

## บทที่ 1

### บทนำ

สารพิษอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. tamarii* และ *A. pseudotamarii* (Kurtzman *et al.*, 1987; Ito *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001) ซึ่งสปอร์ของเชื้อราเหล่านี้พบอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะในดิน สารพิษที่เชื้อราเหล่านี้สร้างขึ้นได้แก่ สารพิษอะฟลาทอกซิน B1, B2, G1, G2, M1, M2, B2a และ G2a (WHO, 1979) สำหรับอะฟลาทอกซินที่พบในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอาหาร ได้แก่ B1, B2, G1, G2, M1 และ M2 การบริโภคผลผลิตทางการเกษตรที่มีเชื้อราจะเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ ถ้าหากว่าเชื้อรามีการสร้างสารพิษขึ้น (ดูชัย, 2546) โดยเฉพาะอะฟลาทอกซิน B1 ซึ่งเป็นสารพิษที่มีความรุนแรงมากที่สุด แม้พบในปริมาณเพียงเล็กน้อยก็สามารถก่อให้เกิดอาการได้อย่างรุนแรงและคาดว่าสารพิษนี้อาจเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งของมนุษย์และสัตว์ ซึ่งมีผลได้ทั้งอาการชนิดเฉียบพลันและเรื้อรัง โดยทำให้เกิดมะเร็งของตับและปอด (ไมตรี, 2528) นอกจากนี้ยังพบว่าไวรัสตับอักเสบบชนิด B และสารพิษอะฟลาทอกซินจะมีปฏิริยาเสริมกันในการกระตุ้นให้เกิดมะเร็งตับ (Montesano *et al.*, 1997; Groopman and Thomas, 1999) ดังนั้นสารพิษอะฟลาทอกซินนั้นนอกจากจะเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งแล้ว ยังเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลาย (Mutagen) ได้อีกด้วย

อะฟลาทอกซินมีสมบัติละลายน้ำได้เล็กน้อย แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม (chloroform) เบนซีน (benzene) อะซีโตน (acetone) เอทานอล (ethanol) และเมทานอล (methanol) แต่ไม่ละลายในเฮกเซน (hexane) อีเทอร์ (ether) และปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) สามารถทนต่อความร้อนสูงถึง 250 องศาเซลเซียส จึงไม่ถูกทำลายหรือเสื่อมสลาย ดังนั้นการใช้ความร้อนในรูปของการต้ม อบ คั่ว นึ่ง หรือการใช้ความดันไอ (autoclave) ในการทำลายอะฟลาทอกซิน จึงไม่ค่อยได้ผล แต่อะฟลาทอกซินถูกทำลายได้โดยไฮโปคลอไรท์ (hypochlorite) แอมโมเนีย ต่างแก่ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และเสื่อมสลายได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แสงแดด และรังสีแกมมา

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน คือ ภายใต้อุณหภูมิ 18 - 30 % นอกจากนี้ยังพบว่าวัตถุดิบทางการเกษตรหรือเมล็ดพืชที่เสื่อมสภาพ แตกหัก หรือมีผลเสียหายจากการทำลายของแมลง นก หรือหนู เป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ของเชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซิน เช่น *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยสารพิษจะสะสมอยู่ภายในเมล็ดพืชหรือวัตถุดิบเหล่านั้น และไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า อาหารและผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิดที่มักพบว่ามีสารปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราเหล่านี้ ได้แก่ ถั่วลิสง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าว ธัญพืช ปลาแห้ง กุ้ง ผลิตภัณฑ์นมและเนื้อสัตว์ต่างๆ (Thanaboripat and Sukhareon, 1997; Ellis *et al.*, 2000; Thanaboripat, 2003) สารพิษอะฟลาทอกซินนี้สามารถปนเปื้อนในเมล็ดพืชได้ทั้งก่อนและหลังการเก็บ

เกียว (Cotty, 1990) การปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินในพืชเศรษฐกิจจัดเป็นปัญหาสำคัญในหลายประเทศทั่วโลก (Smith and Moss, 1985) และพบว่าภูมิอากาศแบบร้อนชื้นทำให้เชื้อราเจริญและสามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ดี สำหรับประเทศไทยซึ่งอยู่ในภูมิอากาศดังกล่าวจึงทำให้มีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรซึ่งเป็นแหล่งอาหารของมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารพิษอะฟลาทอกซินกันมาก (Thanaboripat, 2002) โดยการวิจัยส่วนใหญ่จะมุ่งถึงการควบคุมและกำจัดสารพิษอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอาหารด้วยกรรมวิธีต่างๆ เช่น การใช้สารเคมี สมุนไพร และจุลินทรีย์ เป็นต้น

จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรียและราสามารถย่อยสลายสารพิษจากเชื้อราได้ เช่น *Flavobacterium aurantiacum*, *Corynebacterium rubrum*, *Candida lipolitica*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Armillariella tabescens*, *Neurospora* spp., *Rhizopus* spp. และ *Mucor* spp. (Bata and Lasztity, 1999, Ciegler et al., 1966) แต่จุลินทรีย์เหล่านี้อาจไม่เหมาะต่อการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเหมือนยีสต์ เนื่องจากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีความสำคัญและใช้ในการผลิตอาหารหมักทั่วโลก ซึ่งจากการศึกษาของ Shetty และคณะ (2007) พบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากอาหารหมักในประเทศกานา (Ghana) และอัฟริกาตะวันตก (West Africa) สามารถดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน B1 ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบว่า *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์สามารถดูดจับอะฟลาทอกซิน B1 ได้มากกว่า 40% นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ยีสต์ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตบางสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการดูดจับสารพิษได้ และจากการศึกษาของ Baptista และคณะ (2004) พบว่ายีสต์แห้งและผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถลดปริมาณความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน B1 ได้

สารพิษอะฟลาทอกซินจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขอย่างหนึ่งที่ต้องหาทางป้องกันและแก้ไข เนื่องจากไม่สามารถลดพิษหรือทำลายพิษของอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอาหารได้หมดสิ้นอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นการป้องกันการเจริญของเชื้อราจึงเป็นวิธีที่ดีที่สุดในปัจจุบัน สำหรับในกรณีที่มีการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร จำเป็นต้องมีวิธีการกำจัดสารพิษหรือลดการปนเปื้อนของสารพิษเพื่อให้ผลผลิตอยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัย โดยประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ได้กำหนดให้มีอะฟลาทอกซินปนเปื้อนได้ไม่เกิน 20 พีพีบี (ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) สำหรับ FAO และ WHO นั้น มีการกำหนดปริมาณสูงสุดของอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหารและอาหารสัตว์ต้องไม่เกิน 20 พีพีบี (Krishnamurthy and Shashikala, 2006) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาถึงการคัดเลือกยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน B1 ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

### 1.1 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกและเปรียบเทียบสายพันธุ์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สามารถดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน
2. เพื่อศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารพิษอะฟลาทอกซินต่อการดูดจับของยีสต์
3. เพื่อเปรียบเทียบการดูดจับของยีสต์ในรูปเซลล์แห้งและในรูปการตรึงเซลล์โดยใช้ไคโตซาน

4. เพื่อนำยีสต์ที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการดักจับสารพิษอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรต่างๆ

## 1.2 ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการศึกษาความสามารถในการดักจับอะฟลาทอกซิน B1 โดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุด โดยนำยีสต์มาทำให้เป็นผง หรือในรูปตรึงเซลล์ และนำไปผสมกับอะฟลาทอกซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการดักจับ เป็นการเพิ่มมูลค่าของยีสต์และลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหรืออาหารให้อยู่ในเกณฑ์ที่ปลอดภัย

## 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สามารถดักจับสารพิษอะฟลาทอกซินได้ดีที่สุด
2. สามารถนำยีสต์มาใช้ในการลดปริมาณของสารพิษอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหรือในอาหารได้
3. ช่วยลดอัตราความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งโดยสาเหตุจากอะฟลาทอกซิน

## บทที่ 2

### วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ประวัติของสารพิษอะฟลาทอกซิน

การศึกษาวិจัยเกี่ยวกับสารพิษอะฟลาทอกซินเริ่มต้นในปี ค.ศ. 1960 เมื่อเกิดโรคระบาดอย่างรุนแรงกับสัตว์เลี้ยงในฟาร์มต่างๆในประเทศอังกฤษ ที่ชื่อว่า Turkey X disease เนื่องจากมีการตายของไก่ลงเป็นจำนวนมาก (Blount, 1961) นอกจากนี้ยังเกิดพิษกับลูกเป็ดและลูกวัวอีกด้วย จากการศึกษาของ Sargeant และคณะ (1961a) พบว่ามีสาเหตุเนื่องจากกากถั่วลิสงจากประเทศบราซิลที่นำมาใช้เป็นส่วนผสมของอาหาร และสามารถสกัดแยกและทำให้สารพิษบริสุทธิ์จากถั่วลิสง พบว่าเชื้อรา คือ *Aspergillus flavus* สามารถสร้างสารพิษที่เป็นชนิดเดียวกันกับสารพิษจากถั่วลิสง (Sargeant และคณะ, 1961b) ดังนั้นจึงได้ให้ชื่อสารพิษที่ได้จากเชื้อรานี้ว่า อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ซึ่งมาจากการรวมคำ 3 คำเข้าด้วยกัน คือ *Aspergillus* (A-), *flavus* (-fla) และ toxin

#### 2.2 เชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

ในปัจจุบันมีรายงานพบว่าเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินมีหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* (ซึ่งคาดว่า เป็นสายพันธุ์ที่กลายมาจาก *A. flavus* ), *A. tamarii* (Kurtzman *et al.*, 1987; Goto *et al.*, 1997) และ *A. bombycis* (Peterson *et al.*, 2001) นอกจากนี้ Ito และคณะ (2001) ยังพบว่าเชื้อรา *A. pseudotamarii* สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้อีกด้วย เนื่องจากเมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะพันธุกรรม รวมถึงลักษณะการสร้างสารพิษของเชื้อรา พบว่ามีความแตกต่างจาก *A. tamarii* ดังนั้นจึงรายงานว่าเชื้อรา *A. pseudotamarii* เป็นเชื้อราชนิดใหม่ที่สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ ซึ่งสปอร์ของเชื้อราเหล่านี้พบอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะในดิน (WHO, 1979) เชื้อราแต่ละสายพันธุ์จะมีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินที่ต่างกันทั้งในด้านชนิดและปริมาณ จากการศึกษาของ Torres และคณะ (1980) พบว่าความสามารถในการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อราจะลดลงเมื่อมีการถ่ายเชื้อ (subculture) บ่อยขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราบางสายพันธุ์แม้จะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันแต่ไม่สามารถสร้างอะฟลาทอกซิน ตัวอย่างเช่น *A. flavus columnaris* ATCC 44310 ที่ใช้ในการหมักซีอิ๊ว หรือ *A. oryzae* และ *A. sojae* ที่ใช้ในการผลิตโคจิ (Wang and Hesseltine, 1982) เป็นต้น

เชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* จัดอยู่ใน sub-division Deuteromycotina, class Hyphomycetes (Alexopoulos *et al.*, 1996) โดยโคโลนีของเชื้อราเจริญได้ดีบนอาหาร Czapek's solution agar ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ลักษณะผิวหน้าของโคโลนีจะมีสีเขียวปนเหลืองเกิดขึ้นอย่างหนาแน่น ด้านใต้โคโลนีของเชื้อราจะมีสีเหลืองอ่อน มีการสร้าง sclerotium ที่มีสีน้ำตาลเข้มจนเกือบดำ มีรูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดประมาณ 1.0 มิลลิเมตร ส่วนของ conidial head จะมีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 300-400 ไมโครเมตร ส่วนของ conidiophore ยาวประมาณ 700-800

ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10-25 ไมโครเมตร ผนังขรุขระและไม่มีสี หนาประมาณ 1.0 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของ vesicle มีขนาด 20-60 ไมโครเมตร รูปร่างค่อนข้างกลม มี sterigma แบบ 2 ชั้น conidia มีรูปร่างกลม ผนังขรุขระและมีสีเขียวอ่อน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3.5-4.5 ไมโครเมตร (อุทัยวรรณ, 2522) จากการศึกษาลักษณะของเชื้อราบนอาหารสูตรธรรมชาติ เช่น corn meal agar และ malt extract agar พบว่าเชื้อรามีลักษณะอื่นๆ ใกล้เคียงกับที่เลี้ยงบนอาหาร Czapek's solution agar แต่ conidiophore จะมีความผันแปรในด้านความยาวน้อยกว่า และเมื่อตรวจดูลักษณะต่างๆของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นในการจัดจำแนกเชื้อราทั้ง 2 ชนิดออกจากกันจึงจำเป็นต้องตรวจดูในระดับ DNA (Kurtzman *et al.*, 1987) สำหรับตัวอย่างลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราของ *A. flavus* ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2.1

### 2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างอะฟลาทอกซิน

ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา (อนงค์, 2546) ได้แก่

1) ชนิดของเชื้อรา เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* หลายสายพันธุ์ สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ในธรรมชาติ แต่บางสายพันธุ์ก็ไม่มีการสร้างอะฟลาทอกซิน สำหรับเชื้อราที่สำคัญและมีการศึกษามากที่สุด ได้แก่ *Aspergillus flavus* และ *A. parasiticus*

2) อาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อราสามารถเจริญบนอาหารหรือเมล็ดพืชชนิดต่างๆ และสามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับธาตุอาหารที่มีอยู่ในอาหารหรือเมล็ดพืชชนิดต่างๆ ดังนี้

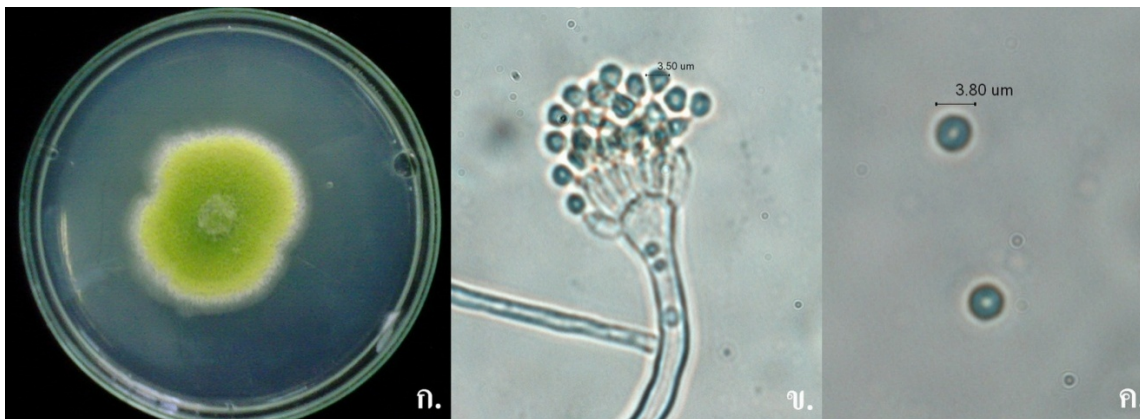
ธาตุอาหารคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ซูโครส กลูโคส ฟรักโทส มอลโทส ไซโลส และไรโบส โดยพบว่าซูโครสมีผลต่อการสร้างอะฟลาทอกซินได้ดีที่สุด

ธาตุอาหารไนโตรเจน ได้แก่ เกลือแอมโมเนียมชนิดต่างๆ ซึ่งเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลต่อการสร้างอะฟลาทอกซินได้ดีกว่าเกลือแอมโมเนียมชนิดอื่นๆ

เกลือแร่ต่างๆ ได้แก่ สังกะสีไอออนที่พบในอาหารหรือที่จับตัวกับสารอื่นๆ ซึ่งถ้ามีในปริมาณน้อยจะทำให้เชื้อราสร้างอะฟลาทอกซินได้น้อย เช่น ในถั่วเหลืองจะมีกรดไฟติก (phytic acid) ปริมาณมากและจับตัวกับสังกะสีไอออนได้มาก ทำให้สังกะสีไอออนบนเมล็ดถั่วเหลืองมีน้อย และมีผลทำให้เชื้อราใช้ถั่วเหลืองในการสร้างอะฟลาทอกซินได้น้อยกว่าถั่วชนิดอื่นๆ

3) ความชื้น อาหารที่มีความชื้นต่ำจะมีผลทำให้เชื้อราสร้างอะฟลาทอกซินได้น้อย ซึ่งเชื้อรา *Aspergillus* ทั่วไปจะเจริญได้ดีที่ความชื้นประมาณ 16 - 21 % และถ้าในอากาศมีความชื้นต่ำจะมีผลทำให้เชื้อราสร้างอะฟลาทอกซินได้น้อยเช่นกัน

4) อุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน อุณหภูมิที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญของ *A. flavus* คือที่ 36 - 38 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เชื้อราเจริญได้เล็กน้อย คือที่ 6 - 8 องศาเซลเซียส หรือ 44 - 46 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เชื้อราสามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้สูงสุดในระหว่างการเจริญวันที่ 11 - 13 คือที่ 20 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อรา



รูปที่ 2.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

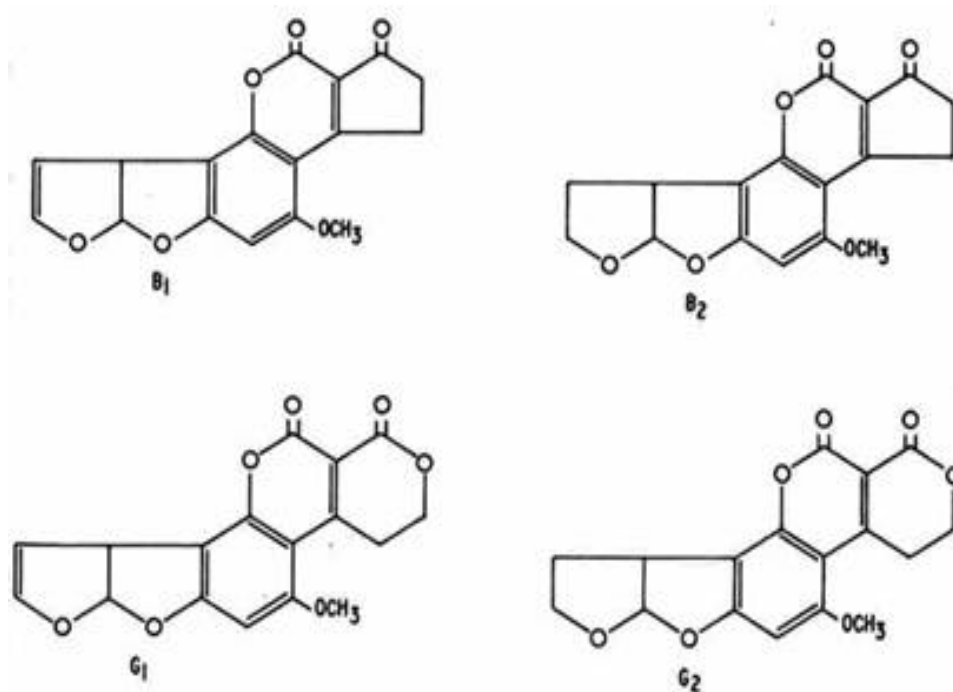
- ก. โคลนินของเชื้อรา ที่เจริญบนอาหาร PDA (อายุ 7 วัน) ที่อุณหภูมิห้อง
- ข. conidiophore และ phialide กำลังขยาย 1000 เท่า
- ค. conidia กำลังขยาย 1000 เท่า

สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้สูงสุดในระหว่างการเจริญวันที่ 7 - 9 และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อราสามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้สูงสุดในระหว่างการเจริญวันที่ 5 - 7 สำหรับประเทศไทยซึ่งอยู่ในเขตภูมิอากาศร้อนชื้นจึงมีความเหมาะสมต่อการสร้างอะฟลาทอกซินได้ดีเมื่อเชื้อรามีการเจริญระหว่างวันที่ 7 - 14

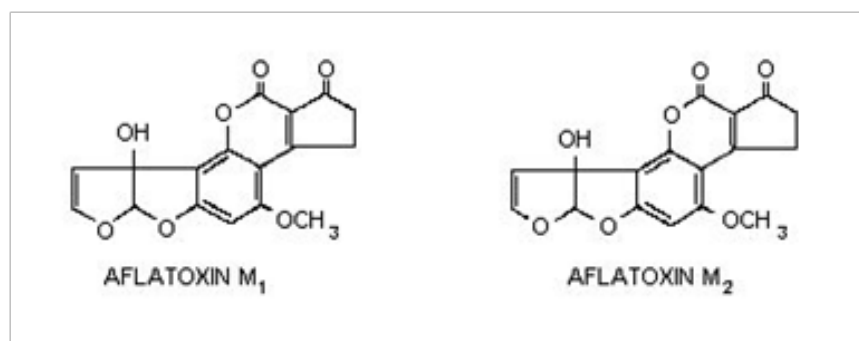
5) ปริมาณก๊าซออกซิเจนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ปริมาณออกซิเจนมากจะมีผลทำให้เชื้อราสร้างอะฟลาทอกซินได้มาก นอกจากนี้ยังพบว่าก๊าซออกซิเจน 1 % และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 20 % สามารถลดการสร้างสปอร์ของเชื้อราได้

## 2.4 ชนิดและคุณสมบัติของอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินเป็นสารอินทรีย์ประเภท heterocyclic compound จัดอยู่ในกลุ่มบิสฟูราโนควิ-มาริน(bisfuranocoumarin) ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน อะฟลาทอกซินที่พบโดยทั่วไปตามธรรมชาติ ได้แก่ อะฟลาทอกซิน B1, B2, G1 และ G2 (รูปที่ 2.2) นอกจากนี้ก็มีอะฟลาทอกซินอีกหลายชนิดในปริมาณน้อยได้แก่ อะฟลาทอกซิน M1, M2, B2a และ G2a ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิท์ (metabolite) ของอะฟลาทอกซิน B1, B2, G1 และ G2 ตามลำดับ สำหรับอะฟลาทอกซิน M1 และ M2 (รูปที่ 2.3) พบมากในน้ำมันและปัสสาวะของสัตว์ที่ได้รับอะฟลาทอกซิน B1 และ B2 (ชาญยุทธและอุทัย, 2538; Palmgren and Hayes , 1987) ส่วนอะฟลาทอกซิน B2a และ G2a พบได้ในอาหารทั่วไป ความรุนแรงของการเกิดพิษจากอะฟลาทอกซินจะเป็นไปตามลำดับจากมากไปหาน้อย ดังนี้ B1 > G1 > B2 > G2 (Bressac *et al.*, 1991; Hsu *et al.*, 1991 ) และอะฟลาทอกซินที่มีความสำคัญและพบมากที่สุดคืออะฟลาทอกซินชนิด B1 (นงนุช, 2540)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างโมเลกุลของอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> และ G<sub>2</sub>



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของอะฟลาทอกซิน M<sub>1</sub> และ M<sub>2</sub>

สูตรโครงสร้างของอะฟลาทอกซินทุกชนิดนั้น จะมีหมู่ methoxy และแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างทางโครงสร้างเพียงเล็กน้อย เช่น อะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> จะแตกต่างจาก B<sub>2</sub> ตรงที่มีพันธะคู่ (double bond) ที่วงแหวน (ring) ที่หนึ่ง ซึ่งเป็นพันธะทางเคมีที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated bond) แต่ B<sub>2</sub> มีพันธะทางเคมีที่อิ่มตัว (saturated bond) สำหรับอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> จะเหมือนกับ G<sub>1</sub> คือจะมีพันธะคู่ในวงแหวนที่ 1 แต่จะแตกต่างกันตรงวงแหวนที่ 5 เพราะ B<sub>1</sub> เป็น five-membered ring แต่ G<sub>1</sub> เป็น six-membered ring ความเหมือนและแตกต่างกันของโครงสร้างเพียงเล็กน้อยจะมีความสำคัญในการ

แสดงความเป็นพิษ เนื่องจากอะฟลาทอกซินที่มีพันธะคูในวงแหวนที่หนึ่งและไม่มีกลุ่มแล็กโทน (lactone group) ในวงแหวนที่ห้า มีผลทำให้การเกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันและเกิดมะเร็งในตับเพิ่มขึ้นด้วย (ธีรยุทธและชัยวัฒน์, 2524) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของอะฟลาทอกซิน มีผลทำให้คุณสมบัติการเรืองแสงของสารพิษบนแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin-layer chromatographic (TLC) plate) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ในช่วงความยาวคลื่น 256 - 365 นาโนเมตร เปลี่ยนแปลงไปด้วย เช่น การเชื่อมกับวงแหวนแล็กโทน ในวงแหวนที่ 1 จะได้อะฟลาทอกซินชนิด B ที่เรืองแสงสีน้ำเงิน (blue fluorescence) และเมื่อเชื่อมกับวงแหวนแล็กโทนในวงแหวนที่ 5 จะได้อะฟลาทอกซินชนิด G ที่เรืองแสงสีเขียว (green fluorescence) ความเข้มของแสงที่เรืองนี้จะเป็นส่วนโดยตรงกับปริมาณความเข้มของอะฟลาทอกซิน ดังนั้นจึงมีการนำคุณสมบัติการเรืองแสงดังกล่าวมาใช้เป็นวิธีทดสอบและตรวจหาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินและเมแทบอไลต์ของอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ

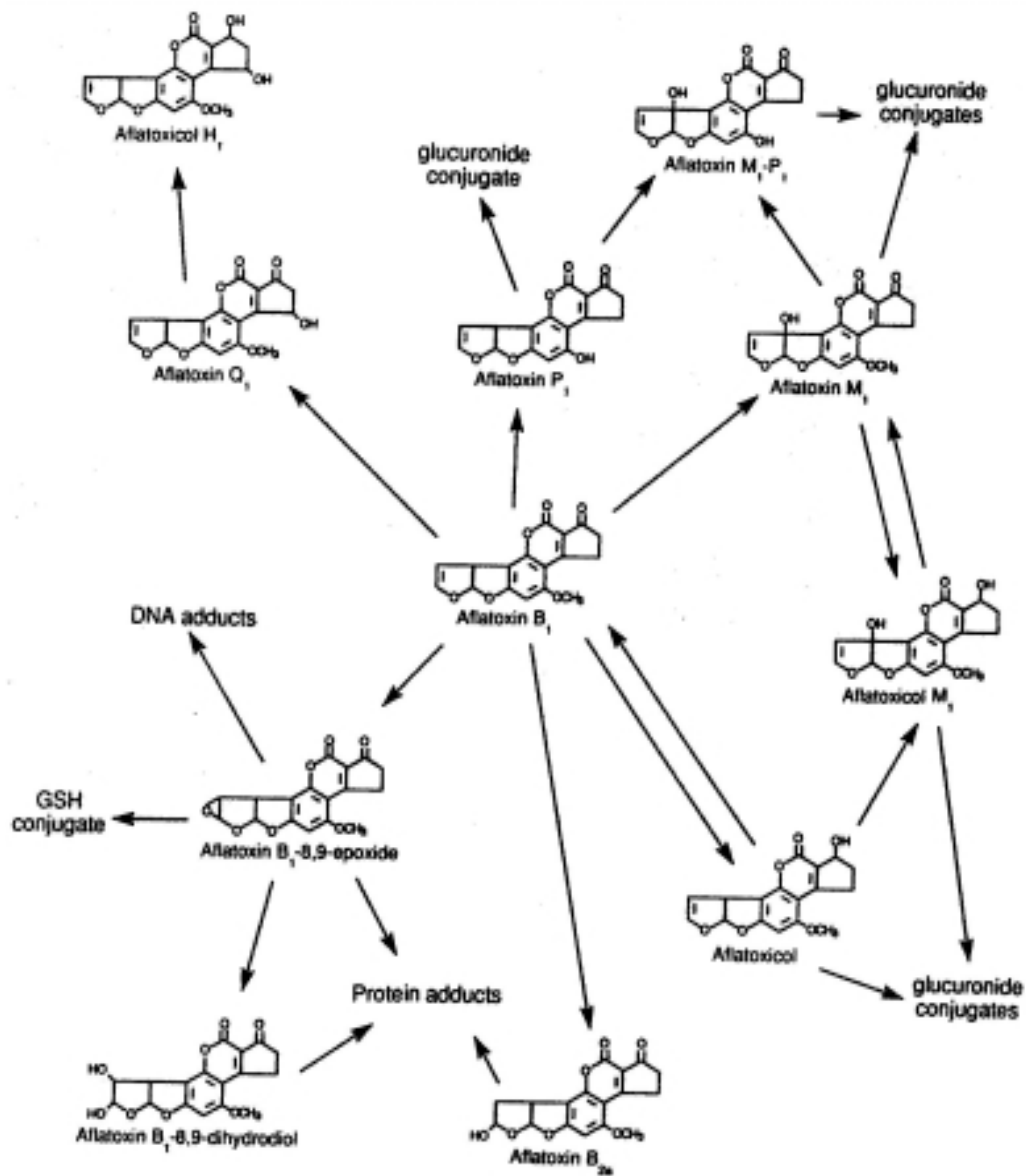
## 2.5 ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินจัดเป็นโปรมิวตาเจน (promutagen) และโปรทอกซิน (protoxin) ไม่ได้เป็นสารก่อมะเร็งปฐมภูมิ คือจะต้องเกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการเมแทบอลิซึมก่อนจะเปลี่ยนเป็นสารที่มีพิษและออกฤทธิ์เป็นสารก่อกลายพันธุ์ ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของอะฟลาทอกซินที่มีผลต่อการเกิดมะเร็งตับเริ่มจากการที่อะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> สามารถเข้าไปที่นิวเคลียส (nucleus) ของเซลล์ตับและรวมตัวกับ DNA ด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) โดยจับกับ DNA ที่ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) มากกว่าที่นิวเคลียสของเซลล์ตับและทำให้การสร้าง DNA หยุดลง มีผลทำให้การสังเคราะห์โปรตีนลดลงและทำให้เซลล์ของเนื้อเยื่อตับตาย หลังจากนั้นจะมีการขยายตัวของนิวเคลียสและเกิดเป็นก้อนมะเร็งที่ตับ (นิธิยาและวิบูลย์, 2543) นอกจากนี้ยังพบว่าอะฟลาทอกซินสามารถทำให้เกิดมะเร็งที่ปอด ไต และลำไส้ใหญ่ในสัตว์ทดลอง แต่ตับเป็นอวัยวะเป้าหมายที่ได้รับอะฟลาทอกซินไวที่สุด และทำให้เกิดมะเร็งที่เซลล์ตับ

เมื่อร่างกายได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน จะกระจายไปทั่วร่างกาย โดยสารพิษบางส่วนถูกเปลี่ยนแปลงหรือถูกขับออกไปได้บ้าง แต่บางส่วนจะมีการสะสมหรือตกค้างอยู่เป็นระยะเวลานานจนทำให้เกิดพิษได้ (นงนุช, 2540) เมื่อมนุษย์หรือสัตว์ได้รับอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหาร สารพิษจะเข้าสู่ร่างกายและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยโครงสร้างโมเลกุลของสารพิษอะฟลาทอกซินจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นเมแทบอไลต์ของอะฟลาทอกซิน (aflatoxin metabolite) ที่มีโครงสร้างโมเลกุลแตกต่างไปจากเดิม เช่น อะฟลาทอกซิน M1, M 2, P1, Q1, aflatoxicol, B2a, G2a, B 1-8,9-epoxide เป็นต้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของอะฟลาทอกซิน B1 ภายในร่างกายสัตว์ ได้แสดงดังรูปที่ 2.4 (อนงค์, 2546; Eaton *et al.*, 1994) โดยสารพิษเหล่านี้อาจตรวจพบได้ในปัสสาวะ อุจจาระ น้ำนม ไข่ ตับ ไต กล้ามเนื้อ และผลิตภัณฑ์อื่นๆ

อะฟลาทอกซินจะออกฤทธิ์ทำลายตับซึ่งเป็นอวัยวะเป้าหมาย สามารถทำให้เกิดพิษแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง ทั้งในมนุษย์และสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์เศรษฐกิจ ทำให้เกิดโรคตับอักเสบ ดีซ่าน ตับแข็งและมะเร็งตับ ซึ่งในมนุษย์ยังพบว่าทำให้เกิดโรคกลุ่มอาการไรย์ (Rye's syndrome) มักพบมีอาการทางสมองในเด็กอายุระหว่าง 1-7 ปี สำหรับในสัตว์จะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง อัตราการตายเพิ่มขึ้น

ผลผลิตเนื้อ นมและไข่ลดลง คุณภาพ ขนาดและการฟักไข่ลดลง เปลือกไข่บางลง นอกจากนี้สารพิษอะฟลาทอกซินยังสามารถผ่านไปตามกระแสเลือด และเกิดการสะสมในเนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆและผ่านไปสู่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ และเมื่อมนุษย์บริโภคผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ ก็จะได้รับอะฟลาทอกซินด้วย (อภิษฐา, 2548)



รูปที่ 2.4 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอะฟลาทอกซิน B1 ภายในร่างกายสัตว์

## 2.6 การปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซิน

สารพิษอะฟลาทอกซินสามารถปนเปื้อนในอาหารและผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิด เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด พริกแห้ง กระเทียม เต้าเจี้ยว เต้าหู้ยี้ เมล็ดฝ้าย ช้างฟาง ข้าวสาลี ปลายข้าว ถั่วลิสง ถั่วเหลือง มันสำปะหลัง ปลาป่น กระจุกป่น แยม น้ำมันพืช อื่นๆ(จักรพันธ์ุ, 2542; อนงค์, 2546) นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในนมสดยูเอชทีและนมสดพาสเจอร์ไรซ์ ซึ่งคาดว่าอาจปนเปื้อนมากับอาหารสัตว์ที่วัวกินเข้าไป (อะฟลาทอกซิน, 2553) เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้น จึงมีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนของสารพิษนี้ โดยเฉพาะผลิตผลทางการเกษตร ซึ่งใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับอาหารคนและอาหารสัตว์ จากการตรวจหาสารพิษอะฟลาทอกซิน B1 ในอาหารชั้นโคนมด้วยวิธี TLC ในเขตภาคตะวันตกของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2549-2550 จำนวน 50 ตัวอย่าง พบอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง 27 ตัวอย่าง โดยพบที่ระดับน้อยกว่า 20 พีพีบี จำนวน 14 ตัวอย่าง ที่ระดับ 21-50 พีพีบี จำนวน 7 ตัวอย่าง ที่ระดับ 51-100 พีพีบี จำนวน 4 ตัวอย่าง และที่ระดับ 101-150 พีพีบี จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหารชั้นโคนมดังกล่าวผ่านเกณฑ์มาตรฐาน 74 % (อรรถพร และคณะ, 2551) จากการศึกษาของกานดาและคณะ (2552) พบว่าสมุนไพรมานาแปรรูปมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และสารพิษอะฟลาทอกซิน และจากรายงานของอมรา (2544) พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในเครื่องเทศและสมุนไพรมากหลายชนิด เช่นในมะขามแขก พบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน 66.7-271 พีพีบี ในถุงขง และ 264 พีพีบี ในแคปซูล

จากการสุ่มตัวอย่างถั่วลิสงบดใส่อาหารจากร้านต่างๆ 6 แห่งในกรุงเทพฯ เมื่อวันที่ 9 กุมภาพันธ์ 2542 พบการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินในปริมาณตั้งแต่ 60-380 พีพีบี (สถาบันอาหาร, 2553) และจากการวิเคราะห์ตัวอย่างเครื่องเทศของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ในระหว่างปี พ.ศ. 2535-2544 จากตัวอย่างเครื่องเทศทั้งหมด 160 ตัวอย่าง พบว่ามีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินเพียง 8 ตัวอย่าง ปริมาณที่พบอยู่ระหว่าง 6.59 -61.28 พีพีบี โดยพบในพริกทั้งเมล็ด 4 ตัวอย่าง พริกป่น 3 ตัวอย่าง และกระเทียมผง 1 ตัวอย่าง ซึ่งมีเพียงพริกทั้งเมล็ด 3 ตัวอย่างเท่านั้น ที่พบอะฟลาทอกซินเกินมาตรฐาน 20 พีพีบี ปริมาณที่พบ คือ 23.73, 30.70 และ 61.28 พีพีบี (ดวงจันทร์, 2553)

## 2.7 การกำหนดค่าปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหาร

เนื่องจากสารพิษอะฟลาทอกซินมีความรุนแรงมาก แม้ในปริมาณน้อยก็สามารถทำให้เกิดอันตรายได้ ดังนั้นหน่วยงานที่เป็นผู้กำหนดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน จึงมักกำหนดเป็นส่วนในพันล้านส่วน (ppb) หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และในบางครั้งอาจใช้เป็นส่วนในล้านส่วน (ppm) โดยปริมาณสูงสุดของอะฟลาทอกซินที่อนุญาตให้มีได้ในผลิตผลทางการเกษตร ในอาหารสัตว์และอาหารมนุษย์นั้น มีการกำหนดแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ดังตารางที่ 2.1 ซึ่งจากประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ที่ประกาศในราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 103 ตอนที่ 23 ฉบับพิเศษ ลงวันที่ 16 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2529 ได้กำหนดให้อาหารมีอะฟลาทอกซินปนเปื้อนได้ไม่เกิน 20 พีพีบี (ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม)

ตารางที่ 2.1 ค่ากำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินต่ำสุดที่อนุญาตให้มีในอาหารต่างๆในบางประเทศ (อมรา 2547)

ชนิดของสาร	ประเทศ	ชนิดของอาหาร	ค่าต่ำสุดที่ยอมให้มีได้ (พีพีบี)
อะฟลาทอกซิน B1	ออสเตรเลีย	อาหารทุกชนิด	5
	ญี่ปุ่น	อาหารสัตว์ทุกชนิด	10
	ญี่ปุ่น	อาหารทุกชนิด	10-20
อะฟลาทอกซิน ทุกชนิด	ไทย	อาหารทุกชนิด	20
	อเมริกา	อาหารทุกชนิด	20
	อเมริกา	อาหารสัตว์ทุกชนิด	20-300
	นิวซีแลนด์	อาหารนำเข้าทุกชนิด	15
อะฟลาทอกซิน M1	อเมริกา	นม	0.5
	ไทย	นม	0
	ญี่ปุ่น	นม	0.5
	ประเทศอื่นๆ	นม	0.01-0.5

จากประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2537 ซึ่งประกาศในราชกิจจานุเบกษาฉบับประกาศทั่วไปเล่ม 112 ตอนพิเศษ ลงวันที่ 10 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2538 ได้กำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพ โดยมีปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารต่างๆ ดังนี้

1) ประเภทวัตถุดิบ เช่น กากถั่วเหลืองที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินมากกว่า 50 พีพีบี กากถั่วลิสงที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินมากกว่า 500 พีพีบี ปลาป่นที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินมากกว่า 40 พีพีบี รำข้าว รำละเอียด รำหยาบและรำสกัดน้ำมันที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินมากกว่า 50 พีพีบี ข้าวโพดป่นและข้าวโพดเมล็ดที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินมากกว่า 100 พีพีบี

2) ประเภทวัตถุดิบที่ผสมแล้ว ได้แก่

ก. หัวอาหารสุกรที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินมากกว่า 50 พีพีบี หัวอาหารเป็ดที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินมากกว่า 40 พีพีบี หัวอาหารโคกระบือที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินมากกว่า 100 พีพีบี และหัวอาหารสุกร มีปริมาณอะฟลาทอกซินมากกว่า 50 พีพีบี

ข. อาหารสัตว์สำเร็จรูป ได้แก่ อาหารสำเร็จรูปไก่ไข่และไก่เนื้อที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินมากกว่า 100 พีพีบี อาหารสำเร็จรูปเป็ดที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินมากกว่า 30 พีพีบี อาหารสำเร็จรูปสุกรแรกเกิดถึงน้ำหนัก 15 กิโลกรัมที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินมากกว่า 50 พีพีบี อาหาร

สำเร็จรูปสุกรน้ำหนัก 15 กิโลกรัมขึ้นไปที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินมากกว่า 100 พีพีบี อาหารสำเร็จรูปโคอายุไม่เกิน 1 ปีที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินมากกว่า 100 พีพีบี และอาหารสำเร็จรูปโคอายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไปที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินมากกว่า 200 พีพีบี

ประเทศไทยได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินของข้าวโพดและถั่วลิสงมาเป็นเวลานาน (Pitt *et al.*, 1993) โดยก่อนหน้านี้มีการสำรวจพบเชื้อราหลายชนิดที่แยกได้จากข้าวโพดจากท้องตลาด ซึ่งสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน เช่น *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. nomius* ซึ่งพบในปริมาณน้อยมาก (Saito and Tsuruta, 1993) สำหรับ *A. flavus* ที่พบเป็นสายพันธุ์ที่ผิดปกติ (เรียกสายพันธุ์ SBG หรือ *A. flavus* Group II) คือผลิตทั้งสารพิษอะฟลาทอกซินชนิด B และ G (Pitt *et al.*, 1993; Saito and Tsuruta, 1993) ซึ่งมีรายงานว่าพบในข้าวโพดและถั่วลิสง ในขณะที่ *A. flavus* ที่พบทั่วไป จะผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินชนิด B เท่านั้น และ *A. parasiticus* และ *A. nomius* จะผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินชนิด B และ G (Fernandez *et al.*, 2001; Saito and Tsuruta, 1993)

## 2.8 การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษอะฟลาทอกซิน

เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีวิธีใดที่สามารถลดพิษหรือทำลายพิษของอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอาหารได้หมดสิ้นอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราจึงเป็นแนวทางที่ดีที่สุดในการแก้ปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของเชื้อราและอะฟลาทอกซิน สำหรับกรรมวิธีต่างๆ ที่ใช้ในการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษอะฟลาทอกซิน ได้แก่

### ก. วิธีทางกายภาพ

1) การคัดแยกเมล็ด (Physical separation) ตัวอย่างเช่น การคัดเลือกเมล็ดถั่วลิสงที่มีเชื้อราและสารพิษปนเปื้อนอยู่ออกไป โดยใช้เครื่องแยกไฟฟ้า (electronic sieving) หรือใช้การคัดแยกด้วยมือ (hand sorting) วิธีเหล่านี้ใช้ได้ดีกับเมล็ดถั่วลิสงกว่าเมล็ดข้าวโพด เนื่องจากสามารถสังเกตเห็นเมล็ดที่มีเชื้อราขึ้นปะปนได้ชัดเจนกว่า โดยสังเกตจากส่วนของเมล็ดที่ถูกทำลายและสีที่เปลี่ยนแปลงไป (ธรรมศักดิ์, 2540)

2) การใช้ความร้อน เช่น การใช้อุณหภูมิไอน้ำเดือดที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง จะสามารถลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินได้ 66 % และถ้าใช้อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียสจะให้ผลที่ดียิ่งขึ้น (ธรรมศักดิ์, 2540)

3) การใช้รังสี (irradiation) วิธีนี้ใช้ได้ผลกับเมล็ดน้ำมัน จากการทดลองใช้รังสีแกมมาพบว่าสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้ถึง 90 % แต่วิธีนี้ยังไม่เป็นที่นิยมใช้กันเพราะอาจมีผลต่อคุณค่าทางอาหาร นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง (Anderson, 1983)

### ข. วิธีการทางชีววิทยา

การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษอะฟลาทอกซินโดยวิธีทางชีววิทยาเป็นการนำเอาจุลินทรีย์ต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รา แอคติโนมัยสีท และสาหร่าย หรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆ มาใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน (Cieger *et al.*, 1966) หรือเป็นการเปลี่ยนรูปโครงสร้างของอะฟลาทอกซินเพื่อทำให้ความเป็นพิษลดลงหรือไม่เกิดความเป็นพิษต่อสัตว์

คุณิและคณะ (2539) พบว่าถั่วเหลืองหนึ่งที่มีการเติมสปอร์ของเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* สามารถยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ในระหว่างการผลิตเทมเป้ ส่วนกนิษฐา (2536) พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ *Rhizopus* sp. - F135, *Rhycomycetes* group - F135 และ *Trichoderma* sp. - ES 136 มีประสิทธิภาพในการลดและสลายอะฟลาทอกซินได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าการใช้แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) สามารถดูดซับอะฟลาทอกซิน M1 ที่ปนเปื้อนใน phosphate buffered saline (PBS) ได้ (Pierides *et al.*, 2000) และการใช้ *Flavobacterium aurantiacum* สามารถดูดซับอะฟลาทอกซิน M1 ที่ปนเปื้อนในน้ำมัน 9.9 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30<sup>0</sup> ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง (Doyle *et al.*, 1982)

Thanaboripat และคณะ (1997) พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus lactis* ร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* และ การเติมเชื้อ *S. lactis* หลังจากเชื้อรา *A. parasiticus* เจริญแล้วเป็นเวลา 3 วัน พบว่าในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างขึ้นจะลดลงจาก 108.33 เป็น 94.18 และ 31.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยง *S. lactis* เป็นเวลา 3 วันก่อนทำการใส่สปอร์ *A. parasiticus* พบว่า *A. parasiticus* สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้เพียง 58.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการศึกษาถึงการเพาะเลี้ยงเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) ในรูปเส้นใยบนเมล็ดข้าวฟ่างเป็นเวลา 3 วันขึ้นไป ก่อนทำการใส่เชื้อรา *A. parasiticus* IMI 10256 พบว่า เส้นใยของเห็ดสามารถยับยั้งการเจริญและสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อราได้ (Thanaboripat *et al.*, 2002)

Thanaboripat และคณะ (2007) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 16 ชนิดต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากเสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*) มีประสิทธิภาพดีที่สุด รองลงมาคือ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย (*Cinnamomum cassia*) และลาเวนเดอร์ (*Lavandula officinalis*) และพบว่าน้ำมันจากเสม็ดขาวที่ความเข้มข้น 25 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) จะมีประสิทธิภาพในยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้อย่างสมบูรณ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 28 วัน

#### ค. วิธีการทางเคมี

1) การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราบางชนิด เพื่อยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* เช่น การใช้สารเคมี thiabendazole หรือ benomyl ในอัตรา 10 พีพีเอ็มขึ้นไป หรือการใช้สารเคมี captan ในอัตราความเข้มข้นที่สูง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ (ทิพวรรณและธรรมศักดิ์, 2531; Garcia and Ilag, 1986) นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเคมีอื่นๆในการยับยั้ง เช่น mercuric chloride (HgCl<sub>2</sub>) แต่การใช้สารเคมีในลักษณะนี้ไม่สามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภคได้ เนื่องจากมีพิษตกค้างค่อนข้างสูง

2) การใช้สารเคมีเพื่อลดความเป็นพิษของสารพิษ เช่น การนำแอมโมเนียมาทดสอบเพื่อลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในข้าวโพด พบว่าแอมโมเนียสามารถลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินจากเดิมที่มีค่ามากกว่า 1,000 พีพีบี ให้เหลือน้อยกว่า 10 พีพีบี สำหรับการนำแอมโมเนียมาใช้จากใช้ได้ทั้งในสภาพก๊าซและของเหลวและอาจจะใช้แอมโมเนียเดี่ยวๆหรือใช้ร่วมกับความร้อนก็ได้ (Anderson, 1983)

Inan และคณะ (2007) ศึกษาผลความเข้มข้นของก๊าซโอโซน (ozone) และเวลาในการให้ก๊าซต่อการลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ในพริกไทยแดงบดละเอียดและพริกไทยแดงสับ พบว่า การใช้โอโซนที่ความเข้มข้น 80 และ 93 % เป็นเวลา 60 นาที สามารถลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ในพริกไทยแดงบดละเอียดและพริกไทยแดงสับ นอกจากนี้ Giorni และคณะ (2008) ยังพบว่าที่ค่าความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มากกว่า 75 % และที่ค่า a<sub>w</sub> 0.95 และ 0.92 สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์และบนเมล็ดข้าวโพด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน

Chitaree และคณะ (1993) พบว่า ความเข้มข้นของเกลือที่ 80, 120 และ 160 มิลลิกรัมต่อกรัม สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ขณะที่เกลือความเข้มข้นต่ำมีผลไปกระตุ้นให้เชื้อรามีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินมากขึ้น

Thanaboripat และคณะ (1996) ศึกษาประสิทธิภาพของสารอนอมอาหาร benzoic acid, sodium benzoate และ potassium metasulfite ที่ระดับความเข้มข้น 2.0, 6.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในการยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเขย่า เป็นเวลา 6 วัน จากการทดลองพบว่า sodium benzoate ที่ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสามารถลดการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ 13 และ 35 % ตามลำดับ benzoic acid ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมสามารถลดการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ 72 และ 87 % ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 6.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้อย่างสมบูรณ์ ขณะที่ potassium metasulfite ที่ความเข้มข้น 2.0, 6.0 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์

จากการศึกษาของ เกศรา (2527) พบว่า ถ้าคลุกและอบถั่วลิสงด้วยสารละลายแอมโมเนียที่มีความเข้มข้น 1 % เป็นเวลา 6-16 วัน ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินจะลดลง 70-80 % แต่ข้อเสียคือ ถั่วลิสงจะมีสีคล้ำ ซึ่งไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าการลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในน้ำมันถั่วลิสงให้ต่ำกว่า 20 พีพีบี สามารถทำได้โดยใช้ดินพอกสีดูดสารพิษนี้ เมื่อกวนดินพอกสี 0.3 % (โดยน้ำหนัก) ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที พบว่าสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินจาก 76 พีพีบี เป็น 7.85 พีพีบี คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันถั่วลิสงซึ่งผ่านกรรมวิธีนี้แล้ว จะมีมาตรฐานตามที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนดไว้ การลดปริมาณอะฟลาทอกซินโดยวิธีนี้ได้ผลดี ไม่ยุ่งยาก อุปกรณ์ที่ใช้ก็มีเพียงถังกวนซึ่งสามารถสร้างขึ้นได้เองและเครื่องกรองที่มีอยู่ในโรงงานผลิตน้ำมันถั่วลิสงแล้ว และค่าใช้จ่ายก็ไม่สูง ซึ่งโรงงานผลิตน้ำมันถั่วลิสงมีการนำกรรมวิธีนี้ไปใช้บ้างแล้ว

ในกรณีของดินเหนียวสมกโทด์ (smactite clay mineral) พบว่าเหมาะที่จะนำมาใช้ดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> เนื่องจากมีความสามารถในการแลกเปลี่ยนแคตไอออน (cation) สูง และมีขนาดอนุภาคที่เล็ก สามารถเข้าสู่พื้นที่ระหว่างชั้นได้ ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้ดินเหนียวชนิดนี้มีความสามารถในการจับกับอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ได้สูงกว่าดินเหนียวชนิดอื่น (คมกริชและคณะ, 2547)

สำหรับทิพย์วรรณและธรรมศักดิ์ (2531) พบว่า propionic acid และ sodium bisulfite ที่ความเข้มข้น 100 พีพีเอ็มมีผลต่อการลดสารพิษอะฟลาทอกซินได้ดี

## 2.9 วิธีการตรวจหาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน

การตรวจหาสารพิษอะฟลาทอกซินจากอาหารหรือวัตถุดิบทางการเกษตรหรือเมล็ดพืช อาหารสัตว์ อวัยวะหรือเนื้อเยื่อ สิ่งขับถ่าย และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เช่น เนื้อ ตับ ไต ไข่ เลือดหรือซีรัม อุจจาระ เป็นต้น ซึ่งวิธีการตรวจหาสารพิษอะฟลาทอกซินมีขั้นตอนดังนี้ (Smith and Moss, 1985; Hirano, 1992)

2.9.1 การสกัดอะฟลาทอกซิน (extraction) วิธีการสกัดตัวอย่างแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของตัวอย่าง เช่น เมล็ดพืช อาหารสัตว์ เนื้อเยื่อสัตว์ ไข่ เลือดหรือซีรัม อุจจาระ เป็นต้น โดยใช้หลักการเดียวกัน คือ

- 1) สารเคมีที่ใช้สกัดสารพิษออกจากตัวอย่าง ได้แก่ คลอโรฟอร์ม หรือเมทานอล
- 2) การใช้เครื่องเขย่าหรือเครื่อง ultrasonic เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สารพิษถูกสกัดออกจากตัวอย่างให้ได้มากที่สุด
- 3) กรณตัวอย่างที่แห้ง เช่น เมล็ดพืช อาหารสัตว์ ให้เติมน้ำกลั่นหรือกรดเกลือ 1 % เพื่อให้ตัวอย่างชุ่มชื้น
- 4) ต้องชั่งน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น เพื่อคำนวณย้อนกลับไปเทียบกับตัวอย่างทั้งหมดหรืออาหารทั้งหมดที่มีการปนเปื้อนสารพิษได้
- 5) ต้องมีการกรองเอากากออก เช่น เมล็ดพืช อาหารสัตว์ หรือทำการปั่นแยกเอากากตะกอนออก เช่น เลือดหรือซีรัม เป็นต้น
- 6) ควรดูดน้ำออกจากสารละลายที่สกัดสารพิษด้วย anhydrous sodium sulfate

2.9.2 การทำสารละลายที่สกัดสารพิษได้ให้ปราศจากสิ่งปนเปื้อน (clean up) ตัวอย่างที่สกัดด้วยสารละลายคลอโรฟอร์มหรือเมทานอล จะประกอบด้วยสารพิษอะฟลาทอกซิน และสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ ของตัวอย่าง ผสมกันอยู่ เช่น สี ไขมัน จึงต้องทำการล้างเอาสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ ออกให้มากที่สุด เพื่อให้เหลือแต่อะฟลาทอกซินที่ต้องการตรวจหา โดยใช้หลักการเดียวกัน คือ

- 1) ใช้ซิลิกาหรือ florisil เป็นสารจับสารพิษอะฟลาทอกซิน
- 2) ใช้ anhydrous sodium sulfate เป็นสารดูดน้ำออก
- 3) ใช้ *n* hexane และ diethyl ether เป็นสารกำจัดสีและไขมัน

2.9.3 การตรวจวัดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่มีอยู่ในตัวอย่างซึ่งผ่านการสกัดและทำให้สารละลายปราศจากสิ่งปนเปื้อนแล้ว มีหลายวิธี คือ

- 1) วิธีทางเคมี ได้แก่ มินิคอลัมน์ (Mini Column) คอลัมน์โครมาโทกราฟี (Column Chromatography) ทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี (Thin Layer Chromatography) และไฮเพรสเซอร์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Pressure Liquid Chromatography) เป็นต้น
- 2) วิธีทางอิมมูโนวิทยา ได้แก่ ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) อิมมูโนแอฟฟินิตีคอลัมน์ (Immuno-Affinity Column) และเรดิโออิมมูโนแอสเส (Radioimmuno

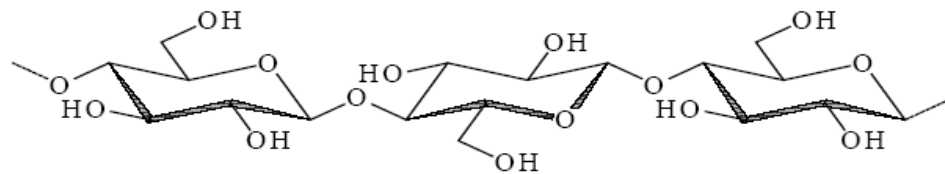
Assay) วิธีนี้สามารถตรวจหาสารพิษเมื่อมีตัวอย่างอาหารที่ต้องการตรวจสอบเป็นจำนวนมากและสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว (สุรลักษณ์, 2538)

ในโรงงานอาหารสัตว์บางแห่งอาจใช้วิธีตรวจหาอะฟลาทอกซินโดยอาศัยคุณสมบัติเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) บนเมล็ด และคัดเลือกเมล็ดที่เรืองแสงสีเขียวหรือสีฟ้าออก ในกรณีนี้ใช้ได้เฉพาะเมล็ดที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในปริมาณสูง และอยู่ที่ผิวเมล็ดเท่านั้น (จักรพันธ์, 2542) นอกจากนี้การฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตยังช่วยลดความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินและทำลายอะฟลาทอกซินในน้ำนมได้

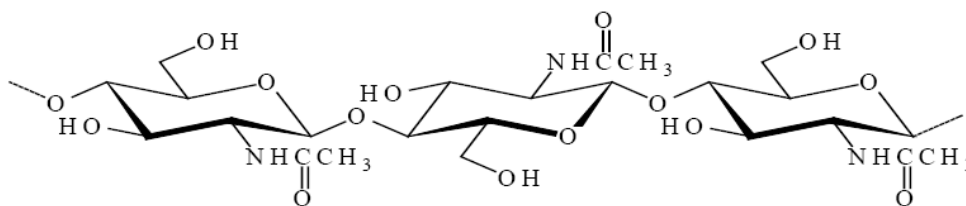
## 2.10 การผลิตไคตินและไคโตซาน

ไคติน (chitin) เป็นสารชีวภาพที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเซลลูโลส (cellulose) แต่จะต่างกันที่ตำแหน่ง C-2 โดยเซลลูโลสจะประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ในขณะที่ไคตินจะประกอบด้วยหมู่อะซิทามิโด (acetamido group) (รูปที่ 2.6) ไคตินไม่สามารถละลายในตัวทำละลายมีขั้วและไม่ขั้ว โดยทั่วไปมักพบไคตินในผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น เห็ด รา รวมทั้งเปลือกของแมลง และสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังประเภทมีข้อและปล้อง อาทิ กุ้ง ปู และแกนปลาหมึก (Merk Index, 1996) ไคโตซาน (chitosan) หรืออนุพันธ์ของไคติน จะได้จากการทำปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซิทิลของไคติน หรือที่เรียกว่าปฏิกิริยา deacetylation โดยการนำไคตินมาแช่ในสารละลายต่างเข้มข้น ซึ่งไคโตซานที่ได้นี้จะเป็นพอลิเมอร์ที่ไม่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์เกือบทั้งหมดและน้ำที่มีค่าพีเอช (pH) เป็นกลางหรือด่าง แต่สามารถละลายได้ในกรดอ่อน (Hayes *et al.*, 1977) สำหรับโครงสร้างของไคโตซานดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.6 (ค)

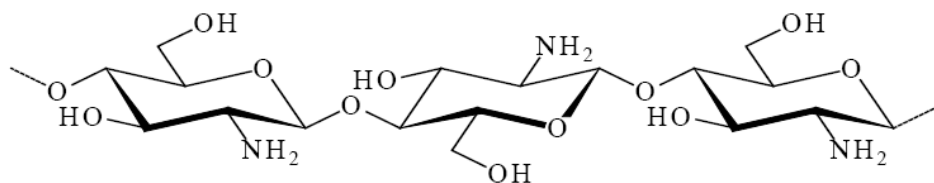
กรรมวิธีการผลิตไคตินและไคโตซานมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องทั้งวิธีทางเคมีและทางชีวภาพ ซึ่งในระดับอุตสาหกรรมมักจะใช้วิธีทางเคมี และวัตถุดิบส่วนใหญ่มาจากกากของเหลือในอุตสาหกรรมอาหารทะเลแช่แข็ง โดยสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของไคตินและไคโตซานที่ได้มีความหลากหลาย ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์เหล่านี้ รวมถึงกรรมวิธีการผลิต ดังนั้นกระบวนการผลิตที่นำเอาเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาผสมผสานกับกระบวนการผลิตทางเคมี จึงมีการพัฒนาขึ้นเพื่อให้ได้สมบัติของผลิตภัณฑ์ไคตินและไคโตซานตามต้องการ และเหมาะสมกับการนำไปใช้ โดยการใช้น้ำหมักในการดึงหมู่อะซิทิลออกจากไคตินนั้นยังอยู่ในระดับห้องปฏิบัติการ (Win *et al.*, 2000; Win and Stevens, 2001) ส่วนวิธีทางเคมีเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน มีข้อเสีย คือ คุณภาพในการผลิตจะควบคุมยาก เครื่องมือที่ใช้ถูกกัดกร่อนอันเนื่องมาจากสารเคมีที่เข้มข้นและประการสำคัญคือเรื่องสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะหาวิธีการผลิตที่ใช้สภาวะที่ไม่รุนแรงนัก แต่ให้คุณภาพผลิตภัณฑ์ไคโตซานตามต้องการ การสกัดไคโตซานจากไคตินสามารถทำได้โดยการแช่ไคตินในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น (40 - 50 %) ที่อุณหภูมิ 100°C หรือสูงกว่า เพื่อให้หมู่อะซิทิลบางส่วนหรือทั้งหมดถูกดึงออกจากพอลิเมอร์ (Muzzarelli, 1977) ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไคโตซาน ได้แก่ อุณหภูมิ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา ความเข้มข้นของด่าง สภาวะในการผลิตไคติน บรรยากาศและอัตราส่วนของไคตินต่อสารละลายต่างเข้มข้น เป็นต้น



(ก) โครงสร้างของเซลลูโลส



(ข) โครงสร้างของไคติน



(ค) โครงสร้างของไคโตซาน

รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส ไคตินและไคโตซาน

## 2.11 ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และการใช้ประโยชน์

*Saccharomyces cerevisiae* (รูปที่ 2.7) เป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต (Eucaryote) จัดอยู่ใน Kingdom: Fungi, Phylum: Ascomycota, Subphylum: Saccharomycotina, Class: Saccharomycetes, Order: Saccharomycetales, Family: Saccharomycetaceae, Genus: *Saccharomyces* และ Species: *cerevisiae* เซลล์ยีสต์ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม หรือรี ขนาดของยีสต์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ลักษณะเด่นคือ เป็นเซลล์เดี่ยวและมีหน่อ (bud) การแตกหน่อ (budding) ในบางครั้งไม่หลุดออกจากกัน แต่เกาะกันเป็นกลุ่ม บางครั้งมีการเปลี่ยนแปลงโดยเซลล์ตรงกลางยาวต่อกันเป็นสาย มีลักษณะคล้ายเส้นใย เรียกว่า pseudomycelium องค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ (Kurtzman และ Fell, 1998) ได้แก่



รูปที่ 2.7 ลักษณะยีสต์ *S. cerevisiae*

ที่มา: <http://habitatnews.nus.edu.sg/news/labrador/blog/2005/04/yeast>

1) แคปซูล (capsule) ยีสต์บางชนิดมีสารเมือกเหนียวที่ขับออกสู่ภายนอกเซลล์ที่เรียกว่าแคปซูล แคปซูลส่วนใหญ่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีทั้ง heteropolysaccharide แมนโนส (mannose) และสารที่คล้ายแป้ง

2) ผนังเซลล์ (cell wall) ยีสต์ที่มีอายุน้อยจะมีผนังเซลล์บางและผนังเซลล์จะหนาขึ้นเมื่อมีอายุมากขึ้น องค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* (รูปที่ 2.8 และ 2.9) ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ 2 ชนิด คือ glucan 30-34 % และ mannan 30 % สำหรับ glucan (ประกอบด้วย D-glucose) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในยีสต์ต่างๆ แต่ mannan (ประกอบด้วย D-mannose) จะไม่พบในผนังเซลล์ของ *Schizosaccharomyces*, *Nadsonia*, *Rhodotorula* และราที่มีเส้นใยทุกชนิด ผนังเซลล์ของยีสต์มีโปรตีนประกอบอยู่ด้วย โดยโปรตีนบางชนิดทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ มีไขมัน 8.5 – 13.5 % ส่วนปริมาณไคตินเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของยีสต์

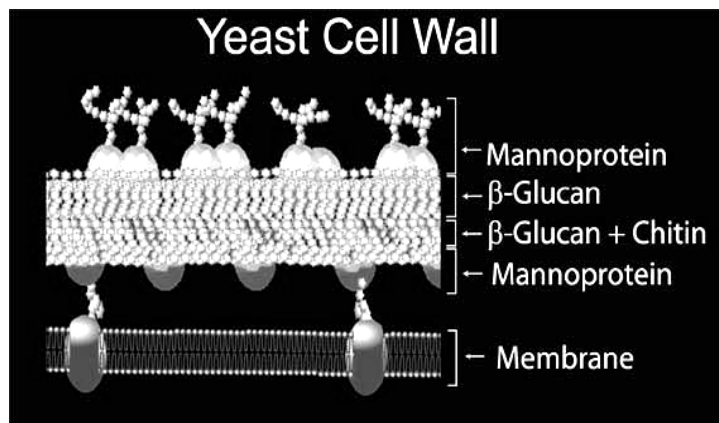
3) เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) มีความหนาประมาณ 8 ไมโครเมตร ประกอบด้วยไขมัน (รวมทั้ง phospholipid) โปรตีน และ พอลิแซ็กคาไรด์

4) องค์ประกอบใน protoplasm ประกอบด้วย cytoplasm ซึ่งเป็นสารกึ่งเหลวภายในมีไรโบโซม (ribosome) ที่มี RNA และ organelle ที่มีเยื่อหุ้ม ได้แก่ endoplasmic reticulum

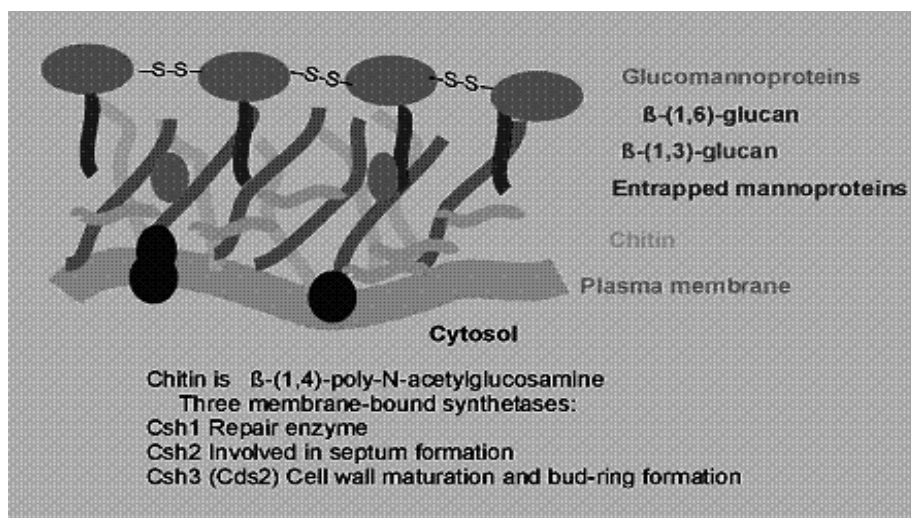
5) นิวเคลียส (nucleus) เป็น organelle ที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสล้อมรอบ นิวเคลียสมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึม และการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต

6) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.3-1 ไมโครเมตร และความยาว 3 ไมโครเมตร มีเยื่อหุ้มสองชั้น ชั้นในจะพับเข้าข้างใน (cristae) ไมโทคอนเดรียประกอบด้วย lipoprotein จำนวนมาก และมี RNA และ DNA เล็กน้อย

7) แวคิวโอล (vacuole) ภายในเซลล์ยีสต์จะมีแวคิวโอลซึ่งมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเมื่อย้อมสี ในเซลล์ที่กำลังเจริญ ภายในแวคิวโอลจะไม่มีโครงสร้างที่เป็นชิ้นส่วน แต่เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ “stationary phase” แวคิวโอลจะมีสารแกรนูล (granule) เพิ่มขึ้น อาจเป็น metaphosphate, polyphosphate หรือ lipid สารที่อยู่ในแวคิวโอลที่แยกได้ ได้แก่ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ



รูปที่ 2.8 แสดงภาพผนังเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*  
ที่มา : [www.sigmaldrich.com/Life-scienc...mes.html](http://www.sigmaldrich.com/Life-scienc...mes.html)



รูปที่ 2.9 แสดงองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*  
ที่มา : [www.sbtthai.com/sbtold/education...main.htm](http://www.sbtthai.com/sbtold/education...main.htm)

การย่อย (hydrolyze) เช่น protease, ribonuclease และ esterase จากการที่พบเอนไซม์ไฮโดรเลสในแวคิวโอล จึงคาดว่าแวคิวโอลเปรียบเหมือนไลโซโซม (lysosome)

8) inclusion ยีสต์บางชนิดสะสมสารต่างๆไว้จำนวนมาก เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือโปรตีน บางชนิดมีรงควัตถุสีเหลือง ส้ม ชมพู น้ำตาลหรือดำ รงควัตถุเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็น

carotenoid ที่ละลายในไขมัน นอกจากนี้ยังควัตถุ เช่น ไซโตโครม (cytochrome) และอื่นๆ ที่พบในเซลล์พืชและสัตว์ชั้นสูง ก็พบในยีสต์ด้วย

**ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ได้แก่** (สาวิตรี, 2549)

1) อาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ใช้ได้ดี ได้แก่ น้ำตาล โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทส สำหรับพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ได้ คือ แป้ง

2) อุณหภูมิ ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่ *S. cerevisiae* สามารถเจริญได้ ประมาณ 35-47 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญได้อยู่ระหว่าง 0-5 องศาเซลเซียส นอกจากอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญแล้ว ยังมีผลต่อการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) ของยีสต์อีกด้วย อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแอสโคสปอร์ของ *S. cerevisiae* อยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส สูงสุดประมาณ 35 องศาเซลเซียส และต่ำสุด 11-12 องศาเซลเซียส

3) ออกซิเจน ยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นพวก facultative anaerobe แต่เจริญได้ดีในสภาพมีออกซิเจน ส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจนจะเจริญได้ช้า ในสภาพที่มีออกซิเจนนั้น ยีสต์จะใช้น้ำตาลในกระบวนการหายใจเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ให้มากขึ้น ซึ่งปรากฏการณ์นี้เรียกว่า Pasteur effect และในกรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลสูงจะทำให้กระบวนการหายใจของยีสต์ถูกยับยั้ง และเกิดกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ขึ้นแทนที่ ถึงแม้ว่าในอาหารจะมีปริมาณออกซิเจนเพียงพอก็ตาม ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า Crabtree effect หรือ glucose effect หรือ reverse pasteur effect

4) พีเอช (pH) ยีสต์ *S. cerevisiae* เจริญได้ในพีเอชช่วงกว้าง พีเอชต่ำสุดที่สามารถเจริญได้คือ 1.5 ส่วนพีเอชสูงสุด คือ 8.0 นอกจากพีเอชจะมีผลต่อการเจริญแล้วยังมีผลต่อการสร้างแอสโคสปอร์ของ *S. cerevisiae* อีกด้วย พีเอชที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของ *S. cerevisiae* สูงสุดคือ 9.1-9.2 ที่ต่ำสุดคือ 2.4-2.6

**ความสำคัญของ *Saccharomyces cerevisiae* ในอุตสาหกรรมต่างๆ (ดุษณี, 2555)**

1) ใช้ในการผลิตยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast) ยีสต์ขนมปังประกอบด้วยเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ *S. cerevisiae* หน้าที่ของยีสต์ขนมปังคือทำให้ขนมปังฟูและมีลักษณะเป็นเนื้อ ขนมปังตามที่ต้องการ ยีสต์ขนมปังมีการผลิตเป็น 3 รูปแบบ คือ

*ยีสต์สด* (fresh หรือ compressed yeast, CY) เป็นยีสต์ที่อัดกันเป็นก้อน ปกติมี 2 ขนาด คือ 0.454 กก. และ 2.27 กก. มีลักษณะคล้ายก้อนเนย มีสีครีม มีความชื้นอยู่ประมาณ 70% ยีสต์สดนี้จำเป็นต้องเก็บไว้ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 1-5°C. จนกว่าจะนำมาใช้

*ยีสต์เม็ดหรือยีสต์น้ำ* (active dry yeast, ADY) เป็นยีสต์แห้งที่ได้จากการนำยีสต์สดไปอบแห้ง จนเหลือความชื้น 7.5-8.5% เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา ก่อนที่จะนำยีสต์เม็ดหรือยีสต์น้ำมาใช้ในการทำขนมปังจะต้องนำมาละลายน้ำก่อน

*ยีสต์ผง* (instant active dry yeast, IADY) เป็นยีสต์แห้งที่ได้จากการนำยีสต์สดไปอบแห้ง มีความชื้นเพียง 4-6% สามารถใช้ผสมกับแป้งทำขนมปังได้ทันทีโดยไม่ต้องนำมาละลายน้ำก่อนใช้

2) ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein หรือ SCP) เพื่อเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารของมนุษย์และสัตว์ ยีสต์เป็นโปรตีนเซลล์เดียวที่มีการนำมาใช้กันมากที่สุด เนื่องจากยีสต์มี

คุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับมนุษย์และสัตว์ การใช้ยีสต์เป็นอาหารมีมานานตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 1 ชาวเยอรมันได้บริโภคยีสต์เป็นอาหารเสริมโปรตีน ซึ่งยีสต์ที่ใช้ในการบริโภคคือ *S. cerevisiae* โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งอาหาร และในสมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 ในประเทศเยอรมันก็มีการผลิต *Torula yeast (Candida utilis)* จากของเสียจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษเป็นวัตถุดิบและจากน้ำตาลที่ได้จากการใช้กรดย่อยเนื้อไม้ โปรตีนที่ผลิตได้นี้ใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับมนุษย์ นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถใช้ผลพลอยได้ทางการเกษตรหรืออุตสาหกรรมเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ เช่น กากน้ำตาล วัตถุดิบพวกแป้ง หางนม ผลไม้ และน้ำทิ้งจากโรงงานต่าง ๆ เป็นต้น

3) ใช้ในการหมักปุ๋ย (puto) ซึ่งเป็นอาหารของชาวฟิลิปปินส์ มีลักษณะคล้ายข้าวหมากทำจากข้าวบดผสมผสมน้ำและหมักด้วยยีสต์เพื่อให้เกิดกรดและก๊าซ

4) ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ส่วนใหญ่คือยีสต์ *S. cerevisiae* หรือ *S. carlsbergensis* ความแตกต่างระหว่างยีสต์ 2 ตัวนี้คือ *S. carlsbergensis* สามารถใช้น้ำตาลแรฟฟิโนส (raffinose) ได้ในขณะที่ *S. cerevisiae* ไม่สามารถใช้น้ำตาลนี้ได้ โดย *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมแอลกอฮอล์ในปัจจุบัน เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีการผลิตทั่วโลกจะมีหลายชนิดแตกต่างกันไปตามรสชาติ แอลกอฮอล์ที่ผลิตได้จะอยู่ในรูปของเหลวที่เก็บเกี่ยวได้หลังจากกระบวนการหมักสิ้นสุดลง โดยวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ส่วนใหญ่ได้แก่วัตถุดิบที่มีน้ำตาล เช่น น้ำผลไม้ น้ำผึ้ง หรือพืชที่มีน้ำตาล เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถนำวัตถุดิบที่แบ่งเป็นส่วนประกอบมาใช้ในการผลิตได้ด้วย เช่น เมล็ดธัญพืชต่าง ๆ หรือพืชหัวต่างๆ ซึ่งจำเป็นต้องนำมาย่อยให้เป็นน้ำตาลก่อนที่จะนำมาหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม ภายหลังจากกระบวนการหมักสิ้นสุดลงของเหลวที่ได้จะมีแอลกอฮอล์ในปริมาณต่างๆ กันไปแล้วแต่ชนิดของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ต้องการผลิต เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มียีสต์เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิต เช่น

*เบียร์* เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ได้จากกระบวนการหมักของข้าวมอลต์ น้ำฮอป (hop) และยีสต์ แต่ในปัจจุบันนี้มีเพียงประเทศเยอรมันประเทศเดียวเท่านั้นที่มีการผลิตเบียร์ตามความหมายนี้ แต่ประเทศอื่น ๆ จะมีการใช้ธัญพืชอื่น ๆ ผสมกับข้าวมอลต์ในการผลิตเบียร์ ธัญพืชที่ใช้ได้แก่ ข้าวโพด ข้าว และข้าวสาลี เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต การหมักเบียร์ในสมัยโบราณจะไม่มี การเติมเชื้อยีสต์ลงไป แต่จะอาศัยเชื้อยีสต์จากธรรมชาติที่ติดมากับธัญพืชที่ใช้หมัก ในปัจจุบันมีเบียร์เพียง 2 ชนิดที่ยังใช้การหมักด้วยเชื้อธรรมชาติคือ gueuze beer และ lambic beer ของประเทศเบลเยียม สำหรับเบียร์ที่มีการผลิตกันมากทั่วโลกในปัจจุบันนี้มีอยู่ 2 ชนิดคือ ale และ lager ซึ่งเบียร์ทั้งสองชนิดนี้แตกต่างกันที่สายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ในการหมักและสภาวะที่ใช้ในการหมัก lager beer จะผลิตโดยกระบวนการหมักที่เรียกว่า bottom fermentation ส่วน ale จะผลิตโดยกระบวนการหมักที่เรียกว่า top fermentation โดย bottom fermentation เป็นการหมัก lager beer โดยใช้ยีสต์ *S. uvarum (S. carlsbergensis)* เบียร์ชนิดนี้นิยมผลิตในประเทศเยอรมนีและทวีปอเมริกาเหนือ แต่ในปัจจุบันเบียร์ชนิดนี้นิยมบริโภคกันทั่วโลก ในระหว่างการหมักเบียร์ยีสต์จะแขวนลอยอยู่ในถังหมักและใช้น้ำตาลในวอร์ต เมื่อน้ำตาลในวอร์ตตกลงเกือบหมดแล้วยีสต์จะเริ่มเกาะกันเป็นกลุ่มและจมลงสู่ก้นถังหมัก การตกตะกอนนี้เรียกว่า flocculation ยีสต์ที่ตกตะกอนนี้จะถูกแยกไปหลังจากกระบวนการหมักสิ้นสุดลงแล้ว สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก lager beer คือ 6-15°C. และเวลาที่ใช้ในการหมักจะเป็น 7-12 วัน สำหรับ top fermentation เป็นการ

หมัก ale โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* แต่ในบางครั้งอาจใช้เชื้อ *Brettanomyces* sp. ในการผลิต ale เพื่อการส่งออก เบียร์ชนิดนี้นิยมผลิตในประเทศอังกฤษและไอร์แลนด์ ในระหว่างการหมักเชื้อยีสต์จะลอยขึ้นมาอยู่ที่ผิวหน้าของวอร์ต มีลักษณะเป็นชั้นยีสต์ที่หนา อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักจะอยู่ระหว่าง 18-22°C. เวลาที่ใช้ในการหมักคือ 5-7 วัน หลังจากกระบวนการหมักสิ้นสุดลงชั้นของยีสต์ที่ผิวหน้าจะถูกแยกออกไป โรงงานเบียร์บางแห่งในประเทศสหรัฐอเมริกาจะผลิตทั้ง lager beer และ ale โดยใช้ยีสต์ *S. uvarum* เพียงสายพันธุ์เดียวเพื่อกำจัดปัญหาการแยกเก็บรักษาเชื้อยีสต์ 2 ชนิด

**ไวน์** เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักน้ำองุ่นโดยยีสต์ องุ่นทั่ว ๆ ไปที่ใช้ในการหมักไวน์คือ องุ่นพันธุ์ *Vitis vinifera* แต่ในแถบอเมริกาเหนือจะใช้องุ่นหลายพันธุ์ เช่น *V. labruska*, *V. rotundifolia*, *V. rupestris* และลูกผสมระหว่างพันธุ์เหล่านี้กับพันธุ์ *V. vinifera* การทำไวน์จะเป็นการนำองุ่นมาบดและนำน้ำคั้นที่ได้ซึ่งเรียกว่า must มาหมักในถังหมักเป็นระยะเวลาหนึ่งเพื่อให้ได้ไวน์ชนิดที่ต้องการ หลังจากการหมักสิ้นสุดลงไวน์จะถูกนำมาบรรจุในถังไม้เพื่อบ่มจนกระทั่งเหมาะที่จะมาดื่ม ในระหว่างการบ่มจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีทำให้เกิดกลิ่นและรสแก่ไวน์ สิ่งที่สำคัญที่สุดในการทำไวน์คือการกำจัดแทนนิน เพกนิน โปรตีน และ phenolic ออกไปเนื่องจากสารเหล่านี้มีผลต่อคุณภาพของไวน์ที่ผลิตได้ ยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์ (wine yeast) เป็นยีสต์ที่สามารถเจริญได้ในน้ำองุ่นที่มีความเป็นกรดสูง สามารถทนเอทานอลในปริมาณสูงกว่า 10% (ปริมาตรต่อปริมาตร) และทนต่อปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ในปริมาณต่ำที่เติมลงไปในการหมักไวน์เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้ ยีสต์ที่ใช้ในการหมักไวน์ส่วนใหญ่คือ *S. cerevisiae* แต่เดิมเชื้อยีสต์นี้มีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน แต่ในปัจจุบันนักอนุกรมวิธานได้จัดจำแนกยีสต์ต่าง ๆ ที่ใช้ในการหมักไวน์ซึ่งเป็นชนิดเดียวกันไว้ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งถึงแม้ว่ายีสต์บางสายพันธุ์จะจัดไว้ในกลุ่มเดียวกันกับ *S. cerevisiae* แต่ก็มี ความแตกต่างกันในการทำไวน์

5) ใช้ในการผลิตเอนไซม์ เช่น อินเวอร์เทส (invertase) ที่ใช้ย่อยน้ำตาลซูโครสให้เป็นกลูโคสและฟรักโทส ใช้กำจัดน้ำตาลออกจากอาหาร ใช้ป้องกันการตกผลึกในกาน้ำตาล ใช้ในการผลิตน้ำตาลแปร (invert sugar) ซึ่งมีความหวานมากกว่าน้ำตาลซูโครส ใช้ในการทำลูกกวาดและขนมต่าง ๆ

6) มีบทบาทในการหมักผลิตภัณฑ์อาหารพื้นบ้าน เช่น พูโตเป็นอาหารหมักของชาวฟิลิปปินส์ มีลักษณะคล้ายข้าวหมากของไทย และโอดลิจของอินเดีย ทำจากข้าวบดผสมน้ำและหมักเพื่อให้เกิดกรดและก๊าซ คุณภาพของพูโตที่ผลิตได้จะขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติในข้าว โดยจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมักได้แก่ แบคทีเรียพวกแลคติก และ *S. cerevisiae* กรรมวิธีการหมักพูโตแบบดั้งเดิมจะใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 42 ชั่วโมง ซึ่งอาจลดระยะเวลาการหมักให้สั้นลงได้โดยการใช้กล้าเชื้อที่มีเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus faecalis* และ *S. cerevisiae* ซึ่งพูโตที่หมักได้จะมีรสชาติ เนื้อสัมผัส และกลิ่นเช่นเดียวกับพูโตที่ผลิตโดยกรรมวิธีดั้งเดิม

### 2.1.2 การใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการดูดจับสารพิษ

จุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรียและเชื้อราสามารถย่อยสลายสารพิษจากเชื้อราได้ เช่น *Flavobacterium aurantiacum*, *Corynebacterium rubrum*, *Candida lipolitica*, *Aspergillus*

*niger*, *Trichoderma viride*, *Armillariella tabescens*, *Neurospora* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp. (Bata and Lasztity, 1999, Ciegler *et al.*, 1966) แต่จุลินทรีย์เหล่านี้อาจไม่เหมาะสมกับการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเหมือนยีสต์เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีความสำคัญและใช้ในการผลิตอาหารหมักทั่วโลก ซึ่งจากการศึกษาของ Shetty และ Jespersen (2006) โดยทดลองนำยีสต์ *S. cerevisiae* กับ lactic acid bacteria มาใช้ในการลดการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) พบว่าสามารถลดปริมาณของสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหารได้ดีและมีความปลอดภัยด้วย Shetty และคณะ (2007) พบว่า ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากอาหารหมักในประเทศ Ghana และ West Africa สามารถดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบว่ายีสต์ 3 สายพันธุ์สามารถดูดจับอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ได้มากกว่าร้อยละ 40 และยังพบว่าเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต บางสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการดูดจับสารพิษได้ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ Santin และคณะ (2003) พบว่าในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ โดยปกติจะมีการเติมเซลล์ของ *S. cerevisiae* ในอาหารไก่เพื่อใช้เป็น โปรไบโอติก (Probiotic) โดยยีสต์ที่เติมในอาหารไก่นั้นจะเป็นส่วนผนังเซลล์ซึ่งเป็นผลพลอยได้ (By-Product) จากกระบวนการผลิตเบียร์ และเมื่อทดลองให้หนูที่ได้รับสารอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> กินอาหารที่ผสมด้วยยีสต์แห้งและผนังของเซลล์ยีสต์ พบว่าความเป็นพิษที่เกิดจากสารอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

จากการศึกษาของ Baptista และคณะ (2004) พบว่ายีสต์แห้งและผนังเซลล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถลดปริมาณความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ได้ ดังนั้นยีสต์จึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพที่จะนำมาใช้ในการแก้ปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในอาหารได้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 เชื้อจุลินทรีย์

- 3.1.1 เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5013
- 3.1.2 เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5047
- 3.1.3 เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5094
- 3.1.4 เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5278
- 3.1.5 เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5337

ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เทคโนโลยีแห่งประเทศไทย คลองห้า อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

#### 3.2 สารเคมีและอุปกรณ์

##### 3.2.1 สารเคมี

- 3.2.1.1 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (Phosphate buffer saline) พีเอช 6.0
- 3.2.1.2 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 โมลาร์ (Hydrochloric acid)
- 3.2.1.3 สารอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> (Aflatoxin B<sub>1</sub>) บริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน
- 3.2.1.4 กรดแอสติก (Acetic acid) เข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.1.5 เมทานอล (Methanol, grade HPLC)
- 3.2.1.6 กลูโคส (Glucose)
- 3.2.1.7 เปปโตน (Peptone)
- 3.2.1.8 สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)
- 3.2.1.9 สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
- 3.2.1.10 วุ้น (Agar)
- 3.2.1.11 ไคโตซาน (Chitosan)
- 3.2.1.12 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์
- 3.2.1.13 ข้าวเปลือก
- 3.2.1.14 ข้าวโพดแห้ง

##### 3.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.2.2.1 เครื่องแก้วต่างๆ
- 3.2.2.2 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE 600 บริษัท Memmert ประเทศเยอรมัน
- 3.2.2.3 ตู้ปลอดเชื้อ รุ่น UV-126
- 3.2.2.4 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) Falcon 6/300 บริษัท Sanyo ประเทศญี่ปุ่น

- 3.2.2.5 กล้องจุลทรรศน์ บริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
- 3.2.2.6 เครื่องมือวัดความเข้มข้น Haemocytometer
- 3.2.2.7 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ (Autoclave) Hirayama รุ่น Kiclave ประเทศญี่ปุ่น
- 3.2.2.8 เครื่องเขย่า (shaker) บริษัท Gallencamp ประเทศญี่ปุ่น
- 3.2.2.9 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) รุ่น Class VC-5 บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
- 3.2.2.10 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) บริษัท Shimadzu รุ่น LC-20A ประเทศญี่ปุ่น
- 3.2.2.11 กระจกบดปั่นเหวี่ยง ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3.2.2.12 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) Eutech instrument P4510 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.2.2.13 ชุดกรอง Millipore จากประเทศอินเดีย
- 3.2.2.14 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
- 3.2.2.15 เช็มฉีดยา
- 3.2.2.16 เครื่องชั่ง รุ่น BA 610 บริษัท Sartorius ประเทศเยอรมัน

### 3.3 วิธีการทดลอง

#### 3.3.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อยีสต์

3.3.1.1 นำเชื้อ *S. cerevisiae* ทั้ง 5 สายพันธุ์มาถ่ายลงในหลอดอาหาร malt yeast extract glucose peptone (MYGP) (ภาคผนวก ก.) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.1.2 ถ่ายเชื้อยีสต์จาก 3.3.1.1 ลงในอาหารเหลว MYGP ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับให้มีความเข้มข้นของยีสต์เริ่มต้นเป็น  $10^4$  เซลล์ต่อ มิลลิลิตร ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งความเข้มข้นของเซลล์ มีค่า Optical density (O.D.) เป็น 1.0 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.3.1.3 เก็บเกี่ยวเซลล์ที่มีความเข้มข้นตามที่กำหนด นำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย PBS (phosphate buffer saline, pH 6.0) (ภาคผนวก ก.) ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีทุกครั้งที่ทำการล้างเซลล์

3.3.1.4 นับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี direct count โดยใช้วิธี haemocytometer (ภาคผนวก ข.)

3.3.1.5 นำเซลล์ไปทำให้แห้งโดยการนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman no.1 นำไปอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### 3.3.2 การปรับสภาพเซลล์ (Treatment of cell) (Shetty และคณะ, 2007)

3.3.2.1 คัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการดูดจับสารอะฟลาทอกซินที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเซลล์มีค่า O.D. เท่ากับ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.3.2.2 ถ่ายเซลล์ลงใน PBS 10 มิลลิลิตร ปรับสภาพเซลล์โดยการใช้ความร้อน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หรือปรับสภาพเซลล์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงพร้อมกับเขย่าเบาๆ

3.3.2.3 นำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย PBS ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีทุกครั้งที่ทำกรล้างเซลล์

### 3.3.3 การเตรียมสารพิษอะฟลาทอกซินมาตรฐาน

เจือจางสารพิษอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเมทานอลเกรด HPLC จากนั้นปรับความเข้มข้นให้ได้ 160, 80, 40, 20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

### 3.3.4 การทดสอบความสามารถในการดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซินโดยยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ

3.3.4.1 นำเซลล์ที่ล้างด้วย PBS บัฟเฟอร์มาปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 10<sup>9</sup> เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ประมาณ 30 มิลลิลิตรของน้ำหนักเซลล์แห้ง)

3.3.4.2 ชั่งเซลล์ที่มีน้ำหนัก 300 มิลลิกรัม นำไปบดให้ละเอียด

3.3.4.3 ผสมสารละลาย PBS ปริมาตร 9.50 มิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซิน B1 เข้มข้น 10.0 ไมโครกรัม ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันกับตัวเซลล์ ทำชุดควบคุมโดยผสมสารละลาย PBS และสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซิน B1

3.3.4.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.3.4.5 นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.3.4.6 คัดเลือกเก็บเฉพาะส่วนใส (supernatant)

3.3.4.7 ในกรณีชุดควบคุม (Control) ที่มีเฉพาะสารพิษมาตรฐานอะฟลาทอกซิน ไม่มีเชื้อ *S. cerevisiae*

3.3.4.8 นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินด้วยด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

### 3.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน

นำสารละลายส่วนใสที่มีสารพิษอะฟลาทอกซินมากรองด้วยแผ่น membrane filter (Millipore) 0.45 ไมโครเมตร ใส่ในขวดเล็ก (vial) นำสารละลายส่วนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และทำการเปรียบเทียบผลการทดลองทำได้โดยทำการฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงที่ต่อด้วยคอลัมน์ (column) ชนิด reverse phase column (supercosil TMLC - 18) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 250 x 4.6 มิลลิเมตร และ mobile

phase ที่ใช้คือ น้ำ : กรดแอสซิดิก: เมทานอล ในอัตราส่วน 45 : 5 : 50 ค่าอัตราการไหล (Flow rate) คือ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ 365 นาโนเมตร เปรียบเทียบผลกับกราฟมาตรฐาน

### 3.3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของดันแคน (Duncan's new multiple rang test, DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $p < 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ยโปรแกรม SPSS

### 3.3.7 การศึกษาความสามารถในการดูดซับอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

3.3.7.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกได้ โดยใช้วิธีเดียวกันกับข้อ 3.3.1

3.3.7.2 การเตรียมสารอะฟลาทอกซินมาตรฐาน โดยการเจือจางสารอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ให้ได้ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเมทานอลเกรด HPLC

#### 3.3.7.3 การศึกษาความสามารถในการดูดซับสารอะฟลาทอกซิน

การศึกษาความสามารถในการดูดซับสารอะฟลาทอกซิน ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่มการทดลอง ดังนี้

1) กลุ่มวัตถุบับซึ่งข้าวโพดและข้าวเปลือกบดละเอียดอย่างละ 2.5 กรัม ผสมกับสารละลาย PBS (pH 6.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2) กลุ่มควบคุม ซึ่งข้าวโพดและข้าวเปลือกบดละเอียดอย่างละ 2.5 กรัม ผสมกับสารละลาย PBS (pH 6.0) ปริมาตร 95 มิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3) กลุ่มที่ 1 ซึ่งข้าวโพดและข้าวเปลือกบดละเอียดอย่างละ 2.5 กรัมและซึ่งเซลล์ยีสต์แห้งที่นำไปบดละเอียดและมีน้ำหนัก 300 มิลลิกรัม ผสมกับสารละลาย PBS (pH 6.0) ปริมาตร 95 มิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

4) กลุ่มที่ 2 ซึ่งข้าวโพดและข้าวเปลือกบดละเอียดอย่างละ 2.5 กรัมและซึ่งเซลล์ยีสต์แห้งที่นำไปบดละเอียดและมีน้ำหนัก 300 มิลลิกรัม นำยีสต์มาตรึงกับไคโตซาน (ละลายด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์) ที่มีน้ำหนัก 300 มิลลิกรัม ตามวิธีของรินดาและคณะ (2541) ผสมกับสารละลาย PBS (pH 6.0) ปริมาตร 95 มิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> เข้มข้น 50 ไมโครกรัม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

หลังจากนั้นนำแต่ละกลุ่มการทดลองที่เตรียมไว้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำสารตัวอย่างในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง

ไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บสารละลายส่วนใส (supernatant) เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินต่อไป

**3.3.7.4 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารอะฟลาทอกซิน** โดยวิธีสกัดและวิเคราะห์ เช่นเดียวกันกับข้อ 3.3.5

#### **3.3.7.5 การวิเคราะห์ข้อมูล**

จากการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในแต่ละชุดการทดลองที่ศึกษา จะนำมาคำนวณค่าร้อยละการดูดจับอะฟลาทอกซินของตัวอย่างแต่ละชนิด โดยร้อยละของการดูดจับอะฟลาทอกซินมีค่าเท่ากับ (ปริมาณอะฟลาทอกซินในกลุ่มควบคุม - ปริมาณอะฟลาทอกซินในแต่ละกลุ่มทดลอง)/ปริมาณอะฟลาทอกซินในกลุ่มควบคุม  $\times 100$  และนำข้อมูลทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยโปรแกรม SSPS+ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้ด้วยวิธี Duncan's multiple range test จากการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ

## บทที่ 4

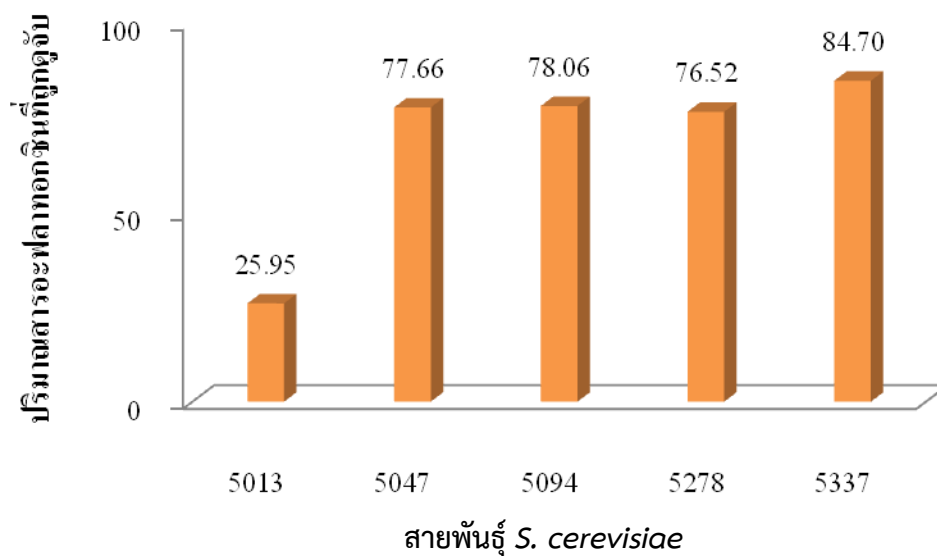
### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### 4.1 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub>

จากการศึกษาความสามารถในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ของเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติและยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ TISTR 5013, TISTR 5047, TISTR 5094 , TISTR 5278 และ TISTR 5337 โดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการเก็บเกี่ยวเชื้อเมื่อมีค่าความเข้มข้น (OD<sub>600</sub>) เท่ากับ 0.1 นำเชื้อในรูปผงปริมาณ 0.3000 กรัม ผสมลงในสารอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน นำไปเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อนำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินที่เหลือจากการดูดจับ พบว่ายีสต์จากแหล่งธรรมชาติมีประสิทธิภาพต่ำกว่า *S. cerevisiae* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ดังนั้นจึงคัดเลือกเฉพาะยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์มาศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการดูดจับอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ที่มีความเข้มข้นของสารอะฟลาทอกซินเริ่มต้นที่ 10.4736 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1 โดยพบว่า *S. cerevisiae* แต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีการดูดจับอย่างเฉพาะเจาะจง และจากการทดลองพบว่าปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่ถูกดูดจับโดยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ TISTR 5013, TISTR 5047, TISTR 5094, TISTR 5278 และ TISTR 5337 คิดเป็นร้อยละ 25.95 , 77.66, 78.06, 76.52 และ 84.70 ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีความสามารถในการดูดจับสารอะฟลาทอกซินได้มากที่สุด คือ TISTR 5337 ส่วนสายพันธุ์ยีสต์ที่มีการดูดจับได้น้อยที่สุดคือ TISTR 5013

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพของยีสต์ *S. cerevisiae* ในการดูดจับสารอะฟลาทอกซินหลังจากบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ยีสต์	ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่ถูกดูดจับโดยยีสต์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณสารพิษที่เหลือจากการดูดจับ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารพิษอะฟลาทอกซินที่ถูกดูดจับโดยยีสต์ (%)
ชุดควบคุม	-	10.4736	-
5013	2.7179	7.7557	25.95
5047	7.6603	2.3397	77.66
5094	8.1754	2.2982	78.06
5278	8.0140	2.4596	76.52
5337	8.8711	1.6025	84.70



รูปที่ 4.1 ร้อยละของปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B1 ที่ถูกดูดจับโดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่าง ๆ

จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ ดันแคน (Duncan's new multiple rang test, DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ( $p \leq 0.05$ ) โดยค่าเฉลี่ย โปรแกรม SPSS พบว่าการดูดจับสารอะฟลาทอกซินของยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นยีสต์สายพันธุ์ TISTR 5047 และสายพันธุ์ TISTR 5094 ที่การดูดจับสารอะฟลาทอกซิน ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.2)

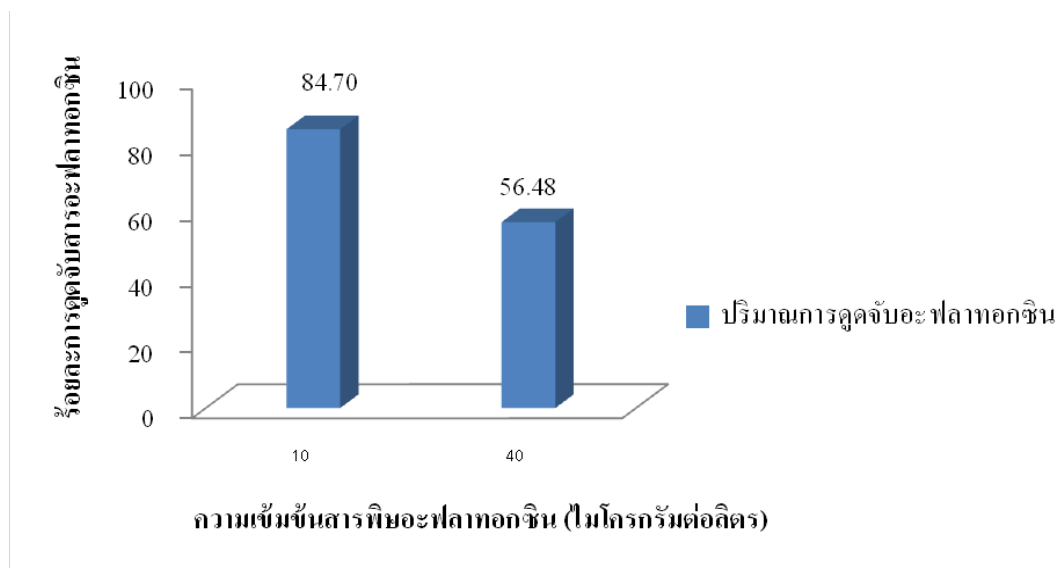
**ตารางที่ 4.2** การวิเคราะห์ความแปรปรวนในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซินโดย *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์	เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง
5337	84.6995 <sup>a</sup> ± 0.08622
5094	78.0571 <sup>b</sup> ± 0.07506
5047	77.6606 <sup>b</sup> ± 0.68973
5278	76.5164 <sup>c</sup> ± 0.57709
5013	25.9495 <sup>d</sup> ± 0.94733

\*ตัวอักษรที่เหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ 0.05 ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.2 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นของสารพิษอะฟลาทอกซินที่เหมาะสมต่อการดูดจับ

จากการทดลองเบื้องต้นพบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน B1 ดังนั้นจึงคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์นี้มาศึกษาหาความเข้มข้นของสารพิษอะฟลาทอกซินที่เหมาะสมต่อการดูดจับโดยยีสต์ โดยควบคุมความเข้มข้นของสารพิษอะฟลาทอกซินที่ความเข้มข้น 10 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (อ้างอิงจากงานวิจัยของ Shetty และคณะ, 2007 เพราะเป็นระยะเวลาที่ยีสต์ดูดจับสารอะฟลาทอกซินได้ดีที่สุด) จากการทดลองพบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 สามารถดูดจับสารอะฟลาทอกซินได้สูงถึง 84.70 % เมื่อมีการเติมสารอะฟลาทอกซินลงไป 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถดูดจับสารอะฟลาทอกซินได้ 56.48 % (รูปที่ 4.2) ซึ่งมีการดูดจับสารอะฟลาทอกซินที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อคำนวณหาปริมาณอะฟลาทอกซินที่ถูกดูดจับอย่างสมบูรณ์แล้ว พบว่าปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่ถูกดูดจับจะเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารอะฟลาทอกซิน โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 จะดูดจับสารอะฟลาทอกซินที่ความเข้มข้น 10 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้เท่ากับ 8.46 และ 22.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้



รูปที่ 4.2 ร้อยละของการรอดชีวิตของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 ที่ความเข้มข้นต่างๆของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337

$$\frac{\text{ร้อยละการรอดชีวิตของยีสต์} \times \text{ความเข้มข้นอะฟลาทอกซิน(ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)}}{100}$$

แสดงว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารอะฟลาทอกซินมีผลอย่างมากต่อการรอดชีวิตของยีสต์อย่างจำเพาะเจาะจง

#### 4.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการรอดชีวิตของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5037 ที่สภาวะต่างๆ

เมื่อนำเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการรอดชีวิตของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 ในสภาวะปกติ มาทดลองในสภาวะต่าง ๆ เพื่อศึกษาผลการรอดชีวิตของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยนำเซลล์ไปให้ความร้อนโดยใช้ autoclave ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่ายีสต์สามารถรอดชีวิตของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 ได้ 57.76 % และเมื่อนำเซลล์ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ด้วยความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (60 นาที) ที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาทดสอบการรอดชีวิตของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลที่ได้คือ

สามารถดูดจับสารได้ 59.55 % สำหรับที่สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยีสต์สามารถดูดจับสารอะฟลาทอกซินได้ 56.48 %

เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดจับสารอะฟลาทอกซินโดยยีสต์ในสภาวะต่างๆ พบว่าเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการทรีทเมนต์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จะให้ค่าการดูดจับอะฟลาทอกซินที่แตกต่างจากสภาวะอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.3)

**ตารางที่ 4.3** การวิเคราะห์ทางสถิติของการดูดจับสารอะฟลาทอกซินของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ 5037 หลังจากผ่านการทรีทเมนต์เซลล์ด้วยการให้ความร้อนและกรด

ชุดการทดลอง(Treatment)	การดูดจับสารอะฟลาทอกซิน (ระยะเวลา 2 ชั่วโมง)(%)
30°C (control)	56.4833 <sup>b</sup> ± 0.90716
120°C (20 นาที)	57.7567 <sup>b</sup> ± 0.60451
2M HCl (60 นาที)	59.5533 <sup>a</sup> ± 0.69745

\*ตัวอักษรที่เหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ 0.05 ( $p \leq 0.05$ )

จากการทดลองการคัดเลือกเชื้อ *S. cerevisiae* ที่มีความสามารถดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์สามารถดูดจับสารอะฟลาทอกซินได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ ) ยกเว้นสายพันธุ์ TISTR 5047 กับ สายพันธุ์ TISTR 5094 ที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ถึงแม้จะมีการเพาะเลี้ยงและทำการทดลองภายใต้สภาวะเดียวกัน และจากการนำเชื้อ *S. cerevisiae* มาปรับสภาพเซลล์เพื่อปรับปรุงให้มีความสามารถในการดูดจับสารอะฟลาทอกซินให้ได้ในปริมาณมาก แม้แต่ในการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นสูง (40ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) การดูดจับสารโดยที่ไม่มีการอิมมัตจะแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเชื้อสายพันธุ์นั้นๆ ว่ามีศักยภาพที่ดีในการดูดจับสารอะฟลาทอกซินในอาหาร

El-Nezami และคณะ (1998) พบว่า การเปลี่ยนแปลงเซลล์ด้วยวิธีทางกายภาพและเคมีจะทำให้เซลล์ที่ไม่มีชีวิตสามารถดูดจับสารพิษได้ดีขึ้น บ่งบอกได้ว่าลักษณะทางกายภาพโดยทั่วไปของยีสต์ (physical nature) จะมีผลมากกว่ากระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ภายในเซลล์

Shetty และคณะ (2007) ทำการทดลองนำเซลล์มาให้ความร้อน (heat treatment) โดยให้ความร้อนด้วย autoclave และการนำเซลล์ไปทรีทเมนต์กับกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดจับ ทำให้เซลล์มีความสามารถในการดูดจับที่สูงขึ้น Zlotnik และคณะ (1984) กล่าวว่า ความร้อนอาจทำให้ชั้นนอกของผนังเซลล์ เกิดการซึมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการสลายของ

แมนแนน (mannan) เพียงบางส่วนจากผิวด้านนอก เมื่อเกิดการสลายมากขึ้นจนกระทั่งมากพอที่จะไปปกคลุมตำแหน่งการดูดจับสารพิษ และในสถานะที่เป็นกรดจะมีผลต่อพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งสืบเนื่องมาจากการสลายตัวของมอนอเมอร์ (releasing monomer) นอกจากนี้ยังทำให้สายของไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) แยกออกจากกันกลายเป็นอัลดีไฮด์ (aldehyde) ที่มีลักษณะเป็นท่อนๆ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมี จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งต่างๆ ภายในผนังเซลล์ในระหว่างที่มีการให้ความร้อนแก่เซลล์นอกเหนือไปจากการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งการดูดจับที่ได้แสดงผลออกมา

Bejaoui และคณะ (2004) และ Yiannikouris และคณะ (2004) พบว่าผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* มีโครงสร้างทางเคมีเป็นลักษณะ bi-layer ซึ่งองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ประมาณร้อยละ 85-90 ประกอบด้วยแมนโนโปรตีน และ  $\beta$ -D glucan ซึ่งเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,3-linkage และ  $\beta$ -1,6-linkage การกำจัดสารพิษจากเชื้อราโดยยีสต์นั้น พบว่าสารพิษจะถูกจับที่ผนังเซลล์ ไม่ได้เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ดังนั้นเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้วก็สามารถนำมาใช้ในการกำจัดสารพิษได้ด้วย และพบว่าแมนแนนที่ผนังเซลล์จะเป็นตัวที่จับอะฟลาทอกซินและออกคราทอกซิน (ochratoxin) และ  $\beta$ -D-glucan จะเป็นตัวจับกับซีราลีโนน (zearalenone) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Bejaoui และคณะ (2004) ถึงการเปลี่ยนแปลงการดูดซับสารพิษออกคราทอกซิน เอ (OTA) จากเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่มีการให้ความร้อน (heat treatment) โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* ผลการดูดจับออกคราทอกซิน เอ (OTA) หลังจากบ่ม 5 นาที จะเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วถึงร้อยละ 90 และจะคงที่เข้าสู่สมดุลเมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมง และจากการศึกษาของ Santose และคณะ (2000) พบว่าการใช้เชื้อยีสต์ที่มีความไว (sensitive) จะได้ผลที่รวดเร็วและทำปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ภายใน 2 นาที

Shetty และ Jespersen (2006) พบว่า การกำจัดสารพิษของเชื้อราโดยใช้แมนแนนโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Mannan - Oligosaccharide) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* ผสมกับสารอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> พบว่าแมนแนนโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถจับกับอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ได้ถึงร้อยละ 95 น้ำหนักต่อน้ำหนัก

จากการศึกษาขั้นต้นนี้พบว่า การนำเซลล์ยีสต์มาปรับสภาพด้วยความร้อนจะมีบริเวณที่ใช้ในการดูดจับสารพิษมากขึ้นจึงทำให้มีความสามารถในการดูดจับสารอะฟลาทอกซินที่คงเหลืออยู่ในอาหารที่ปรุงแต่งเสร็จแล้ว และในสถานะที่มีความเป็นกรดสูงทั้งในผลิตภัณฑ์และในกระเพาะอาหารจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการดูดจับสารพิษได้

#### 4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการดูดจับอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

จากการศึกษาชนิดของสารดูดซับทางชีวภาพต่อความสามารถในการดูดจับอะฟลาทอกซินโดยอาศัยลักษณะขององค์ประกอบและโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกันมาศึกษาความสามารถในการดูดจับอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> โดยใช้เซลล์ยีสต์แห่งในกลุ่มทดลองที่ 1 และโคโตซานในกลุ่มทดลองที่ 2 ที่มีการเติมสารอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ในข้าวโพดและข้าวเปลือกบดละเอียด และใช้กลุ่มควบคุมเป็นข้าวโพดและข้าวเปลือกที่บดละเอียด ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.4 และ 4.5

**ตารางที่ 4.4** ความสามารถในการดูดจับอะฟลาทอกซิน B 1 ในข้าวโพดและข้าวเปลือกของเซลล์ยีสต์ ผง (กลุ่มที่ 1) และยีสต์ที่ตรึงด้วยโคโตซาน(กลุ่มที่ 2)

กลุ่ม	ปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 ( $\mu\text{g/ml}$ )				% การดูดจับ อะฟลาทอกซิน B1
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	
กลุ่มวัตถุดิบ	0.34	0.38	0.37	$0.36 \pm 0.02$	
กลุ่มควบคุม	50.34	56.76	57.09	$54.73 \pm 3.80^a$	
กลุ่มที่ 1	11.55	11.11	11.17	$11.28 \pm 0.24^b$	79.4
กลุ่มที่ 2	6.88	7.17	5.49	$6.51 \pm 0.90^c$	88.1

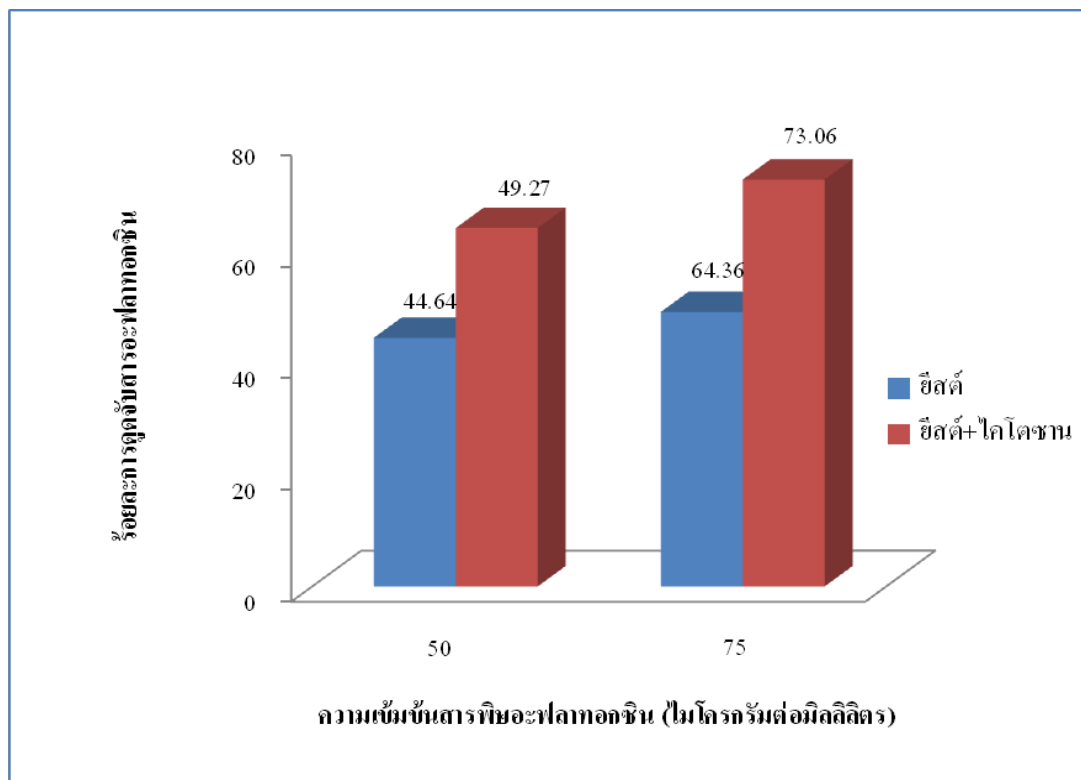
หมายเหตุ ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงว่าแตกต่างกันทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ 4.5** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการดูดจับอะฟลาทอกซิน B 1

แหล่งความ แปรปรวน	องศาความ เสรี	ผลบวกกำลัง สอง	ค่ากำลังสอง เฉลี่ย	F	Sig
ระหว่างทรีตเมนต์	2	4235.728	2117.864	414.059	.000
ภายในทรีตเมนต์	6	30.689	5.115		
รวม	8	4266.418			

จากผลการทดลองพบว่าการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน B1 ในวัตถุดิบข้าวโพดและข้าวเปลือกที่บดละเอียดเริ่มต้นที่ใช้ศึกษา ซึ่งมักพบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินนี้อยู่ทั่วไปในธัญพืช จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ยีสต์แห้งและโคโตซานสามารถดูดจับสารอะฟลาทอกซินได้มากกว่าร้อยละ 75 และพบว่าการใช้โคโตซานช่วยเพิ่มความสามารถในการดูดจับสารอะฟลาทอกซินได้สูงกว่าการใช้เซลล์ยีสต์อย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 โดยสามารถดูดจับปริมาณอะฟลาทอกซินได้ร้อยละ 88.1 ในขณะที่เซลล์ยีสต์สามารถดูดจับปริมาณอะฟลาทอกซินได้ร้อยละ 79.4 ดังนั้นการใช้สารดูดซับทางชีวภาพในการบำบัดหรือลดปริมาณอะฟลาทอกซิน B1 จึงอาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ

เมื่อนำยีสต์ทั้งสองกลุ่มมาศึกษาความสามารถในการดูดจับอะฟลาทอกซิน B1 ที่ความเข้มข้น 50 และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงร้อยละการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน B1 ของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และไคโตซาน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

จากการทดลองพบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 สามารถดูดจับอะฟลาทอกซินที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ร้อยละ 44.64 และ 64.36 ตามลำดับ และไคโตซานสามารถดูดจับสารอะฟลาทอกซินที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้สูงถึงร้อยละ 49.27 และ 73.06 ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองนี้จะแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินและการใช้ไคโตซานมีผลต่อการดูดจับของสารอะฟลาทอกซินอย่างจำเพาะเจาะจง โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

ร้อยละการดูดจับอะฟลาทอกซิน X ความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

100

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติดังตารางที่ 4.6 พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และไคโตซานสามารถดูดจับสารอะฟลาทอกซินได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

**ตาราง 4.6** แสดงปริมาณร้อยละของการยับยั้งสารอะฟลาทอกซินโดย *S.cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 ที่ผสมไคโตซาน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ระดับความเข้มข้น		ร้อยละการยับยั้ง
50	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5337	87.0333 <sup>a</sup> ± 0.18475
	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5337 + Chitosan	96.0700 <sup>b</sup> ± 0.10536
75	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5337	85.5567 <sup>c</sup> ± 0.49085
	<i>S. cerevisiae</i> TISTR 5337 + Chitosan	97.1233 <sup>d</sup> ± 0.02309

**หมายเหตุ** ตัวอักษรที่ไม่เหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ( $p \leq 0.05$ )

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 ที่ผสมกับไคโตซาน สามารถดูดจับสารอะฟลาทอกซิน B1 ได้มากกว่าเชื้อ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 เพียงอย่างเดียว โดยทดลองกับสารอะฟลาทอกซินที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าจากการทดลองที่ 2 ระดับความเข้มข้นนี้ สามารถแสดงให้เห็นว่าระดับความเข้มข้นของสารอะฟลาทอกซินมีผลต่อการดูดจับโดยเชื้อ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และไคโตซาน โดยทำให้สามารถดูดจับสารอะฟลาทอกซินได้ในปริมาณที่มากยิ่งขึ้น เมื่อมีความเข้มข้นเริ่มต้นของสารอะฟลาทอกซินมากขึ้น

## บทที่ 5

### สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ TISTR 5013, TISTR 5047, TISTR 5094, TISTR 5278 และ TISTR 5337 มีความสามารถในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub> ได้แตกต่างกัน โดยพบว่ายีสต์สายพันธุ์ TISTR 5337 สามารถดูดจับสารพิษได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า การดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซินด้วยเซลล์ที่ไม่มีชีวิต (non-viable) ที่ผ่านการทรีทเมนต์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกนั้น คุณสมบัติทางกายภาพเกิดการเปลี่ยนแปลงซึ่งจะทำให้มีการดูดจับสารพิษได้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้นำไปปรับสภาพ (control) สำหรับการนำเซลล์ไปให้ความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียสพบว่าการดูดจับสารอะฟลาทอกซินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้วก็สามารถใช้ในการกำจัดสารพิษได้ด้วย และเมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถของเซลล์ยีสต์กับไคโตซาน พบว่าทั้งเซลล์ยีสต์และไคโตซานสามารถดูดจับสารพิษได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์ TISTR 5337 จึงมีความสามารถในการดูดจับสารพิษจากเชื้อราและมีศักยภาพที่ดีในการนำไปใช้ประโยชน์ในการลดการปนเปื้อนของสารพิษในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้

#### ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการดูดจับสารพิษ
2. การระบุโครงสร้างผิวการดูดจับของผิวภายนอกเซลล์
3. การศึกษาการเปรียบเทียบการดูดจับสารพิษของเซลล์ยีสต์แห้งและการตรึงยีสต์ในรูปไคโตซานหรือในรูปอื่นๆ เพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะสม
4. วิเคราะห์ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในเซลล์ยีสต์หลังจากนำไปดูดจับสารพิษ
5. ศึกษาหาระยะเวลาที่ใช้บ่มยีสต์กับสารพิษ เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมยิ่งขึ้น
6. ศึกษาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการดูดจับ
7. ศึกษาการดูดจับสารพิษในผลิตภัณฑ์ต่างๆ

## เอกสารอ้างอิง

- กนิษฐา สังคะหะ. (2536). การคัดเลือกเชื้อราที่สลายอะฟลาทอกซิน. ข่าวสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 34(370): 8.
- กานดา หวังชัย ศรีณยา เฟ่งผล และจำนงค์ อุทัยบุตร 2552. ผลของโอโซนในการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และสารอะฟลาทอกซินในมะขามแขก วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 1 (พิเศษ), 237-240.
- เกศรา นุตาลัย. 2527. งานวิจัยเกี่ยวกับแอลฟลาทอกซินในถั่วลิสง รายงานความก้าวหน้าปี 2526. รายงานการสัมมนาเรื่อง งานวิจัยถั่วลิสง ครั้งที่ 3 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน 19-21 เมษายน 2527.
- คมกริช พิมพ์ภักดี , บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล และพนารัตน์ ชัตยิพนธ์ 2547. การศึกษาประสิทธิภาพของสารดูดซับ (commercial adsorbents) ในการดูดซับสารอะฟลาทอกซิน B<sub>1</sub>. 1(2): 40-43.
- จักรพันธ์ ปัญจะสุวรรณ. 2542. พิษภัยในอาหาร. บริษัทโอเดียนส์โตร, กรุงเทพฯ.
- ชาญยุทธ จรุงเกียรติกำจร และ อุทัย คันโธ. 2538. ผลของอะฟลาทอกซินต่อสัตว์เลี้ยง. สัตว์เศรษฐกิจ. 12(268): 73-76.
- ดวงจันทร์ สุประเสริฐ 2553. สารอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในเครื่องเทศ. [Online] Available: [http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc\\_food/a\\_fd\\_4\\_00t.asp?info\\_id=57](http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_food/a_fd_4_00t.asp?info_id=57)
- ดุขณี ณะบริพัฒน์, พนอ รวยสูงเนิน, สายชล นุชน้อง และ เหมือนหมาย จันทราพันธุ์กุล. 2539. การยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในระหว่างการผลิตหมัก. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 12(2): 8-15.
- ดุขณี ณะบริพัฒน์. 2546. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. (พิมพ์ครั้งที่ 3). ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ดุขณี ณะบริพัฒน์. 2555. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. (พิมพ์ครั้งที่ 4). โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ทิพย์วรรณ จตุมานัสศิริ และธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2531. การควบคุมเชื้อและการลดสารพิษแอฟลาทอกซินด้วยสารเคมีในถั่วลิสงปน. รายงานการสัมมนาเรื่องงานวิจัยถั่วลิสง ครั้งที่ 7 ณ โรงแรมซีบีซี พัทยา ชลบุรี 16-18 มีนาคม 2531.
- ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2540. โรคถั่วลิสง (Peanut diseases). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ
- ธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และ ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว. 2524. สารพิษของเชื้อรากับปัญหาในวงการปศุสัตว์. วารสารสัตวแพทย์ 1(3): 211-223.

- นงนุช วัฒนียธนาคม. 2540. วิทยาเชื้อราการแพทย์. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่
- นิธิยา รัตนาปนนท์ และวิบูลย์ รัตนาปนนท์. 2543. สารพิษในอาหาร. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.
- ไมตรี สุทธิจิตต์ 2528. สารพิษและสารอันตรายจากธรรมชาติ วารสารวิทยาศาสตร์ 39:207-222.
- รินดา คันธวณ, อัมภา เรืองปรีดามย์ และอุดมฤทธิ์ วิฑูรชวลิตวงษ์ 2541. การใช้โคโคแซนขึ้นรูปสำหรับยีสเชื้อ *Chlorella vulgaris* TISTR 2861 เพื่อดูดซับโครเมียม (+6) โครงการงานพิเศษวิทยาศาสตร์-บัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กทม.
- สถาบันอาหาร 2553. ระวัง ถั่วลิสงปน. [Online] Available: [www.nfi.or.th/publication/thairath/thairath15.html](http://www.nfi.or.th/publication/thairath/thairath15.html)
- สาวิตรี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สุรสิทธิ์ รอดทอง. 2538. จุลินทรีย์และโรคที่เกิดจากอาหาร. สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- อนงค์ บิณฑวิท. 2546. สารพิษจากเชื้อรา : อะฟลาทอกซิน. การเกิดสารพิษจากเชื้อราอะฟลาทอกซิน. (พิมพ์ครั้งที่ 1). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อภิษฐา ช่างสุพรรณ. 2548. อันตรายของเชื้อราในเมล็ดพืช ที่เป็นอาหารนกเขา. [Online]. Available: <http://nokkhao.com/afla.html>.
- อะฟลาทอกซิน 2553. อะฟลาทอกซิน: สารปนเปื้อนในอาหาร. [Online] Available: <http://mochikung.212café.com/archive/2008-09-06/aflatoxin-aspergillus-flavus-asp-par...>
- อมรา ชินภูติ 2544. จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร ข้าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา 11(3), 27-38.
- อมรา ชินภูติ. 2547. ปัญหาสารพิษ Aflatoxin ในถั่วลิสงและการวิเคราะห์สารพิษ Aflatoxin ในถั่วลิสง. เอกสารประกอบการฝึกอบรมการถ่ายทอดเทคโนโลยีการแปรรูปถั่วลิสงปลอดสารพิษ Aflatoxin. (หน้า 14-31). สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อรรถพร มณีกุล ประพฤกษ์ ตั้งมั่นคง ศศิธร นาคทอง และ สุเจตน์ ชื่นชม 2551. วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร 16(3), 189-193.
- อุทัยวรรณ แสงวนิช. 2522. การตรวจหา *Aspergillus* ที่สร้าง aflatoxin ในการผลิตผลเกษตรวิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- Alexopoulos, C.J. et al. 1996. Introductory mycology. 4<sup>th</sup> ed. Jonh Wiley and Sons, New York.
- Anderson, R.A. 1983. Detoxification of aflatoxin-contaminated corn. (Diener, U. L., Asquith, R. L. and Dickens, J. W. eds.). Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. So. Coop. Ser. Bull. 279. Alabama.

- Baptista, A.S., Horii, J., Calori-Domingues, M.A., da Gloria, E.M., Salgado, J.M., Vizioli, M.R., 2004. The capacity of manno-oligosaccharides, thermolysed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, 474–481.
- Bata and Lasztity, 1999. Detoxification of mycotoxin contaminated food and feed by microorganisms. *Trends in Food Science and Technology* 10, 223-228.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P., Lebrihi, A., 2004. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1038–1044
- Blount WP, 1961. Turkey X disease. *Turkeys* 9(2), 55–58.
- Bressac, J. P. *et al.* 1991. Selective G to T mutation of *p53* gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature* 350, 429-430
- Chitaree, T., Kiatsompob, W., Panchang, W. and Thanaboripat, D. 1993. Effect of salt concentration on aflatoxin in peanut by *Aspergillus flavus*. *Journal of Kasetsart* 27, 354-367.
- Ciegler, A., Lillehoj, E.B., Peterson, R.E., Hall, H.H., 1966. Microbial detoxification of aflatoxin. *Applied Microbiology* 14, 934–939.
- Cotty, P.J. 1900. Effect of atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* on aflatoxin contamination of developing cottonseed. *Plant Disease* 74, 233-235.
- Doyle, M.P., Applebaum, R.S., Bracket, R.E., and Marth, E.H. 1982. Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities. *Journal of Food Protection* 45, 964-971.
- Eaton, D. L., Ramsdell, H. S. and Neal, G. E. (1994). Biotransformation of aflatoxins. In Eaton, D. L. and Groopman, J. D. (eds.). *The toxicology of aflatoxins*. (pp. 45-72). San Diego: Academic Press.
- Ellis, R.W., Clements, M., Tibbetts, A. and Winfree, R. 2000. Reduction of bioavailability of 20 ug/kg aflatoxin in trout feed containing clay. *Aquaculture*, 183, 179-188.
- El-Nezami, H., Kankaanpaa, P., Salminen, S. and Ahokas, J. 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology* 36, 321–326.
- Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A, and Magan, N. 2008. Effect of  $a_w$  and  $CO_2$  level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post harvest. *International Journal of Food Microbiology* 122, 109-113.

- Garcia, R. P. and Ilag, L. L. 1986. Aflatoxin in the Philippines. In Batan, E. L. ed. Aflatoxin in Maize. A Proceeding of the Workshop. Mexico.
- Groopmann, J. D. and Thomas, W. K. 1999. CRC Critical Reviews in Toxicology, Chapter 19, pp. 13-124.
- Hayes, E.R., Davis, D.H. and Munroe, V.G. 1977. Organic solvent system for chitosan. Proceedings of 1<sup>st</sup> International Conference on Chitin and Chitosan. MIT Sea Grant, Massachusetts, pp. 103.
- Hirano, K., Adachi, Y., Bintvihok, A., Ishibashi, S. and Kumazawa, N.H. 1992. An improved method for extraction and clean up of aflatoxin B<sub>1</sub> from liver. Journal of Veterinary Medical Science 54, 567-569.
- Hsu, I.C. *et al.* 1991. Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas. Nature. 350, 427-428.
- Inan, F., Pala, M. and Doymaz, I. 2007. Use of ozone in detoxification of aflatoxin B<sub>1</sub> in red pepper. Journal of Stored Products Research 43, 425-429.
- Ito, Y. *et al.* 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. Mycolog. Res. 105(2):233-239.
- Krishnamurthy, Y. L. and Shashikala, J. 2006. Inhibition of aflatoxin B<sub>1</sub> production of *Aspergillus flavus*, isolated from soybean seeds by certain natural plant products. Letters in Applied Microbiology 43, 469-474.
- Kurtzman, C. D., Horn, B. W. and Hesselteine, C. W. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. Antonie van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology 53, 158-174.
- Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. 1998. Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In: The Yeasts. 4<sup>th</sup> ed. pp.3-5. A Taxonomic Study, C.P. Kurtzman and J.W. Fell (eds.) Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Merck Index. 1996. 12<sup>th</sup> ed. Merck, New York.
- Montesano, R. Hainaut, P. and Wild, C. P. 1997. Hepatocellular carcinomas : From gene to public health. Review Journal of Natural Cancer Institute 89, 1844-1851.
- Muzzarelli, R.A.A. (1977) Enzymatic synthesis of chitin and chitosan. Occurrence of chitin. In Chitin, pp. 5-44. Muzzarelli, R.A.A., ed. Pergamon Press, New York
- Palmgren, M. S. and Hayes, A. W. 1987. Aflatoxins in food. In Mycotoxins in Food, pp. 65-95. Krogh, P. (ed.). Academic Press, London

- Peterson, S. W. *et al.* 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia*. 93: 689-703.
- Pierides, M., El-Nizami, H., Peltonen, K., Salminen, S. and Ahokas, J. 2000. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model. *Journal of Food Protection* 63(5), 645-650.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., and Tanboon-Ek, P. 1993. The normal mycoflora of commodities from Thailand.1. Nuts and oilseeds. *Food Microbiology* 20, 211-226.
- Saito, M. and Tsuruta, O. 1993. A new variety of *A. flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. *Association of Mycotoxicology* 37, 31-36.
- Santin, E., Paulilo, A. C., Maiorka, A., Nakaghi, L. S. O., Macan. 2003. Evaluation of the efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *International Journal of Poultry Science*, 2, 241-344.
- Santose, A., Marquina, D., Leal, J. A., & Peinado, J. M. 2000. (1→6)-beta-D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1809-1813.
- Shetty, P.H. and Jespersen, L., 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science and Technology* 17, 48-55.
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 41-46
- Smith, J. E. and Moss, M. O. 1985. *Mycotoxins. Formation, Analysis and Significance*. John Wiley & Sons, Chichester.
- Thanaboripat, D. 2002. Importance of aflatoxins. *KMITL Science Journal* 2(1), 38-45.
- Thanaboripat, D. 2003. Mycotoxins: Occurrence and control in foods. In *The International Review of Food Science and Technology*, November 2003, pp.130-133.
- Thanaboripat, D. and Sukchareon, O. 1997. Survey of aflatoxin in human breast milk. *Journal of KMITL* 5,1-5.
- Thanaboripat, D., Im-erb, A. and Ruangrattanametee, V. 2003. Effect of Ling Zhi mushroom on aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*. In *Biological Control and Biotechnology*, pp. 22-30. Heilongjiang Science and Technology Press, China.

- Thanaboripat, D., Kraipeerapun, K., Pattanaphongsak, C., Srisana, S. and Nanasombat, S. 1997. Detoxification of anatoxin by *Streptococcus lactis* and lactic acid bacteria in commercialyoghurt. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 31,117-123.
- Thanaboripat, D., Premsi, T., Punbusayakul, N. and Suhcharoen, O. 1996. Effect of food preservative on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in liquid medium. ASEAN Food Journal 11(2), 61-64.
- Thanaboripat, D., Suvathi, Y., Srilohasin, P., and Sripakdee, P. 2007 Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*, KMITL Science and Technology Journal 7(1),1-7.
- Torres, J. *et al.* 1980. Morphological changes in strains of *Aspergillus flavus* Link Exfries and *Aspergillus parasiticus* Spears related with aflatoxin production. Mycopathol 72(3), 171-174
- Wang, H.L. and Hesseltine, C.W. 1982. Prescott and Dunn Industrial Microbiology. 4<sup>th</sup> ed. Connecticut, Westport.
- WHO, 1979. Environmental Health Criteria II: Mycotoxins. World Health Organization, Geneva.
- Win, N.N. and Stevens, W.F. 2001. Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. Applied Microbiology and Biotechnology 57, 334-341.
- Win, N.N., Pengju, G. and Stevens, W.F. 2000. Deacetylation of chitin by fungal enzymes. In Advance in Chitin Science, Vol. 4, pp. 55-62. Uragami *et al.* eds. National Taiwan Ocena University, Taiwan
- 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. Journal of Food Protection 67. 1195-1200.
- Zlotnik, H., Fernandez, M.P., Bowers, B., Cabib, E., 1984. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins from an external cell wall layer that determines wall porosity. Journal of Bacteriology 159, 1018-1026.

## ภาคผนวก ก

### สูตรอาหาร

#### 1. สูตรอาหาร Malt Yeast Glucose Peptone (MYGP)

Glucose	10	กรัม
Peptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ชั่งสูตรอาหารเลี้ยงยีสต์ MYGP ตามน้ำหนักที่กำหนด ละลายลงในน้ำกลั่นที่เตรียมไว้ เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตรสุดท้ายที่ต้องการ บรรจุอาหารที่เตรียมได้ลงใน Erlenmeyer flask นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121<sup>0</sup>ซ เวลา 15 นาที

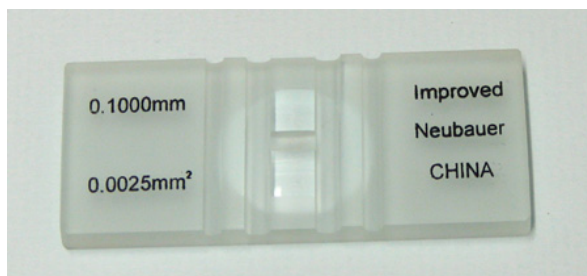
#### 2. Phosphate Buffer Saline (PBS)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.44	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.24	กรัม
ปรับพีเอช	6.0	

## ภาคผนวก ข

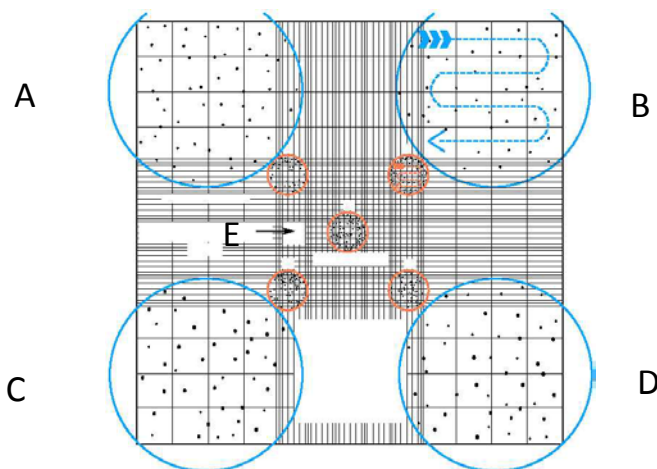
### การนับเซลล์โดย Haemocytometer

เครื่องมือวัดที่เรียกว่า Haemocytometer ซึ่งเป็นอุปกรณ์ขนาดเล็ก มีรูปร่างดังในรูปที่ ข-1 ลักษณะของ Haemocytometer คล้ายสไลด์ แต่มีความหนาแน่นมากกว่าสไลด์แก้วธรรมดา ตรงกลางมีร่องเป็นรูปตัว H ซึ่งทำให้เกิดบริเวณที่ใช้ในการตรวจนับ 2 บริเวณ ตรงกลางตัว H ซึ่งทำเป็น scale ที่ใช้ในการตรวจนับเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารแขวนลอย เช่น สปอร์ หรือเซลล์ต่างๆ (รูปที่ ข.2 )



รูปที่ ข-1 แสดงลักษณะและขนาดของ Haemocytometer

ที่มา [http://www.thesciencefair.com/Merchant2/graphics/00000001/BloodCountrSlideB-4005\\_M.jpg](http://www.thesciencefair.com/Merchant2/graphics/00000001/BloodCountrSlideB-4005_M.jpg)



รูปที่ ข- 2 แสดงลักษณะและตำแหน่งสำหรับการตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราด้วย Haemacytometer

ที่มา [http://www.tpub.com/content/medical/14295/img/14295\\_279\\_1.jp](http://www.tpub.com/content/medical/14295/img/14295_279_1.jp)

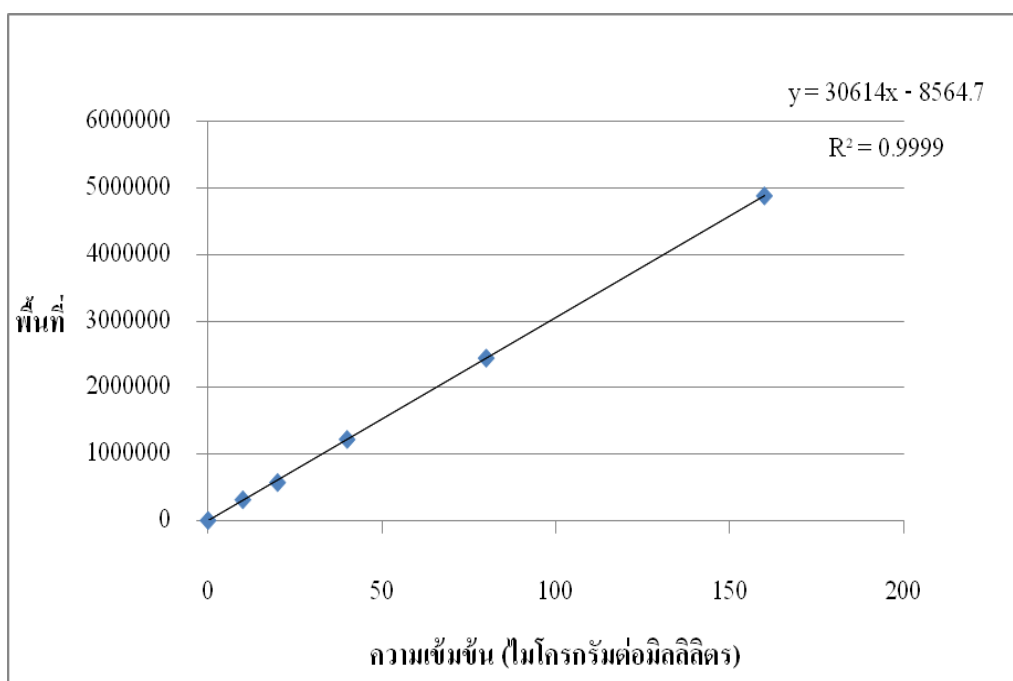
#### การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ Haemacytometer

1. ในกรณีที่สปอร์หรือเซลล์ที่ต้องการนับมีขนาดเล็ก การนับควรใช้บริเวณ E ตรงกลาง ซึ่งประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก (small square) ทั้งหมด 25 ช่อง และแต่ละช่องเล็กนั้นประกอบด้วยช่องขนาดเล็กที่สุด (smallest square) 16 ช่อง การนับสปอร์จะนับจำนวนทั้งหมดที่อยู่บริเวณนี้ รวมทั้งสปอร์ที่อยู่บริเวณขอบของตารางทุกช่องด้วย
2. พื้นที่บริเวณ E เท่ากับ  $25 \times 16 \times 1/400$  ตารางมิลลิเมตร
3. เมื่อคิดเป็นปริมาตร (มีความลึก 1/10 มิลลิเมตร) จะเท่ากับ  $25 \times 16 \times 1/400 \times 1/10$  ลูกบาศก์ต่อมิลลิเมตร หรือ 0.1 ลบ.ซม.
4. วิธีคำนวณ
  - สมมตินับสปอร์ในบริเวณ E ได้รวมทั้งหมดเท่ากับ Y สปอร์ ใน 0.1 ลบ. มม.
  - ต้องการเปรียบเทียบความเข้มข้นในหน่วย ลบ.ซม. ซึ่ง 1 มล. เท่ากับ 1000 ลบ. มม.
  - ดังนั้น ในปริมาตร 0.1 ลบ. มม. นับสปอร์ได้ = Y สปอร์
  - ถ้าใน 1000 ลบ. มม. (1 มล.) จะมีสปอร์ =  $Y \times 1000 \times 1/0.1$  สปอร์
  - ในกรณีสปอร์ หรือ เซลล์มีขนาดใหญ่ ควรนับจำนวนสปอร์หรือเซลล์ทุกบริเวณ A B C D และ E จากนั้นนำค่าที่ได้มารวมกัน และหาค่าเฉลี่ยโดยหาร 5 อีกครั้ง ก่อนนำไปคำนวณความเข้มข้น เช่น สมมติจำนวนสปอร์รวมกันได้รวมกันเท่ากับ Z สปอร์ ดังนั้นความเข้มข้นของสปอร์ต่อ 1 มล. =  $Z/5 \times 1000 \times 1/0.1$  สปอร์ / มล.

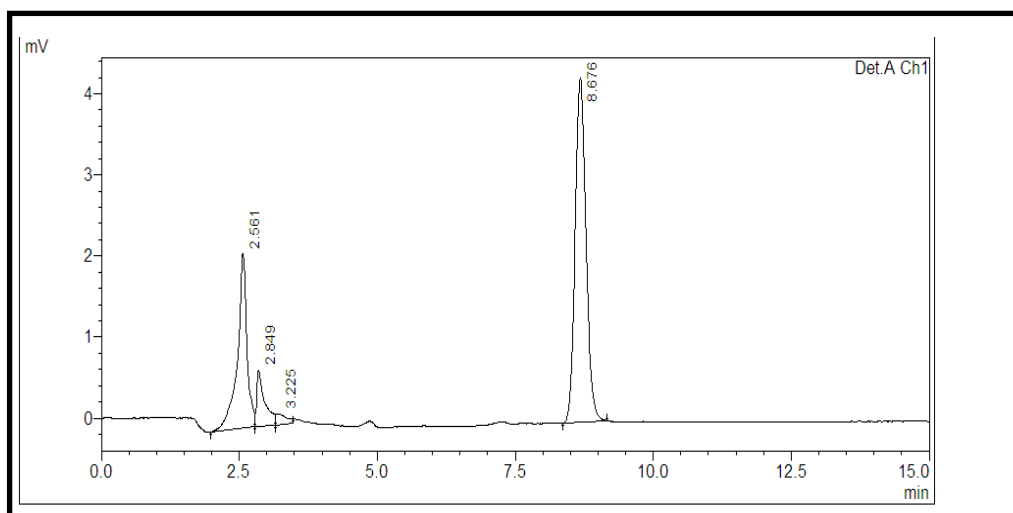
5. การตรวจนับความเข้มข้นจะให้ผลใกล้เคียงมากที่สุด จะต้องทำให้ Suspension กระจายตัวมากที่สุด หรืออาจจำเป็นจะต้องมีการนับมากกว่าครั้งขึ้น เช่น 3-10 ครั้ง แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยภายหลัง หรือบางครั้งอาจจำเป็นต้องเติม Wetting agent เช่น tween 20 ลงไปเพื่อช่วยให้สปอร์หรือเซลล์กระจายตัวได้ดีขึ้น (ทั้งนี้เพื่อให้การคำนวณความเข้มข้นถูกต้องแม่นยำมากขึ้น) จากนั้นใช้ Dropper หรือ loop หยด Suspension ของเชื้อลงบน scale ของ Haemocytometer ข้างละ 1 หยด จากนั้นปิดทับด้วย Cover slip และกดเบาๆ หากหยด Spore suspension ปริมาณพอดีจะไม่มีเชื้อเหลือล้นออกมาจากสไลด์
6. นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนสปอร์หรือเซลล์ของเชื้อ แล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้น โดยวิธีคำนวณข้างต้น ซึ่งความเข้มข้นที่มักใช้ในการปลูกเชื้อโดยทั่วไป เช่น เชื้อราจะอยู่ในช่วง  $10^5$ - $10^6$  สปอร์ต่อ มล. เป็นต้น

## ภาคผนวก ค

### การวิเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซิน



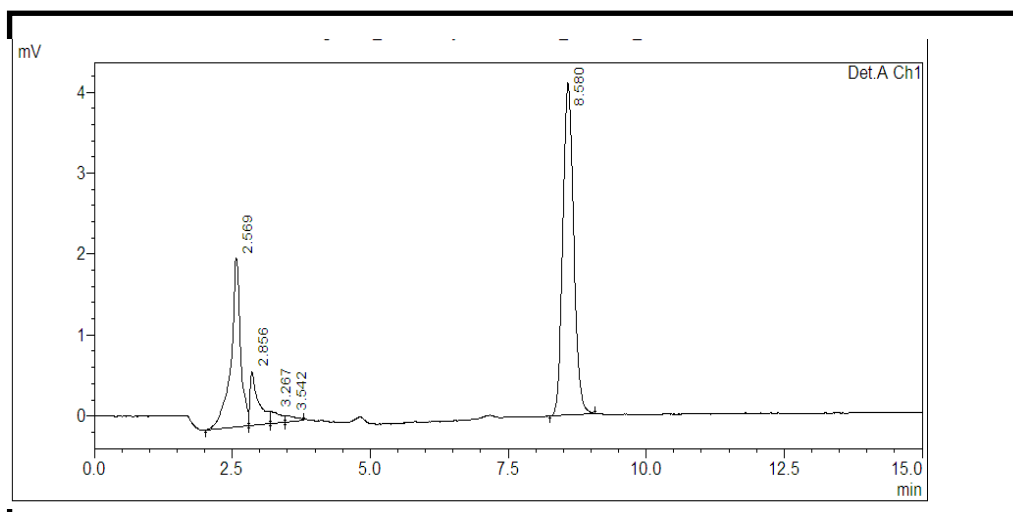
รูปที่ ค-1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารพิษอะฟลาทอกซินที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ ค-2 กราฟ (HPLC Chromatogram) แสดงการดูดซับอะฟลาทอกซิน B1 ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และยีสต์ผสมโคโคโตซาน (ครั้งที่ 1)

ตาราง ค-1 แสดงพื้นที่ใต้กราฟการดูดซับอะฟลาทอกซิน B1 ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และยีสต์ผสมโคโคโตซาน

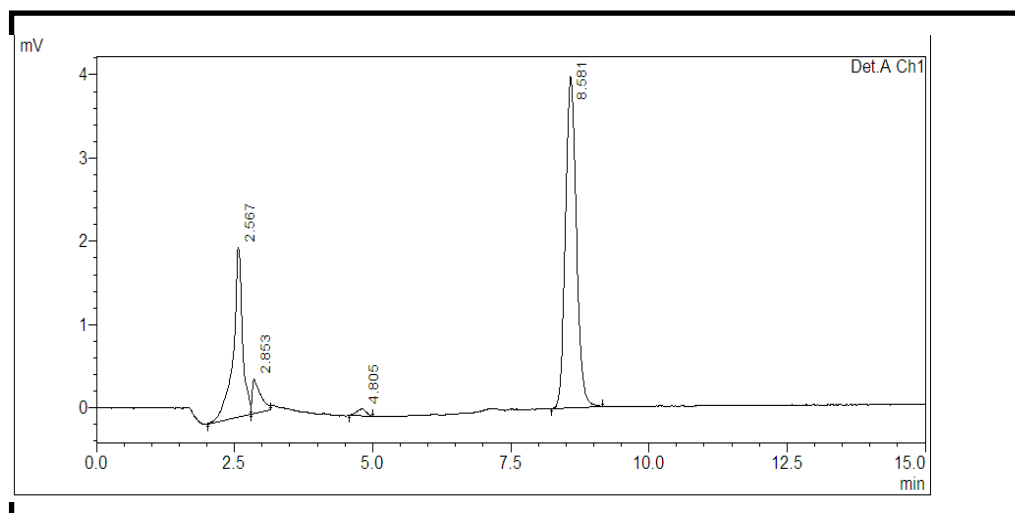
Peak Table					
Detector A Ch1 365 nm					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	2.561	26085	2157	28.07	29.828
2	2.849	6948	701	7.476	9.698
3	3.225	1774	130	1.908	1.799
4	8.676	58123	4242	62.545	58.674
Total		92930	7230	100.000	100.000



รูปที่ ค-3 กราฟ (HPLC Chromatogram) แสดงการดูดซับอะฟลาทอกซิน B1 ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยยีสต์ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และยีสต์ผสมโคโตซาน (ครั้งที่ 2)

ตาราง ค-2 แสดงพื้นที่ใต้กราฟการดูดซับอะฟลาทอกซิน B1 ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และยีสต์ผสมโคโตซาน

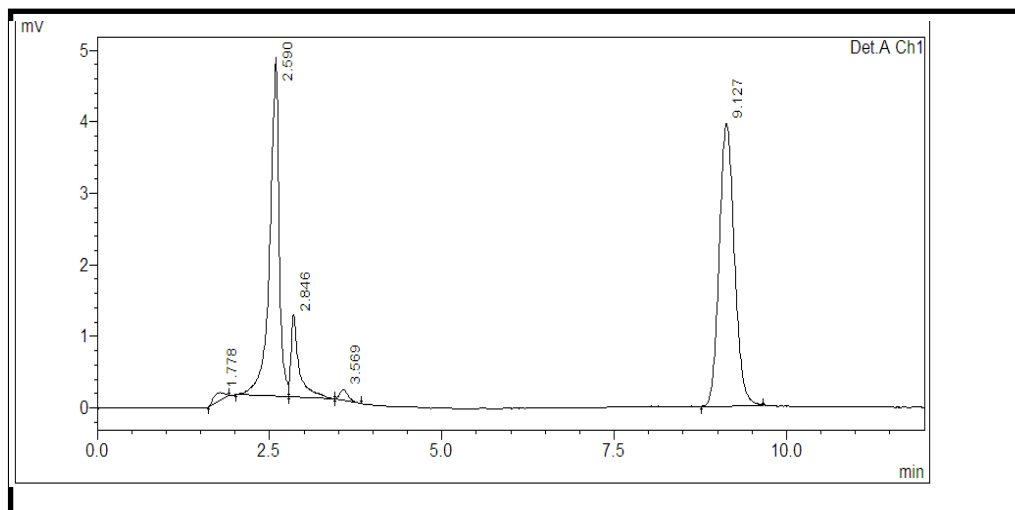
Peak Table					
Detector A Ch1 365 nm					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	2.569	25367	2090	27.635	29.546
2	2.856	7132	664	7.769	9.387
3	3.267	1852	140	2.017	1.984
4	3.542	1097	74	1.195	1.039
5	8.580	56347	4106	61.383	58.044
Total		91795	7074	100.000	100.000



รูปที่ ค-4 กราฟ (HPLC Chromatogram) แสดงการดูดซับอะฟลาทอกซิน B1 ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และยีสต์ผสมโคโตซาน (ครั้งที่ 3)

ตาราง ค-3 แสดงพื้นที่ใต้กราฟการดูดซับอะฟลาทอกซิน B1 ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และยีสต์ผสมโคโตซาน

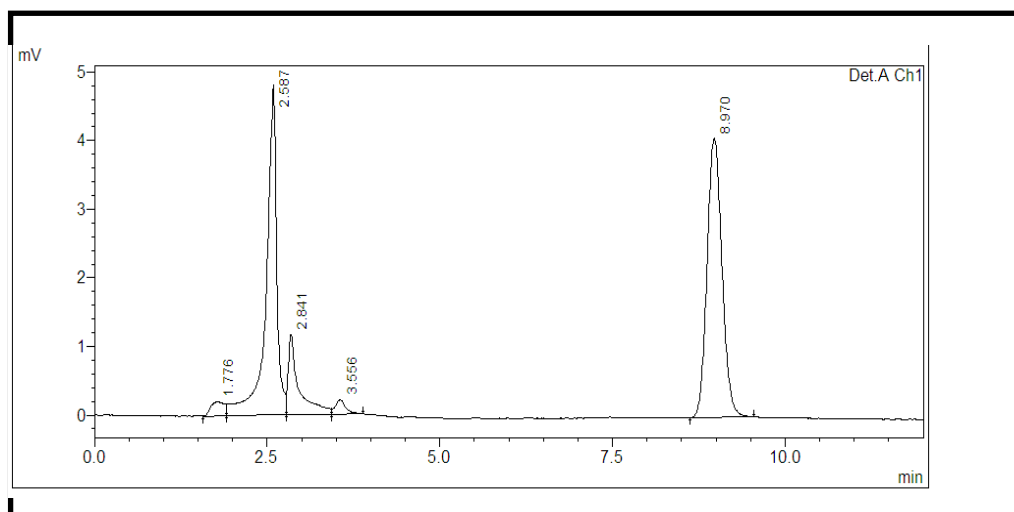
Peak Table					
Detector A Ch1 365 nm					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	2.567	23689	2037	28.289	31.285
2	2.853	4150	410	4.956	6.295
3	4.805	1008	84	1.204	1.298
4	8.581	54893	3980	65.551	61.122
Total		83740	6511	100.000	100.000



รูปที่ ค-5 กราฟ (HPLC Chromatogram) แสดงการดูดจับอะฟลาทอกซิน B1 ที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยยีสต์ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และยีสต์ผสมโคโตซาน (ครั้งที่ 1)

ตาราง ค-4 แสดงพื้นที่ใต้กราฟการดูดจับอะฟลาทอกซิน B1 ที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และยีสต์ผสมโคโตซาน

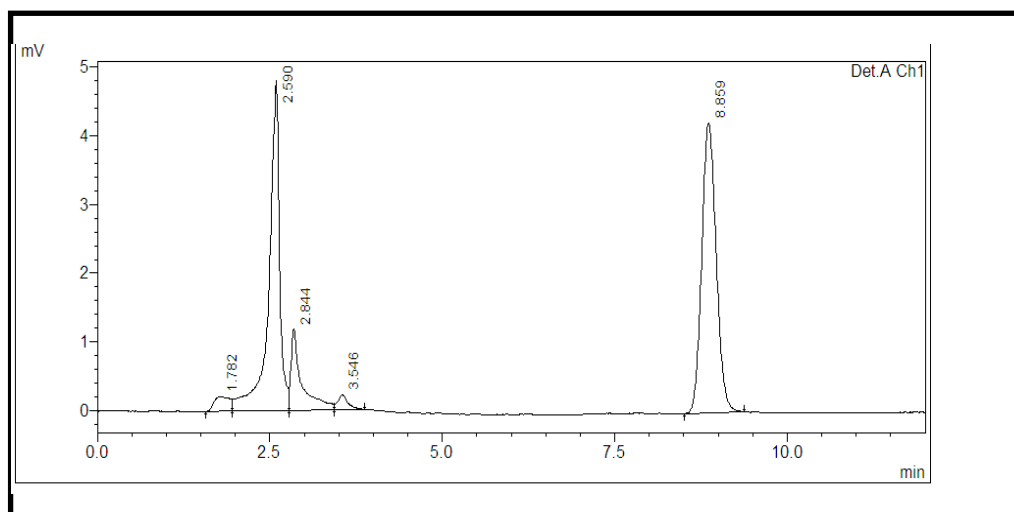
Peak Table					
Detector A Ch1 365 nm					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	1.778	1211	107	1.038	1.065
2	2.590	44329	4734	37.997	46.917
3	2.846	9447	1147	8.097	11.372
4	3.569	1280	155	1.097	1.535
5	9.127	60398	3946	51.771	39.11
Total		116665	10089	100.000	100.000



รูปที่ ค-6 กราฟ (HPLC Chromatogram) แสดงการดูดจับอะฟลาทอกซิน B1 ที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และยีสต์ผสมโคโตซาน (ครั้งที่ 2)

ตาราง ค-5 แสดงพื้นที่ใต้กราฟการดูดจับอะฟลาทอกซิน B1 ที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และยีสต์ผสมโคโตซาน

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	1.776	2786	208	2.143	1.981
2	2.587	51077	4812	39.294	45.905
3	2.841	12655	1175	9.736	11.205
4	3.556	2199	213	1.692	2.030
5	8.970	61270	4075	47.135	38.879
Total		129988	10482	100.000	100.000



รูปที่ ค-7 กราฟ (HPLC Chromatogram) แสดงการดูดซับอะฟลาทอกซิน B1 ที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และยีสต์ผสมโคโตซาน (ครั้งที่ 3)

ตาราง ค-6 แสดงพื้นที่ใต้กราฟการดูดซับอะฟลาทอกซิน B1 ที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และยีสต์ผสมโคโตซาน

Peak Table					
Detector A Ch1 365 nm					
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area%	Height%
1	1.782	3290	212	2.506	1.991
2	2.590	51660	4798	39.348	45.143
3	2.844	12796	1185	9.746	11.151
4	3.546	2165	215	1.649	2.019
5	8.859	61378	4219	46.751	39.696
Total		131288	10628	100.000	100.000

ตาราง ค- 7 แสดงปริมาณความเข้มข้นต่างๆของอะฟลาทอกซิน B1

ความเข้มข้น AFB <sub>1</sub>	พื้นที่ใต้กราฟ
0	0
10	312074.66
20	571308
40	1221241.5
50	1562596
75	2253908.7
80	2445011
160	4889201

ตาราง ค-8 แสดงผลการศึกษาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินปี 1 ที่เหลือจากการดูดซับโดยยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และยีสต์ผสมโคโตซาน ที่ระดับความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน 50 และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

	จำนวนซ้ำ	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	พื้นที่ใต้ กราฟ	ร้อยละของการยับยั้ง สารพิษอะฟลาทอกซิน
<i>S.cerevisiae</i> 5337 [AFB <sub>1</sub> 50]	1	6.5965	196480	87.13865163
	2	6.7607	201500	86.8184477
	3	6.5965	196480	87.13865163
	ค่าเฉลี่ย	6.6512	198153.3	87.03191699
<i>S.cerevisiae</i> 5337 + Chitosan [AFB <sub>1</sub> 50]	1	2.0701	58123	95.96384212
	2	2.0120	56347	96.07712543
	3	1.9644	54893	96.16986975
	ค่าเฉลี่ย	2.0155	56454.33	96.0702791
<i>S.cerevisiae</i> 5337 [AFB <sub>1</sub> 75]	1	11.2479	338660	85.04681107
	2	10.8383	326140	85.59133218
	3	10.5046	315940	86.03495161
	ค่าเฉลี่ย	10.8636	326913.3	85.55769829
<i>S.cerevisiae</i> 5337 + Chitosan [AFB <sub>1</sub> 75]	1	2.1445	60398	97.14901013
	2	2.1731	61270	97.11108502
	3	2.1766	61378	97.10638787
	ค่าเฉลี่ย	2.1647	61015.33	97.12216101

## ภาคผนวก ง.

### ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อนสำหรับยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และยีสต์ผสมไคโตซานในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน B1 ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตาราง ง-1 แสดงค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อน

Descriptives								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<i>S. cerevisiae</i> 5337	3	87.0329	.18438	.10645	86.5749	87.4909	86.82	87.14
<i>S. cerevisiae</i> 5337 + chitosan	3	96.0700	.10536	.06083	95.8083	96.3317	95.96	96.17
Total	6	91.5515	4.95165	2.02150	86.3550	96.7479	86.82	96.17

ตาราง ง-2 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	122.504	1	122.504	5433.114	.000
Within Groups	.090	4	.023		
Total	122.594	5			

2. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติสำหรับยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และ ยีสต์ผสม โคโคซาน ในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน B1 ที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตาราง ง-3 แสดงค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อน

Descriptives								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<i>S. cerevisiae</i> 5337	3	85.5567	.49085	.28339	84.3373	86.7760	85.05	86.03
<i>S. cerevisiae</i> 5337 + chitosan	3	97.1233	.02309	.01333	97.0660	97.1807	97.11	97.15
Total	6	91.3400	6.34294	2.58950	84.6835	97.9965	85.05	97.15

ตาราง ง-4 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	200.682	1	200.682	1662.189	.000
Within Groups	.483	4	.121		
Total	201.165	5			

3. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติสำหรับยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 และยีสต์ผสมโคโตซาน ในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน B1 ที่ระดับความเข้มข้น 50 และ 75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตาราง ง-5 แสดงค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อน

Descriptives								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
<i>S. cerevisiae</i> 5337 [50]	3	87.0333	.18475	.10667	86.5744	87.4923	86.82	87.14
<i>S. cerevisiae</i> 5337 + chitosan [50]	3	96.0700	.10536	.06083	95.8083	96.3317	95.96	96.17
<i>S. cerevisiae</i> 5337 [75]	3	85.5567	.49085	.28339	84.3373	86.7760	85.05	86.03
<i>S. cerevisiae</i> 5337 + chitosan [75]	3	97.1233	.02309	.01333	97.0660	97.1807	97.11	97.15
Total	12	91.4458	5.42621	1.56641	87.9982	94.8935	85.05	97.15

ตาราง ง-6 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน

ANOVA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	323.308	3	107.769	1503.584	.000
Within Groups	.573	8	.072		
Total	323.881	11			

ตาราง ง-6 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT)

	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
<i>S. cerevisiae</i> 5337 [75]	3	85.5567			
<i>S. cerevisiae</i> 5337 [50]	3		87.0333		
<i>S. cerevisiae</i> 5337 + chitosan [50]	3			96.0700	
<i>S. cerevisiae</i> 5337 + chitosan [75]	3				97.1233
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000