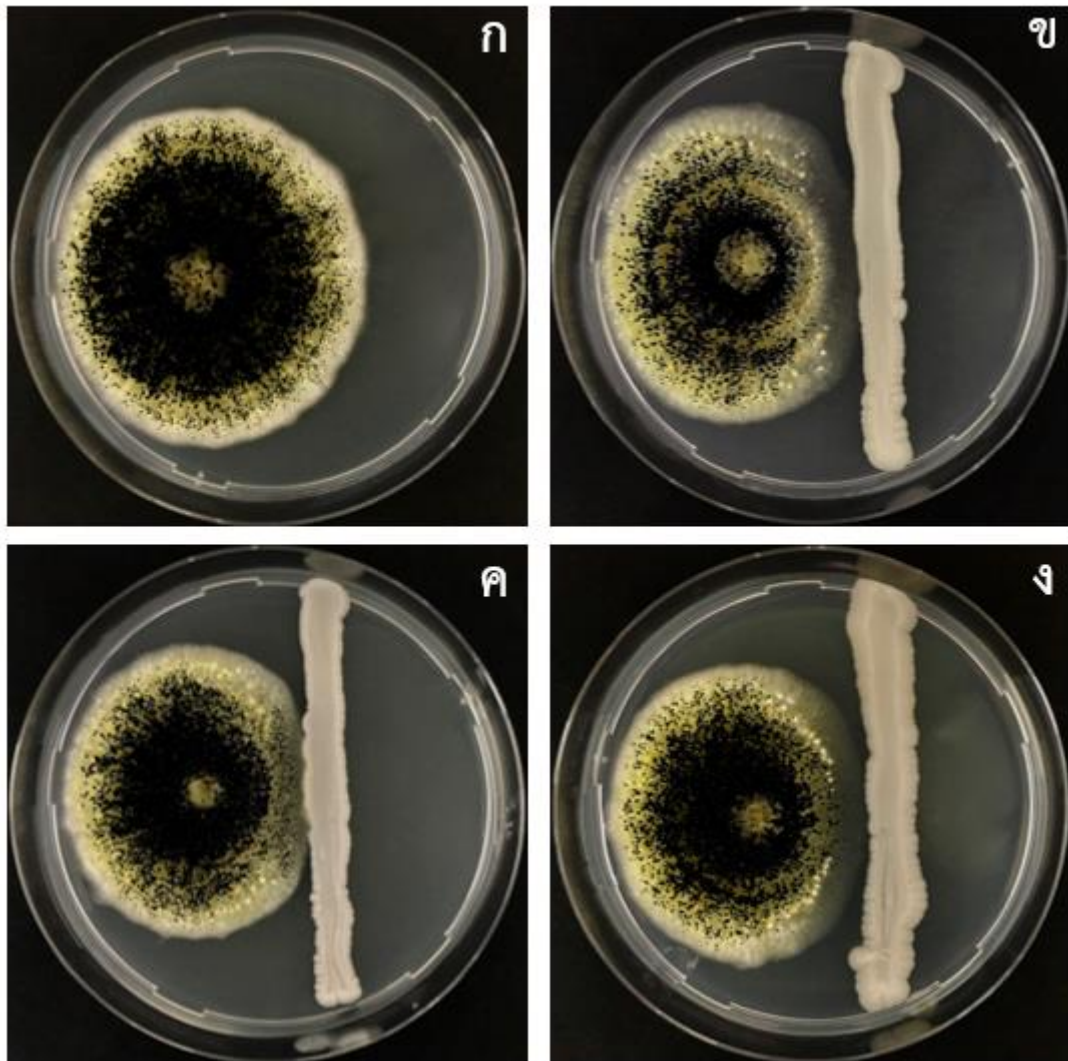


รูปที่ 8 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี dual culture บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) *W. anomalus* MSCU 0652, (ค) *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ (ง) *K. marxianus* MSCU 0655

ตารางที่ 12 การเจริญและการผลิตอะพลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus M3T8R4G3* เมื่อเลี้ยงร่วมกับ ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด ด้วยวิธี *dual culture* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ชุดทดสอบ	การเจริญของรา		การผลิตอะพลาทอกซินปี 1	
	เส้นผ่าน ศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์ การยับยั้ง	ปริมาณ อะพลาทอกซินปี 1 (นาโนกรัมต่อกรัม)	เปอร์เซ็นต์ การลดลง
ชุดควบคุม	5.83±0.09		1,900.46±105.61	
<i>W. anomalous</i> MSCU 0652	4.65±0.16	20.25±4.12	1,236.15±161.70	35.09±4.90
<i>S. cerevisiae</i> MSCU 0654	4.57±0.00	21.70±1.27	1,135.16±65.97	40.27±0.15
<i>K. marxianus</i> MSCU 0655	4.50±0.14	22.83±3.67	1,080.70±8.92	43.03±3.63





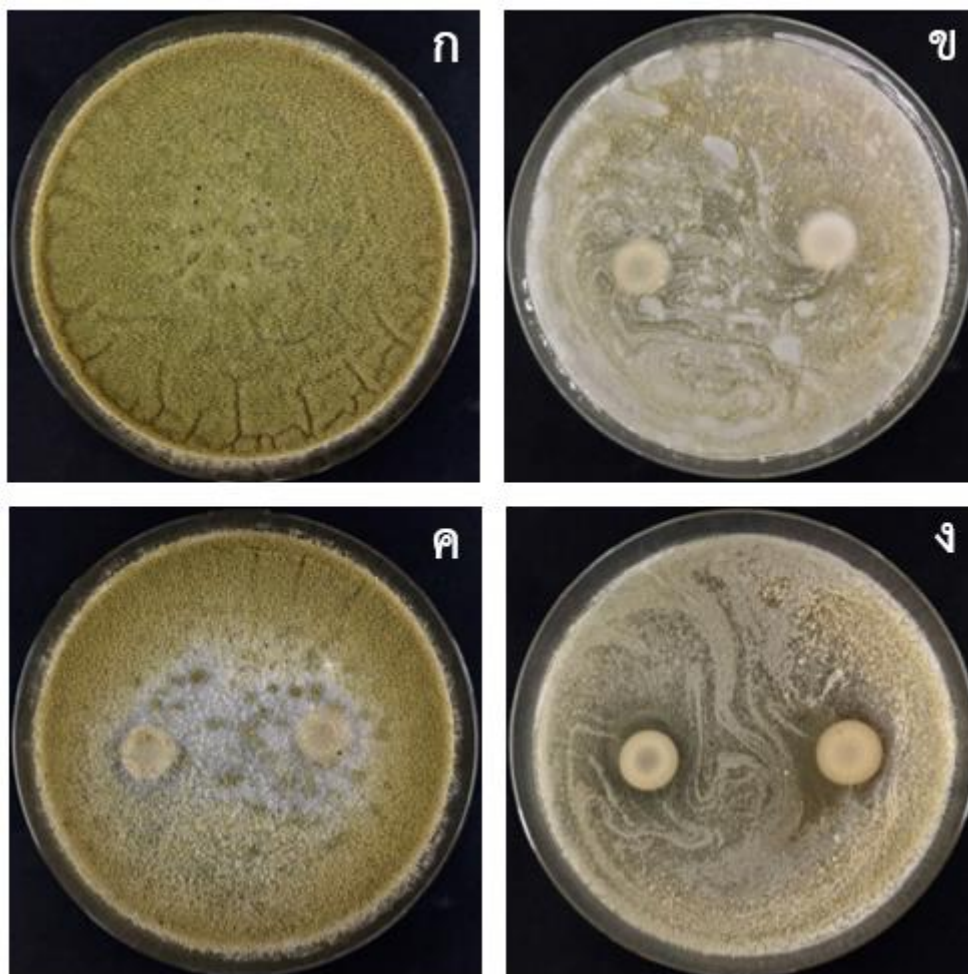
รูปที่ 9 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *dual culture* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) *W. anomalus* MSCU 0652, (ค) *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ (ง) *K. marxianus* MSCU 0655

**ตารางที่ 13** การเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด ด้วยวิธี *dual culture* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ชุดทดสอบ	การเจริญของรา		การผลิตโอคราทอกซินเอ	
	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ปริมาณโอคราทอกซินเอ (นาโนกรัมต่อกรัม)	เปอร์เซ็นต์การลดลง
ชุดควบคุม	6.17±0.19		697.45±51.63	
<i>W. anomalus</i> MSCU 0652	4.87±0.00	21.04±2.41	549.62±14.03	21.05±3.83
<i>S. cerevisiae</i> MSCU 0654	4.87±0.09	21.02±3.94	561.31±187.76	18.30±32.97
<i>K. marxianus</i> MSCU 0655	4.85±0.02	21.31±2.79	486.13±46.67	30.36±1.54

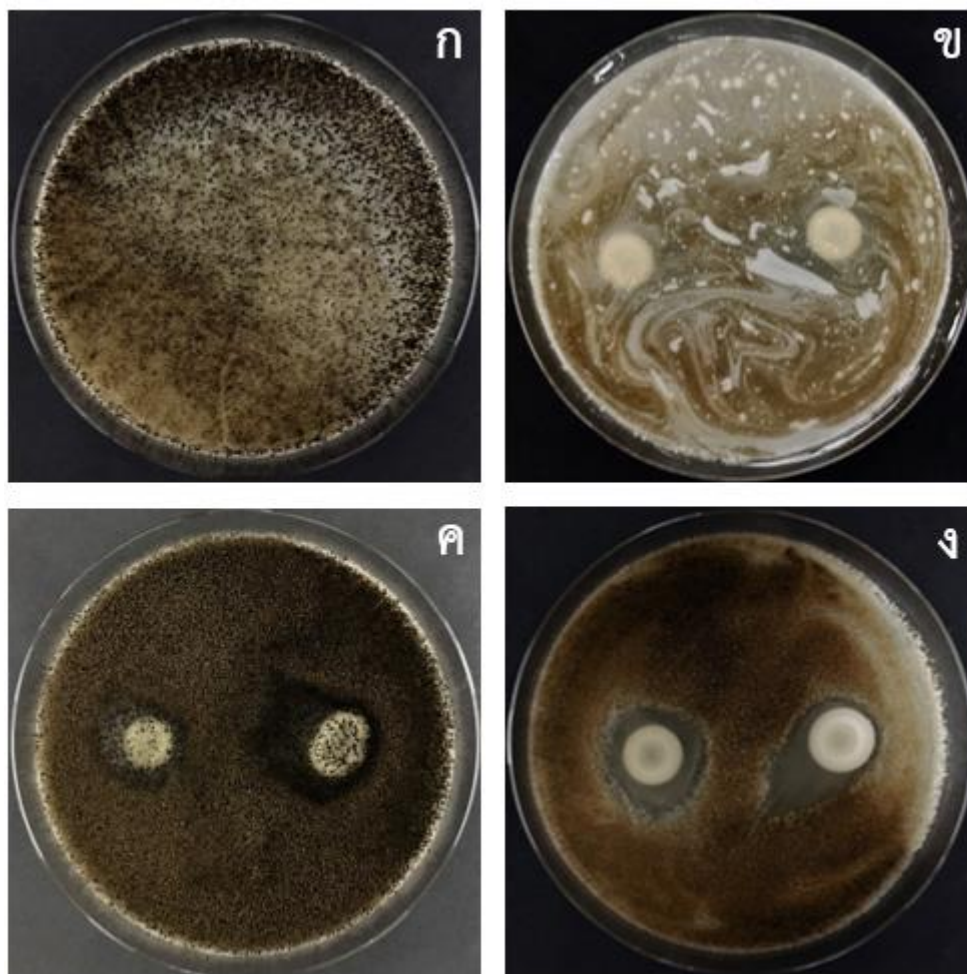
#### 4.2 ทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับรา

จากการทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar spot assay พบว่า เมื่อบ่มยีสต์ปฏิปักษ์ร่วมกับราซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ที่มีปริมาณวุ้นเท่ากับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน แล้วสังเกตลักษณะการเจริญของราเบื้องต้นพบว่า เมื่อเลี้ยง *A. flavus* M3T8R4G3 ร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 ไม่พบการเจริญของรา และเกิดบริเวณใส (clear zone) ข้นชัดเจนเหนือโคโลนีของยีสต์ (รูปที่ 10ง) และเมื่อเลี้ยงราร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 พบการเจริญของราเบาบางเหนือโคโลนีของยีสต์ (รูปที่ 10ค) ในขณะที่เมื่อเลี้ยงราร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 พบการเจริญของยีสต์เป็นจำนวนมากในชั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จึงทำให้พบการเจริญของราเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 10ข)



**รูปที่ 10** การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Agar spot assay ปมที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) *W. anomalous* MSCU 0652, (ค) *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ (ง) *K. marxianus* MSCU 0655

สำหรับ *A. carbonarius* TK4.2 พบบริเวณใสเหนือโคโลนีของยีสต์ชัดเจนมากที่สุดเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 (รูปที่ 11ง) รองลงมาคือ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (รูปที่ 11ค) ในขณะที่เมื่อเลี้ยงราร่วมกับ *W. anomalous* MSCU 0652 พบการเจริญของยีสต์เป็นจำนวนมากในชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จึงทำให้พบการเจริญของราเพียงเล็กน้อยและปรากฏบริเวณใสไม่ชัดเจน (รูปที่ 11ข)



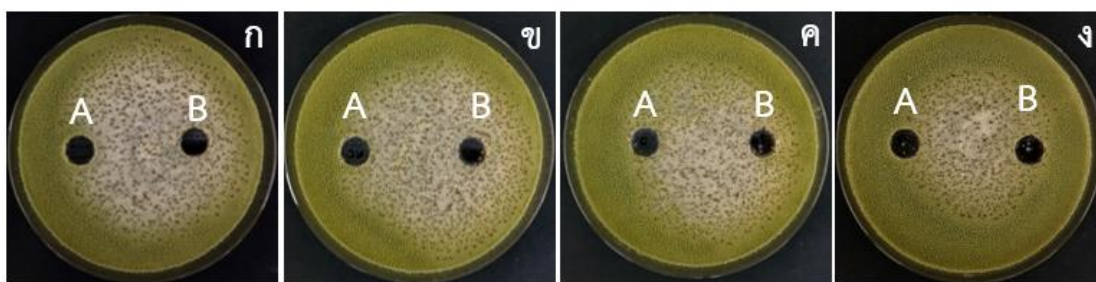
รูปที่ 11 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี Agar spot assay บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) *W. anomalous* MSCU 0652, (ค) *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ (ง) *K. marxianus* MSCU 0655

#### 4.3 ทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของรา

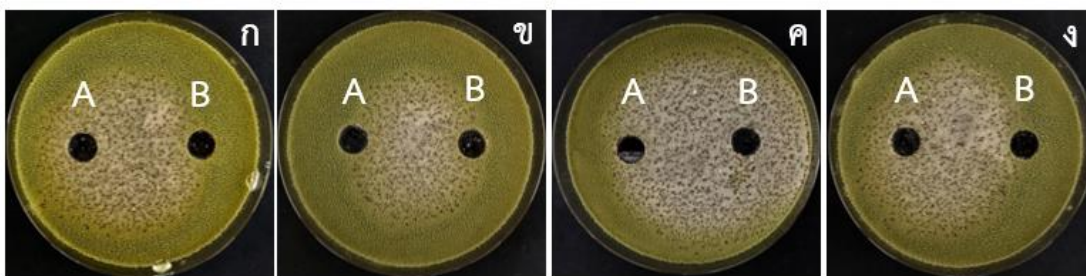
จากผลการทดลองในข้อ 4.2 แสดงให้เห็นว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ที่ใช้ทดสอบสามารถสร้างเมแทบอลิต์ที่สามารถแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 และ *A. carbonarius* TK4.2 จึงทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นของเมแทบอลิต์ที่ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดผลิตขึ้นด้วยวิธี Agar diffusion assay โดยทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของราจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ ซึ่งผลการทดสอบแสดงในรูปที่ 12 ถึง 15 พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ทั้งสามชนิดและที่ผ่านการฆ่าเชื้อไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 ได้ เนื่องจากไม่พบบริเวณใสรอบหลุมที่มีการเติมน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์

นอกจากนี้ น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ของยีสต์ทั้งสามชนิดในช่วง mid log phase และ late log phase ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเราได้ และราในชุดทดสอบสามารถเจริญและสร้างสปอร์สีเขียวไม่แตกต่างจากราในชุดควบคุม (รูปที่ 12 และ 13)

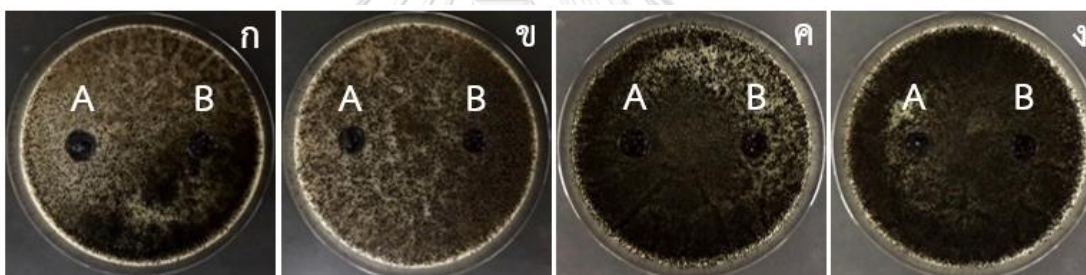
สำหรับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 โดยเมแทบอลิটในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ทั้งสามชนิดพบว่า ให้ผลการทดสอบที่คล้ายคลึงกับ *A. flavus* M3T8R4G3 คือ น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ของยีสต์ทั้งสามชนิดทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเราได้ และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ที่เจริญในช่วง mid log phase และ late log phase ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเราได้เช่นเดียวกันดังแสดงในรูป 14 และ 15 ตามลำดับ นอกจากนี้ ราในทุกชุดทดสอบยังสามารถเจริญและสร้างสปอร์สีดำได้ตามปกติ ไม่แตกต่างจากราในชุดควบคุม



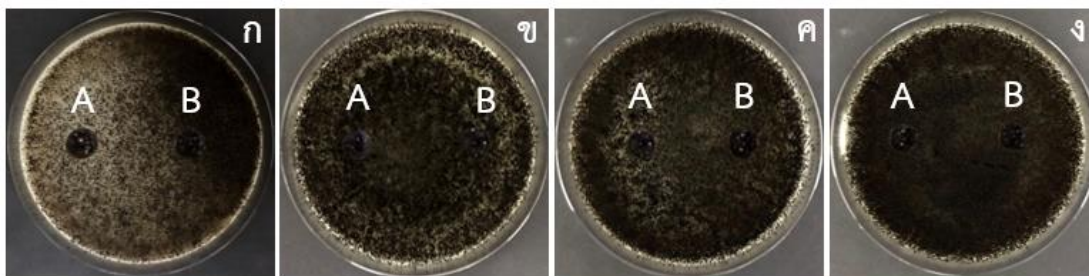
**รูปที่ 12** การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง mid log phase เพื่อยับยั้งการเจริญของเราด้วยวิธี Agar diffusion หลุม A ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ หลุม B ทดสอบน้ำด้วยเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *W. anomalus* MSCU 0652 (ค) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (ง) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ *K. marxianus* MSCU 0655



**รูปที่ 13** การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง late log phase เพื่อยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion หลุม A ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ หลุม B ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *W. anomalous* MSCU 0652 (ค) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (ง) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ *K. marxianus* MSCU 0655



**รูปที่ 14** การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง mid log phase เพื่อยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี Agar diffusion หลุม A ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ หลุม B ทดสอบน้ำด้วยเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *W. anomalous* MSCU 0652 (ค) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (ง) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ *K. marxianus* MSCU 0655



**รูปที่ 15** การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในช่วง *late log phase* เพื่อยับยั้งการเจริญของราด้วยวิธี *Agar diffusion* หลุม A ทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ หลุม B ทดสอบน้ำด้วยเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุม (ข) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *W. anomalus* MSCU 0652 (ค) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (ง) น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ *K. marxianus* MSCU 0655

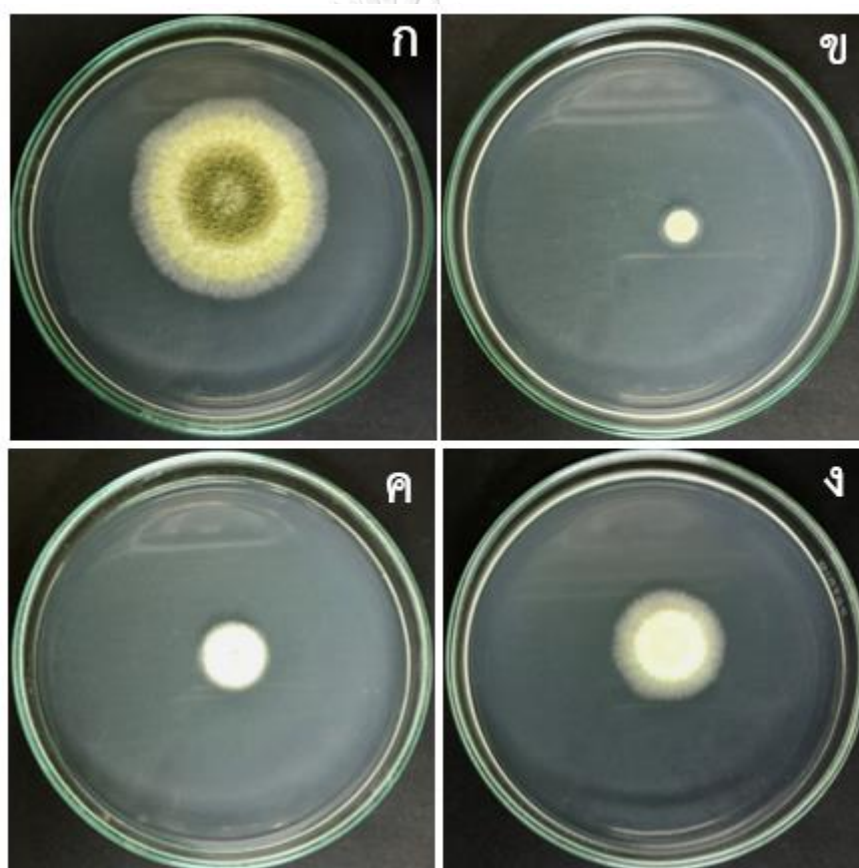
#### 4.4 ทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) ของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา

##### 4.4.1 ทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์

เมื่อนำ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA มาเลี้ยงร่วมกับยีสต์แต่ละชนิดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ด้วยวิธี *face to face double petri dish assay* (Fiori et al., 2014) พบว่า ลักษณะโคโลนีของราเป็นเส้นใยสีขาว ไม่สร้างสปอร์ และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของราเล็กกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน โดยเฉพาะในชุดทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 (รูปที่ 16) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้สูงสุดเท่ากับ  $78.54 \pm 1.08$  เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ *K. marxianus* MSCU 0655 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเท่ากับ  $68.06 \pm 6.16$  และ  $56.03 \pm 1.72$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 14) สำหรับการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 พบว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดสามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้ใกล้เคียงกันและลดลงมากกว่า 97 เปอร์เซ็นต์ โดย *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้ดีที่สุดในที่นี้ ซึ่งใกล้เคียงกับ *W. anomalus* MSCU 0652 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ  $99.19 \pm 0.29$  และ  $99.04 \pm 0.41$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

เมื่อสังเกตลักษณะของโคโลนี *A. carbonarius* TK4.2 ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์แต่ละชนิดเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่า ราในชุดทดสอบสร้างเส้นใยที่เป็นสีขาว ไม่สร้างสปอร์สีดำ และมี

ขนาดโคโลนีของราในชุดทดสอบเล็กกว่าราในชุดควบคุมอย่างชัดเจน โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงราร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 (รูปที่ 17) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 ได้ดีที่สุดด้วยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ  $83.06 \pm 2.02$  เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ *K. marxianus* MSCU 0655 ( $66.57 \pm 8.80$  เปอร์เซ็นต์) และ *S. cerevisiae* MSCU 0654 ( $60.10 \pm 0.34$  เปอร์เซ็นต์) สำหรับประสิทธิภาพในการลดการผลิตโอคราทอกซินเอของยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดพบว่า สามารถลดการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 ได้ใกล้เคียงกันทั้งสามชนิด ซึ่งลดการผลิตได้มาก 99 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15)



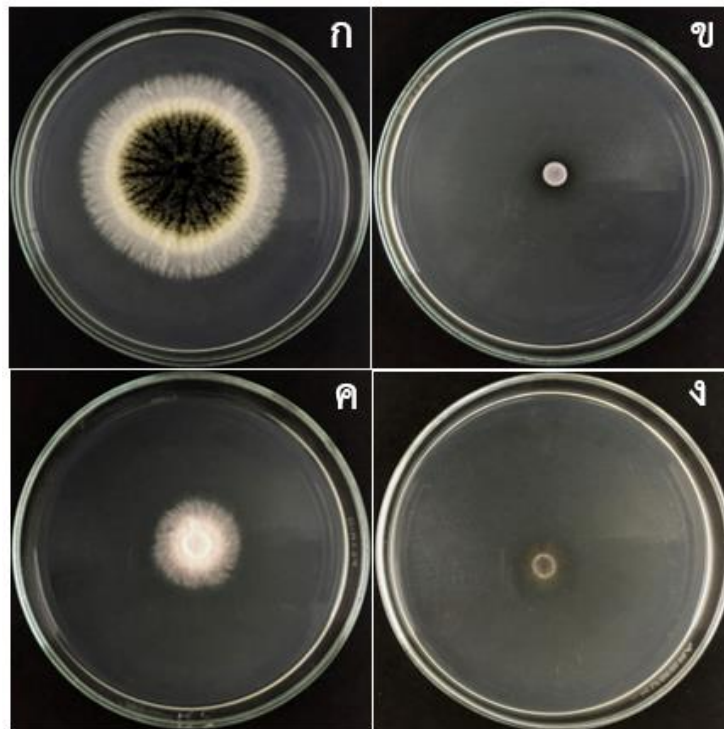
**รูปที่ 16** การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face double petri dish assay* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) *W. anomalus* MSCU 0652, (ค) *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ (ง) *K. marxianus* MSCU 0655



**ตารางที่ 14** การยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus M3T8R4G3* โดยสารประกอบอินทรีย์ระเหยได้ที่สร้างจากยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face double petri dish assay* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ชุดทดสอบ	การเจริญของรา		การผลิตอะฟลาทอกซินบี 1	
	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 (นาโนกรัมต่อกรัม)	เปอร์เซ็นต์การลดลง
ชุดควบคุม	4.67±0.24		172.95±0.35	
<i>W. anomalus</i> MSCU 0652	1.00±0.00	78.54±1.08	น้อยกว่า LOQ* (1.66±0.71)	99.04±0.41
<i>S. cerevisiae</i> MSCU 0654	1.48±0.21	68.06±6.16	4.11±0.67	97.62±0.39
<i>K. marxianus</i> MSCU 0655	2.05±0.02	56.03±1.71	น้อยกว่า LOQ (1.39±0.51)	99.19±0.29

\*LOD และ LOQ ของอะฟลาทอกซินบี 1 เท่ากับ 0.89 และ 2.71 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ



รูปที่ 17 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face double petri dish assay* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก) ชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว, (ข) *W. anomalus* MSCU 0652, (ค) *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ (ง) *K. marxianus* MSCU 0655

**ตารางที่ 15** การยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 โดยสารประกอบอินทรีย์ระเหยได้ที่สร้างจากยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face double petri dish assay* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

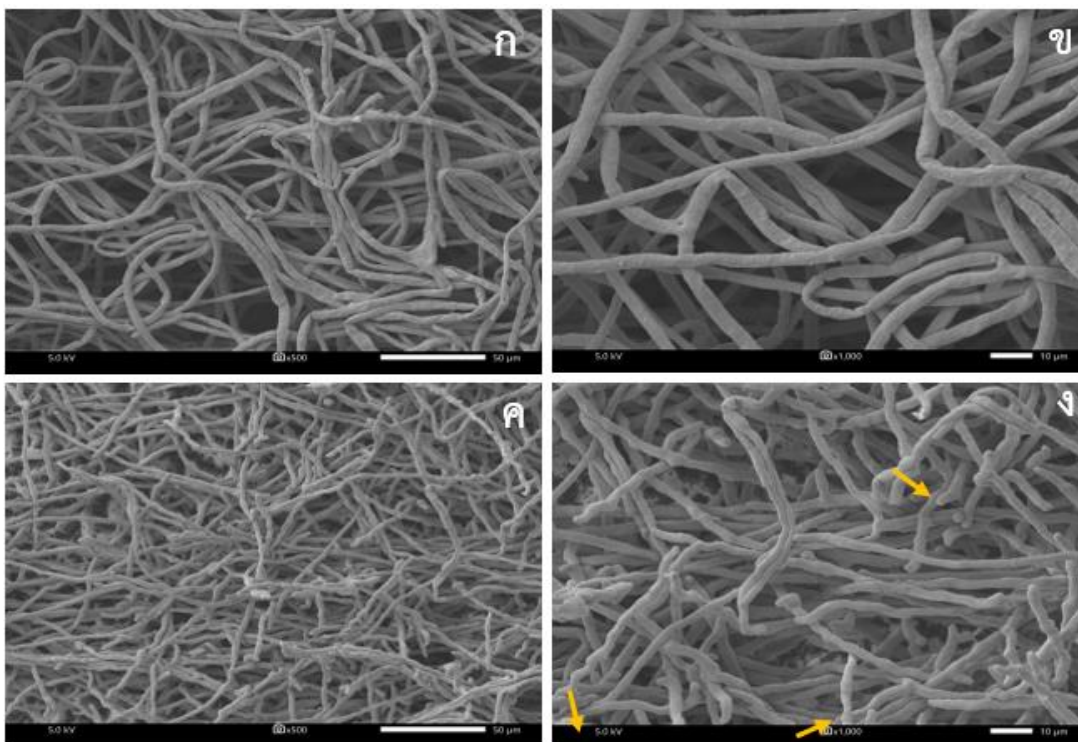
ชุดทดสอบ	การเจริญของรา		การผลิตโอคราทอกซินเอ	
	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง	ปริมาณโอคราทอกซินเอ (นาโนกรัมต่อกรัม)	เปอร์เซ็นต์การลดลง
ชุดควบคุม	5.35±0.64		526.61±149.78	
<i>W. anomalus</i> MSCU 0652	0.90±0.00	83.06±2.02	น้อยกว่า LOQ* (1.20±0.44)	99.77±0.02
<i>S. cerevisiae</i> MSCU 0654	2.13±0.24	60.10±0.34	น้อยกว่า LOQ (1.29±0.55)	99.76±0.04
<i>K. marxianus</i> MSCU 0655	1.82±0.68	66.57±8.80	น้อยกว่า LOQ (1.21±0.85)	99.79±0.10

\*LOD และ LOQ ของโอคราทอกซินเอเท่ากับ 0.63 และ 1.92 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

#### 4.4.2 วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราโดยใช้ Scanning Electron Microscope (SEM)

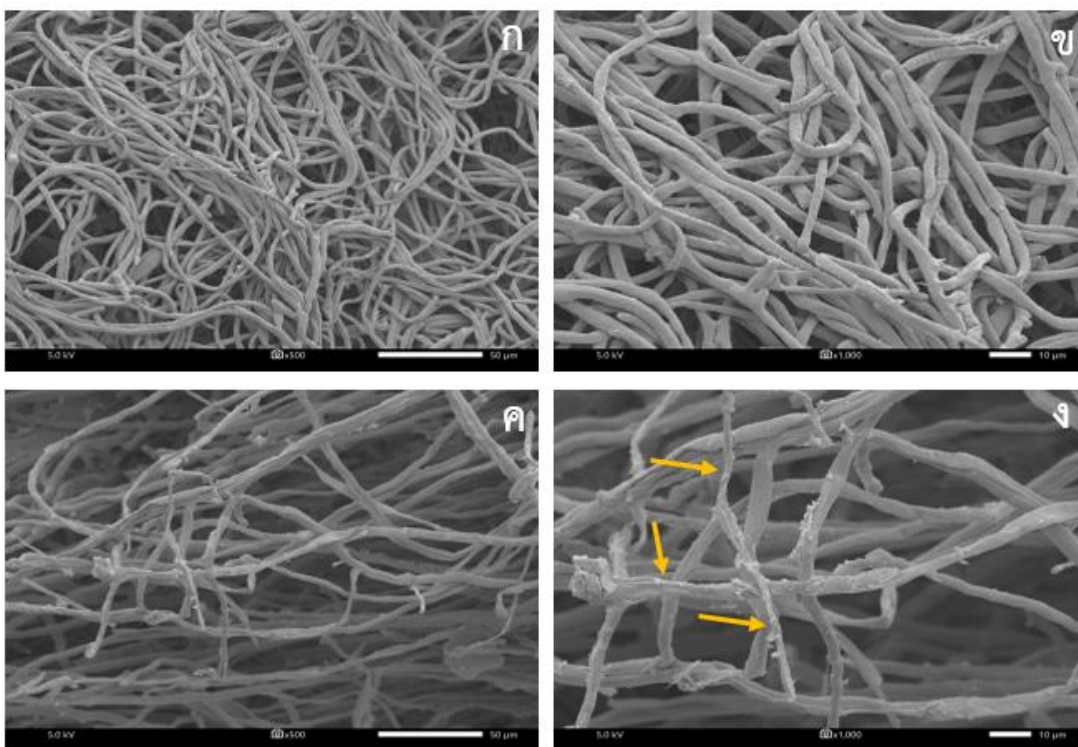
เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากข้อ 4.4.1 พบว่า *W. anomalus* MSCU 0652 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญทั้ง *A. flavus* M3T8R4G3 และ *A. carbonarius* TK4.2 ได้ดีที่สุด จึงนำราทั้งสองชนิดที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ดังกล่าวมาวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียวด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) โดยเลือกวิเคราะห์บริเวณขอบของโคโลนีรา

รูปที่ 18 แสดงลักษณะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 พบว่า ลักษณะเส้นใยบริเวณขอบของโคโลนีของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 ที่กำลังขยาย 500 เท่า มีความหนาแน่นของเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีมากกว่าในชุดควบคุม (รูปที่ 18ค) และเมื่อเพิ่มกำลังขยายเป็น 1000 เท่า พบว่า มีลักษณะเส้นใยมีขนาดเล็ก มีรอยหยักและโป่งพองขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 18ง)



**รูปที่ 18** ลักษณะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 จากกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เมื่อทดสอบผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของ *W. anomalus* MSCU 0652 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก, ข) ชุดควบคุมเมื่อเลี้ยงราเพียงอย่างเดียวที่กำลังขยาย 500 และ 1000 เท่า (ค, ง) ชุดทดสอบเมื่อเลี้ยงราร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 ที่กำลังขยาย 500 และ 1000 เท่า ลูกศรสีเหลืองแสดงลักษณะเส้นใยของราที่เกิดรอยหยักและโป่งพอง

สำหรับลักษณะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของ *A. carbonarius* TK4.2 (รูปที่ 19) พบว่า ที่กำลังขยาย 500 เท่าจะสังเกตเห็นได้ว่าเส้นใยราที่เลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 มีลักษณะบางกว่าเส้นใยราในชุดควบคุม (รูปที่ 19ค) และเมื่อเพิ่มกำลังขยายเป็น 1000 เท่า จะพบว่า เส้นใยของราในชุดทดสอบมีลักษณะลึบแบนผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 19ง)



**รูปที่ 19** ลักษณะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของ *A. carbonarius* TK4.2 จากกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM) เมื่อทดสอบผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของ *W. anomalus* MSCU 0652 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ก, ข) ชุดควบคุมเมื่อเลี้ยงราเพียงอย่างเดียวที่กำลังขยาย 500 และ 1000 เท่า (ค, ง) ชุดทดสอบเมื่อเลี้ยงราร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 ที่กำลังขยาย 500 และ 1000 เท่า ลูกศรสีเหลืองแสดงลักษณะเส้นใยของราที่สืบแบนผิดปกติ

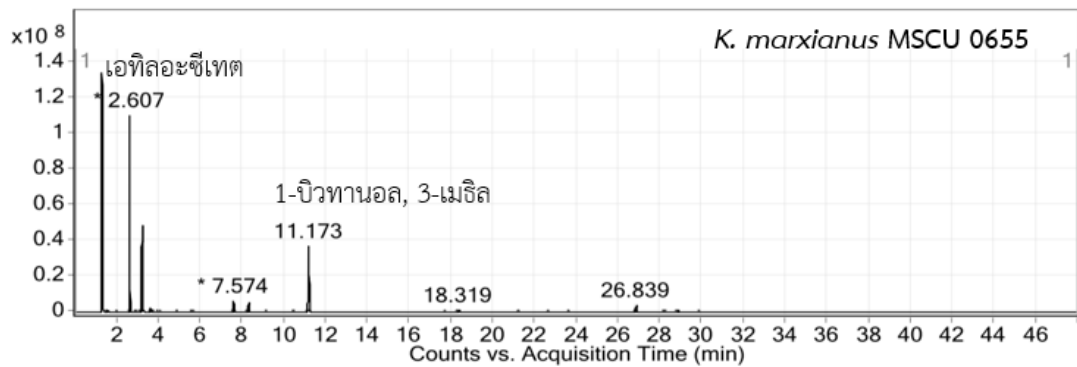
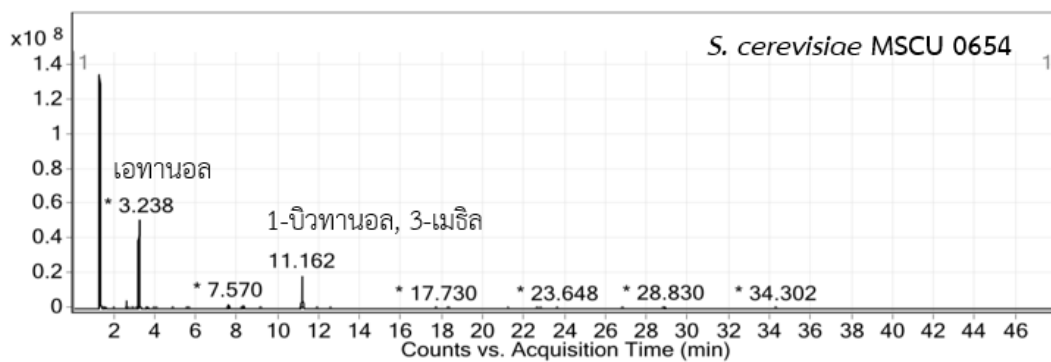
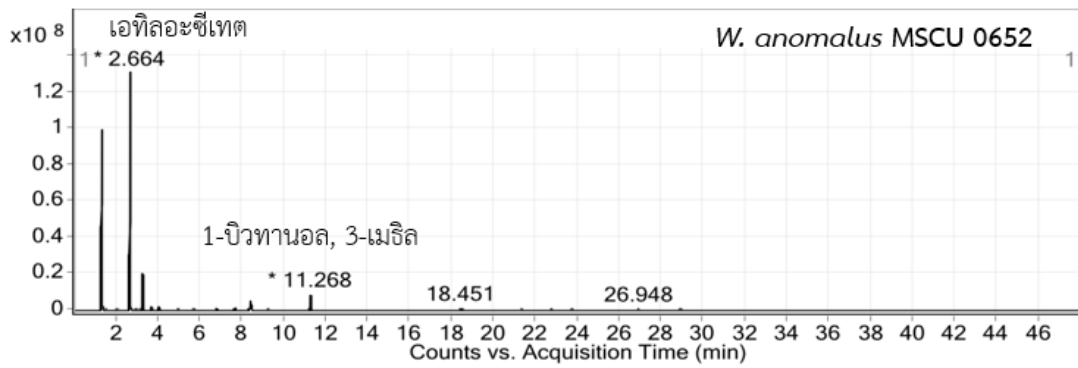
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

#### 4.4.3 วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์

ผลการวิเคราะห์หาชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด ด้วยวิธี GC-MS analysis แสดงในรูปที่ 20 และตารางที่ 16 จากรูปที่ 20 พบว่า *W. anomalus* MSCU 0652 สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิดเอทิลอะซิเตตได้ปริมาณมากที่สุด (retention time, RT เท่ากับ 2.664 นาที) รองลงมาได้แก่ 1-บิวทานอล, 3-เมทิล (RT เท่ากับ 11.268 นาที) *S. cerevisiae* MSCU 0654 สามารถผลิตเอทานอล (RT เท่ากับ 3.238 นาที) ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีการผลิตในสัดส่วนที่มากที่สุด รองลงมาได้แก่ 1-บิวทานอล, 3-เมทิล (RT เท่ากับ 11.162 นาที) (รูปที่ 20ข) และ *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถผลิต

สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิดเอทิลอะซีเตตได้มากที่สุด โดยมีค่า retention time เท่ากับ 2.607 นาที รองลงมาได้แก่ 1-บิวทานอล, 3-เมทิล (RT เท่ากับ 11.173 นาที) (รูปที่ 20ค)

ตารางที่ 16 แสดงชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายทั้งหมดที่ยีสต์ปฏิภักษ์ทั้งสามชนิดผลิตได้ พบว่า *W. anomalus* MSCU 0652 สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้มากที่สุด 11 ชนิด สำหรับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ *K. marxianus* MSCU 0655 พบว่า สามารถสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้เท่ากับ 10 ชนิด ซึ่งยีสต์ปฏิภักษ์ทั้งสามชนิดสามารถสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายบางชนิดได้เหมือนกัน ได้แก่ เอทิลอะซีเตต 1-โพรพานอล, 2-เมทิล 1-บิวทานอล, 3-เมทิล-, อะซีเตต และ 1-บิวทานอล, 3-เมทิล สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สร้างจาก *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 แต่ไม่พบใน *S. cerevisiae* MSCU 0654 ได้แก่ กรดแอสติค, 2-ฟีนิลเอสเทอร์ นอกจากนี้ยังพบสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สร้างจาก *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ *K. marxianus* MSCU 0655 แต่ไม่พบใน *W. anomalus* MSCU 0652 ได้แก่ อะซีตัลดีไฮด์ กรดโพรพานอิก เอทิลเอสเทอร์ และฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์



รูปที่ 20 โครมาโทแกรมของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายในสัดส่วนที่มากที่สุดที่ผลิตจากยีสต์  
ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด

ตารางที่ 16 ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ปฏิปักซ์ เมื่อบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน วิเคราะห์โดยเครื่อง GC/MS Chromatography

สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย	<i>W. anomalus</i> RA (%)	<i>S. cerevisiae</i> RA (%)	<i>K. marxianus</i> RA (%)
อะซีตัลดีไฮด์	-	0.35	0.23
อะซีโตน	-	0.04	-
เอทิลอะซีเตต	56.94	2.78	39.40
บิวทานอล, 3-เมทิล	-	0.18	-
ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์	-	-	30.79
เอทานอล	-	71.75	-
กรดแลกติก	6.92	-	-
กรดโพรพานอิก, เอทิลเอสเทอร์	-	0.33	0.69
กรดโพรพานอิก	0.54	-	-
n-โพรพิลอะซีเตต	0.63	-	-
ไอโซบิวทิลอะซีเตต	0.12	-	-
1-โพรพานอล, 2-เมทิล	0.43	1.94	2.79
1-บิวทานอล, 3-เมทิล-, อะซีเตต	2.41	1.84	2.93
1-บิวทานอล, 3-เมทิล	3.36	18.69	19.58
กรดแอซิดิก	0.28	-	0.43
กรดแอซิดิก, 2-ฟีนิลเอสเทอร์	0.17	-	1.59
ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์	-	0.41	0.23

#### 4.4.4 ทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย

##### 4.4.4.1 ผลของค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ

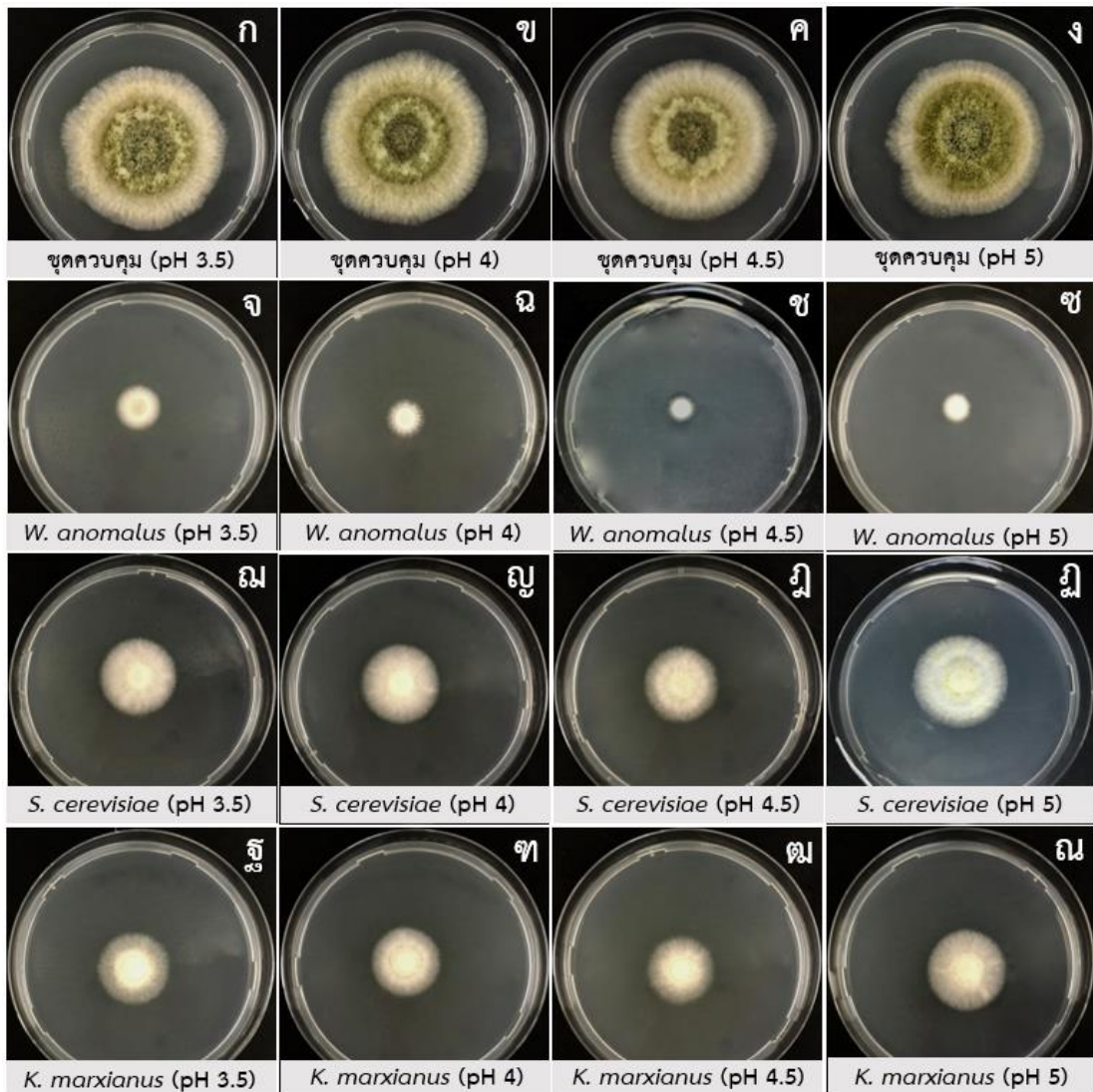
ผลการทดสอบค่าความเป็นกรด-เบสที่แตกต่างกันของอาหารเลี้ยงยีสต์ (ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 3.5, 4, 4.5 และ 5) ต่อการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักซ์ เมื่อบ่มยีสต์และ *A. flavus* M3T8R4G3 แสดงในรูปที่ 21 ถึง 23 เมื่อบ่มราร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 พบว่า มีขนาดโคโลนีของราที่เล็กกว่าราในชุดควบคุมและสร้างเส้นใยสีขาว ไม่สร้างสปอร์



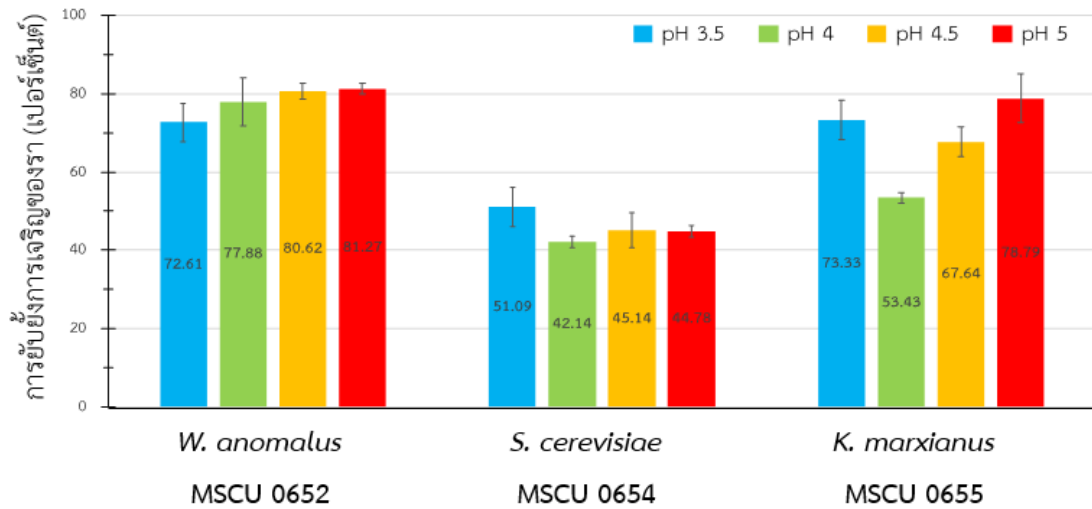
แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อค่าความเป็นกรด-เบสลดลง ราที่เลี้ยงร่วมกับ *W. anomalous* MSCU 0652 มีขนาดโคโลนีของราที่เล็กลงเรื่อย ๆ (รูปที่ 21จ-ข) เมื่อพิจารณาที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราโดยยีสต์ปฏิปักษ์ แสดงในรูปที่ 22 พบว่า *W. anomalous* MSCU 0652 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราจะเพิ่มขึ้นด้วยเช่นเดียวกัน โดย *W. anomalous* MSCU 0652 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5 ( $81.27 \pm 1.23$  เปอร์เซ็นต์) และเมื่อพิจารณาการลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของรา พบว่า สามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ ทุกค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบ (รูปที่ 23)

รูปที่ 21ฉ-ฎ แสดงการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 ในชุดควบคุมและชุดทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 ตามลำดับ พบว่า ขนาดโคโลนีของราในชุดทดสอบมีขนาดเล็กกว่าราในชุดควบคุม และมีเส้นใยสีขาวโดยไม่พบการสร้างสปอร์ อย่างไรก็ตาม ราที่เจริญร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 ทุกค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่แตกต่างกัน โดยที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรา มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 45-51 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 22) ซึ่งที่ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3.5 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราดีที่สุด ( $51.09 \pm 0.03$  เปอร์เซ็นต์) เมื่อพิจารณาการลดลงของอะฟลาทอกซินปี 1 พบว่า ที่ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5 ราลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 มากที่สุด ( $99.28 \pm 0.28$  เปอร์เซ็นต์) (รูปที่ 23)

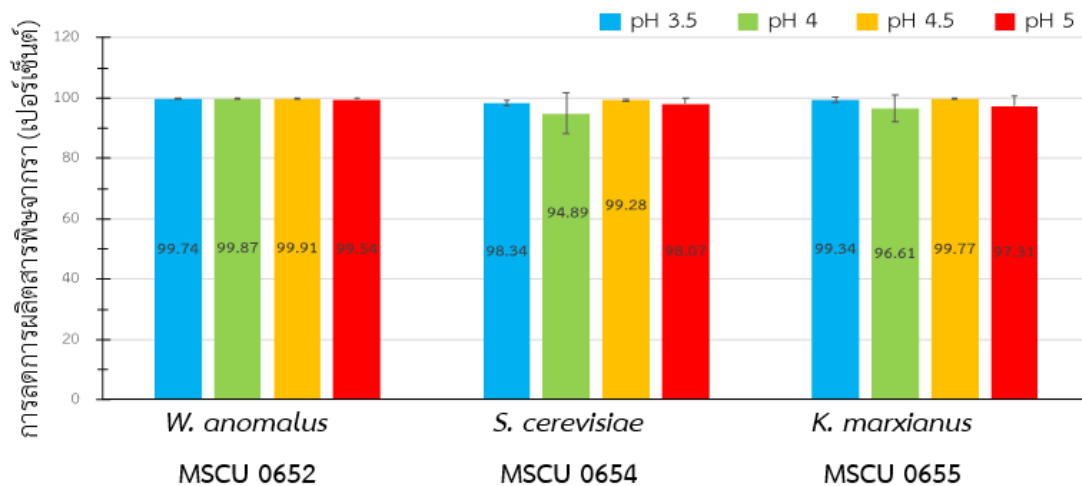
และเมื่อสังเกตลักษณะโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 ในชุดควบคุมและชุดทดสอบเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 (รูปที่ 21ฐ-ณ) พบว่า ราในชุดทดสอบสร้างเส้นใยสีขาวและไม่สร้างสปอร์ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน โดยราที่มีขนาดที่ใกล้เคียงกันในทุกค่าความเป็นกรด-เบสที่ทดสอบ เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราดังแสดงในรูปที่ 22 พบว่า *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ในช่วง 53-78 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราที่ดีที่สุดเท่ากับ  $78.79 \pm 6.35$  เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5 สำหรับประสิทธิภาพในการลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 (รูปที่ 23) พบว่า ในทุกค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการทดสอบมีเปอร์เซ็นต์การลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้มากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ โดยลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้มากที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5 ( $99.77 \pm 0.10$  เปอร์เซ็นต์)



รูปที่ 21 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงยีสต์ที่แตกต่างกัน (ก-ง) ขุดควบคุม (จ-ซ) เลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655



รูปที่ 22 การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face double petri dish assay* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงยีสต์ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)



รูปที่ 23 การลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face double petri dish assay* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงยีสต์ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)

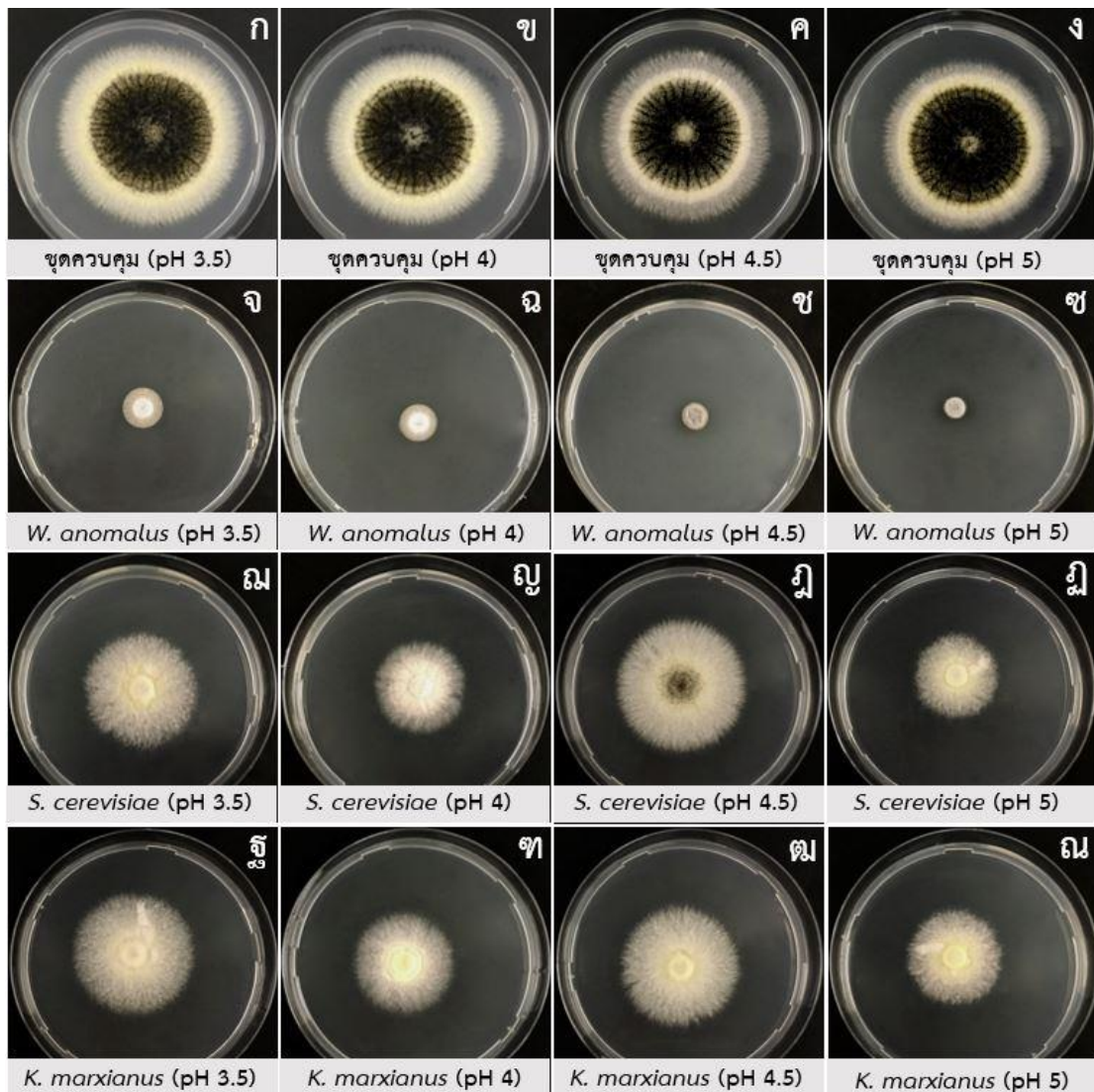
ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงยีสต์ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสแตกต่างกันต่อการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 แสดงในรูปที่ 24 ถึง 26 จากการสังเกตลักษณะโคโลนีราเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมในรูปที่ 24จ-ข พบว่า ทุก ๆ ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบ โคโลนีของรามิขนาดเล็กกว่าโคโลนีของราในชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียวและสร้างเส้นใยสีขาว ไม่สร้างสปอร์ นอกจากนี้ โคโลนีของราในชุดทดสอบมีขนาดโคโลนีเล็กลงเรื่อย ๆ เมื่อค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราในชุดทดสอบเปรียบเทียบกับราในชุดควบคุม (รูปที่ 25) พบว่า *W. anomalus* MSCU 0652 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้มากกว่า 78 เปอร์เซ็นต์ ทุกค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของราได้มากที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5 โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเท่ากับ  $82.42 \pm 2.76$  เปอร์เซ็นต์ สำหรับรูปที่ 26 แสดงประสิทธิภาพในการลดการผลิตโอคราทอกซินเอของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์พบว่า ทุกค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบ ผลิตโอคราทอกซินเอลดลงมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของโอคราทอกซินเอสูงสุดเท่ากับ  $99.91 \pm 0.07$  เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5

เมื่อสังเกตลักษณะของโคโลนีราในชุดทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (รูปที่ 24ฉ-ฐ) พบว่า ราในชุดทดสอบมีขนาดเล็กกว่าราในชุดควบคุมเล็กน้อย ทุกค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงยีสต์ การเจริญของราที่ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5 และ 5 มีการสร้างสปอร์สีดำเหมือนกับราในชุดควบคุมเล็กน้อย เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราในรูปที่ 25 จะพบว่า ทุกชุดทดสอบ *S. cerevisiae* MSCU 0654 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้เล็กน้อย โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด ( $61.65 \pm 18.89$  เปอร์เซ็นต์) แต่เมื่อพิจารณาที่ประสิทธิภาพการลดการผลิตโอคราทอกซินเอในรูปที่ 26 พบว่า ผลิตโอคราทอกซินเอได้ลดลงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในทุกชุดทดสอบ และที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5 สามารถลดการผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่สุด ( $93.47 \pm 6.21$  เปอร์เซ็นต์)

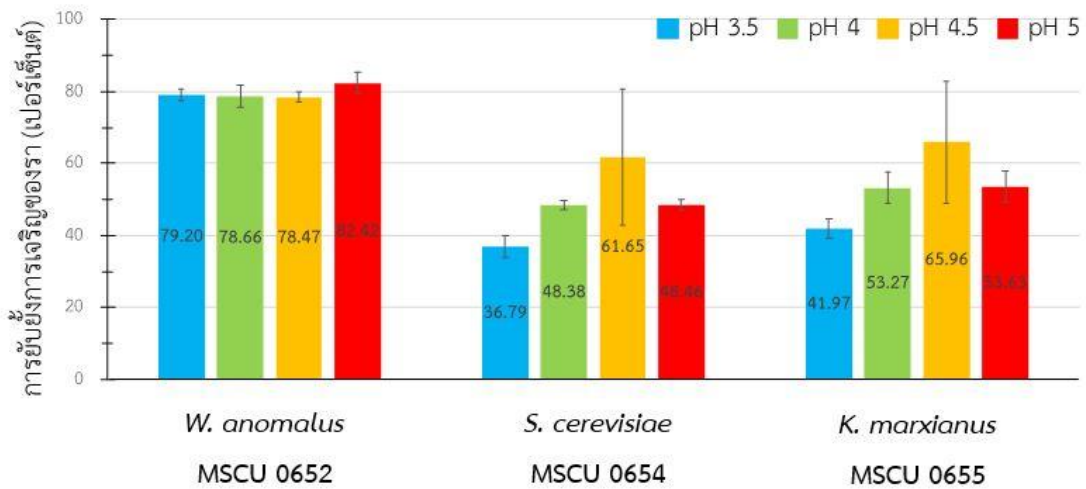
สำหรับลักษณะของโคโลนีของราในชุดทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 แสดงดังรูปที่ 24ฐ-ณ พบว่า ราในชุดทดสอบทุกค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อมีขนาดเล็กกว่าโคโลนีของราในชุดควบคุม ไม่สร้างสปอร์สีดำและมีเส้นใยของราสีขาว ซึ่งเมื่อพิจารณาที่

เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 (รูปที่ 25) พบว่า ที่ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5 *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ในช่วง 41-65 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดเท่ากับ  $65.96 \pm 16.95$  เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาที่เปอร์เซ็นต์การลดการผลิตโอคราทอกซินเอ (รูปที่ 26) พบว่า ราผลิตโอคราทอกซินเอลดลงมากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ และลดการผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3.5 ( $99.89 \pm 0.07$  เปอร์เซ็นต์)

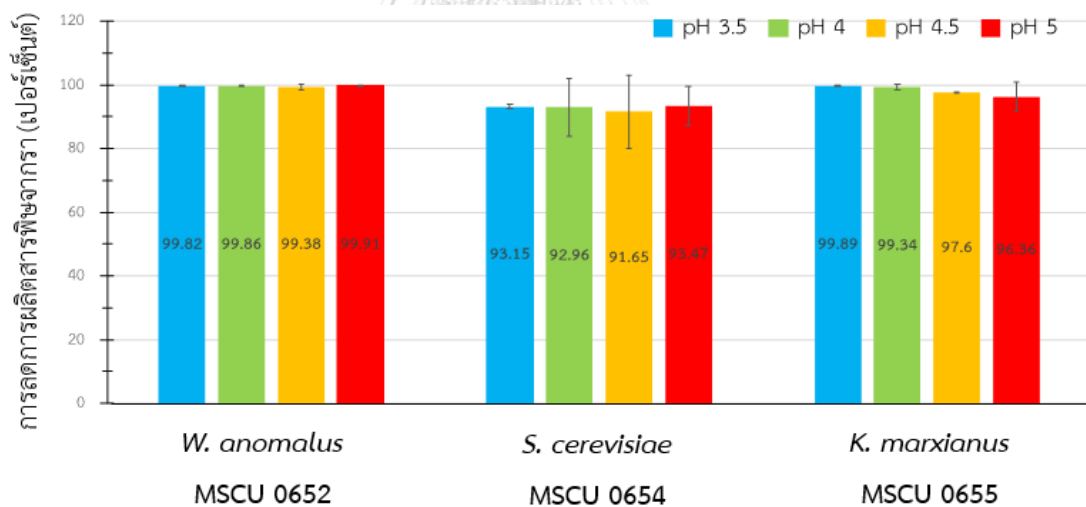




รูปที่ 24 การเจริญของ *A carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงยีสต์ที่แตกต่างกัน (ก-ง) ชุดควบคุม (จ-ซ) เลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 ที่ (ฅ-จ) เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ (ฐ-ณ) เลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU



รูปที่ 25 การยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงยีสต์ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)



รูปที่ 26 การลดการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงยีสต์ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)

#### 4.4.4.2 ผลของอุณหภูมิในการบ่ม

ผลของอุณหภูมิที่ทดสอบเพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* M3T8R4G3 โดยบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันได้แก่ 25 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส แสดงในรูปที่ 27 ถึง 29

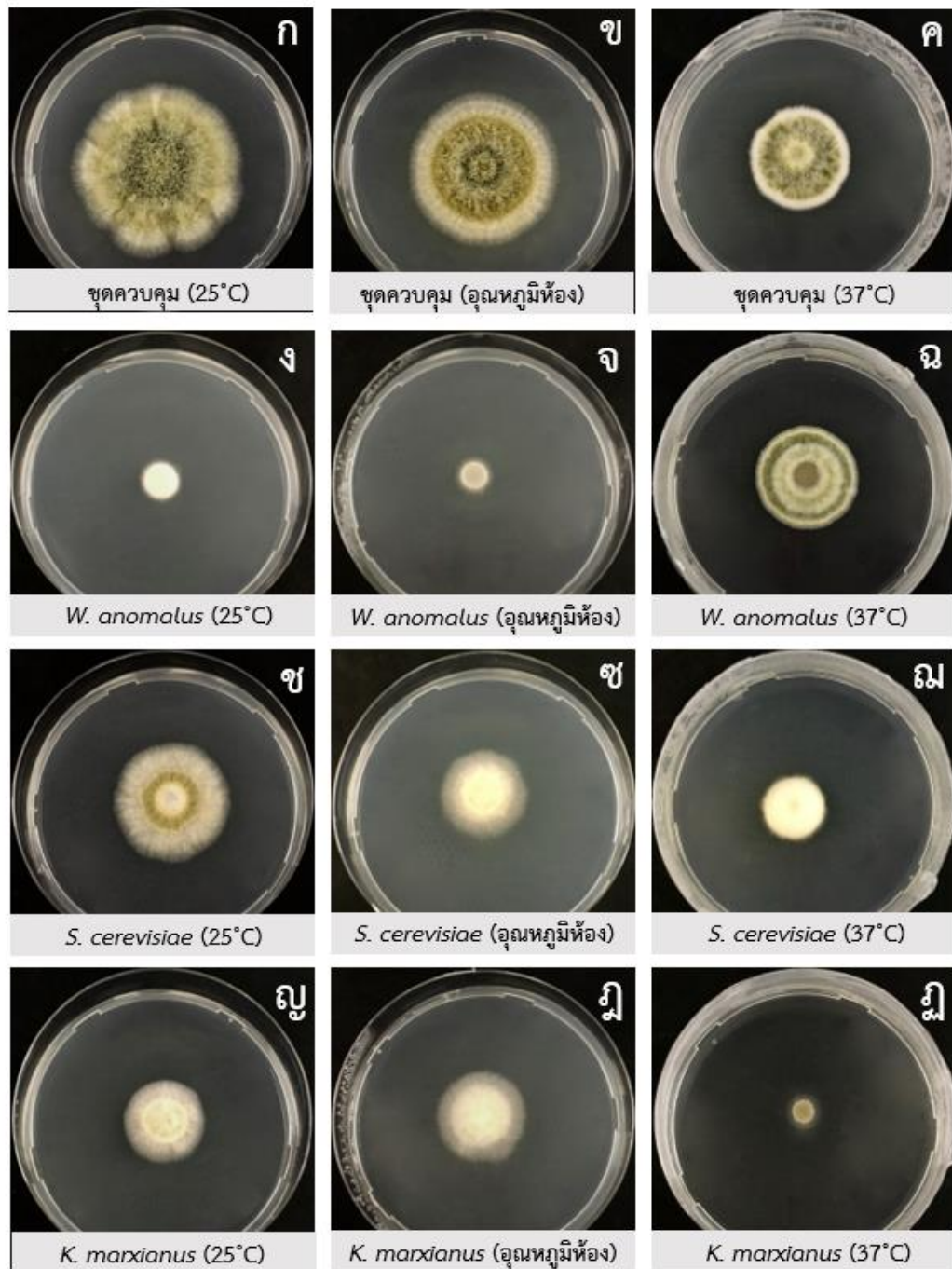
จากรูปที่ 27ง-ฉ แสดงลักษณะโคโลนีของราที่เลี้ยงร่วมกับ *W. anomalous* MSCU 0652 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่า ราในชุดทดสอบเมื่อบ่มที่อุณหภูมิเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง มีขนาดโคโลนีของราเล็กกว่าราในชุดควบคุมอย่างชัดเจน เมื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราดังแสดงในรูปที่ 28 พบว่า ที่อุณหภูมิห้องสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 ได้ดีที่สุด รองลงมาได้แก่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ( $81.38 \pm 1.80$  และ  $75.69 \pm 3.39$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) สำหรับการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ซึ่งแสดงในรูปที่ 29 พบว่า ที่อุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส ราผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ลดลงมากที่สุด ( $99.73 \pm 0.21$  เปอร์เซ็นต์) รองลงมาได้แก่ ชุดทดสอบที่อุณหภูมิห้อง สามารถลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้เท่ากับ  $84.70 \pm 20.53$  เปอร์เซ็นต์

จากการสังเกตลักษณะโคโลนีราในชุดทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (รูปที่ 27ข-ฉ) พบว่า ราในชุดทดสอบทุกอุณหภูมิมีขนาดเล็กกว่าราในชุดควบคุม และไม่พบการสร้างสปอร์สีเขียวซึ่งแตกต่างกับราในชุดควบคุม เมื่อพิจารณาที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรา (รูปที่ 28) พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราได้ 43-54 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราสูงที่สุดเท่ากับ  $54.56 \pm 0.51$  เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง และในรูปที่ 29 แสดงเปอร์เซ็นต์การลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของราในชุดทดสอบที่บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกันพบว่า ราในชุดทดสอบเมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง ผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ลดลงสูงที่สุดเท่ากับ  $98.67 \pm 0.25$  เปอร์เซ็นต์

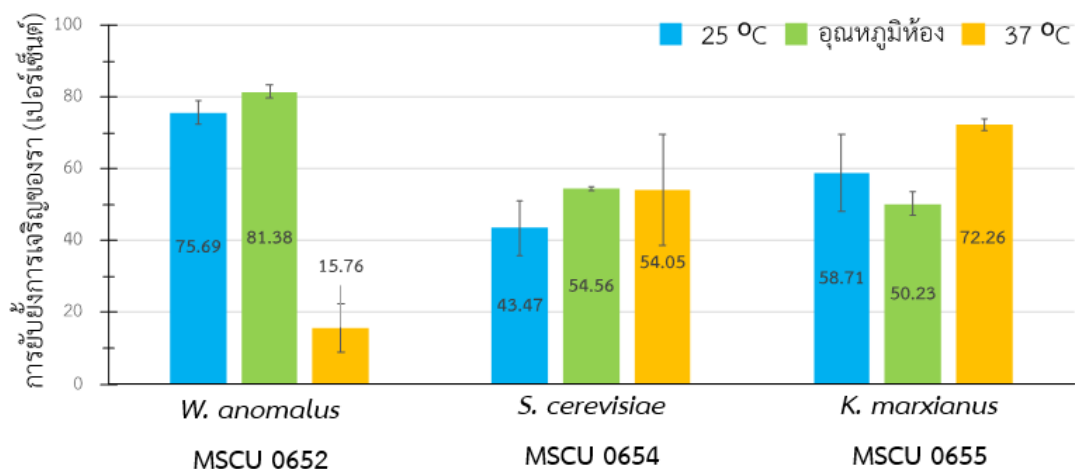
สำหรับราในชุดทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันในรูปที่ 27ญ-ฎ จะสังเกตได้ว่า โคโลนีราในชุดทดสอบทุกอุณหภูมิมีขนาดเล็กกว่าราในชุดควบคุม เส้นใยเป็นสีขาวและไม่พบการสร้างสปอร์ เมื่อพิจารณาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 ในรูปที่ 28 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกันจะพบว่า *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ในช่วง 50-72 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ( $72.26 \pm 1.79$  เปอร์เซ็นต์) สำหรับการผลิต



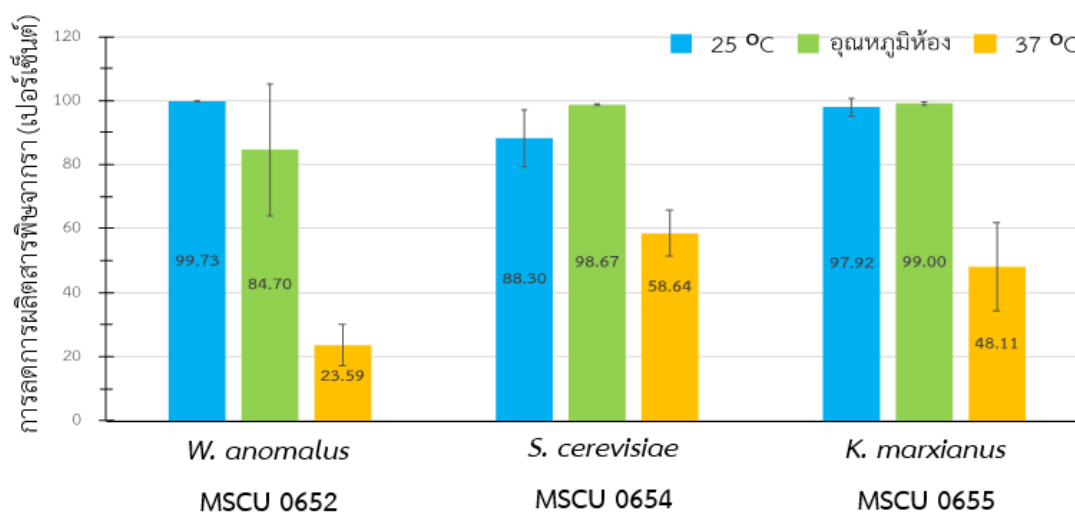
อะฟลาทอกซินบี 1 แสดงในรูปที่ 29 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกันพบว่า ราคการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ลดลงมากที่สุด ( $99.00 \pm 0.55$  เปอร์เซ็นต์) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้อง



รูปที่ 27 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิสัมพันธ์ด้วยวิธี *face to face* และบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน โดย (ก-ค) ชุดควบคุม (ง-ฉ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *W. anomalous* MSCU 0652 37 (ช-ฌ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU (ญ-ฏ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655



รูปที่ 28 การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปลูกด้วยวิธี *face to face* บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)



รูปที่ 29 การลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปลูกด้วยวิธี *face to face* บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)

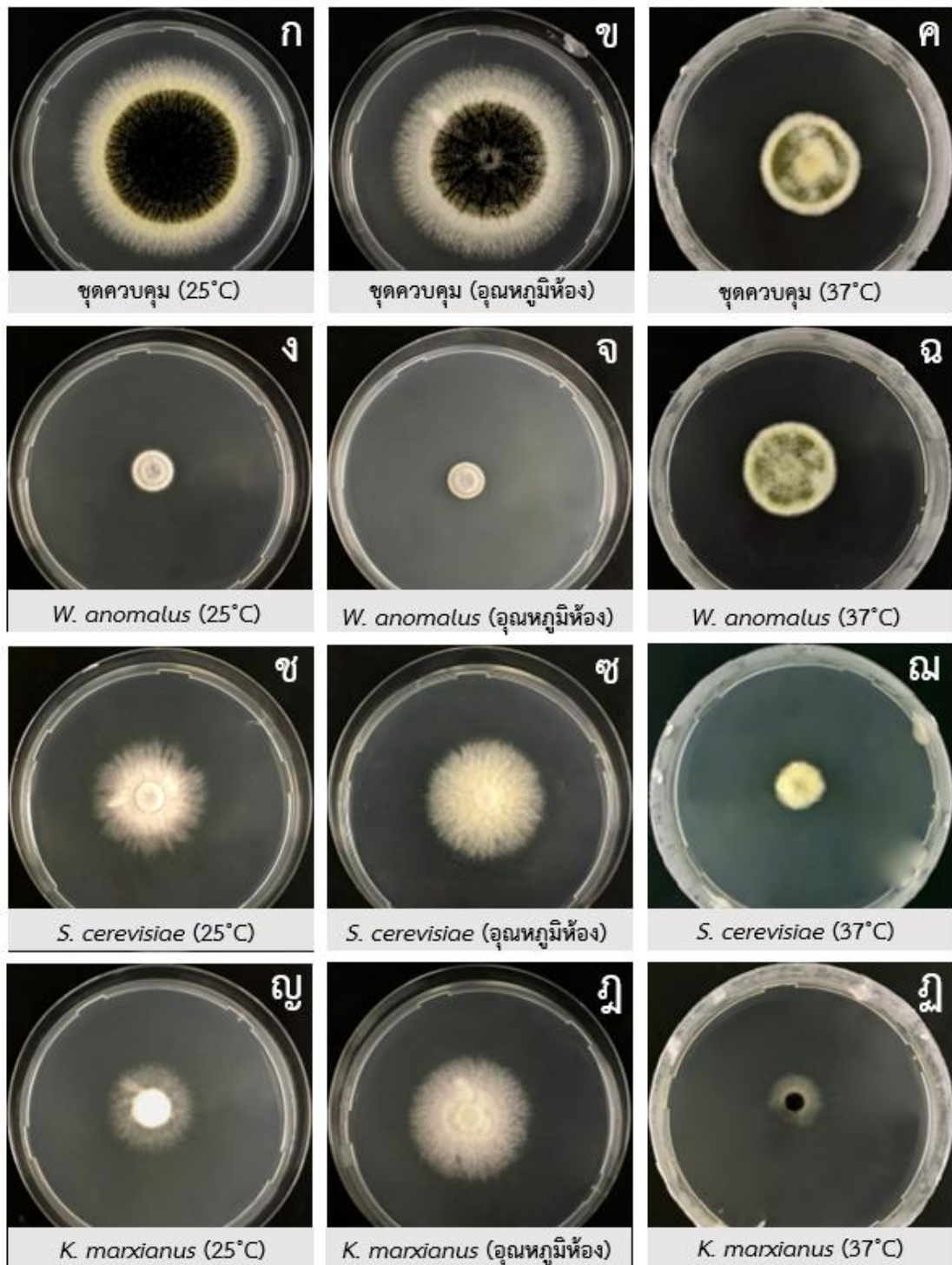
สำหรับความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการลดการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ แสดงในรูปที่ 30-32 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราในชุดควบคุม (รูปที่ 30ก-ค) เปรียบเทียบกับราในชุดทดสอบเมื่อบ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน รูปที่ 30ง-ฉ แสดงลักษณะของราเมื่อบ่มร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง มีขนาดโคโลนีของราเล็กกว่าในชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีขนาดโคโลนีของราใกล้เคียงกับราในชุดควบคุม เมื่อพิจารณาที่เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ (รูปที่ 31) พบว่า *W. anomalus* MSCU 0652 สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 ได้ดีเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเท่ากับ  $79.53 \pm 5.51$  และ  $81.20 \pm 2.65$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการผลิตโอคราทอกซินเอเมื่อบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน (รูปที่ 32) พบว่า ราผลิตโอคราทอกซินเอลดลงมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ( $99.88 \pm 0.03$  และ  $99.92 \pm 0.01$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

เมื่อสังเกตลักษณะโคโลนีของ *A. carbonarius* TK4.2 จากรูปที่ 30ข-ฉ แสดงลักษณะโคโลนีของราที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 พบว่า ราในชุดทดสอบสร้างเส้นใยเป็นสีขาวและไม่สร้างสปอร์ในทุกอุณหภูมิที่ทดสอบ และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า โคโลนีของราในชุดทดสอบมีขนาดเล็กกว่าโคโลนีราในชุดควบคุมอย่างชัดเจน โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 แสดงในรูปที่ 31 พบว่า ทุกอุณหภูมิที่ทำการทดสอบ สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ 40-57 เปอร์เซ็นต์ โดยที่อุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด ( $57.36 \pm 4.55$  เปอร์เซ็นต์) สำหรับประสิทธิภาพในการลดการผลิตโอคราทอกซินเอที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 แสดงในรูปที่ 32 พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง มีเปอร์เซ็นต์การผลิตโอคราทอกซินเอลดลงมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถลดการผลิตโอคราทอกซินเอของราได้ดีที่สุด ( $99.74 \pm 7.10$  เปอร์เซ็นต์)

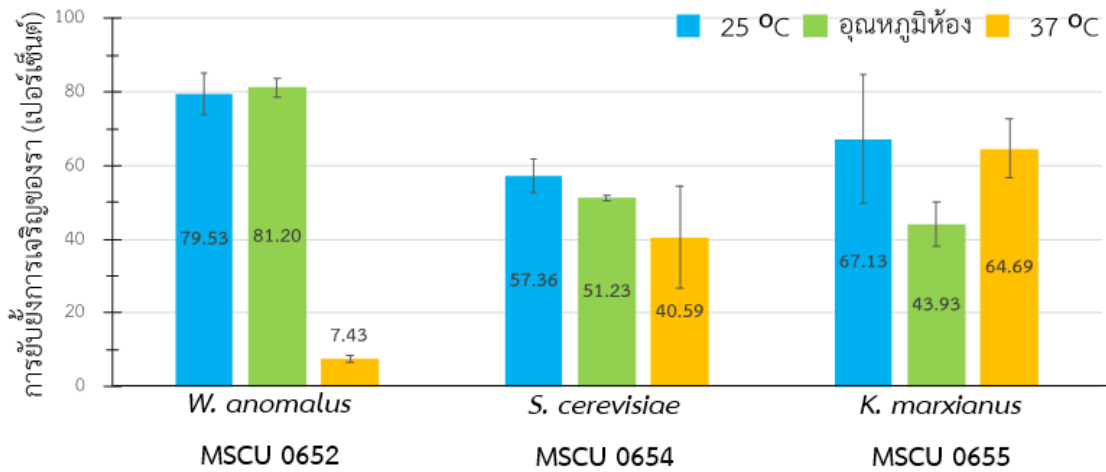
ลักษณะโคโลนีของราดังรูปที่ 30ญ-ฎ แสดงลักษณะโคโลนีของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 ที่บ่มในอุณหภูมิต่างๆ พบว่า ที่อุณหภูมิในการบ่มเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส มีการเจริญของราในชุดทดสอบน้อยมาก แต่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง เราสามารถเจริญได้และมีขนาดเล็กกว่าโคโลนีของราในควบคุม มีเส้นใยเป็นสีขาวและไม่สร้างสปอร์ จากรูปที่ 31 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเมื่อบ่มร่วมกับ *K.*

*marxianus* MSCU 0655 พบว่า เมื่อป๋มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด ( $67.13 \pm 17.58$  เปอร์เซ็นต์) และเมื่อพิจารณาที่ประสิทธิภาพในการลดการผลิตโอคราทอกซินเอของราที่ป๋มร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 (รูปที่ 32) พบว่า เมื่อป๋มที่อุณหภูมิห้อง มีเปอร์เซ็นต์การผลิตโอคราทอกซินเอลดลงมากที่สุดเท่ากับ  $99.60 \pm 0.02$  เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ ชุดทดสอบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ( $96.96 \pm 4.18$  เปอร์เซ็นต์)

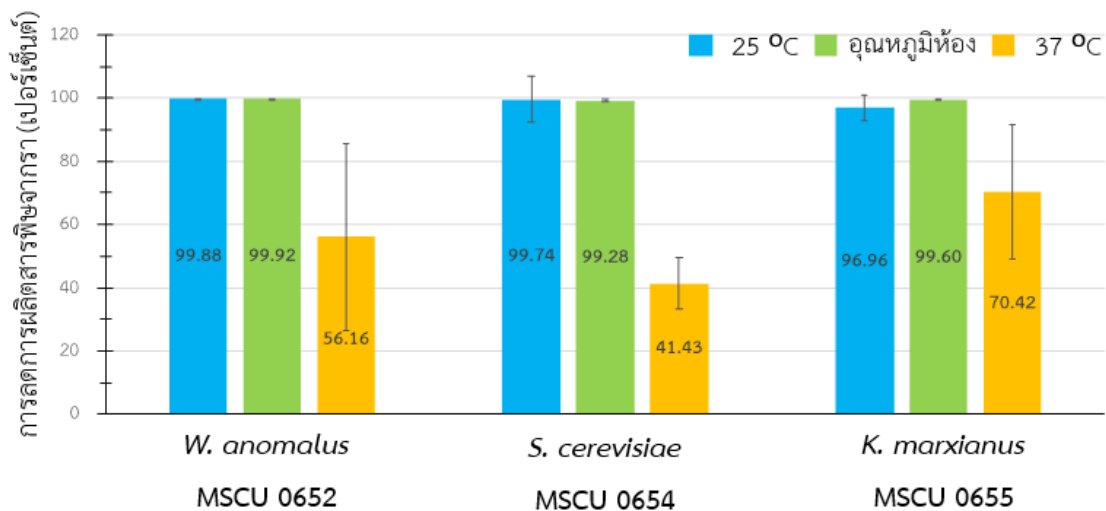




รูปที่ 30 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* และบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน โดย (ก-ค) ชุดควบคุม (ง-ฉ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 (ช-ฌ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (ญ-ฎ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655



**รูปที่ 31** การยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)



**รูปที่ 32** การลดการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 7 วัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)

#### 4.4.4.3 ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD

รูปที่ 33 แสดงลักษณะของโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 ในชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 33ก-ค) เปรียบเทียบกับราในชุดทดสอบที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน (ความเข้มข้นปกติ, 0.5 เท่า และ 0.1 เท่า) จากรูปที่ 33ง-ฉ แสดงลักษณะโคโลนีของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 โดยใช้ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ, 0.5 เท่า และ 0.1 เท่า ตามลำดับ พบว่า ราที่เลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 บนอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ และ 0.5 เท่า มีขนาดโคโลนีของราเล็กกว่าโคโลนีของราในชุดควบคุมอย่างชัดเจน มีเส้นใยของราสีขาวและไม่สร้างสปอร์ ในขณะที่ราในชุดทดสอบความเข้มข้นอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD 0.1 เท่า มีขนาดโคโลนีของราใกล้เคียงกับราในชุดควบคุม และสร้างสปอร์ได้เช่นเดียวกับราในชุดควบคุมด้วย เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรา (รูปที่ 34) พบว่า ยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ลดลง เมื่อมีการลดความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ลงตามลำดับ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ ( $82.86 \pm 1.14$  เปอร์เซ็นต์) สำหรับการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ในรูปที่ 35 พบว่า ราผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ลดลงมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบบนอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ และ 0.5 เท่า ( $99.44 \pm 0.27$  และ  $99.67 \pm 0.12$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

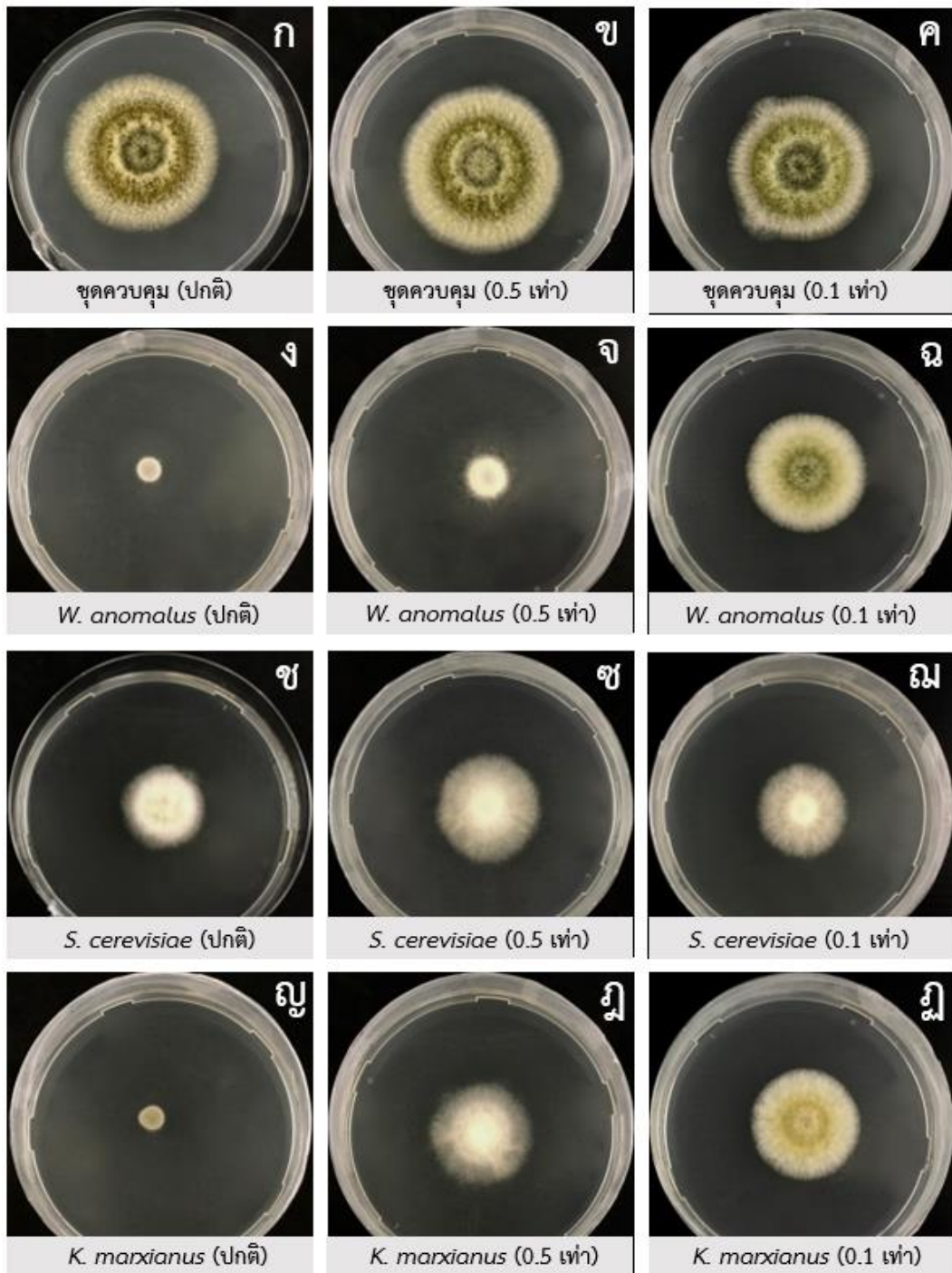
ลักษณะโคโลนีของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 ในความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD แบบต่าง ๆ (รูปที่ 33ข-ณ) พบว่า โคโลนีของราในทุกชุดทดสอบสร้างเส้นใยสีขาวและไม่สร้างสปอร์ และมีขนาดโคโลนีของราที่เล็กกว่าราในชุดควบคุม จากรูปที่ 34 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *S. cerevisiae* MSCU 0654 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ ( $61.83 \pm 3.14$  เปอร์เซ็นต์) และรูปที่ 35 แสดงประสิทธิภาพในการลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของราที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 พบว่า ทุกชุดทดสอบ ราผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ลดลงมากกว่า 92 เปอร์เซ็นต์ และผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ลดลงมากที่สุดเท่ากับ  $95.82 \pm 0.79$  เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ

ลักษณะโคโลนีของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 ที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD แบบต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 33ญ-ฎ พบว่า เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ และ 0.5 เท่า มีขนาดโคโลนีของราเล็กกว่าราในชุดควบคุม มีเส้นใยเป็นสีขาวและไม่สร้างสปอร์ ในขณะที่ ชุดทดสอบที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD 0.1 เท่า มีขนาด

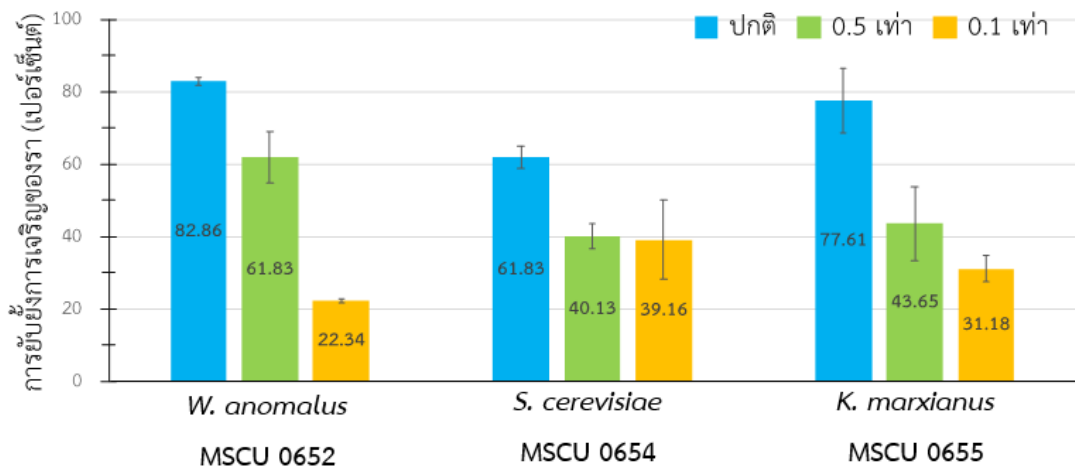
ใกล้เคียงกับราในชุดควบคุม แต่มีสปอร์น้อยกว่าและเส้นใยเป็นสีขาวเช่นกัน จากรูปที่ 34 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุดเท่ากับ  $77.61 \pm 9.00$  เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นปกติ และเมื่อพิจารณาที่การผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของรา (รูปที่ 35) พบว่า ที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ ราผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ลดลงมากที่สุด ( $99.59 \pm 0.05$  เปอร์เซ็นต์)



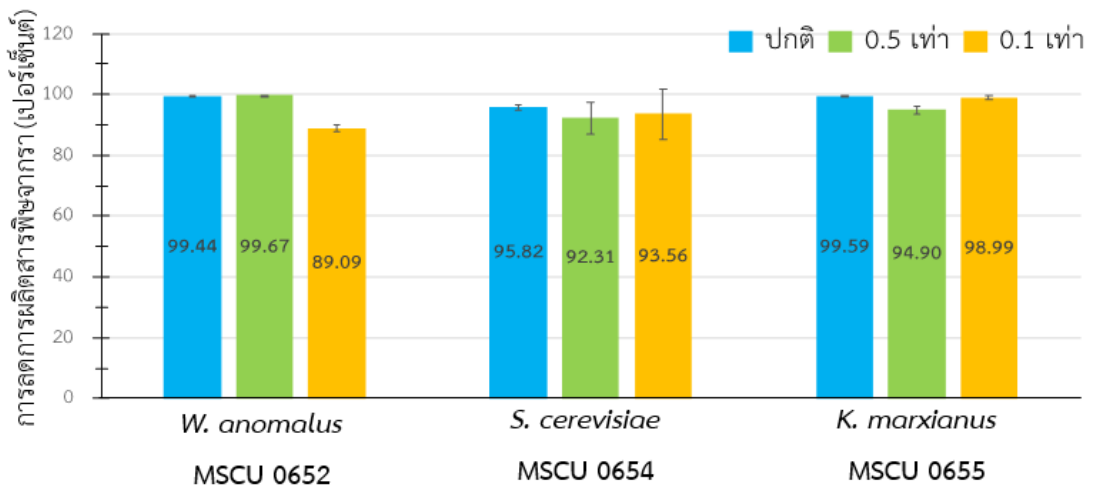




รูปที่ 33 การเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิสัมพันธ์ด้วยวิธี face to face บนอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดย (ก-ค) ชุดควบคุม (ง-ฉ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *W. anomalous* MSCU 0652 (ช-ฉ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (ญ-ฎ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655



**รูปที่ 34** การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face double petri dish assay* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)



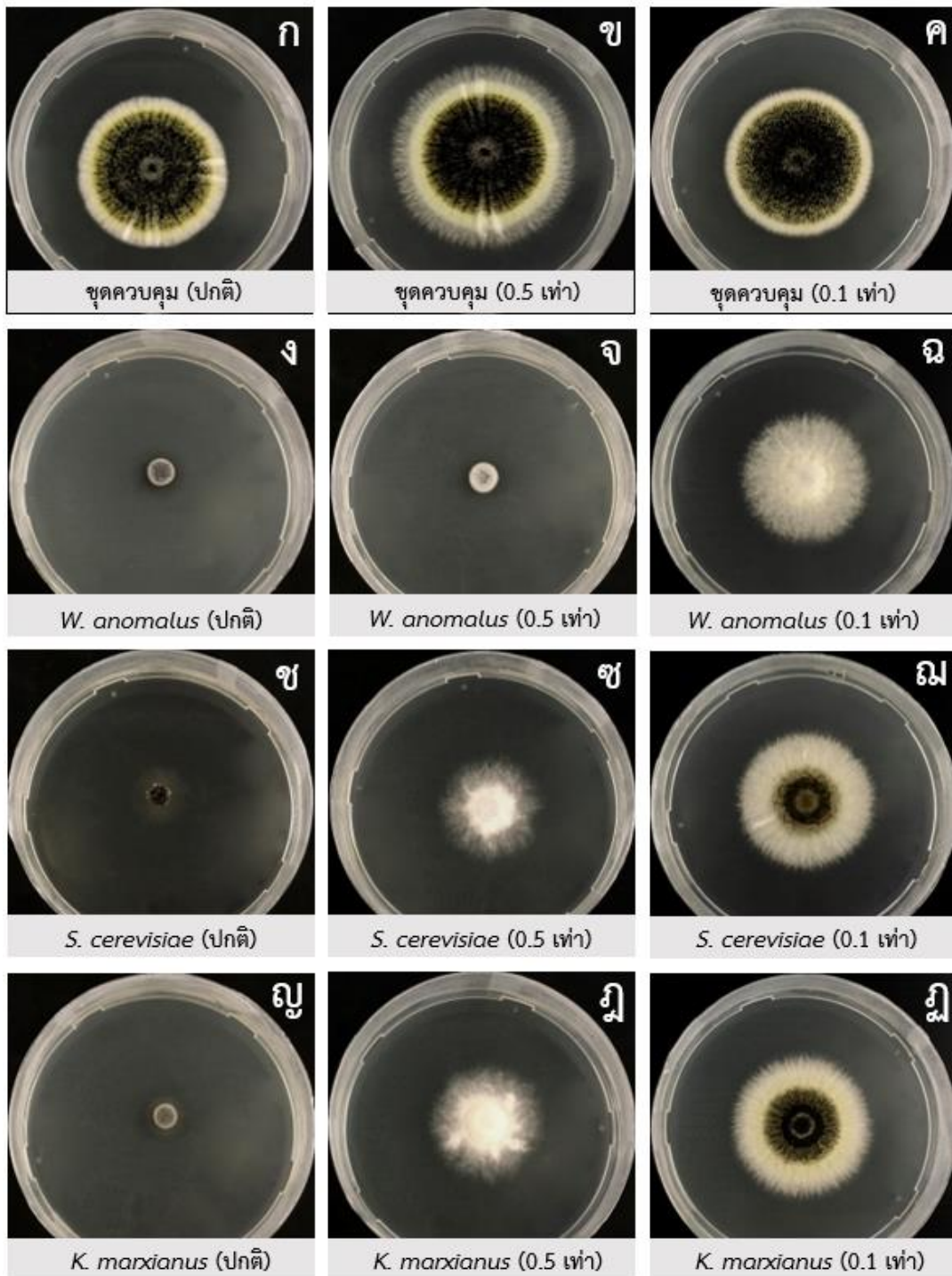
**รูปที่ 35** การลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face double petri dish assay* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)

สำหรับผลการทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์  
 ปฏิปักษ์เพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 โดยสังเกต  
 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีราในชุดควบคุม (รูปที่ 36ก-ค) เทียบกับราที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์  
 ปฏิปักษ์ ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน เมื่อพิจารณาลักษณะโคโลนี  
 ของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *W. anomalous* MSCU 0652 (รูปที่ 36ง-ฉ) พบว่า ราในชุดทดสอบมีการ  
 เจริญเพียงเล็กน้อยเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ และ 0.5 เท่า สำหรับ  
 การทดสอบที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD 0.1 เท่า พบว่า ขนาดของโคโลนีราในชุดทดสอบ  
 ใกล้เคียงกับราในชุดควบคุม แต่มีเส้นใยที่เป็นสีขาวและไม่สร้างสปอร์ และเมื่อพิจารณาจาก  
 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรา (รูปที่ 37) พบว่า ที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ  
 และ 0.5 เท่า สามารถยับยั้งการเจริญของราได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ( $83.88 \pm 0.32$  และ  
 $80.54 \pm 0.26$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และเมื่อพิจารณาการผลิตโอคราทอกซินเอของรา (รูปที่ 38)  
 พบว่า ที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ และ 0.5 เท่า ราผลิตโอคราทอกซินเอลดลง  
 ใกล้เคียงกันและมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ ( $99.97 \pm 0.01$  และ  $99.95 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

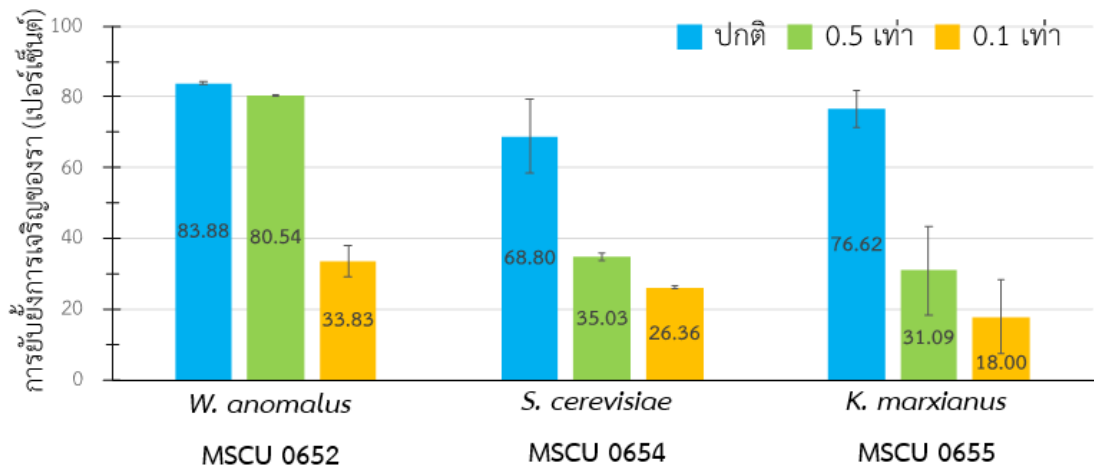
ลักษณะโคโลนีของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยง  
 ยีสต์ YPD ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (รูปที่ 36ข-ฅ) พบว่า โคโลนีของราที่ความเข้มข้นของอาหาร  
 เลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ เจริญได้น้อย ในขณะที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD แบบอื่น ๆ พบ  
 การเจริญของรา โดยที่ 0.5 เท่า โคโลนีของราไม่มีสปอร์สีดำและมีเส้นใยสีขาวเท่านั้น ส่วนความ  
 เข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD 0.1 เท่า โคโลนีของรามีขนาดใกล้เคียงกับราในชุดควบคุม แต่มี  
 สปอร์สีดำน้อยกว่าและมีเส้นใยสีขาว เมื่อพิจารณาที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของรา เมื่อ  
 เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (รูปที่ 37) พบว่า มีเฉพาะที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยง  
 ยีสต์ YPD ปกติ สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดี ( $68.80 \pm 10.41$  เปอร์เซ็นต์) และจากรูปที่ 38  
 แสดงประสิทธิภาพในการลดการผลิตโอคราทอกซินเอของราพบว่า ราบนอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ทุก  
 ความเข้มข้นผลิตโอคราทอกซินเอลดลง ซึ่งที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ และ 0.5  
 เท่า ราผลิตโอคราทอกซินเอลดลงมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การลดการผลิตโอครา  
 ทอกซินเอที่ใกล้เคียงกัน ( $99.95 \pm 0.02$  และ  $99.96 \pm 0.00$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ)

รูปที่ 36 ญ-ภู แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 ซึ่งเจริญบนความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่แตกต่างกันพบว่า ที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ มีการเจริญของราเล็กน้อย และที่ 0.5 เท่า พบว่า รามีการสร้างเส้นใยสีขาว ไม่สร้างสปอร์ และขนาดเล็กกว่าราในชุดควบคุม จากรูปที่ 37 แสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 พบว่า ที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของรามากที่สุดเท่ากับ  $76.62 \pm 5.33$  เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาจากรูปที่ 38 แสดงการลดการผลิตโอคราทอกซินเอของราพบว่า ราผลิตโอคราทอกซินเอลดลงทุกความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD และที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติ ราผลิตโอคราทอกซินเอลดลงมากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การลดการผลิตโอคราทอกซินเอเท่ากับ  $99.96 \pm 0.02$  เปอร์เซ็นต์

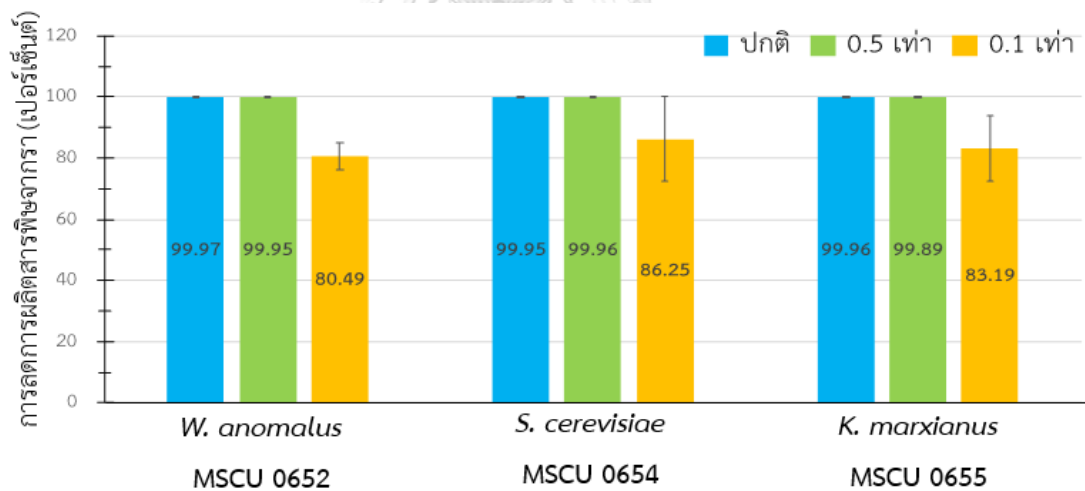




รูปที่ 36 การเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี face to face บนอาหารเลี้ยงยีสต์ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดย (ก-ค) ชุดควบคุม (ง-ฉ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *W. anomalous* MSCU 0652 (ช-ฉ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 (ญ-ฎ) ราที่เลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655



**รูปที่ 37** การยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)



**รูปที่ 38** การลดการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ด้วยวิธี *face to face* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยมีความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว โดยมีความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ที่แตกต่างกัน (เปอร์เซ็นต์ที่ได้เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เลี้ยงราเพียงอย่างเดียว)

#### 4.5 ทดสอบความสามารถของยีสต์ในการลดการปนเปื้อนสารพิษจากรา

##### 4.5.1 ทดสอบความสามารถในการดูดซับหรือดูดซึมสารพิษจากราของยีสต์ปฏิบั้กษ

เมื่อทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิบั้กษทั้งสามชนิดในการดูดซับหรือดูดซึมอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ เมื่อทดสอบการดูดซับด้วยเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต (living yeast cell) และไม่มีชีวิต (non-living yeast cell) แสดงดังตารางที่ 17 และ 18 จากผลการทดสอบการดูดซับหรือดูดซึมอะฟลาทอกซินบี 1 พบว่า เซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตของ *W. anomalous* MSCU 0652 มีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 สะสมในตะกอนเซลล์ยีสต์มากที่สุด ( $2.53 \pm 2.92$  นาโนกรัมต่อกรัม) รองลงมาได้แก่ *K. marxianus* MSCU 0655 และ *S. cerevisiae* MSCU 0654 มีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 สะสมในตะกอนเซลล์ยีสต์เท่ากับ  $0.85 \pm 0.15$  และ  $0.69 \pm 0.55$  นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ และพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ของ *W. anomalous* MSCU 0652 มีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ลดลงจากชุดควบคุม สำหรับน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ของ *K. marxianus* MSCU 0655 และ *S. cerevisiae* MSCU 0654 มีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ใกล้เคียงกับชุดควบคุม

สำหรับตะกอนของเซลล์ยีสต์ที่ไม่มีชีวิตพบว่า *K. marxianus* MSCU 0655 มีอะฟลาทอกซินบี 1 สะสมในตะกอนเซลล์ยีสต์มากที่สุด ( $4.68 \pm 3.70$  นาโนกรัมต่อกรัม) รองลงมาได้แก่ *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ *W. anomalous* MSCU 0652 ( $4.38 \pm 4.56$  และ  $2.11 \pm 0.43$  นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ) และพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ไม่มีชีวิตของ *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ *W. anomalous* MSCU 0652 มีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ลดลงจากชุดควบคุม สำหรับน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ไม่มีชีวิตของ *K. marxianus* MSCU 0655 มีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ใกล้เคียงกับชุดควบคุม

ปริมาณโอคราทอกซินเอเมื่อทดสอบความสามารถในการดูดซับหรือดูดซึมสารพิษจากราของยีสต์ปฏิบั้กษทั้งสามชนิด (ตารางที่ 18) พบว่า ตะกอนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตของ *W. anomalous* MSCU 0652 มีปริมาณโอคราทอกซินเอสะสมมากที่สุด ( $0.80 \pm 0.57$  นาโนกรัมต่อกรัม) รองลงมาได้แก่ ตะกอนเซลล์ยีสต์ของ *K. marxianus* MSCU 0655 และ *S. cerevisiae* MSCU 0654 มีปริมาณโอคราทอกซินเอสะสมเท่ากับ  $0.42 \pm 0.06$  และ  $0.21 \pm 0.01$  นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตของยีสต์ปฏิบั้กษทั้งสามชนิดมีปริมาณโอคราทอกซินเอลดลงจากชุดควบคุม

สำหรับตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ไม่มีชีวิตของ และ *S. cerevisiae* MSCU 0654 มีปริมาณโอคราทอกซินเอสะสมอยู่มากที่สุด ( $0.76 \pm 0.40$  นาโนกรัมต่อกรัม) รองลงมาได้แก่ ตะกอนเซลล์ยีสต์ไม่มี

ชีวิตของ *W. anomalus* MSCU 0652 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีปริมาณโอคราทอกซินเอะสมเท่ากับ  $0.43 \pm 0.18$  และ  $0.23 \pm 0.01$  นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ในขณะที่ น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ไม่มีชีวิตทั้งสามชนิดมีปริมาณโอคราทอกซินเอดลดลงจากชุดควบคุม

**ตารางที่ 17** การดูดซับหรือดูดซึมอะฟลาทอกซินบี 1 โดยเซลล์ยีสต์ปฏิภักษ์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่เติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน

ชุดทดสอบ	ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 (นาโนกรัมต่อกรัม)			
	ตะกอนเซลล์ยีสต์มีชีวิต	น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์มีชีวิต	ตะกอนเซลล์ยีสต์ไม่มีชีวิต	น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ไม่มีชีวิต
ชุดควบคุม	-	$4.56 \pm 0.57^a$	-	$4.56 \pm 0.57^a$
<i>W. anomalus</i> MSCU 0652	น้อยกว่า LOQ** ( $2.53 \pm 2.92^a$ )	$3.44 \pm 1.34^a$	น้อยกว่า LOQ ( $2.11 \pm 0.43^a$ )	$3.58 \pm 1.33^a$
<i>S. cerevisiae</i> MSCU 0654	น้อยกว่า LOD ( $0.69 \pm 0.55^a$ )	$6.75 \pm 2.88^a$	$4.38 \pm 4.56^a$	น้อยกว่า LOQ $2.02 \pm 0.10^a$
<i>K. marxianus</i> MSCU 0655	น้อยกว่า LOQ ( $0.85 \pm 0.15^a$ )	$4.75 \pm 0.14^a$	$4.68 \pm 3.70^a$	$4.84 \pm 1.50^a$

\* ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละแถวแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P > 0.05$ )

\*\* LOD และ LOQ ของอะฟลาทอกซินบี 1 เท่ากับ 0.89 และ 2.71 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ



**ตารางที่ 18** การดูดซับหรือดูดซึมโอคราทอกซินเอโดยเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่เติมสารละลายมาตรฐานโอคราทอกซินเอ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

ชุดทดสอบ	ปริมาณโอคราทอกซินเอ (นาโนกรัมต่อกรัม)			
	ตะกอนเซลล์ยีสต์มีชีวิต	น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์มีชีวิต	ตะกอนเซลล์ยีสต์ไม่มีชีวิต	น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ไม่มีชีวิต
ชุดควบคุม	-	4.56±0.57 <sup>a*</sup>	-	4.56±0.57 <sup>a</sup>
<i>W. anomalous</i> MSCU 0652	น้อยกว่า LOQ <sup>**</sup> (0.80±0.57 <sup>a</sup> )	3.16±0.45 <sup>b</sup>	น้อยกว่า LOD 0.43±0.18 <sup>a</sup>	2.98±0.03 <sup>a</sup>
<i>S. cerevisiae</i> MSCU 0654	น้อยกว่า LOD 0.21±0.01 <sup>a</sup>	3.10±0.12 <sup>b</sup>	น้อยกว่า LOQ 0.76±0.40 <sup>a</sup>	2.99±0.21 <sup>a</sup>
<i>K. marxianus</i> MSCU 0655	น้อยกว่า LOD 0.42±0.06 <sup>a</sup>	3.25±0.34 <sup>b</sup>	น้อยกว่า LOD 0.23±0.01 <sup>a</sup>	3.96±1.54 <sup>a</sup>

\* ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละแถวแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P > 0.05$ )

\*\* LOD และ LOQ ของโอคราทอกซินเอเท่ากับ 0.63 และ 1.92 นาโนกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

## CHULALONGKORN UNIVERSITY

### 4.5.2 ทดสอบการย่อยสลายสารพิษจากราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์

ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ โดยทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ บ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่เติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ เป็นเวลา 2 วัน ได้ผลทดสอบดังแสดงในตารางที่ 19 และ 20 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาจากประสิทธิภาพในการย่อยสลายอะฟลาทอกซินบี 1 ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ (ตารางที่ 19) พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดมีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ในขณะที่น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อของ *S. cerevisiae* MSCU 0654 มีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1

น้อยที่สุด และมีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 น้อยกว่าชุดควบคุม ( $3.75 \pm 0.32$  นาโนกรัมต่อกรัม) อย่างไรก็ตามปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 19** การย่อยสลายอะฟลาทอกซินบี 1 ด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่เติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

ชุดทดสอบ	ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 (นาโนกรัมต่อกรัม)	
	น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์	น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
ชุดควบคุม	$4.97 \pm 0.57^a$	$4.97 \pm 0.57^a$
<i>W. anomalus</i> MSCU 0652	$4.12 \pm 0.46^a$	$5.27 \pm 1.45^a$
<i>S. cerevisiae</i> MSCU 0654	$4.24 \pm 0.85^a$	$3.75 \pm 0.32^a$
<i>K. marxianus</i> MSCU 0655	$4.88 \pm 0.57^a$	$5.16 \pm 0.11^a$

\* ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละแถวแสดงว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P > 0.05$ )

จากตารางที่ 20 แสดงประสิทธิภาพในการย่อยสลายโอคราทอกซินเอของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดมีปริมาณโอคราทอกซินเอไม่แตกต่างจากชุดควบคุม เช่นเดียวกับเมื่อทดสอบด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อพบว่า โอคราทอกซินเอในทุกชุดทดสอบมีปริมาณโอคราทอกซินเอไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

**ตารางที่ 20** การย่อยสลายโอคราทอกซินเอด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่เติมสารละลายมาตรฐานโอคราทอกซินเอ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

ชุดทดสอบ	ปริมาณโอคราทอกซินเอ (นาโนกรัมต่อกรัม)	
	น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์	น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
ชุดควบคุม	2.21±0.54 <sup>a*</sup>	2.21±0.54 <sup>a</sup>
<i>W. anomalus</i> MSCU 0652	3.34±0.83 <sup>a</sup>	3.52±0.87 <sup>a</sup>
<i>S. cerevisiae</i> MSCU 0654	2.71±0.39 <sup>a</sup>	2.70±0.28 <sup>a</sup>
<i>K. marxianus</i> MSCU 0655	2.40±0.75 <sup>a</sup>	2.71±0.06 <sup>a</sup>

\* ตัวอักษรที่เหมือนกันในแต่ละแถวแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ( $P > 0.05$ )

## บทที่ 5

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 5.1 ทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* และ *A. carbonarius*

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา โดยใช้ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามสายพันธุ์ ด้วยวิธี Dual culture ทำให้ทราบถึงความสามารถในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้น จากผลการทดลองข้อ 4.1 แสดงให้เห็นว่า *W. anomalous* MSCU 0652, *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* และ *A. carbonarius* ได้แตกต่างกัน

ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของราเพียงเล็กน้อย (20-22 เปอร์เซ็นต์) และราผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ลดลง 35-43 เปอร์เซ็นต์ โดย *K. marxianus* MSCU 0655 มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของรา โดยมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญของราเท่ากับ  $22.83 \pm 3.67$  เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 เท่ากับ  $43.03 \pm 3.63$  เปอร์เซ็นต์ ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 ได้ใกล้เคียงกันประมาณ 21 เปอร์เซ็นต์ และลดการผลิตโอคราทอกซินเอได้ 18-30 เปอร์เซ็นต์ โดย *K. marxianus* MSCU 0655 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* TK4.2 ได้ดีที่สุด ( $21.31 \pm 2.79$  และ  $30.36 \pm 1.54$  เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ)

จากสรุปผลการทดสอบข้างต้นจะเห็นได้ว่า *K. marxianus* MSCU 0655 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของ *A. flavus* M3T8R4G3 และ *A. carbonarius* TK4.2 ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ปฏิปักษ์อีกสองชนิด จากงานวิจัยของ Penna และ Etcheverry (2006) ได้ทดสอบความสามารถของ *K. marxianus* ต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์ การเจริญของเส้นใยรา และการสะสมของอะฟลาทอกซินปี 1 ของราในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* เมื่อทดสอบที่ค่าวอเตอร์แอกทิวิตีแตกต่างกันพบว่า เมื่อทดสอบที่ค่าวอเตอร์แอกทิวิตีเท่ากับ 0.982 *K. marxianus* สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราและลดอัตราการเจริญของราอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ ยังสามารถลดการสะสมของอะฟลาทอกซินปี 1 ได้มากกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ (Penna & Etcheverry, 2006) Geng และคณะ (2011) พบว่า *K. marxianus* สามารถยับยั้งการเกิดโรคเน่าใน

ผลสัมจากรา *P. digitatum* ได้ เมื่อทดสอบด้วยความเข้มข้นของ *K. marxianus*  $10^8$  CFU ต่อ มิลลิลิตร ที่ผสมด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต 2 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดการเกิดโรคเน่าในผลส้มได้ 58.33 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 6 วัน และมีประสิทธิภาพมากขึ้น 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ ยีสต์เพียงอย่างเดียว (Geng, Chen, et al., 2011)

อย่างไรก็ตาม จากผลการทดสอบด้วย *W. anomalus* MSCU 0652 และ *S. cerevisiae* MSCU 0654 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราด้วยวิธี dual culture เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ แต่มีงานวิจัยหลายฉบับที่พบว่า ยีสต์ทั้งสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการเป็นตัว ควบคุมทางชีวภาพที่ดี เช่น งานวิจัยของ Hua และคณะ (2019) ทดสอบความสามารถในการยับยั้ง การเจริญของ *A. flavus* โดยใช้ยีสต์ *W. anomalus* ด้วยวิธี dual culture พบว่า สามารถยับยั้ง การเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* ได้ โดยสามารถลดจำนวนสปอร์ของราได้ มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ยังสามารถลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวกับการผลิตอะฟลา ทอกซินของราได้ (S.S.T Hua, Sarreal, Chang, & Yu, 2019) และจากงานวิจัยของ Petersson และคณะ (1998) ศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *P. verrucosum* ด้วย *W. anomalus* และ *S. cerevisiae* พบว่า ยีสต์ทั้งสองชนิดสามารถลดอัตราการ เจริญของราได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อทดสอบบนอาหาร malt extract agar และลดการสะสมของ โอคราทอกซินเอในข้าวสาลีได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้ เนื่องจากยีสต์มีอัตราการเจริญที่เร็วกว่ารา จึงอาจ ส่งผลให้ยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญของราได้เพียงช่วงระยะแรกของการเจริญของราเท่านั้น ทำให้ ยีสต์ปฏิปักษ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราเพียงเล็กน้อย (Petersson, Hansen, Axberg, Hult, & SchunÜRer, 1998)

นอกจากนี้ การยับยั้งการเจริญของราโดยยีสต์ปฏิปักษ์อาจส่งผลต่อการผลิตสารพิษจากราที่ ลดลงด้วย จากรายงานของ Sánchez และคณะ ในปี 2005 พบว่า เมื่อใช้เมแทบอลิต์ เช่น เอทานอลิก และเมทานอลิก ที่ผลิตจากจุลินทรีย์หลายชนิดที่อาศัยอยู่ในพืช สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และ *A. paraciticus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งส่งผลให้มีการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ ลดลงตามไปด้วย (Sanchez, Heredia, & Garcia, 2005) และจากรายงานของ O'Callaghan และ คณะ (2006) พบว่า การเลี้ยง *S. cerevisiae* ร่วมกับ *A. ochraceus* สามารถยับยั้งการเจริญของรา ได้ดี เนื่องจากการแย่งชิงสารอาหารที่สำคัญ เช่น ไนโตรเจน ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการผลิตโอ คราทอกซินเอ จึงทำให้ราผลิตโอคราทอกซินเอได้น้อยลง (O'Callaghan, Stapleton, & Dobson, 2006)

## 5.2 ทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นในการสร้างสารยับยั้งการเจริญเมื่อเลี้ยงร่วมกับรา

จากผลการทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์เบื้องต้นเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *A. flavus* M3T8R4G3 ด้วยวิธี Agar spot assay สังเกตพบบริเวณใสขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเลี้ยงราร่วมกับ *S. cerevisiae* MSCU 0654 โดยไม่มีการกระจายของเซลล์ยีสต์บริเวณชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์) ทำให้ทราบว่า *S. cerevisiae* MSCU 0654 อาจสร้างสารยับยั้งการเจริญต่อ *A. flavus* M3T8R4G3 โดยแพร่ผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์) ได้ ในขณะที่เมื่อทดสอบกับ *K. marxianus* MSCU พบว่าบริเวณด้านบนมีการเจริญของราอยู่เล็กน้อยร่วมกับโคโลนีของยีสต์ที่กระจายอยู่ด้านบน และเมื่อทดสอบกับ *W. anomalus* MSCU 0652 0655 พบว่า โคโลนีของยีสต์มีการกระจายตัวปนอยู่กับ *A. flavus* M3T8R4G3 ด้านบนของอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์) ทำให้สังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นด้านบนไม่ชัดเจน จากผลการทดสอบดังกล่าว *S. cerevisiae* MSCU 0654 อาจสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 ได้ สำหรับ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด พบบริเวณใสชัดเจนเมื่อเลี้ยงราร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 รองลงมาได้แก่ *S. cerevisiae* MSCU 0654 และเนื่องจากมีการเจริญของ *W. anomalus* MSCU 0652 กระจายอยู่ในชั้นของอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง PDA (วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์) ทำให้ราเจริญเติบโตได้น้อยและสังเกตบริเวณใสได้ยาก จากผลการทดสอบดังกล่าว *K. marxianus* MSCU 0655 และ *S. cerevisiae* MSCU 0654 อาจสร้างสารยับยั้งบางชนิดที่มีผลต่อการเจริญของ *A. carbonarius* TK4.2 ได้

จากงานวิจัยของ Nally และคณะ (2015) ศึกษากลไกของยีสต์ที่สามารถยับยั้งเจริญของราที่ก่อให้เกิดโรคเน่าในผลองุ่น พบว่า *S. cerevisiae* สามารถสร้างเอนไซม์ลามินาริเนสและโคดีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์ราได้ และสามารถสร้าง siderophore เพื่อใช้ในการแย่งธาตุเหล็ก ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของราก่อโรค นอกจากนี้ งานวิจัยของ Nally และคณะ ในปีเดียวกันยังพบว่า *K. marxianus* BKm128 และ BKm145 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus terreus* โดยผลิตเอนไซม์ลามินาริเนส เพื่อทำลายผนังเซลล์ของรา และผลิต siderophore เพื่อแย่งชิงธาตุเหล็กที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต รวมทั้ง สามารถผลิตเอนไซม์  $\beta$ -1,3-กลูคาเนส เพื่อยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้อีกด้วย (Nally et al., 2015) อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจากการทดลองจะไม่สังเกตเห็นบริเวณใสได้อย่างชัดเจนเมื่อเลี้ยงราร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 แต่จากงานวิจัยของ Jijakli และ Lepoivre (1998) พบว่า *W. anomalus* สามารถสร้างเอนไซม์ exo

$\beta$ -1,3-กลูคาเนส ที่มีผลต่อการสร้างผนังเซลล์ของ *B. cinerea* ได้ ซึ่งส่งผลให้ราามีเส้นใยที่ผิดปกติ และลดการเจริญของเส้นใยราที่ใช้ในการสืบพันธุ์ได้ (Jijakli & Lepoivre, 1998)

### 5.3 ทดสอบความสามารถของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของรา

จากผลการทดสอบความสามารถเบื้องต้นของยีสต์ปฏิปักษ์ในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 และ *A. carbonarius* TK4.2 พบว่า *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถสร้างสารยับยั้งบางชนิดเพื่อยับยั้งการเจริญของราได้ เพื่อพิสูจน์ว่าสารที่ยีสต์สร้างขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ จึงได้ศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของรา โดยทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion assay

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ของยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์ ทั้งที่เจริญในช่วง mid log phase และ late log phase ซึ่งเป็นช่วงการเจริญที่เหมาะสมต่อการสร้างสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ เช่นเดียวกับ *A. carbonarius* TK4.2 ไม่พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ แสดงให้เห็นว่าสารที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ทั้งสามชนิดไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิด อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบด้วยวิธี Agar spot assay แสดงให้เห็นว่ายีสต์ *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถผลิตสารยับยั้งซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แสดงว่าสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งดังกล่าวอาจถูกสร้างขึ้นเมื่อมีการเจริญร่วมกับราเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jijakli และ Lepoivre ในปี 1998 พบว่า เมื่อเติมเส้นใยราลงไปในสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ *P. anomala* strain K (*W. anomalus*) จะกระตุ้นให้ยีสต์ผลิตเอนไซม์ เอคโซ  $\beta$ -1,3-กลูคาเนส และเมื่อนำเอนไซม์ดังกล่าวไปทดสอบเพื่อยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้ดียิ่งขึ้น (Jijakli & Lepoivre, 1998) และรายงานของ Zhu และคณะ (2015) ศึกษาผลของน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* M114 เพื่อยับยั้งการงอกของสปอร์รา *A. carbonarius* พบว่า เมื่อบ่มราร่วมกับยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD เป็นเวลา 3 วัน แล้วแยกน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ออกจากตะกอนเซลล์ยีสต์ และนำน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ไปบ่มร่วมกับสปอร์ราเป็นเวลา 96 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้อย่างชัดเจน ผู้วิจัยจึงสรุปว่า เมื่อมีการเจริญของรากับยีสต์ร่วมกัน ยีสต์จะสามารถสร้างสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของราละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (C. Zhu et al., 2015)

#### 5.4 ทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย (volatile organic compounds: VOCs) ของยีสต์ต่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษของรา

##### 5.4.1 ทดสอบความสามารถของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์

กลไกสำคัญอีกประการหนึ่งของยีสต์ปฏิปักษ์ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา ได้แก่ การผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายจากยีสต์ โดยทดสอบด้วยวิธี face to face double petri dish assay ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญและเปอร์เซ็นต์การลดการผลิตสารพิษของ *A. flavus* M3T8R4G3 และ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652, *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ *K. marxianus* MSCU 0655

ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *A. flavus* M3T8R4G3 สามารถสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญได้อย่างมีประสิทธิภาพ (56-78 เปอร์เซ็นต์) และรวมลิตอะฟลาทอกซินเอลดลงอย่างชัดเจน (99-97 เปอร์เซ็นต์) โดย *W. anomalus* MSCU 0652 สามารถสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด ( $78.54 \pm 1.08$  เปอร์เซ็นต์) และราที่เลี้ยงร่วมกับ *K. marxianus* MSCU 0655 ลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้มากที่สุด ( $99.19 \pm 0.29$  เปอร์เซ็นต์) สำหรับ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดพบว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดมีประสิทธิภาพในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญของราได้ (60-83 เปอร์เซ็นต์) และราลดการผลิตโอคราทอกซินเอลงมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ โดย *W. anomalus* MSCU 0652 สามารถสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด ( $83.06 \pm 2.02$  เปอร์เซ็นต์) และ *K. marxianus* MSCU 0655 เมื่อเลี้ยงร่วมกับราสามารถสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อลดการผลิตโอคราทอกซินเอของราได้สูงที่สุด ( $99.79 \pm 0.10$  เปอร์เซ็นต์)

งานวิจัยของ Hua และคณะ (2014) พบว่า *P. anomala* WRL-076 (*W. anomalus*) สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ที่พบการปนเปื้อนในต้นถั่วในรัฐแคลิฟอร์เนีย โดยสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ราและกวดการแสดงออกของยีนที่มีส่วนในการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของราได้ (S.S.T. Hua et al., 2014) งานวิจัยของ Jaibangyang และคณะ (2020) ศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ที่คัดแยกได้จากใบของธัญพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เช่น ข้าว อ้อย และข้าวโพด จากประเทศไทย เพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษ



จาก *A. flavus* A39 ผลการศึกษาพบว่า *W. anomalus* DMKU-RP25 ที่คัดแยกได้ สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราได้ดี และยับยั้งการงอกของสปอร์ราได้ และลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้  $51.40 \pm 10.3$  เปอร์เซ็นต์ (Jaibangyang et al., 2020) Masoud และคณะ (2005) พบว่า *P. anomala* (*W. anomalus*) สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. ochraceus* และทำให้มวลชีวภาพของราลดลงด้วย (Masoud, Poll, & Jakobsen, 2005) และรายงานของ Oro และคณะ (2018) ได้ศึกษาสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์สามชนิด ได้แก่ *W. anomalus*, *S. cerevisiae* และ *Metschnikowia pulcherrima* ในการยับยั้งการเจริญของราที่ก่อให้เกิดโรคเน่าในผลสตอเบอร์รี่หลายชนิด รวมทั้ง *A. carbonarius* จากผลการวิจัยพบว่า *W. anomalus* สามารถลดการเจริญของราได้ 44 เปอร์เซ็นต์ ในระดับห้องปฏิบัติการ และเมื่อทดสอบในผลสตอเบอร์รี่พบว่า เมื่อเลี้ยงราพร้อมกับ *W. anomalus* ก่อให้เกิดโรคเน่าได้ลดลง 89 เปอร์เซ็นต์ (Oro et al., 2018)

#### 5.4.2 วิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราโดยใช้ Scanning Electron Microscope (SEM)

จากผลการทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ เพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* M3T8R4G3 และ *A. carbonarius* TK4.2 ปรากฏว่า *W. anomalus* MSCU 0652 สามารถยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด แม้ว่าจะมีเปอร์เซ็นต์การลดการผลิตสารพิษจากราทั้งสองชนิดน้อยกว่า *K. marxianus* MSCU 0655 แต่ยังมีประสิทธิภาพในการลดการผลิตสารพิษจากราที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้น จึงนำเส้นใยราบริเวณขอบของโคโลนีที่เลี้ยงร่วม *W. anomalus* MSCU 0652 มาวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้ Scanning Electron Microscope (SEM) จากผลการวิเคราะห์พบว่า เส้นใยของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 มีลักษณะแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน เช่นเดียวกับเมื่อวิเคราะห์เส้นใยของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 เส้นใยของรามีลักษณะลึบแบน แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่า สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สร้างจาก *W. anomalus* MSCU 0652 มีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา ทำให้มีการเจริญและการพัฒนาของเส้นใยราที่ผิดปกติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Farbo และคณะ (2018) ที่ทดสอบผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. ochraceus* และ *A. carbonarius* ที่ปนเปื้อนในผลองุ่นได้

จากผลการทดสอบพบว่า เส้นใยของราทั้งสองชนิดบริเวณขอบของโคโลนีที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์เมื่อนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์มีการแตกออกอย่างผิดปกติแตกต่างจากชุดควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่า เส้นใยรามีการจับตัวเป็นก้อนและที่ปลายของเส้นใยเกิดการบวมทำให้เซลล์แตกหลายตำแหน่งและงานวิจัยของ Fiori และคณะ (2014) ศึกษาผลของยีสต์ปฏิปักษ์ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* พบว่า *Candida friedrichii* 778 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีขนาดของโคโลนีลดลงและไม่สร้างสปอร์ เมื่อสังเกตลักษณะของเส้นใยราผ่านกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอพบว่า เส้นใยของราบริเวณขอบของโคโลนีมีลักษณะที่ยืดยาวและบางกว่าเส้นใยของราในชุดควบคุมอย่างชัดเจน (Fiori et al., 2014)

#### 5.4.3 วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์เพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจาก *A. flavus* M3T8R4G3 และ *A. carbonarius* TK4.2 พบว่ายีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด ได้แก่ *W. anomalus* MSCU 0652, *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ *K. marxianus* MSCU 0655 สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่มีผลทำให้ราทั้งสองชนิดเจริญเติบโตและผลิตสารพิษจากราได้ลดลงอย่างชัดเจน ดังนั้น จึงได้นำยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดมาวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ยีสต์ทั้งสามชนิดที่ยีสต์ผลิตได้ โดยวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยด้วยวิธี SHS-GC/MS พบว่ายีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดสามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่แตกต่างกันออกไป โดย *W. anomalus* MSCU 0652 ผลิตเอทิลอะซีเตตได้มากที่สุด *S. cerevisiae* MSCU 0654 ผลิตเอทานอลได้มากที่สุด และ *K. marxianus* MSCU 0655 ผลิตเอทิลอะซีเตตได้มากที่สุด

จากงานวิจัยของ Hua และคณะ (2014) ได้วิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจาก *P. anomala* WRL-076 (*W. anomalus*) และศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ปฏิปักษ์ต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* ซึ่งพบว่า *P. anomala* WRL-076 ผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิด 2-พีนิลเอทานอล (2-PE) โดย 2-PE นี้สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยราและการงอกสปอร์รา และพบบริเวณยับยั้งอย่างชัดเจนเมื่อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง นอกจากนี้ 2-PE ยังมีผลต่อยีนที่สำคัญในการสังเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 เช่น *aflR*, *pkcA*, *nor1* และ *omtB* ซึ่งสามารถลดการแสดงออกของยีนดังกล่าวในขั้นตอนการถอดรหัสได้มากกว่า 10,000 เท่า (S.S.T. Hua et al., 2014) ในขณะที่ งานวิจัยของ Oro และ

คณะ (2018) พบว่า *W. anomalus* สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิดเอทิลอะซีเตต ได้มากที่สุด และสามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น อะไมลิกแอลกอฮอล์ ไอโซเอมิลอะซีเตต ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ไอโซบิวทานอล และ 2-ฟีนิลเอทานอล เป็นต้น ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. alternata* และ *A. carbonarius* ได้ 47 และ 44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสามารถลดการก่อโรคน้ำจากราในผลสตอเบอร์รี่ได้ (Oro et al., 2018) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Masoud และคณะ (2005) พบว่า *P. anomala* สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้หลายชนิด ได้แก่ เอทิลอะซีเตต ไอโซบิวทิลอะซีเตต 2-ฟีนิลเอทิลอะซีเตต และเอทิลโพรพิโอเนต โดยผลิตเอทิลอะซีเตตในปริมาณมากที่สุด อย่างไรก็ตาม แม้ว่าเอทิลอะซีเตตจะสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. ochraceus* ได้ แต่ไม่สามารถลดการผลิตโอคราทอกซินเอของราได้ จากงานวิจัยนี้ยังค้นพบว่า 2-ฟีนิลเอทิลอะซีเตต เป็นสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สำคัญในการยับยั้งการผลิตโอคราทอกซินเอของรา (Masoud et al., 2005)

Toffano และคณะ (2017) ศึกษาประสิทธิภาพของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจาก *S. cerevisiae* เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพต่อโรคน้ำจากรา *Phyllosticta citricarpa* ในผลส้มหลังการเก็บเกี่ยว พบว่า สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ปฏิปักษ์สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยและการงอกของสปอร์ ซึ่ง *S. cerevisiae* สามารถสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้หลายชนิด จากงานวิจัยนี้สามารถวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย ได้แก่ เอทานอล (มีปริมาณมากที่สุด), 3-เมทิล-1-บิวทานอล, 2-เมทิล-1-บิวทานอล และเอทิลอะซีเตต เป็นต้น (Toffano, Fialho, & Pascholati, 2017) จากงานวิจัยของ Ren และคณะ (2020) พบว่า เอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* ซึ่งสามารถลดการแสดงออกของยีน *aflK* และ *aflLa* ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในการถอดรหัสเพื่อสังเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 (Ren, Jin, Zheng, Yang, & Xing, 2019) นอกจากนี้ Jiang และคณะ (2015) ศึกษาผลของการสะสมเอทานอลและซัลเฟอร์ไดออกไซด์ต่อการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* พบว่า เมื่อปริมาณของเอทานอลเพิ่มขึ้น 2-4 เปอร์เซ็นต์ ในกระบวนการผลิตไวน์สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. carbonarius* และการสะสมของโอคราทอกซินเอได้ (C. Jiang, Shi, Chen, & Liu, 2015)

*K. marxianus* สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้หลายชนิด เช่น 3-เมทิล-1-บิวทานอล, 2-เมทิล-1-บิวทานอล, ออกทานาล, เบนซาลดีไฮด์, นอนนาล, แอปทานาล และเตคานาล เป็นต้น จากงานวิจัยของ Leclercq-Perlat และคณะ (2004) พบว่า *K. marxianus* สามารถ

ผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิด เบนซาลดีไฮด์ได้มากที่สุด (Leclercq-Perlat, Corrieu, & Spinnler, 2004) อย่างไรก็ตาม จากรายงานของ Gethins และคณะ (2014) พบว่า *K. marxianus* สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิด เอทิลอะซิเตต ซึ่งผลิตได้มากที่สุด นอกจากนี้ ยังพบการผลิต ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ไอโซเอมิลอะซิเตต ฟีนิลเอทิลแอลกอฮอล์ ฟีนิลเอทิลอะซิเตต และ ฟีนิลเอทิลโพรพาเนต เป็นต้น (Gethins et al., 2015) นอกจากนี้ งานวิจัยของ Fasoli และคณะ (2015) ศึกษาการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของ *K. marxianus* 39 สายพันธุ์ ที่ใช้ผลิตเนยแข็งในประเทศอิตาลีพบว่า *K. marxianus* สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้หลายชนิด และมีความแตกต่างกันตามแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งทุกสายพันธุ์ของยีสต์สามารถสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิดเอทานอลได้มากที่สุด (Fasoli et al., 2015) อย่างไรก็ตาม ยังมีงานวิจัยที่พบว่า สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่สร้างจาก *K. marxianus* สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ เช่น งานวิจัยของ Plessas และคณะ (2008) ทดสอบความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายในกระบวนการผลิตขนมปังร่วมกับการใช้แบคทีเรีย ซึ่ง *K. marxianus* สามารถผลิตเอทิลอะซิเตตและสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายชนิดอื่น ๆ ได้แก่ สารจำพวกแอลกอฮอล์ เอสเทอร์ และกรดอินทรีย์บางชนิด ส่งผลให้ขนมปังมีอายุการเก็บรักษานานขึ้นและลดการปนเปื้อนของราที่ทำให้ขนมปังเน่าเสีย (Plessas et al., 2008)

#### 5.4.4 ทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย

##### 5.4.4.1 ผลของค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลการทดสอบปัจจัยที่อาจมีผลต่อการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักซ์ทั้งสามชนิดที่เลี้ยงร่วมกับ *A. flavus* M3T8R4G3 และ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อทดสอบปัจจัยของค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 3.5, 4, 4.5 และ 5 เนื่องจาก เป็นค่าความเป็นกรด-เบสของไซเลจ ซึ่งเป็นแหล่งที่คัดแยกยีสต์ปฏิปักซ์ทั้งสามชนิด (เจริญยงค์, 2556; มารุ่งเรือง, 2559) มีค่าความเป็นกรด-เบสอยู่ในช่วงที่เป็นกรดอ่อนเท่ากับ 3.6-4.5 (Kung & Ranjit, 2001) พบว่า ยีสต์แต่ละชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราแตกต่างกันออกไป

ลักษณะโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักซ์ทั้งสามชนิดมีลักษณะแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน ทุกค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ โคโลนีของราในทุก

ชุดทดสอบมีเส้นใยสีขาวและไม่สร้างสปอร์เช่นเดียวกัน เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราพบว่า *W. anomalus* MSCU 0652 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* M3T8R4G3 มากที่สุด ทุกค่าความเป็นกรด-เบสที่ทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ปฏิปักษ์อีกสองชนิด และที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5 มี เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราสูงที่สุด ( $81.27 \pm 1.23$  เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่ เมื่อพิจารณาจากลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ของราพบว่า ราที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด มีการลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ด้วยเปอร์เซ็นต์การลดลงที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ทุกค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ

โคโลนีของ *A. carbonarius* TK4.2 ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากราในชุดควบคุมอย่างชัดเจน โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 มีขนาดเล็กกว่าราที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์อีกสองชนิดอย่างชัดเจน ทุกค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราสูงที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5 ( $82.42 \pm 2.76$  เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ ยังมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของราสูงกว่ายีสต์ปฏิปักษ์ชนิดอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างค่าความเป็นกรด-เบสเดียวกัน เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การลดลงของการผลิตโอคราทอกซินเอพบว่าเป็น *A. carbonarius* TK4.2 ที่เลี้ยงร่วมกับยีสต์ทั้งสามชนิด มีการลดการผลิตโอคราทอกซินเอลดลงมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ทุกค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดสอบสรุปได้ว่ายีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 4.5-5 แต่สามารถลดการผลิตสารพิษจากราได้อย่างมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันทุกค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบ จากรายงานของ Grzegorzczuk และคณะ (2017) ทดสอบกลไกการควบคุมทางชีวภาพของยีสต์สองชนิด ได้แก่ *D. hansenii* KI2a และ *W. anomalus* BS91 ต่อการเจริญของ *M. fructicola* และ *M. fructigena* โดยทดสอบที่ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5 และ 6 ซึ่งพบว่าสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจาก *W. anomalus* BS91 ที่ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5 สามารถยับยั้งการเจริญของ *M. fructigena* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (Grzegorzczuk, Zarowska, Restuccia, & Cirvilleri, 2017) จากรายงานของ Parafati และคณะ (2015) ซึ่งทดสอบความสามารถของยีสต์ปฏิปักษ์ 4 ชนิด ได้แก่ *M. pulcherrima*, *A. pullulans*, *W. anomalus* และ *S. cerevisiae* โดยศึกษาผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจากยีสต์ทั้ง 4 ชนิด เพื่อยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea* พบว่า สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ทั้ง 4 ชนิด สามารถ

ยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด เมื่อทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-เบส 4.5 (Parafati et al., 2015)

นอกจากนี้ ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์ อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราได้ จากรายงานของ Oliveira และคณะ (2012) พบว่า ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *K. marxianus* คือ 7.3-7.4 (Oliveira et al., 2012) รายงานของ Cappelli และคณะ (2014) พบว่า *W. anomalous* สามารถเจริญได้ดีในช่วงของค่าความเป็นกรด-เบสกว้างเท่ากับ 2-12 (Cappelli et al., 2014) และจากรายงานของ Salari และ Salari ปี 2017 พบว่า *S. cerevisiae* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่มีค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5.5-6.5 (Salari & Salari, 2017)

#### 5.4.4.2 ผลของอุณหภูมิในการบ่ม

ปัจจัยที่อาจส่งผลต่อการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายอีกหนึ่งปัจจัยที่ทดสอบได้แก่ อุณหภูมิในการบ่มเชื้อ โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส จากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. carbonarius* เท่ากับ 20-33 องศาเซลเซียส (Passamani et al., 2014) และ *A. flavus* เท่ากับ 37 องศาเซลเซียส (Lahouar et al., 2016) ซึ่งพบว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดมีความสามารถในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจาก *A. flavus* M3T8R4G3 และ *A. carbonarius* TK4.2 แตกต่างกันออกไปในแต่ละอุณหภูมิที่ทดสอบ

โคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์แต่ละสายพันธุ์มีลักษณะโคโลนีแตกต่างจากชุดควบคุม โดยที่ไม่สร้างสปอร์และเส้นใยมีสีขาว โดย *W. anomalous* MSCU 0652 สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ปฏิปักษ์อีกสองชนิด ซึ่งเมื่อบ่มที่อุณหภูมิห้องสามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด ( $81.38 \pm 1.80$  เปอร์เซ็นต์) และลดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ได้สูงที่สุด เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ( $99.73 \pm 0.21$  เปอร์เซ็นต์) *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อบ่มร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดพบว่า มีขนาดโคโลนีเล็กกว่าราในชุดควบคุมอย่างชัดเจน เมื่อบ่มร่วมกับ *W. anomalous* MSCU 0652 ที่อุณหภูมิห้อง สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ปฏิปักษ์อีกสองชนิด ( $81.20 \pm 2.65$  เปอร์เซ็นต์) และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ราผลิตโอคราทอกซินแอลดลงมากที่สุด ( $99.92 \pm 0.01$  เปอร์เซ็นต์)

จากผลการทดสอบข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า *W. anomalus* MSCU 0652 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราได้ดี เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Huang และคณะ (2012) เมื่อศึกษาสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจาก *Sporidiobolus pararoseus* YCXT3 เพื่อยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea* ที่ก่อโรคเน่าของผลสตอเบอร์รี่ในขั้นตอนหลังการเก็บเกี่ยว โดย *S. pararoseus* เมื่อทดสอบที่อุณหภูมิแตกต่างกันได้แก่ 4, 10 และ 20 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิทั้งสามค่าที่ทดสอบ สามารถยับยั้งการเจริญและการงอกของสปอร์ราได้อย่างมีประสิทธิภาพ และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นผลมาจากยีสต์สามารถเจริญเติบโตและมีน้ำหนักแห้งมากที่สุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ส่งผลให้สามารถสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายได้มาก (Huang et al., 2012) และจากรายงานของ Arrate และคณะ (2017) ศึกษาสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตโดย *Candida sake* ต่อการยับยั้งการเกิดโรคในผลแอปเปิ้ลจากราก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ *P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternata*, *A. tenuissima* และ *A. arborescens* เมื่อบ่มร่วมกับ *Candida sake* สองสายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 0 และ 25 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาพบว่า สารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตจาก *C. sake* 41E สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cinerea* และ *A. alternata* ได้ดีที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส และยับยั้งการเจริญของ *P. expansum*, *A. alternata*, *A. tenuissima* และ *A. arborescens* ได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของ *C. sake* F36A สามารถยับยั้งการเจริญของราทุกชนิดได้ดีที่สุด เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Arrate et al., 2017)

นอกจากนี้ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ปฏิบัติแต่ละชนิด อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย *S. cerevisiae* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส (Salari & Salari, 2017) *W. anomalus* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 3-37 องศาเซลเซียส และเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Cappelli et al., 2014) และ *K. marxianus* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 17-25 องศาเซลเซียส (Lachance, 2011)

#### 5.4.4.3 ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD

ปัจจัยอีกหนึ่งประการที่อาจส่งผลต่อการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิบัติได้แก่ ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD โดยทดสอบที่ความเข้มข้นปกติ 0.5 เท่า และ

0.1 เท่า เมื่อเลี้ยงยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดร่วมกับ *A. flavus* M3T8R4G3 และ *A. carbonarius* TK4.2 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดให้ผลการทดสอบที่แตกต่างกันในแต่ละความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD

โคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด มีลักษณะแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างชัดเจน โดยเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 ที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD ปกติมีประสิทธิภาพในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด ( $82.86 \pm 1.14$  เปอร์เซ็นต์) และราผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ลดลงมากที่สุด เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD 0.5 เท่า ( $99.67 \pm 0.12$  เปอร์เซ็นต์) สำหรับโคโลนีของ *A. carbonarius* TK4.2 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป โดยเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 ที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD แบบปกติ สามารถยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด ( $83.88 \pm 0.32$  เปอร์เซ็นต์) และเช่นเดียวกับการผลิตไอคราทอกซินเอ เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 ที่ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงยีสต์ YPD แบบปกติ ราผลิตไอคราทอกซินเอลดลงมากที่สุด ( $99.97 \pm 0.01$  เปอร์เซ็นต์)

จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *W. anomalus* MSCU 0652 บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นปกติ ยีสต์สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญของราได้ดีที่สุด จากงานวิจัยของ Fialho และคณะ (2010) ทดสอบประสิทธิภาพของ *S. cerevisiae* CR-1 ในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญของ *Guignardia citricarpa* ซึ่งทดสอบโดยการเลี้ยงยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส มอลโทส และกาแลกโทส ผลการทดสอบสรุปว่า ยีสต์ปฏิปักษ์สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญของราได้ดี เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ กลูโคส ซูโครส และมอลโทส โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 85.9, 85.6 และ 81.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และยีสต์ไม่สามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์เมื่อเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกาแลกโทสเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังทดสอบเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ตั้งแต่ 0-4 เปอร์เซ็นต์ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของราพบว่า *S. cerevisiae* CR-1 จะสามารถผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเพื่อยับยั้งการเจริญของ *Guignardia citricarpa* ได้ ก็ต่อเมื่อ มีความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มากกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป (Fialho et al., 2010)



## 5.5 ทดสอบความสามารถของยีสต์ในการลดการปนเปื้อนสารพิษจากรา

### 5.5.1 ทดสอบความสามารถในการดูดซับหรือดูดซึมสารพิษจากราของยีสต์ปฏิบัติการ

ผลการทดสอบความสามารถในการดูดซับหรือดูดซึมสารพิษจากราโดยยีสต์ปฏิบัติการทั้งสามชนิด แบ่งออกเป็นเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต และเซลล์ยีสต์ที่ไม่มีชีวิต โดยวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากราที่สะสมในตะกอนเซลล์ยีสต์ และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ หลังบ่มร่วมกับสารพิษจากรา มาตรฐานเป็นเวลา 2 วัน

ตะกอนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตของยีสต์ปฏิบัติการทั้งสามชนิดมีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 สะสมในตะกอนเซลล์ยีสต์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยพบปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 สะสมในตะกอนเซลล์ยีสต์ของ *W. anomalous* MSCU 0652 มากที่สุด ( $2.53 \pm 2.92$  นาโนกรัมต่อกรัม) เมื่อพิจารณาที่น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตของยีสต์ปฏิบัติการทั้งสามชนิดมีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ใกล้เคียงกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับตะกอนของเซลล์ยีสต์ที่ไม่มีชีวิตพบว่า ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ที่สะสมในตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ไม่มีชีวิตของยีสต์ปฏิบัติการทั้งสามชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยตะกอนของ *K. marxianus* MSCU 0655 มีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 สะสมมากที่สุด ( $4.68 \pm 3.70$  นาโนกรัมต่อกรัม) ซึ่งใกล้เคียงกับตะกอนของเซลล์ยีสต์ที่ไม่มีชีวิตของ *S. cerevisiae* MSCU 0654 ( $4.38 \pm 4.56$  นาโนกรัมต่อกรัม) ในขณะที่ น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่มีชีวิตของยีสต์ทั้งสามชนิดมีปริมาณของอะฟลาทอกซินบี 1 ใกล้เคียงกัน และไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดสอบสรุปได้ว่า ตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ไม่มีชีวิตของ *K. marxianus* MSCU 0655 และ *S. cerevisiae* MSCU 0654 อาจมีความสามารถในการดูดซับอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ จากงานวิจัยที่ศึกษาลักษณะองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ พบว่า ยีสต์มีส่วนประกอบของผนังเซลล์คิดเป็นน้ำหนัก 30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์ทั้งหมด โดยผนังเซลล์ของยีสต์มีโครงสร้างเป็นผนังสองชั้น ซึ่งสร้างจากโปรตีนสองชนิดได้แก่  $\beta$ -1,3-กลูแคน และ  $\beta$ -1,6-กลูแคน เชื่อมกันด้วยพันธะโคเวเลนต์ และไกลโคโปรตีนอื่นๆ อีกกว่า 70 ชนิด นอกจากนี้ ยังมีองค์ประกอบส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ Mannan oligosaccharides (MOS) และพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ซึ่งเชื่อมตำแหน่งต่างๆ เสริมความแข็งแรงให้กับผนังเซลล์ ทำให้เกิดประจุลบที่พื้นผิวของยีสต์ได้ จากองค์ประกอบทั้งหมด จึง

ส่งเสริมให้ผนังเซลล์ของยีสต์สามารถดูดซับโมเลกุลได้หลากหลายชนิด (Perez & Ribas, 2004) จากงานวิจัยของ Devegowda และคณะ (1996) พบว่า โครงสร้างของผนังเซลล์ส่วนที่เป็นแมนแนน มีบทบาทสำคัญในการลดการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน โดยสามารถจับกับอะฟลาทอกซินที่ผนังเซลล์ได้ นอกจากนี้ ประสิทธิภาพในการดูดซับอะฟลาทอกซินของผนังเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการให้ความร้อน ยังคงมีประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษได้ดี (Devegowda, Aravind, & Morton, 1996) จากงานวิจัยของ Hamza และคณะ (2019) พบว่า เมื่อสกัดส่วนของผนังเซลล์ยีสต์ออกจากตัวเซลล์ของ *S. cerevisiae* โดยผ่านการให้ความร้อน องค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ ได้แก่ Glucan Mannan Lipid Particles (GMLPs) มีความสามารถในการดูดซับอะฟลาทอกซินปี 1 โดย ส่วนของแมนแนนไกลโคโปรตีน ได้แก่  $\beta$ -1,3-กลูแคน,  $\beta$ -1,6-กลูแคน และส่วนของไขมันนั้น มีหน้าที่สำคัญในการจับกับโมเลกุลของอะฟลาทอกซินปี 1 (Hamza et al., 2019)

ปริมาณโอคราทอกซินเอในตะกอนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตของยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด มีโอคราทอกซินเอสะสมอยู่เพียงเล็กน้อย ในขณะที่ปริมาณโอคราทอกซินเอในน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตของยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดมีปริมาณโอคราทอกซินเอใกล้เคียงกัน และแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตของ *K. marxianus* MSCU 0655 มีปริมาณโอคราทอกซินเอมากที่สุด ( $3.25 \pm 0.34$  นาโนกรัมต่อกรัม) เช่นเดียวกับตะกอนเซลล์ยีสต์ที่ไม่มีชีวิตของยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดมีโอคราทอกซินเอสะสมอยู่เพียงเล็กน้อย ในขณะที่ น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่มีชีวิตของยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด มีปริมาณโอคราทอกซินเออยู่ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ไม่มีชีวิตของ *K. marxianus* MSCU 0655 มีปริมาณโอคราทอกซินเอสะสมมากที่สุด ( $3.96 \pm 1.54$  นาโนกรัมต่อกรัม)

จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าเซลล์ของยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตไม่สามารถดูดซับโอคราทอกซินเอได้ ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Joannis-Cassan และคณะ (2011) พบว่า ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* ทั้ง 8 สายพันธุ์ ที่คัดแยกจากยีสต์ทำขนมทั่วไประหว่างปี มีประสิทธิภาพในการดูดซับโอคราทอกซินเอได้ในช่วง 14-72 เปอร์เซ็นต์ (Cassan, Tozlovanu, Medjdoub, Ballet, & Leszkowicz, 2011) และงานวิจัยของ Armado และคณะ (2012) พบว่า ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* RC016 สามารถจับกับโอคราทอกซินเอได้ 30.4-74.2 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม จากผลการทดสอบ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ringot และคณะ (2007) พบว่า เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการดูดซับโอคราทอกซินเอโดยใช้ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 4-

37 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการดูดซับต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Ringot et al., 2007) และงานวิจัยของ Angioni และคณะ (2007) พบว่า *S. cerevisiae* ทั้ง 12 สายพันธุ์ เมื่อบ่มร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมโอคราทอกซินแอลงไป หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการหมักแล้ว ไม่สามารถดูดซับโอคราทอกซินเอได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Angioni et al., 2007)

ทั้งนี้ ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษจากราของยีสต์ปฏิปักษ์ที่สำคัญ ได้แก่ ความหนาแน่นขององค์ประกอบภายในผนังเซลล์ รวมทั้งขนาดและความหนาของผนังเซลล์ยีสต์ จากงานวิจัยของ Armado และคณะ (2012) พบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีความหนาของผนังเซลล์มากกว่าส่งผลให้มีความสามารถในการดูดซับโอคราทอกซินเอและซีราลีโนนได้ดีกว่า นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังพบว่า ปัจจัยที่สำคัญอื่น ๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ โดยเมื่อบ่มยีสต์ร่วมกับโอคราทอกซินเอและซีราลีโนนที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 2 *S. cerevisiae* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ สามารถดูดซับสารพิษจากราทั้งสองชนิดได้ดีกว่าเมื่อบ่มที่ความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์เท่ากับ 7 นอกจากนี้ ปัจจัยที่ส่งเสริมประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษจากราอีกประการหนึ่ง ได้แก่ การให้ความร้อนแก่เซลล์ยีสต์ จากงานวิจัยของ Shetty และคณะ (2007) พบว่า การให้ความร้อนแก่เซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ส่งผลให้สามารถจับกับอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดียิ่งขึ้น และเมื่อทดสอบกับเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 120 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการจับกับอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดีที่สุด ทั้งนี้ คณะผู้วิจัยสรุปว่า การให้ความร้อนนั้นส่งเสริมให้ลักษณะทางกายภาพของผนังเซลล์ยีสต์มีการเปลี่ยนแปลงไปและเหมาะต่อการดูดซับสารพิษจากราได้ดีกว่าผนังเซลล์ของยีสต์ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน

#### 5.5.2 ทดสอบการย่อยสลายสารพิษจากราด้วยน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ปฏิปักษ์

การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารพิษจากรา โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อของยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายอะฟลาทอกซินบี 1 พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเซลล์ยีสต์ของยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดไม่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายอะฟลาทอกซินบี 1 ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตาม น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อของ *S. cerevisiae* MSCU 0654 มีปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 น้อยกว่าในชุดควบคุมเล็กน้อย ( $3.75 \pm 0.32$  นาโนกรัมต่อกรัม) แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เช่นเดียวกับประสิทธิภาพในการย่อยสลายโอคราทอกซินเอ โดยใช้น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อของยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดมีปริมาณโอคราทอกซินเอสะสมใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

จากผลการทดสอบสรุปได้ว่า น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์และน้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อของยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดไม่สามารถย่อยสลายสารพิษจากราได้ อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยของ Zuo และคณะ (2012) พบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อปราศจากเซลล์ยีสต์ของ *P. anomala* (*W. anomalus*) มีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายอะฟลาทอกซินบี 1 นั้น อาจขึ้นอยู่กับเมแทบอลิต์ของยีสต์ ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสม และการแข่งขันกันระหว่างจุลินทรีย์ (Zuo et al., 2012) Zhang และคณะ (2018) ศึกษากลไกการกำจัดโอคราทอกซินเอของ *Yarrowia lipolytica* Y-2 โดยพบว่า ยีสต์สามารถสร้างเอนไซม์ภายในเซลล์ ได้แก่ เอนไซม์คาร์บอกซิเพปติเดสซึ่งสามารถย่อยสลายโอคราทอกซินเอ ให้กลายเป็นโอคราทอกซินแอลฟาที่มีความเป็นพิษน้อยลงได้ โดยสามารถย่อยสลายโอคราทอกซินเอได้ 97.2 เปอร์เซนต์ ภายในเวลา 4 ชั่วโมง (X. Zhang et al., 2018)

จากผลการทดสอบทั้งหมดข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า ยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดได้แก่ *W. anomalus* MSCU 0652, *S. cerevisiae* MSCU 0654 และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีความสามารถในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในระดับ *in vitro* เพื่อยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราของ *A. flavus* M3T8R4G3 และ *A. carbonarius* TK4.2 โดยมีกลไกที่สำคัญ ได้แก่ การสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่าย จากการทดสอบพบว่า *W. anomalus* MSCU 0652 มีประสิทธิภาพในการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายเบื้องต้น เพื่อยับยั้งการเจริญของราทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด และ *K. marxianus* MSCU 0655 มีประสิทธิภาพในการลดการผลิตสารพิษจากราทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด ทั้งนี้ ปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายของยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิด ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ อุณหภูมิในการบ่ม และค่าความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ ส่งผลต่อประสิทธิภาพการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ทั้งสามชนิดแตกต่างกัน โดย *W. anomalus* MSCU 0652 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ปฏิปักษ์อีกสองชนิด ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงที่สุดเมื่อทดสอบที่ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์เท่ากับ 5 อุณหภูมิ

ในการบ่มเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส และค่าความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ YPD ปกติ ผลจากการทดลองข้างต้นนี้สามารถนำไปเป็นต้นแบบในการศึกษาการใช้ยีสต์ปฏิปักษ์เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรต่อไป และเป็นองค์ความรู้ในการพัฒนาประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์เพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น



**ข้อเสนอแนะ**

1. ศึกษากลไกการลดการผลิตสารพิษจากราของยีสต์ปฏิปักษ์ในระดับการส่งออกของยีน
2. ศึกษาการส่งออกของยีนที่มีผลต่อสารประกอบอินทรีย์ระเหยง่ายที่ผลิตโดยยีสต์ปฏิปักษ์
3. ศึกษาประสิทธิภาพของยีสต์ปฏิปักษ์ในการเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพในอาหารและผลผลิตทางการเกษตรที่เกี่ยวข้อง



## บรรณานุกรม

- (FAO), F. a. A. O. (2004). Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. *FAO Food and Nutrition Paper, 81*, 1-180.
- Abadias, M., Teixido, N., Usall, J., Vinas, I., & Magan, N. (2001). Improving water stress tolerance of the biocontrol yeast *Candida sake* grown in molasses-based media by physiological manipulation. *Can J Microbiol, 47*(2), 123-129. doi:10.1139/w00-138
- Abdulrazzaq, Y. M., Osman, N., Yousif, Z. M., & Al-Falahi, S. (2003). Aflatoxin M1 in breast-milk of UAE women. *Ann Trop Paediatr, 23*(3), 173-179. doi:10.1179/027249303322296484
- Afsah-Hejri, L. (2013). Saprophytic yeasts: effective biocontrol agent against *Aspergillus flavus*. *International Food Research Journal, 20*(6), 3403-3409.
- Aiko, V., & Mehta, A. (2015). Occurrence, detection and detoxification of mycotoxins. *J Biosci, 40*(5), 943-954. doi:10.1007/s12038-015-9569-6
- Aish, J. L., Rippon, E. H., Barlow, T., & Hattersley, S. J. (2004). Ochratoxin A. In *Mycotoxins in Food. Detection and Control*, 307-338.
- Al-Anati, L., & E., P. (2006). Immunotoxic activity of ochra- toxin A. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 29*(2), 79-90.
- Al-Jaal, B., Salama, S., Al-Qasbi, N., & Jaganjac, M. (2019). Mycotoxin contamination of food and feed in the Gulf Cooperation Council countries and its detection. *Toxicon, 171*, 43-50. doi:10.1016/j.toxicon.2019.10.003
- Aldred, D., Magan, N., & Olsen, M. (2004). The use of HACCP in the control of mycotoxins: the case of cereals. In: Magan N, Olsen M, eds. *Mycotoxins in Food: Detection and Control*, 139-173.
- Angioni, A., Caboni, P., Garau, A., Farris, A., Orro, D., Budroni, M., & Cabras, P. (2007). In vitro interaction between ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *Journal of Agricultural Food Chemistry, 55*(6), 2043-2048.
- Anwar, M. I., Muhammad, F., Awais, M. M., & Akhtar, M. (2017). A review of  $\beta$ -glucans as

a growth promoter and antibiotic alternative against enteric pathogens in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 73(651-661).

Armando, M. R., Dogi, C. A., Poloni, V., Rosa, C. A., Dalcerro, A. M., & Cavaglieri, L. R. (2013). In vitro study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. *Int J Food Microbiol*, 161(3), 182-188.

doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.016

Armando, M. R., Dogi, C. A., Rosa, C. A. R., Dalcerro, A. M., & Cavaglieri, L. R. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* strains and the reduction of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production at different interacting environmental condition, in vitro. *Food Additives and Contaminants*, 29, 1443-1449.

Arrate, E., Garmendia, G., Rossini, C., Wisniewski, M., & Vero, S. (2017). Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biological Control*, 109, 14-20.

Asao, T., Buchi, G., Kader, M. A., Chang, S. B., Wick, E., & Wogan, G. N. (1963). Aflatoxins B and G. *Journal of the American Chemical Society*, 85, 1706.

Ayalew, A., Fehrmann, H., Lepschy, J., Beck, R., & Abate, D. (2006). Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia. *Mycopathologia*, 162(1), 57-63.

doi:10.1007/s11046-006-0027-8

Aydin, A., Gunsen, U., & Demirel, S. (2008). Total aflatoxin, aflatoxin B1 and ochratoxin A levels in Turkish Wheat flour.

. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(48-53).

Bahrami, R., Shahbazi, Y., & Nikousefat, Z. (2016). Aflatoxin M1 in milk and traditional dairy products from west part of Iran: occurrence and seasonal variation with an emphasis on risk assessment of human exposure

*Food Control* 62, 250-256.

Baird, R. E., Trigiano, R. N., Windham, G., Williams, P., Kelley, R., Abbas, H. K., . . . Scuggs, M. L. (2006). Comparison of aflatoxigenic and nonaflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* using DNA amplification fingerprinting techniques.

*Mycopathologia*, 161, 93-99.



- Banani, H., Spadaro, D., Zhang, D., Matic, S., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2014). Biocontrol activity of an alkaline serine protease from *Aureobasidium pullulans* expressed in *Pichia pastoris* against four postharvest pathogens on apple. *Int J Food Microbiol*, 182-183, 1-8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.05.001
- Barkai-Golan, R. (2001). Postharvest diseases of fruits and vegetables. *Development and control*, 418.
- Bayman, P., & Cotty, P. J. (1993). Genetic Diversity in *Aspergillus flavus* – Association with aflatoxin production and morphology. *Canadian Journal of Botany*, 71, 23-31.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., & Lebrihi, A. (2004). Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J Appl Microbiol*, 97(5), 1038-1044. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02385.x
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*, 16(3), 497-516. doi:10.1128/cmr.16.3.497-516.2003
- Beretta, B., Gaiaschi, A., Galli, C. L., & Restani, P. (2000). Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. *Food Addit Contam*, 17(5), 399-406. doi:10.1080/026520300404815
- Betina, V. (1989). Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects. *Bioactive Molecules*, 114-150.
- Boorman, G. A., Hong, H. L., Dieter, M. P., Hayes, H. T., Pohland, A. E., Stack, M., & Luster, M. I. (1984). Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A. *Toxicol Appl Pharmacol*, 72(2), 304-312. doi:10.1016/0041-008x(84)90315-6
- Broggi, L. E., Resnik, S. L., Pacin, A. M., Gonzalez, H. H. L., Cano, G., & Taglieri, D. (2002). Distribution of fumonisins in dry-milled corn fractions in Argentina. *Food Additives & Contaminants*, 19, 465-469.
- Brown, G. E., Davis, C., & Chambers, M. (2000). Control of citrus green mold with Aspire is impacted by the type of injury. *Postharvest Biology and Technology*, 18, 57-65.
- Bullerman, L. B., & Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *Int J Food Microbiol*, 119(1-2), 140-146. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035

Burpee, L. (2006). Integrated disease management, an introduction to Fungicides.

*Courses support.*

Calvente, V., de Orellano, M. E., Sansone, G., Benuzzi, D., & Sanz de Tosetti, M. I. (2011).

Effect of nitrogen source and pH on siderophore production by *Rhodotorula* strains and their application to biocontrol of phytopathogenic moulds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26, 226-229.

Campbell, D. I., Elia, M., & Lunn, P. G. (2003). Growth faltering in rural Gambian infants is associated with impaired small intestinal barrier function, leading to endotoxemia and systemic inflammation. *The Journal of Nutrition*, 133, 1332-1338.

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. *J Sep Sci*, 36(7), 1291-1297. doi:10.1002/jssc.201201055

Cappelli, A., Ulissi, U., Valzano, M., Damiani, C., Epis, S., Gabrielli, M. G., . . . Ricci, I. (2014). A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Plos One*, 9(5), e95988. doi:10.1371/journal.pone.0095988

Cassan, C. J., Tozlovanu, M., Medjdoub, K. H., Ballet, N., & Leszkowicz, A. P. (2011). Bindind of zearalenone, aflatoxin B1 and ochratoxin A by yeast-based products: a method for quantification of adsorption performance. . *Journal of Food Production*, 74(7), 1175-1185.

CAST. (2003). Mycotoxins: Risks in plate, animal and human system. *Council for Agricultural Science and Technology*, (Ames, Iowa, USA). .

Castella, G., Larsen, T. O., Cabanes, J., Schmidt, H., Alboresi, A., Niessen, L., . . . Geisen, R. (2002). Molecular characterization of ochratoxin A producing strains of the genus *Penicillium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 74-83.

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.

Castoria, R., Wright, S., & Droby, S. (2008). Biological control of mycotoxigenic fungi in fruits. . *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, 311-333.

- Chala, A., Mohammed, A., Ayalew, A., & Skinnnes, H. (2013). Natural occurrence of aflatoxins in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) from eastern Ethiopia. . *Food Control* 30, 602-605.
- Chinnaphuti, A., & Aukkasarakul, S. (2009). Contamination of aflatoxin B1 and ochratoxin A in brown rice and white rice. *Thai Rice Research Journal*, 3, 57-65.
- 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.
- Chulze, S. N., Magnoli, C. E., & Dalcerro, A. M. (2006). Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. *Int J Food Microbiol*, 111 Suppl 1, S5-9. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.02.006
- Coppock, R. W., & Jacobsen, B. J. (2009). Mycotoxins in animal and human patients. *Toxicology and Industrial Health*, 25(9-10), 637-655.
- Cubaiu, L., Abbas, H., Dobson, A. D. W., Budroni, M., & Migheli, Q. (2012). A *Saccharomyces cerevisiae* wine strain inhibits growth and decrease ochratoxin A biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. *Toxins*, 4(12), 1468-1481.
- da Sliva, S. J. N., Schuch, P. Z., Bernardii, C. R., Vainstein, M. H., Jablonski, A., & Bender, R. J. (2007). Patulin in food: state-of-the-art and analytical trends. *Rivista Brasileira de Fruticultura*, 29(2), 406-413.
- Dachoupakan, C., Ratomahenina, R., V., M., 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.
- Dalié, D., Deschamps, A., & Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria – potential control of mould growth and mycotoxins: a review. . *Food Control*, 21, 370-380.
- Dashti, B. (2005). Screening of mycotoxin contamination in food in Kuwait. Abstracts & Program. The Second Asian Conference on Plant Pathology 2005, 25–28 June. Singapore: National University of Singapore, 113.
- de Felice, D. V., Solfrizzo, M., de Curtis, F., Lima, G., Visconti, A., & Castoria, R. (2008). Strains of *Aurobasidium pullulans* can lower ochratoxin A contamination in wine

- grapes. *Phytopathology*, 98(12), 1261-1270.
- de Souza, J. R. B., Kupper, K. C., & Augusto, F. (2018). In vivo investigation of the volatile metabolome of antiphytopathogenic yeast strains active against *Penicillium digitatum* using comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate data analysis. *Microchemical Journal*, 141, 204-209.
- de Vries, H. R., Maxwell, S. M., & Hendrickse, R. G. (1990). Aflatoxin excretion in children with kwashiorkor or marasmic kwashiorkor--a clinical investigation. *Mycopathologia*, 110(1), 1-9. doi:10.1007/BF00442763
- Devegowda, G., Aravind, B. I. R., & Morton, M. G. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* and mannanoligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broiler. *Proceedings of Australian Poultry Science Symposium*, 8, 103-106.
- Devi, K. T., Mayo, M. A., Reddy, G., Emmanuel, K. E., Larondelle, Y., & Reddy, D. V. R. (2001). Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. *Food Additives and Contaminants*, 18(9), 830-835.
- Dhanasekaran, D., Shanmugapriya, S., Thajuddin, N., & Panneerselvam, A. (2011). Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals. *Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology*, 221-254.
- 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.
- Domijan, A. M., Peraica, M., Cvjetkovic, B., Turcin, S., Jurjevic, Z., & Ivic, D. (2005). Mould contamination and co-occurrence of mycotoxins in maize grain in Croatia. *Acta Pharm*, 55(4), 349-356. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16375824>
- Dongo, L., Bandyopadhyay, R., Kumar, M., & Ojiambo, P. S. (2008). Occurrence of ochratoxin A in Nigerian ready for sale cocoa beans. *Agricultural Journal*, 3, 4-9.
- Droby, S., & Chalutz, E. (1994). Mode of action of biocontrol agents of postharvest disease. *Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables-Theory and Practice*, 63-75.
- Droby, S., Chalutz, E., & Wilson, C. L. (1991). Antagonistic microorganisms as biocontrol agents of postharvest diseases of fruit and vegetables. *Postharvest News*

*Information*, 2, 169-173.

Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L., & Wisniewski, M. E. (1989). Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journal of Microbiology*, 35, 794-800.

Duarte, S. C., Lino, C. M., & Pena, A. (2012). Food safety implications of ochratoxin A in animal-derived food products. *Vet J*, 192(3), 286-292.

doi:10.1016/j.tvjl.2011.11.002

Duarte, S. C., Pena, A., & Lino, C. M. (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiol*, 27(2), 187-198. doi:10.1016/j.fm.2009.11.016

EFSA. (2006). European Food Safety Authority, Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to Ochratoxin A in food. *EFSA Journal*, 365, 1-56.

EFSA. (2015). European Food Safety Authority, Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance *Saccharomyces cerevisiae* strain LAS02. *EFSA Journal*, 13, 4322.

El-Ghaouth, A., Wilson, C. L., & Wisniewski, M. E. (1998). Ultrastructural and cytochemical aspects of biocontrol activity of *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology*, 88, 282-291.

El-Tarabily, K. A., & Sivasithamparam, K. (2006). Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-born fungal plant pathogens and as plant growth promoter. *Mycoscience*, 47(1), 25-35.

EU. (2006a). European Commission (EC) Commission Recommendation No 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of the European Union*, 229, 7-9.

EU. (2006b). European Commission (EC) Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 364(5-23).

EU. (2016). European Commission (EC) Commission Regulation (EC) No. 2016/1319 of 29 July 2016 as regards deoxynivalenol, zearalenone and ochratoxin A in pet food.

*Official Journal of the European Union*, 208, 58-60.

- Farbo, M. G., Urgeghe, P. P., Fiori, S., Marcello, A., Oggiano, S., Balmas, V., . . . Migheli, Q. (2018). Effect of yeast volatile organic Ccompounds on ochratoxin A-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology*, 28, 1-10.
- Fasoli, G., Tofalo, R., Lanciotti, R., Schirone, M., Patrignani, F., Perpetuini, G., . . . Suzzi, G. (2015). Chromosome arrangement, differentiation of growth kinetics and volatile molecule profiles in *Kluyveromyces marxianus* strains from Italian cheeses. *Int J Food Microbiol*, 214, 151-158. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.001
- Ferrante, M., Sciacca, S., & Gea, O. C. (2012). Carcinogen role of food by mycotoxins and knowledge. *Carcinogen*. doi:10.5772/46123
- 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.
- Fonseca, G. G., Heinzle, E., Wittmann, C., & Gombert, A. K. (2008). The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79(3), 339-354. doi:10.1007/s00253-008-1458-6
- Fredlund, E., Druvefors, U., Boysen, M. E., Lingsten, K. J., & Schnurer, J. (2002). Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *FEMS Yeast Res*, 2(3), 395-402. doi:10.1016/S1567-1356(02)00098-3
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World J Microbiol Biotechnol*, 35(10), 154. doi:10.1007/s11274-019-2728-4
- 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.

- Gao, X., Mu, P., Wen, J., Sun, Y., Chen, Q., & Deng, Y. (2018). Detoxification of trichothecene mycotoxins by a novel bacterium, *Eggerthella* sp. DII-9. *Food Chem Toxicol*, 112, 310-319. doi:10.1016/j.fct.2017.12.066
- Geng, P., Chen, S., Hu, M., Rizwan-Ul-Haq, M., Lai, K., Qu, F., & Zhang, Y. (2011). Combination of *Kluyveromyces marxianus* and sodium bicarbonate for controlling green mold of citrus fruit. *Int J Food Microbiol*, 151(2), 190-194. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.023
- Geng, P., Zhang, Y. B., Hu, M. Y., Chen, S., & Qu, F. (2011). Screening, identification of antagonistic yeast and its biocontrol efficacy against green mold caused by *Penicillium digitatum* of citrus fruit. *Journal of Northwest Agriculture and Forestry University*, 39(2), 191-196.
- Gethins, L., Guneser, O., Demirkol, A., Rea, M. C., Stanton, C., Ross, R. P., . . . Morrissey, J. P. (2015). Influence of carbon and nitrogen source on production of volatile fragrance and flavour metabolites by the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, 32(1), 67-76. doi:10.1002/yea.3047
- Gil-Serna, J., Patiñoa, B., Cortés, L., M.T., G.-J., & C., V. (2011). Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 113-118.
- Goncalves, B. L., Rosim, R. E., de Oliveira, C. A. F., & Corassin, C. H. (2015). The in vitro ability of different *Saccharomyces cerevisiae* – Based products to bind aflatoxin B1. *Food Control*, 47, 298-300.
- Gong, Y. Y., Watson, S., & Routledge, M. N. (2016). Aflatoxin Exposure and Associated Human Health Effects, a Review of Epidemiological Studies. *Food Saf (Tokyo)*, 4(1), 14-27. doi:10.14252/foodsafetyfscj.2015026
- Grzegorzczak, M., Zarowska, B., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2017). Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiol*, 61, 93-101. doi:10.1016/j.fm.2016.09.005
- Gupta, R. C., Srivastava, A., & Lall, R. (2018). Ochratoxins and Citrinin. *Veterinary Toxicology*, 1019-1027.

- Gürses, M. (2006). Mycoflora and aflatoxin content of hazelnuts, walnuts, peanuts, almonds and roasted chickpeas (LEBLEBI) sold in Turkey. *International Journal of Food Properties*, 9, 395-399.
- Hamza, Z., El-Hashash, M., Aly, S., Hathout, A., Soto, E., Sabry, B., & Ostroff, G. (2019). Preparation and characterization of yeast cell wall beta-glucan encapsulated humic acid nanoparticles as an enhanced aflatoxin B1 binder. *Carbohydr Polym*, 203, 185-192. doi:10.1016/j.carbpol.2018.08.047
- Haque, M. A., Wang, Y., Shen, Z., Li, X., Saleemi, M. K., & He, C. (2020). Mycotoxin contamination and control strategy in human, domestic animal and poultry: A review. *Microb Pathog*, 142, 104095. doi:10.1016/j.micpath.2020.104095
- Haschek, W. M., & Voss, K. A. (2013). Mycotoxins. In W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, M. A. Walling, B. Bolon, & R. Ochoa (Eds.). *Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology*, 30, 1187-1258.
- Hathout, A. S., & Aly, S. (2014). Biological detoxification of mycotoxins: a review. *Annals of Microbiology*, 64(3), 905-919.
- He, J., Zhou, T., Young, J. C., Boland, G. J., & Scott, P. M. (2010). Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 67-76.
- Hernández-Montiel, L. G., Ochoa, J. L., Troyo-Diéguez, E., & Larralde-Corona, C. P. (2010). Biocontrol of postharvest blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus *Debaryomyces hansenii* isolates. *Postharvest Biology and Technology*, 56, 181-187.
- Hope, J. H., & Hope, B. E. (2012). A review of the diagnosis and treatment of Ochratoxin A inhalational exposure associated with human illness and kidney disease including focal segmental glomerulosclerosis. *J Environ Public Health*, 2012, 835059. doi:10.1155/2012/835059
- Hua, S. S. T., Beck, J. J., Sarreal, S. B. L., & Gee, W. (2014). The major volatile compound 2 – phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anamala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Research*, 30, 71-78.



- Hua, S. S. T., Sarreal, S. B., Chang, P. K., & Yu, J. (2019). Transcriptional regulation of aflatoxin biosynthesis and condition in *Aspergillus flavus* by *Wickerhamomyces anomalus* WRL-076 for reduction of aflatoxin contamination. *Toxins*, *11*(2), 81.
- Huang, R., Che, H. J., Zhang, J., Yang, L., Jiang, D. H., & Li, G. Q. (2012). Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruit. *Biological Control*, *62*, 53-63.
- 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*(7), 859-869. doi:10.1094/PHYTO-09-10-0255
- IARC. (1993). Some naturally occurring substances: Food item and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins. *International Agency for Research on Cancer*, *56*(1), 489.
- Ippolito, A., El-Ghaouth, A., Wilson, C. L., & Wisniewski, M. (2000). Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biology and Technology*, *19*(3), 265-272.
- Iqbal, S. Z., Jinap, S., Pirouz, A. A., & Faizal, A. R. A. (2015). Aflatoxin M1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *46*, 110-119.
- Ismail, A., Goncalves, B. L., de Neeff, D. V., Ponzilacqua, B., Coppa, C. F. S. C., Hintzsche, H., . . . Oliveira, C. A. F. (2018). Aflatoxin in foodstuff: occurrence and recent advances in decontamination. *Food Research International*, *113*, 74-85.
- Jaibangyang, S., Nasanit, R., & Limtong, S. (2020). Biological control of aflatoxin-producing *Aspergillus flavus* by volatile organic compound-producing antagonistic yeasts. *BioControl*. doi:<https://doi.org/10.1007/s10526-020-09996-9> (01234567)
- Janisiewicz, W. J., & Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu Rev Phytopathol*, *40*, 411-441. doi:10.1146/annurev.phyto.40.120401.130158
- Janisiewicz, W. J., Tworowski, T. J., & Sharer, C. (2000). Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to

- study competition for nutrients. *Phytopathology*, *90*(11), 1196-1200.  
doi:10.1094/PHTO.2000.90.11.1196
- Jiang, C., Shi, J., Chen, X., & Liu, Y. (2015). Effect of sulfur dioxide and ethanol concentration on fungal profile and ochratoxin a production by *Aspergillus carbonarius* during wine making. *Food Control*, *47*, 656-663.
- Jiang, Y., Jolly, P. E., Ellis, W. O., Wang, J. S., Phillips, T. D., & Williams, J. H. (2005). Aflatoxin B1 albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians. *Int Immunol*, *17*(6), 807-814. doi:10.1093/intimm/dxh262
- Jijakli, M. H., & Lepoivre, P. (1998). Characterization of an exo-b-1,3-Glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology*, *88*(4), 335-343.
- Jung, K. Y., & Endou, H. (1989). Nephrotoxicity assessment by measuring cellular ATP content. II. Intranephron site of ochratoxin A nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, *100*(3), 383-390. doi:10.1016/0041-008x(89)90286-x
- Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Viskelis, P., Urbonaviciene, D., Eidukonyte, D., & Bobinas, C. (2012). Fermentation processes using lactic acid bacteria producing bacteriocins for preservation and improving functional properties of food products. *Advances in Applied Biotechnology*, 63-100.
- Kai, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., & Piechulla, B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *81*(6), 1001-1012.
- Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., . . . Dussort, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Res*, *32*(4), 179-205. doi:10.1007/s12550-016-0257-7
- Klich, M. A. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Mol Plant Pathol*, *8*(6), 713-722. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00436.x
- Korpi, A., Jarnberg, J., & Pasanen, A. L. (2009). Microbial volatile organic compounds. *Crit Rev Toxicol*, *39*(2), 139-193. doi:10.1080/10408440802291497
- Köszegi, T., & Poór, M. (2016). Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins*, *8*, 111-136.

- Kumagai, S., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., . . . Sugita-Konishi, Y. (2008). Aflatoxin and ochratoxin A contamination of retail foods and intake of these mycotoxins in Japan. *Food Additives and Contaminants*, *9*, 1101-1106.
- Kung, L., Jr., & Ranjit, N. K. (2001). The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. *J Dairy Sci*, *84*(5), 1149-1155. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74575-4
- Kurtzman, C. P. (2008). *Wickerhamomyces* Kurtzman, Robnett & Basehoar-Powers (2008). *The Yeasts*, 899-918.
- Laca, A., Mousia, Z., Diaz, M., Webb, C., & Pamdiella, S. S. (2006). Distribution of microbial contamination within cereal grains. *Journal of Food Engineering*, *72*, 332-338.
- Lachance, M. A. (1998). *Kluyveromyces van der Walt* emend. van der Walt. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds). *The Yeasts*, 227-247.
- Lachance, M. A. (2011). *Kluyveromyces van der Walt* (1971). *The Yeasts*, 471-481.
- Lahouar, A., Marin, S., Crespo-Sempere, A., Said, S., & Sanchis, V. (2016). Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. *Rev Argent Microbiol*, *48*(1), 78-85. doi:10.1016/j.ram.2015.10.001
- Lamplugh, S. M., & Hendrickse, R. G. (1982). Aflatoxins in the livers of children with kwashiorkor. *Annals of Tropical Paediatrics*, *2*, 101-104.
- Leclercq-Perlat, M. N., Corrieu, G., & Spinnler, H. E. (2004). Comparison of volatile compounds produced in model cheese medium deacidified by *Debaryomyces hansenii* or *Kluyveromyces marxianus*. *J Dairy Sci*, *87*(5), 1545-1550. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73306-8
- Lemcomte, C., Albouvette, C., Edel-Hermann, V., Robert, F., & Steinberg, C. (2016). Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: a review. *Biological Control*, *101*, 17-30.
- Lešnik, M., Cencič, A., Vajs, S., & Simončič, A. (2008). Milling and bread baking techniques significantly affect the mycotoxin (deoxynivalenol and nivalenol) level in bread. *Acta Alimentaria*, *37*, 471-483.

- 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.
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *Int J Food Microbiol*, *167*(2), 153-160. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004
- 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 Microbiol Ecol*, *80*(3), 578-590. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01324.x
- Liu, P., Cheng, Y., Yang, M., Liu, Y., Chen, K., Long, C., & Deng, X. (2014). Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits. *BMC Microbiology*, *14*, 242-256.
- Liu, Y., & Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environ Health Perspect*, *118*(6), 818-824. doi:10.1289/ehp.0901388
- Liu, Z., Gao, J., & Yu, J. (2006). Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. *Journal of Stored Products Research*, *42*, 268-479.
- Luo, Y., Liu, X., & Li, J. (2018). Updating techniques on controlling mycotoxins – a review. *Food Control*, *89*, 123-132.
- Lurie, S. (1998). Postharvest heat treatments of horticultural crops. *Horticultural Reviews*, *22*, 91-121.
- Maga, N., Sanchis, V., & Aldred, D. (2004). Role of spoilage fungi in seed deterioration. *Fungal biotechnology in agricultural, food and environmental applications*, 311-323.
- Mahdvi, R., Nikniaz, L., Arefhosseini, S. R., & Jabbari, M. V. (2010). Determination of aflatoxin M1 in breast milk samples in Tabriz-Iran. *Matern Child Health Journal*, *14*, 141-145.
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., & Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 Years of Research. *Toxins (Basel)*, *8*(7), 191-240. doi:10.3390/toxins8070191
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., & Novatna, E. (2014). Ochratoxin A:

- developmental and reproductive toxicity-an overview. *Birth Defects Research*, 98, 493-502.
- Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2011). Plant products in the control of mycotoxins and mycotoxigenic fungi on food commodities. *Natural Products in Plant Pest Management*, 21-37.
- Masih, E. I., & Paul, B. (2002). Secretion of b-1,3-glucanase by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. *Current Microbiology*, 44, 391-395.
- Masih, E. I., Slezack-Deschaumes, S., Marmaras, I., Ait Barka, E., Vernet, G., Charpentier, C., . . . 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.
- Masoud, W., Poll, L., & Jakobsen, M. (2005). Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Yeast*, 22(14), 1133-1142. doi:10.1002/yea.1304
- Mata, A. T., Ferreira, J. P., Oliveira, B. R., Batoreu, M. C., Barreto Crespo, M. T., Pereira, V. J., & Bronze, M. R. (2015). Bottled water: analysis of mycotoxins by LC-MS/MS. *Food Chem*, 176(176), 455-464. doi:10.1016/j.foodchem.2014.12.088
- Mega, N., & Aldred, A. (2005). Conditions of formation of ochratoxin A in drying, transport and in different commodities. *Food Additives and Contaminants*, 22, 10-16.
- Milhome, M. A. L., Lima, C. G., De Lima, L. K., Lima, F. A. F., Sousa, D. O. B., & Nascimento, R. F. (2014). Occurrence of aflatoxins in cashew nuts produced in northeastern Brazil. *Food Control*, 42, 34-37.
- Mishra, S. (2020). Global occurrence of deoxynivalenol in food commodities and exposure risk assessment in humans in the last decade: a survey. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 60(8), 1346-1374. doi:10.1080/10408398.2019.1571479
- Mohapatra, D., Kumar, S., Kotwaliwale, N., & Singh, K. K. (2017). Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-chemical approaches for their control. *Industrial Crops and Products*, 108, 162-182.

- Mokiou, S., & Magan, N. (2008). Physiological manipulation and formulation of the biocontrol yeast *Pichia anomala* for control of *Penicillium verrucosum* and ochratoxin A contamination of moist grain. *Biocontrol Science and Technology*, *18*, 1063-1073.
- Montagnoli, C., Fallarino, F., Gaziano, R., Bozza, S., Bellocchio, S., Zelante, T., . . . Romani, L. (2006). Immunity and tolerance to *Aspergillus* involve functionally distinct regulatory T cells and tryptophan catabolism. *J Immunol*, *176*(3), 1712-1723. doi:10.4049/jimmunol.176.3.1712
- Mudili, V., Siddaih, C. N., Nagesh, M., Garapati, P., Naveen Kumar, K., Murali, H. S., . . . Batra, H. V. (2014). Mould incidence and mycotoxin contamination in freshly harvested maize kernels originated from India. *J Sci Food Agric*, *94*(13), 2674-2683. doi:10.1002/jsfa.6608
- Murphy, P. A., Hendrich, S., Landgren, C., & Bryant, C. M. (2006). Food mycotoxins: An update. *Journal of Food Science*, *71*, 51-56.
- Nally, M. C., Pesce, V. M., Maturano, Y. P., Rodriguez Assaf, L. A., Toro, M. E., Castellanos de Figueroa, L. I., & Vazquez, F. (2015). Antifungal modes of action of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. *Int J Food Microbiol*, *204*, 91-100. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.024
- Niessen, L. (2018). The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the rapid diagnosis of food-borne mycotoxigenic fungi. *Current Opinion in Food Science*, *23*(11-22).
- Niknejad, F., Zaini, F., Faramarzi, M. A., Amini, M., Kordbacheh, P., Mahmoudi, M., & Safara, M. (2012). *Candida parasilosis* as a potent biocontrol agent against growth and aflatoxin production by *Aspergillus* species. *Iranian Journal Public Health*, *41*(10), 72-80.
- 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. *Int J Food Microbiol*, *128*(2), 197-202. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.005
- O'Brien, E., & Dietrich, D. R. (2005). Ochratoxin A: the continuing enigma. *Crit Rev*

*Toxicol*, 35(1), 33-60. doi:10.1080/10408440590905948

- O'Callaghan, J., Stapleton, P. C., & Dobson, A. D. (2006). Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genet Biol*, 43(4), 213-221. doi:10.1016/j.fgb.2005.11.005
- Oliverira, R. G., Valasques Juninor, G. L., Uetanabaro, A. P. T., Koblitz, M. G. B., Góes-neto, A., Rosa, C. A., & de Assis, S. A. (2012). Influence of carbon source, pH, and temperature on the polygalacturonase activity of *Kluyveromyces marxianus* CCMB 322. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32(3), 499-504.
- Olstorpr, M., & Passoth, V. (2010). *Pichia anomala* in grain preservation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(1), 57-62.
- Oro, L., Feliziani, E., Ciani, M., Romanazzi, G., & Comitini, F. (2018). Volatile organic compounds from *Wickerhamomyces anomalus*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* inhibit growth of decay causing fungi and control postharvest diseases of strawberries. *Int J Food Microbiol*, 265, 18-22. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.027
- 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 (Basel)*, 7(9), 3608-3635. doi:10.3390/toxins7093608
- Ostry, V., Malir, F., Toman, J., & Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens-the IARC monographs classification. *Mycotoxin Research*, 33(1), 65-73.
- Pantelides, I. S., Christou, O., Tsolakidou, M. D., Tsaltas, D., & Ioannou, N. (2015). Isolation identification and in vitro screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes. *Biological Control* 88, 46-53.
- 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 Microbiol*, 47, 85-92. doi:10.1016/j.fm.2014.11.013
- Park, J. W., Chung, S. H., & Kim, Y. B. (2005). Ochratoxin A in Korean food commodities: occurrence and safety evaluation. *J Agric Food Chem*, 53(11), 4637-4642. doi:10.1021/jf050227j

- Passamani, F. R., Hernandez, T., Lopes, N. A., Bastos, S. C., Santiago, W. D., Cardoso, M., & Batista, L. R. (2014). Effect of temperature, water activity, and pH on growth and production of ochratoxin A by *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* from Brazilian grapes. *J Food Prot*, 77(11), 1947-1952. doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-495
- Pavlovic, N. M. (2013). Balkan endemic nephropathy-current status and future perspectives. *Clin Kidney J*, 6(3), 257-265. doi:10.1093/ckj/sft049
- Payne, G. A., & Brown, M. P. (1998). Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. *Annu Rev Phytopathol*, 36, 329-362. doi:10.1146/annurev.phyto.36.1.329
- Penna, M. L., & Etcheverry, M. (2006). Impact on growth and aflatoxin B1 accumulation by *Kluyveromyces* isolates at different water activity conditions. *Mycopathologia*, 162(5), 347-353.
- Peraica, M., & Domijan, A. M. (2001). Contamination of food with mycotoxins and human health. *Arh Hig Rada Toksikol*, 52(1), 23-35. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11370295>
- Perez, P., & Ribas, J. C. (2004). Cell wall analysis. *Methods*, 33(3), 245-251. doi:10.1016/j.ymeth.2003.11.020
- Pertersson, S., Hansen, M. W., Axberg, W., Hult, K., & SchunÜRer, J. (1998). Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycological Research*, 102(8), 1003-1008.
- Peteri, Z., Teren, J., Vagvolgyi, C., & Varga, J. (2007). Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiol*, 24(3), 205-210. doi:10.1016/j.fm.2006.06.003
- Pfohl-Leszkowicz, A., & Manderville, R. A. (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol Nutr Food Res*, 51(1), 61-99. doi:10.1002/mnfr.200600137
- Piotrowska, M., & Masek, A. (2015). *Saccharomyces cerevisiae* cell wall components as tools for ochratoxin a decontamination. *Toxins*, 7(4), 1151-1162.
- Plessas, S., Bekatorou, A., Gallanagh, J., Nigam, P., Koutinas, A. A., & Psarianos, C. (2008). Evolution of aroma volatiles during storage of sourdough breads made by mixed



- cultures of *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* or *Lactobacillus helveticus*. *Food Chemistry*, 107(2), 883-889.
- Probst, C., Njapau, H., & Cotty, P. J. (2007). Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. *Appl Environ Microbiol*, 73(8), 2762-2764. doi:10.1128/AEM.02370-06
- Puncha, N., Suprasert, D., & Chulamorakot, T. (2000). Remark on mycotoxin contamination in job's tears available in Thailand. *Journal of Agriculture*, 16, 25-30.
- Qian, G., Tang, L., Guo, X., Wang, F., Massey, M. E., Su, J., . . . Wang, J. S. (2014). Aflatoxin B1 modulates the expression of phenotypic markers and cytokines by splenic lymphocytes of male F344 rats. *J Appl Toxicol*, 34(3), 241-249. doi:10.1002/jat.2866
- 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(7), 1168-1174.
- Ren, Y., Jin, J., Zheng, M., Yang, Q., & Xing, F. (2019). Ethanol Inhibits Aflatoxin B1 Biosynthesis in *Aspergillus flavus* by Up-Regulating Oxidative Stress-Related Genes. *Front Microbiol*, 10, 2946. doi:10.3389/fmicb.2019.02946
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J., & Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem Biol Interact*, 159(1), 18-46. doi:10.1016/j.cbi.2005.10.106
- Ringot, D., Lerzy, B., Chaplain, K., Bonhoure, J. P., Auclair, E., & Larondelle, Y. (2007). In vitro biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: comparison of isotherm models. *Bioresour Technol*, 98(9), 1812-1821. doi:10.1016/j.biortech.2006.06.015
- Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification. *Food and Chemical Toxicology*, 124, 81-100.
- Salari, R., & Salari, R. (2017). Investigation of the Best *Saccharomyces cerevisiae* Growth

- Condition. *Electron Physician*, 9(1), 3592-3597. doi:10.19082/3592
- Sanchez, E., Heredia, N., & Garcia, S. (2005). Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. *Int J Food Microbiol*, 98(3), 271-279. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.07.009
- 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., & Sanchez-Ramos, J. (2006). Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *Neurotoxicology*, 27(1), 82-92. doi:10.1016/j.neuro.2005.07.004
- Savi, G. D., Piacentini, K. C., Bittencourt, K. O., & Scussel, V. M. (2014). Ozone treatment efficiency on *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol degradation and its effects on whole wheat grains (*Triticum aestivum* L.) quality and germination. *Journal of Stored Products Research*, 59, 245-253.
- Scott, P. M. (2012). Recent research on fumonisins: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 29(2), 242-248. doi:10.1080/19440049.2010.546000
- Scudamore, K. A., & Banks, J. N. (2004). The fate of mycotoxins during cereal processing. In: Meeting the mycotoxin menaces. In: D. Barug, H. van Egmond, R. Lopez-Garcia, T. van Osenbruggen, & A. Visconti (Eds.). *Proceedings of the 2nd World Mycotoxin Forum*, 17(18), 165-181.
- Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. *Biological Control*, 50, 205-221.
- Shepherd, G. S. (2003). Aflatoxin and food safety: recent Africa perspectives. *Toxin*

*Reviews*, 22, 267-286.

- Shetty, P. H., Hald, B., & Jespersen, L. (2007). Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *Int J Food Microbiol*, 113(1), 41-46.  
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.013
- Shuaib, F. M. B., Jolly, P. E., Ehiri, J. E., Yatich, N., Jiang, Y., Funkhouser, E., . . . Williams, J. H. (2010). Association between birth outcomes and aflatoxin B1 biomarker blood levels in pregnant women in Kumasi, Ghana. *Tropical Medicine & International Health*, 15, 160-167.
- Singh, P., & Cotty, P. J. (2017). Aflatoxin contamination of dried red chilies: contrasts between the United States and Nigeria, two markets differing in regulation enforcement. *Food Control*, 80, 374-379.
- Solfrizzo, M., Piemontese, L., Gambacorta, L., Zivoli, R., & Longobardi, F. (2015). Food coloring agents and plant food supplements derived from *Vitis vinifera*: a new source of human exposure to ochratoxin A. *J Agric Food Chem*, 63(13), 3609-3614. doi:10.1021/acs.jafc.5b00326
- Songsermsakul, P. (2015). Mycotoxins contamination of food in Thailand (2000-2010): Food safety concerns for the world food exporter. *International Food Research Journal*, 22(2), 426-434.
- Spadaro, D., & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science & Technology*, 47, 39-49.
- Stewart, G. G. (2014). *Saccharomyces cerevisiae*. In: Batt CA, Tortorello ML. . *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2, 309-315.
- Sun, G., Wang, S., Hu, X., Su, J., Zhang, Y., Xie, Y., . . . Wang, J. S. (2011). Co-contamination of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in food and human dietary exposure in three areas of China. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 28(4), 461-470. doi:10.1080/19440049.2010.544678
- Suprasert, D., & Chulamorakot, T. (2001). Mycotoxin contamination in lotus seed in Thailand. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 29, 126-129.
- Tangni, E. K., & Pussemier, L. (2006). Ochratoxin A and citrinin loads in stored wheat

- grains: Impact of origin dust and possible prediction using ergosterol measurement. *Food Additives and Contaminants*, 23, 181-189.
- Tansakul, N., Limsuwan, S., Bohm, J., Hollmann, M., & Razzazi-Fazeli, E. (2013). Aflatoxins in selected Thai commodities. *Food Addit Contam Part B Surveill*, 6(4), 254-259. doi:10.1080/19393210.2013.812148
- Tayel, A. A., El-Tras, W. F., Moussa, S. H., & El-Agamy, M. A. (2013). Antifungal action of *Pichia anomala* against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and its application as a feed supplement. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(13), 3259-3263.
- Taylor, W. J., & Draughon, F. A. (2011). *Nannocystis exedens*: A potential biocompetitive agent against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Protection*, 64, 1030-1034.
- Tchana, A. N., Moundipa, P. F., & Tchouanguep, F. M. (2010). Aflatoxin contamination in food and body fluids in relation to malnutrition and cancer status in Cameroon. *Int J Environ Res Public Health*, 7(1), 178-188. doi:10.3390/ijerph7010178
- Tilocca, B., Balmas, V., Hassan, Z. U., Jaoua, S., & Migheli, Q. (2019). A proteomic investigation of *Aspergillus carbonarius* exposed to yeast volatiles or to its major component 2-phenylethanol reveals major shifts in fungal metabolism. *Int J Food Microbiol*, 306, 108265. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108265
- Tiwari, B. K., Brennan, C. S., Curran, T., Gallagher, E., Cullen, P. J., & O'Donnell, C. P. (2010). Application of ozone in grain processing. *Journal of Cereal Science*, 51, 248-255.
- Toffano, L., Fialho, M. B., & Pascholati, S. F. (2017). Potential of fumigation of orange fruits with volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to control citrus black spot disease at postharvest. *Biological Control*, 108, 77-82.
- Trung, T. S., Bailly, J. D., Querin, A., Lebars, P., & Guerre, P. (2001). Fungal contamination of rice from South Vietnam, mycotoxigenesis of selected strains and residues in rice. *Revue Médecine Vétérinaire*, 152, 555-560.
- Tsakiris, I. N., Tzatzarakis, M. N., Alegakis, A. K., Vlachou, M. I., Renieri, E. A., & Tsatsakis, A. M. (2013). Risk assessment scenarios of children's exposure to aflatoxin M1

- residues in different milk types from the Greek market. *Food Chem Toxicol*, *56*, 261-265. doi:10.1016/j.fct.2013.02.024
- Tulayakul, P., & Konishi, Y. S. (2017). Mycotoxin contamination in foodstuffs and feeds-health concerns in Thailand. *Japanese Journal of Veterinary Research*, *65*(3), 173-183.
- Turner, P. C., Moore, S. E., Hall, A. J., Prentice, A. M., & Wild, C. P. (2003). Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. *Environmental Health Perspectives*, *111*, 217-220.
- Urquhart, E. J., & Punja, Z. K. (2002). Hydrolytic enzymes and antifungal compounds produced by *Tilletiopsis* species, phyllosphere yeasts that are antagonists of powdery mildew fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, *48*, 219-229.
- van Egmond, H. P., Schothorst, R. C., & Jonker, M. A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food perspectives in a global and European context. *Annals Bioanalytical Chem*, *389*, 147-157.
- Vaughan-Martini, A., & Martini, A. (1993). A taxonomic key for the Genus *Saccharomyces*. *Systematics and Applied Microbiology*, *16*, 113-119.
- Vega, M., Muñoz, K., Sepúlveda, C., Aranda, M., Campos, V., Villegas, R., & Villarroel, O. (2009). Solidphase extraction and HPLC determination of ochratoxin A in cereals products on Chilean market. *Food Control*, *20*, 631-634.
- Vettorazzi, A., & Cerain, A. L. (2016). Mycotoxins as Food Carcinogens. *Environmental Mycology in Public Health*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-411471-5.00017-X>
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, *40*(1), 1-10.
- Wacco, A. P., Wendiro, D., Vuzi, P., & Hawumba, J. (2014). Method for detection of aflatoxins in agricultural food. *Journal of Applied Chemistry*, *2014*(12), 1-15.
- Wagacha, J. M., & Muthomi, J. W. (2008). Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *Int J Food Microbiol*, *124*(1), 1-12. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.008
- Westhuizen, L., Shephard, G. S., Rheeder, J. P., Burger, H. M., Gelderblom, W. C. A., &

- Wild, C. P. (2010). Optimising sorting and washing of homegrown maize to reduce fumonisin contamination under laboratory-controlled conditions. *Food Control*, *22*, 396-400.
- 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., Mclaulhin, R., Wlison, C., & Chalutz, E. (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Chracterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathogen*, *39*(4), 245-258.
- Wisniewski, M., Wilson, C., Droby, S., Chalutz, E., El Ghaouth, A., & Stevens, C. (2007). Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In: Vincent, C., Goettal, M.S., Lazarovits, G. (Eds.). *Biological Control: A Global Perspective*, 262-273.
- Wogan, G. N. (1966). Chemical nature and biological effect of the aflatoxins. *Bacteriology Reviews*, *30*, 460-470.
- Wolff, J., Bresch, H., Cholmakov-Bodechtel, C., Engel, G., Garais, M., Majerus, P., . . . Scheuer, R. (2000). Ochratoxin A: Contamination of foods and consumer exposure final evaluation. *Archiv fur Lebensmittelhygiene*, *51*, 115-117.
- Wu, F. (2008). A tale of two commodities: how EU mycotoxin regulations have affected US treenut industries. *World Mycotoxin Journal*, *1*, 95-102.
- Yao, H. J., & Tian, S. P. (2005). Effects of a biocontrol agent and methyl jasmonate on postharvest diseases of peach fruit and the possible mechanisms involved. *J Appl Microbiol*, *98*(4), 941-950. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02531.x
- Yiannikouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap, C. G., Bertin, G., Jeminet, G., & Jouany, J. P. (2004). Adsorption of Zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Food Prot*, *67*(6), 1195-1200. doi:10.4315/0362-028x-67.6.1195
- Young, J. C., Zhu, H., & Zhou, T. (2006). Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. *Food Chem Toxicol*, *44*(3), 417-424. doi:10.1016/j.fct.2005.08.015
- 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(1), 44-48.
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 129-144.
- Zhang, H., Mahunu, G. K., Castoria, R., Yang, Q., & Apaliya, M. T. (2018). Recent developments in the enhancement of some postharvest biocontrol agents with unconventional chemical compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 180-187.
- Zhang, J., Xie, J., Zhou, Y., Deng, L., Yao, S., & Zeng, K. (2017). Inhibitory effect of *Pichia membranaefaciens* and *Kllockera apiculata* against *Monilinia fruticola* and their biocontrol ability of brown rot in postharvest plum. *Biological Control*, 114, 51-58.
- Zhang, X., Boesch-Saadatmandi, C., Lou, Y., Wolffram, S., Huebbe, P., & Rimbach, G. (2009). Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells. *Genes Nutr*, 4(1), 41-48. doi:10.1007/s12263-008-0109-y
- Zhang, X., Kuca, K., Dohnal, V., Dohnalová, L., Wu, Q., & Wu, C. (2014). Military potential of biological toxins. *Journal of Applied Biomedicine*, 12, 63-77.
- Zhang, X., Yang, H., Appliya, M. T., Zhoa, L., Gu, X., Hu, W., & Zhang, H. (2018). The mechanisms involved in ochratoxin A elimination by *Yarrowia lipolytica* Y-2. *Annals of Applied Biology*, 173(2), 164-174.
- Zhou, Y., Li, W., Zeng, J., & Shao, Y. (2018). Mechanisms of action of the yeast *Debaryomyces nepalensis* for control of the pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mango fruit. *Biological Control*, 123, 111-119.
- Zhu, C., Shi, J., Jiang, C., & Liu, Y. (2015). Inhibition of the growth and ochratoxinA production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in vitro and in vivo through antagonistic yeasts. *Food Control*, 50, 125-144.
- Zhu, R., Yu, T., Guo, S., Hu, H., Zheng, X., & Karlovsky, P. (2015). Effect of the yeast *Rhodosporidium paludigenum* on postharvest decay and patulin accumulation in apples and pears. *J Food Prot*, 78(1), 157-163. doi:10.4315/0362-028X.JFP-14-218
- Zinedine, A., Soriano, J. M., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2007). Review on toxicity,

- occurrence, metabolism, detoxification, regulation and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1-18.
- Zuo, R., Chang, J., Yin, Q., Wang, P., Cheng, W., Wang, X., . . . Zheng, Q. (2012). Inhibiting *Aspergillus flavus* growth and degrading aflatoxin B1 by combined beneficial microbes. *African Journal of Biotechnology*, 11(65), 12903-129009.
- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2537). ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพ.
- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2551a). ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร: เมล็ดกาแฟโรบัสตา ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. ๒๕๕๑. .
- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2551b). ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เรื่องกำหนด มาตรฐานสินค้าเกษตร: เมล็ดกาแฟอาราบิก้า ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. ๒๕๕๑. .
- กิตติกำแหง. (2554). การปนเปื้อนราสกุล *Aspergillus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 และโอคราทอกซินเอในเมล็ดข้าวไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เจริญยงค์. (2556). การคัดแยกและจำแนกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในข้าวโพดสายพันธุ์ CP-KKK หมักจากประเทศไทยและข้าวโพดหมักเชิงพาณิชย์จากประเทศจีน. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธราตลศิริรัฐติกุล. (2554). การปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในองุ่นไวน์ไทย. โครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์, ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปิ่นทวีหค. (2546). สารพิษจากเชื้อรา: อะฟลาทอกซิน. ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มารุ่งเรือง. (2559). การใช้ยีสต์ที่แยกได้จากไซเลจข้าวโพดเพื่อการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus carbonarius*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. (2561). ร่างประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. กระทรวงสาธารณสุข [ออนไลน์]  
[http://www.spsthailand.net/admin/admin\\_stddata/FileSPS/4.pdf](http://www.spsthailand.net/admin/admin_stddata/FileSPS/4.pdf).





จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

**ภาคผนวก ก**  
**สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (Potato Dextrose Agar)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDA บริษัท Difco, USA	39	กรัม
---	----	------

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (วุ้น 0.8 เปอร์เซ็นต์)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDB บริษัท Difco, USA	24	กรัม
ผงวุ้นสำหรับทำอาหารแข็ง	0.12	กรัมต่อลิตร

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD (Yeast extract Peptone Dextrose)

สารสกัดยีสต์	10	กรัมต่อลิตร
เพปโตน	20	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลเดกซ์โตรส	20	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้นสำหรับทำอาหารแข็ง	15	กรัมต่อลิตร

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 4. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM (Yeast extract Malt extract)

สารสกัดยีสต์	3	กรัมต่อลิตร
สารสกัดมอลต์	3	กรัมต่อลิตร
เพปโทน	5	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลเดกซ์โทรส	10	กรัมต่อลิตร

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 5. อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) ความเข้มข้น 0.5 เท่า

สารสกัดยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
เพปโทน	10	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลเดกซ์โทรส	10	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้นสำหรับทำอาหารแข็ง	15	กรัมต่อลิตร

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 6. อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) ความเข้มข้น 0.1 เท่า

สารสกัดยีสต์	1	กรัมต่อลิตร
เพปโทน	2	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลเดกซ์โทรส	2	กรัมต่อลิตร
ผงวุ้นสำหรับทำอาหารแข็ง	15	กรัมต่อลิตร

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำปลอดประจุปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข  
การเตรียมสารละลาย

1. เฟสเคลื่อนที่สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1

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

ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยชุดกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

2. เฟสเคลื่อนที่สำหรับโอคราทอกซินเอ

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

ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยชุดกรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

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

น้ำปลอดประจุ	800	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.44	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.24	กรัม

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

#### 4. สารแขวนลอยสเปอร์รา (Physiological water)

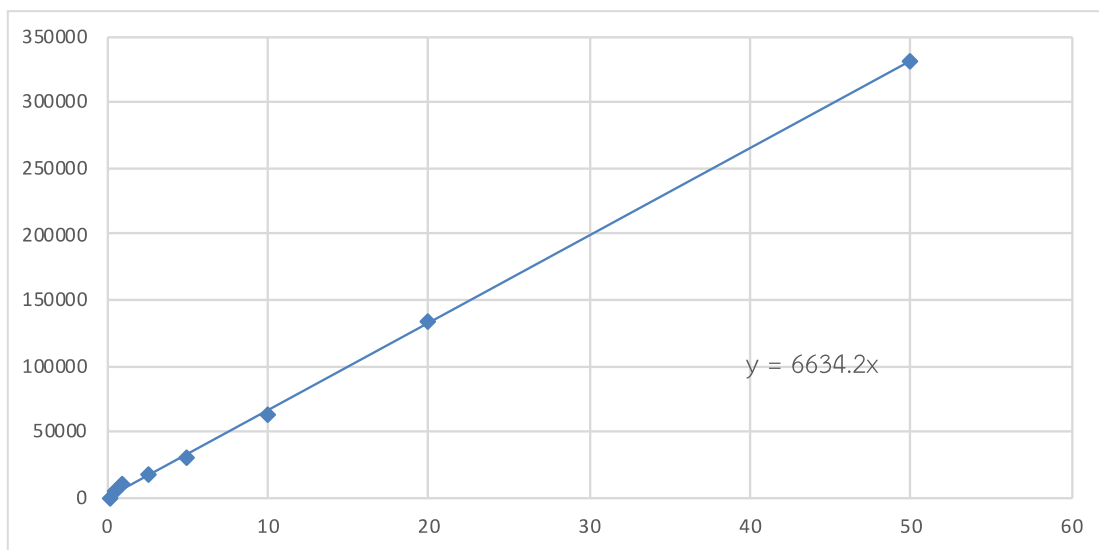
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.85	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร
น้ำปลอดประจุ	100	มิลลิลิตร

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



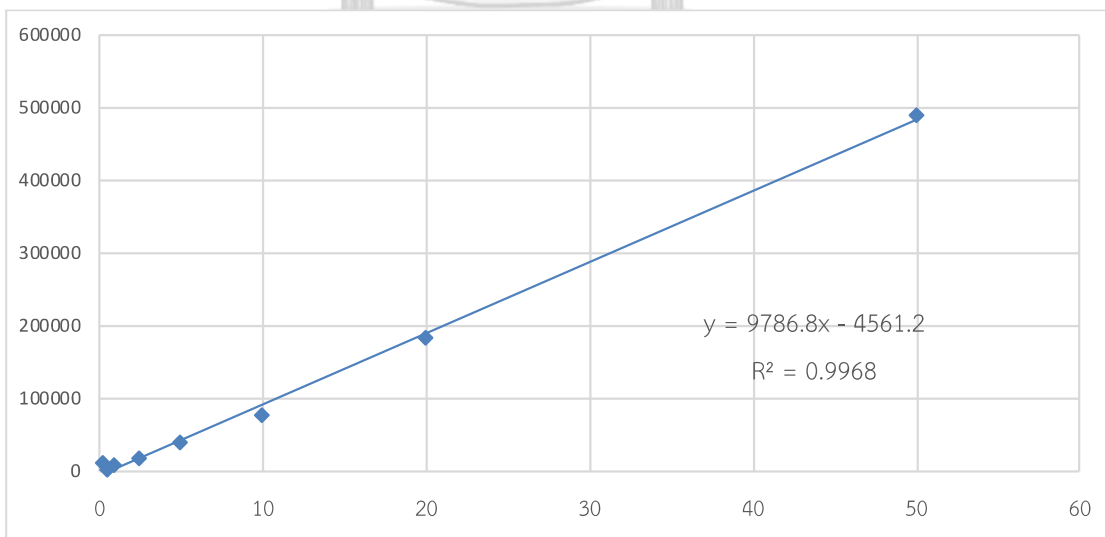
ภาคผนวก ค  
กราฟมาตรฐานสารพิษจากกรา

1. กราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1



Retention Time (RT) : 7 นาที

2. กราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ



Retention Time (RT) : 10 นาที

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	พิชามณูชู่ โสมา
วัน เดือน ปี เกิด	2 พฤศจิกายน 2536
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	45/1 ซอยศรีอยุธยา 12 ถนนศรีอยุธยา แขวงพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400
ผลงานตีพิมพ์	ส่วนหนึ่งของงานวิจัยฉบับนี้ได้เข้าร่วมงานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ The 5th EnvironmentAsia International Conference on Transboundary Environmental Nexus: From Local To Regional Perspectives ระหว่างวันที่ 13-15 มิถุนายน พ.ศ. 2562 ณ โรงแรม The Empress Hotel จังหวัดเชียงใหม่ ในหัวข้อเรื่อง “Effect of Yeast Volatile Organic Compounds on Growth and Ochratoxin A Production of <i>Aspergillus carbonarius</i> ”