

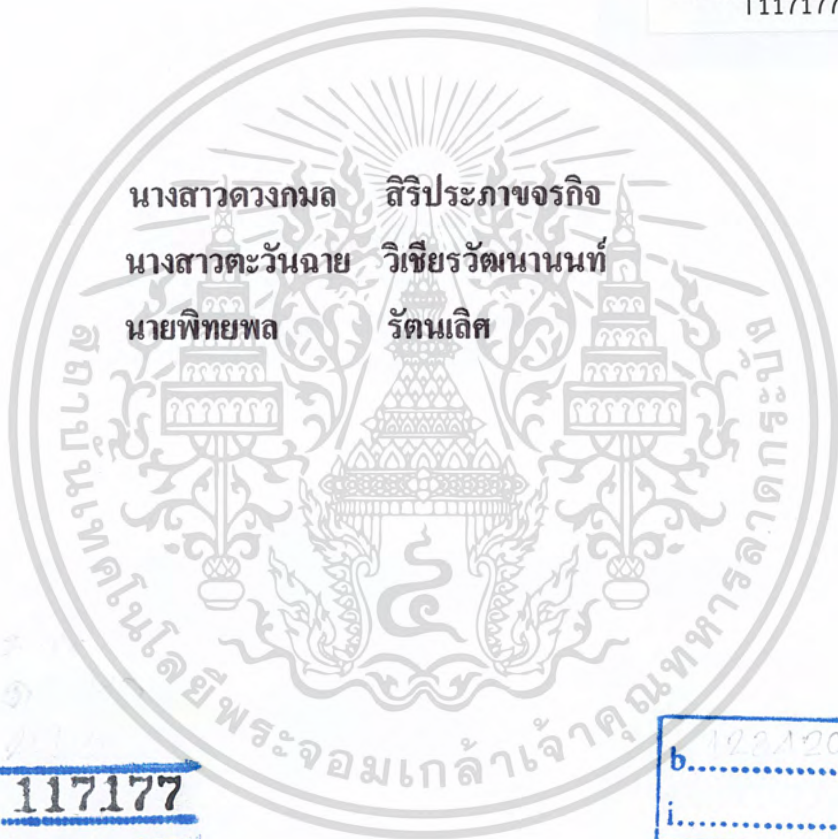
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

**การคัดเลือกสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีประสิทธิภาพ
ในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน**

**Screening of *Saccharomyces cerevisiae* for the efficiency
of aflatoxin binding**



T117177



เลขที่.....
เลขทะเบียน.....117177
วัน,เดือน,ปี. 19 ก.ค. 2554

b. 12212026
i.

**โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2553**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**SCREENING OF *Saccharomyces cerevisiae* FOR THE EFFICIENCY
OF AFLATOXIN BINDING**

**MISS DUANGKAMOL SIRIPRAPHAKACHONKIT
MISS TAWANCHAI WICHAINWATTANANON
MR. PITAYAPOL RATTANALOED**



**A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2010**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การคัดเลือกสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีประสิทธิภาพ
ในการดักจับสารพิษอะฟลาทอกซิน

Screening of *Saccharomyces cerevisiae* for the Efficiency of Aflatoxin Binding

ชื่อนักศึกษา นางสาวดวงกมล สิริประภาจรกิจ รหัสนักศึกษา 50050817
นางสาวตะวันฉาย วิเชียรพัฒนานนท์ รหัสนักศึกษา 50050818
นายพิทยพล รัตนเลิศ รหัสนักศึกษา 50050839



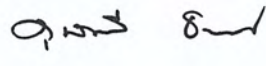
ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.คุณณี ณะบริพัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. ปราโมทย์ศิริโรจน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการ
พิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ประจำปีการศึกษา 2553

| คณะกรรมการสอบ | ลายมือชื่อ |
|---------------------------------|--|
| ประธานกรรมการ ผศ. มงคลเพ็ญสายใจ |  |
| กรรมการ ดร. ปราโมทย์ศิริโรจน์ |  |
| กรรมการ รศ.ดร. คุณณี ณะบริพัฒน์ |  |

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|----------------------|---|
| หัวข้อโครงการพิเศษ | การคัดเลือกสายพันธุ์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ที่มีประสิทธิภาพในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน |
| ชื่อนักศึกษา | นางสาวดวงกมล สิริประภาจรกิจ นางสาวตะวันฉาย วิเชียรวัฒนานนท์ นายพิทยพล รัตน์เลิศ |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรบัณฑิต |
| สาขา | จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม |
| ปีการศึกษา | 2553 |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | รศ.ดร.คุณณี ธาระบริวัฒน์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม | ดร. ปราโมทย์ ศิริโรจน์ |

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ เป็นการคัดเลือกยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 5 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการยึดจับกับอะฟลาทอกซิน บี1 พบว่า *S. cerevisiae* ที่มีค่าการดูดจับอะฟลาทอกซิน บี1 ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เรียงลำดับดังนี้ สายพันธุ์ TISTR 5337 5094 5047 5278 และ 5013 ตามลำดับ โดยมีค่าการดูดจับคิดเป็นร้อยละ 84.70, 78.06, 77.66, 76.52 และ 25.95 ตามลำดับ เมื่อนำ สายพันธุ์ TISTR 5337 มาทดสอบการดูดจับกับอะฟลาทอกซินที่ ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่สภาวะปกติ สภาวะที่ผ่านการทรีทเมนต์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ และ สภาวะที่ผ่านการให้ความร้อน 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่ามีค่าดูดจับคิดเป็นร้อยละ 56.48, 57.76 และ 59.55 ตามลำดับ

คำสำคัญ : อะฟลาทอกซิน, *Saccharomyces cerevisiae*, การดูดจับ

Title Screening of *Saccharomyces cerevisiae* for the Efficiency of Aflatoxin Binding

Students Miss Duangkamol Sripraphakachonkit
Miss Tawanchai Wichainwattananon
Mr. Pitayapol Rattanaoed

Degree Bachelor of Science

Major Program Industrial Microbiology

Academic Year 2010

Advisor Assoc.Prof. Dr. Dusanee Thanaboripat

Co-Advisor Dr. Pramote Sirirote

ABSTRACT

In this study, five strains of *Saccharomyces cerevisiae* were investigated for their ability to bind aflatoxin B₁. The result shows that the ability to bind 10 µg/ml aflatoxin B₁ is as follows: strains TISTR 5337, TISTR 5094, TISTR 5047, TISTR 5278 and TISTR 5013 and the binding percentages are 84.70%, 78.06%, 77.66%, 76.52% and 25.95%, respectively. When strain TISTR 5337 was further treated with 2 M HCl (60 minute) and autoclave (120 °C 20 minute) before tested with 40 µg/ml of aflatoxin B₁. It was found that the binding percentages of untreated yeast and yeast treated with acid and heat were 56.48%, 57.76% and 59.55%, respectively.

Keywords : aflatoxin, *Saccharomyces cerevisiae*, binding

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษเล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากผู้จัดทำได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่าน ดังนี้

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.คุณณี ฐานะบริพัทธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่ได้ให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษาอย่างใกล้ชิดและเสนอแนะแนวทางแก้ปัญหา รวมทั้งตรวจแก้โครงการพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.มงคล เพ็ญสายใจ อาจารย์คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์และให้ความกรุณาเป็นประธานสอบโครงการพิเศษ และ ดร.ปราโมทย์ ศิริโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำและให้ความกรุณาเป็นกรรมการในการสอบครั้งนี้

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่อนุเคราะห์เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นประโยชน์กับโครงการพิเศษฉบับนี้เป็นอย่างมาก

ขอขอบพระคุณ นางสาวจันทมาส จันทราช ที่คอยให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจตลอดการทำงาน รวมทั้งตรวจแก้โครงการพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้น

ขอขอบพระคุณ นายศักรินทร์ บุญล้ำ เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความร่วมมืออำนวยความสะดวก ในการทำโครงการพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำ ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว รวมทั้งเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจตลอดในการทำโครงการพิเศษ

นางสาวดวงกมล สิริประภาจรกิจ

นางสาวตะวันฉาย วิเชียรวัฒนานนท์

นายพิทยพล รัตนเลิศ

สารบัญ

| | หน้า |
|--|----------|
| บทคัดย่อภาษาไทย | I |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | II |
| กิตติกรรมประกาศ | III |
| สารบัญ | VI |
| สารบัญตาราง | VII |
| สารบัญรูป | VIII |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย | 2 |
| 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย | 2 |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง | 3 |
| 2.1 ยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 3 |
| 2.1.1 ลักษณะทั่วไปและโครงสร้างของยีสต์ | 4 |
| 2.1.2 ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ | 6 |
| 2.1.3 ความสำคัญของ <i>S. cerevisiae</i> ในการผลิตอาหารและแอลกอฮอล์ | 7 |
| 2.1.4 การใช้ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในการดักจับสารพิษ | 7 |
| 2.2 อะฟลาทอกซิน | 8 |
| 2.2.1 ชนิดของอะฟลาทอกซิน | 8 |
| 2.2.2 สูตร โครงสร้างของอะฟลาทอกซิน | 9 |
| 2.2.3 คุณสมบัติของอะฟลาทอกซิน | 10 |
| 2.2.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน | 10 |
| 2.2.5 การเปลี่ยนแปลงของสารอะฟลาทอกซินภายในร่างกาย | 11 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|---|------|
| 2.2.6 ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินในหลอดทดลอง | 11 |
| 2.2.7 ภาวะการเกิดพิษของอะฟลาทอกซินในคน | 12 |
| 2.2.8 อาหารที่ตรวจพบอะฟลาทอกซิน | 13 |
| 2.2.9 วิธีการลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซิน | 14 |
| บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย | 17 |
| 3.1 เชื้อจุลินทรีย์ | 17 |
| 3.2 สารเคมีและอุปกรณ์ | 17 |
| 3.2.1 สารเคมี | 17 |
| 3.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ | 17 |
| 3.3 วิธีการทดลอง | 18 |
| 3.3.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อยีสต์ | 18 |
| 3.3.2 การปรับสภาพเซลล์ (Treatment of cell) | 19 |
| 3.3.3 การเตรียมสารพิษอะฟลาทอกซินมาตรฐาน | 19 |
| 3.3.4 การทดสอบความสามารถในการดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซิน | 20 |
| 3.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารอะฟลาทอกซิน | 20 |
| 3.3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ | 21 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล | 21 |
| 4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซิน B ₁ | 21 |
| 4.2 การวิเคราะห์ทางสถิติของยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ใช้ในการดูดซับสารอะฟลาทอกซิน | 22 |
| 4.3 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นของสารอะฟลาทอกซินที่เหมาะสมต่อการดูดซับ | 23 |
| 4.4 การศึกษาประสิทธิภาพในการดูดซับสารอะฟลาทอกซินโดย <i>S. cerevisiae</i> สายพันธุ์ TISTR 5037 ที่สภาวะต่างๆ | 24 |

สารบัญ (ต่อ)

| | หน้า |
|----------------------------------|------|
| บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ | 27 |
| เอกสารอ้างอิง | 28 |
| ภาคผนวก ก. | 33 |
| ภาคผนวก ข. | 34 |
| ภาคผนวก ค. | 36 |
| ภาคผนวก ง. | 37 |



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ **VI** ี้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า | |
|----------|--|----|
| 2.1 | แสดงสูตร โมเลกุล น้ำหนัก โมเลกุลและจุดหลอมเหลวของอะฟลาทอกซิน | 10 |
| 2.2 | ระดับความเป็นพิษของสารอะฟลาทอกซิน | 13 |
| 2.3 | ค่ากำหนดปริมาณสารอะฟลาทอกซินต่ำสุดที่ยอมให้มีในอาหารต่างๆในบางประเทศ | 21 |
| 4.1 | ประสิทธิภาพของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน | 22 |
| 4.2 | แสดงปริมาณร้อยละของการยับยั้งสารอะฟลาทอกซิน โดย <i>S. cerevisiae</i> สายพันธุ์ต่างๆ | |
| 4.3 | แสดงปริมาณร้อยละการดูดจับสารอะฟลาทอกซินของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> สายพันธุ์ TISTR 5037 หลังจากผ่านการทดลองที่รีทเมนต์เซลล์ด้วยการ ให้ความร้อนและกรด | 24 |
| ก-1.1 | แสดงปริมาณความเข้มข้นต่างๆของอะฟลาทอกซิน เมื่อเจือจาง จากความเข้มข้นที่ 2,000 ไมโครกรัมต่อลิตร | 36 |
| ก-2.1 | ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B_1 ที่เหลือจากการดูดจับโดยยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ทั้ง 5 สายพันธุ์ | 37 |
| ก-2.2 | ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B_1 ที่เหลือจากการดูดจับโดยยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> สายพันธุ์ 5337 ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร | 38 |
| ง-1.1 | แสดงค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อน | 39 |
| ง-1.2 | แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน | 39 |
| ง-1.3 | แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT) | 40 |
| ง-2.1 | แสดงค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อน | 40 |
| ง-2.2 | แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน | 41 |
| ง-2.3 | แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT) | 41 |

สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ | หน้า |
|---|------|
| 2.1 แสดงลักษณะยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> | 3 |
| 2.2 แสดงภาพโครงสร้างยีสต์ | 4 |
| 2.3 แสดงภาพผนังเซลล์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> | 4 |
| 2.4 แสดงองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> | 5 |
| 2.5 แสดงโครงสร้างของอะพลาทอกซิน B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂ , B _{2a} และ G _{2a} | 9 |
| 4.1 แสดงถึงร้อยละของสารพิษอะพลาทอกซิน B ₁ ที่ถูกดูดซับโดยเชื้อ <i>S.cerevisiae</i> สายพันธุ์ต่างๆ | 22 |
| 4.2 แสดงร้อยละการดูดซับของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> สายพันธุ์ 5337 ที่ความเข้มข้นต่างๆ | 23 |
| ข.1 แสดงลักษณะและขนาดของ Haemacytometer | 34 |
| ข.2 แสดงลักษณะและตำแหน่งสำหรับการตรวจนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราด้วย Haemacytometer | 34 |
| ค-1.1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารพิษอะพลาทอกซินที่ความเข้มข้นต่างๆ | 36 |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้น มีสภาวะอากาศและสิ่งแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ปลายข้าว ถั่วลิสง กากถั่วเหลือง ปลาป่น กระจุกป่น เป็นต้น (เกรียงศักดิ์, 2540) โดยเชื้อราที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรนี้สามารถผลิตสารพิษชนิดหนึ่งเรียกว่า “อะฟลาทอกซิน” ซึ่งเป็นตัวการทำให้เกิดตับเสื่อมคุณภาพทางโภชนาการและก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคได้ อะฟลาทอกซินเป็นสารที่มีความเป็นพิษรุนแรง เพราะเป็นสารก่อมะเร็ง (Carcinogen) และเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (Mutagen) ในปัจจุบัน IARC (International Association Research Cancer) ได้จัดสารอะฟลาทอกซินเป็นสารก่อมะเร็งที่อยู่ในระดับอันตรายอันดับ 1 (Moss, 1998) อะฟลาทอกซินผลิตโดยเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่พบมากในเขตร้อน สภาพที่เอื้ออำนวยต่อการสร้างอะฟลาทอกซินได้ดีจะต้องมีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณร้อยละ 80-85 ความชื้นร้อยละ 17 และอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 24-35 องศาเซลเซียส ราดังกล่าวจะไม่สามารถเจริญในสภาพที่มีความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 12 ดังนั้นปัญหาการปนเปื้อนจึงเกิดขึ้นบ่อยในเขตที่มีอากาศอบอุ่น ไปจนถึงเขตร้อนชื้น รวมทั้งประเทศไทย (เบญจมาศ, 2539) สารพิษอะฟลาทอกซินมีหลายชนิด คือ สารพิษอะฟลาทอกซินชนิด B₁, B₂, B_{2a}, G₁, G₂, G_{2a}, GM₁, M₁, M₂, P₁, Q₁ และ R₀ ชนิดที่มีความเป็นพิษร้ายแรงได้แก่ อะฟลาทอกซิน ชนิด B₁, B₂, G₁, และ G₂ (ศุภกิจ และคณะ, 2520)

สารพิษอะฟลาทอกซินจัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขอย่างหนึ่งที่ต้องหาทางป้องกันและแก้ไข ดังนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับสารพิษอะฟลาทอกซินกันมาก ซึ่งการวิจัยส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นถึงการควบคุมและกำจัดสารพิษอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอาหาร โดยกรรมวิธีต่างๆ เช่น การใช้สารเคมี สมุนไพร และจุลินทรีย์ เป็นต้น ในการศึกษาโครงการพิเศษนี้มุ่งเน้นถึงการทดลองเปรียบเทียบเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ ในการดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซิน ซึ่งยีสต์ชนิดนี้เจริญได้รวดเร็ว สามารถหาได้ง่าย มีราคาไม่แพง และเหมาะต่อการนำมาดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซิน

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อคัดเลือกและเปรียบเทียบสายพันธุ์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 5 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน
- 1.2.2 เพื่อศึกษาความสามารถในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซินด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*
- 1.2.3 เพื่อศึกษาความเข้มข้นและสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซินของยีสต์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เป็นการศึกษาความสามารถในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน โดยใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์ เพื่อหาสายพันธุ์ที่ดีที่สุด และหาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการดูดจับ เช่น ความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน โดยนำยีสต์แห้งและยีสต์ที่ปรับสภาพ (treatment of cell) ที่อุณหภูมิสูง 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และทรีทเมนต์กับกรดไฮโดรคลอริก ก่อนนำเซลล์ไปดูดจับอะฟลาทอกซิน ทำการวิเคราะห์ผล โดยเทียบกับปริมาณอะฟลาทอกซินหาคความคุมโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 ทราบถึงสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ที่สามารถดูดจับอะฟลาทอกซินได้ดีที่สุด
- 1.4.2 สามารถนำเชื้อยีสต์มาใช้ในการลดปริมาณของสารพิษอะฟลาทอกซินที่พบในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหรือในอาหารได้
- 1.4.3 ช่วยลดอัตราความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็ง โดยสาเหตุมาจากสารพิษอะฟลาทอกซิน

บทที่ 2

ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae (รูปที่ 2.1) จัดอยู่ใน Kingdom: Fungi Phylum: Ascomycota Subphylum: Saccharomycotina Class: Saccharomycetes Order: Saccharomycetales Family: Saccharomycetaceae Genus: *Saccharomyces* และ Species: *S. cerevisiae* (Kurtzman และ Fell, 1998)



รูปที่ 2.1 แสดงลักษณะยีสต์ *S. cerevisiae*

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

2.1.1 ลักษณะทั่วไปและโครงสร้างของยีสต์

ยีสต์ เป็นจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต เซลล์ยีสต์ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม หรือรี นอกจากนี้อาจมีรูปร่างเป็นรูปถั่ว รูปกลมแบน ทรงกระบอก สามเหลี่ยม หรือยาวเป็นสาย ขนาดของยีสต์แตกต่างกันในแต่ละชนิด ลักษณะเด่นของยีสต์คือ เป็นพวกเซลล์เดี่ยวและมีหน่อ การแตกหน่อบางครั้งไม่หลุดออกจากกัน แต่เกาะกันเป็นกลุ่ม บางครั้งมีการเปลี่ยนแปลงโดยเซลล์ตรงกลางยาวต่อกันเป็นสาย เรียก ซูโดไมซีเลียม (pseudomycelium) องค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ (Kurtzman และ Fell, 1998) ได้แก่

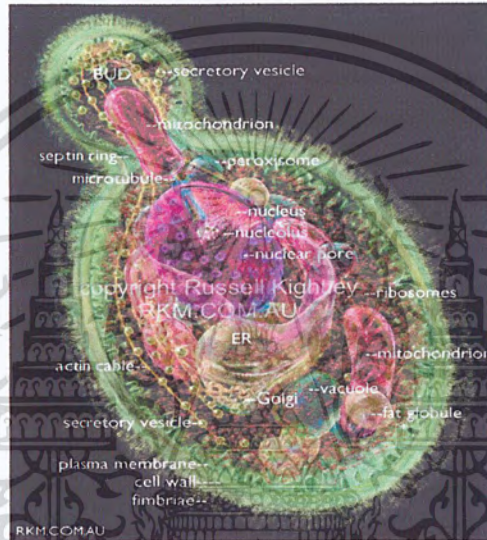
2.1.1.1 แคปซูล (capsule) ยีสต์บางชนิดมีสารเมือก เหนียว ที่จับออกสู่ภายนอก เซลล์ที่เรียกว่าแคปซูล แคปซูลส่วนใหญ่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีทั้งเฮเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) แมนโนส (mannose) และสารที่คล้ายแป้ง

2.1.1.2 ผนังเซลล์ (cell wall) ของยีสต์ที่มีอายุน้อยจะบางและจะหนาขึ้นตามอายุ

องค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* (รูปที่ 2.2 และ 2.3) มีพอลิแซ็กคาไรด์ 2 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

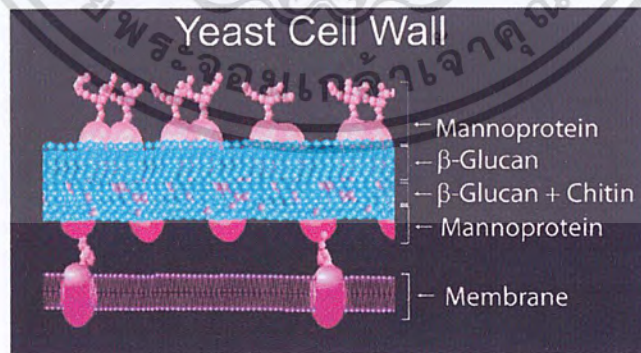
ชนิด คือ กลูแคน (glucan) ร้อยละ 30-34 และแมนแนน (mannan) ร้อยละ 30 กลูแคน (ประกอบด้วย ดี-กลูโคส) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในยีสต์ต่างๆ แต่แมนแนน (ประกอบด้วย ดี-แมนโนส) จะไม่พบในผนังเซลล์ของ *Schizosaccharomyces*, *Nadsonia*, *Rhodotorul* และราที่มีเส้นใยทุกชนิด ผนังเซลล์ของยีสต์มีโปรตีนประกอบอยู่ด้วย โปตีนบางชนิดทำหน้าที่เป็น เอนไซม์ ไขมันมีอยู่ร้อยละ 8.5 – 13.5 ปริมาณไคติน (chitin) เปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของยีสต์

2.1.1.3 เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) เยื่อหุ้มเซลล์มีความหนาประมาณ 8 ไมโครเมตร ประกอบด้วยชั้น 3 ชั้น ที่หีบต่อแสงอิเล็กตรอน 2 ชั้น คือ ชั้นนอกและชั้นในสุด เยื่อหุ้มเซลล์ประกอบด้วยไขมัน (รวมทั้งฟอสโฟลิพิด) โปรตีน และ พอลิแซ็กคาไรด์



รูปที่ 2.2 แสดงภาพ โครงสร้างยีสต์

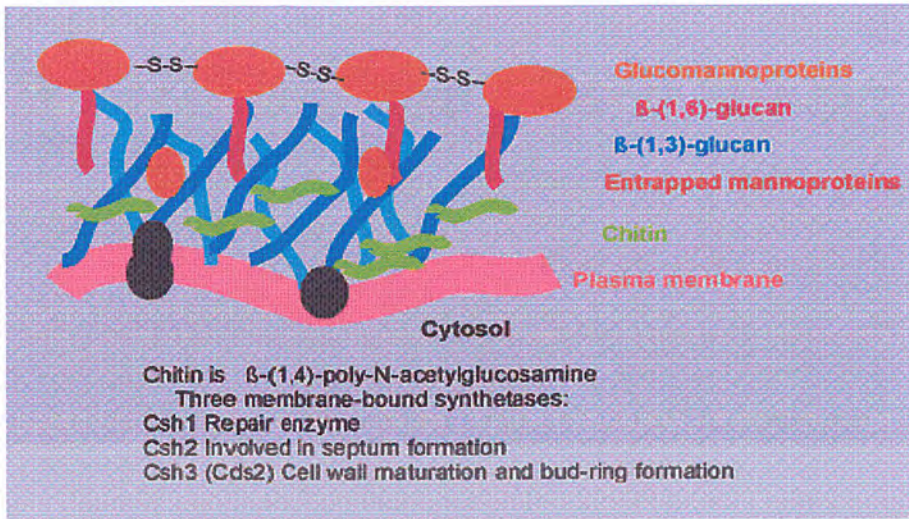
ที่มา : galaxiatours.com/budding-yeast-c...page%3D



รูปที่ 2.3 แสดงภาพผนังเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

ที่มา : www.sigmaaldrich.com/life-scienc...mes.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 แสดงองค์ประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

ที่มา : www.sbtthai.com/sbtold/education...main.htm

2.1.1.4 องค์ประกอบในโปรโทพลาซึม (protoplasm) เซลล์ยีสต์ประกอบด้วยไซโทพลาซึม ซึ่งเป็นสารกึ่งเหลว ภายในมีไรโบโซมที่มี RNA มาก และออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้มได้แก่ เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม

2.1.1.5 นิวเคลียส (nucleus) เป็นออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสล้อมรอบเยื่อหุ้มนิวเคลียสมีสมบัติยอมให้สารบางอย่างผ่านได้เท่านั้น (semipermeable membrane) นิวเคลียสมีหน้าที่เกี่ยวกับเมแทบอลิซึม และการสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต

2.1.1.6 ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เป็นออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม มีลักษณะคล้ายเส้นด้ายพันกันอยู่ ไมโทคอนเดรียมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.3-1 ไมโครเมตร และความยาวถึง 3 ไมโครเมตร มีเยื่อหุ้มสองชั้น ชั้นในจะพับเว้าเข้าข้างในเป็นคริสตี (cristae) ไมโทคอนเดรียประกอบด้วย ลิโปโปรตีนจำนวนมาก และมี RNA และ DNA เล็กน้อย

2.1.1.7 แวกิวโอล (vacuole) ภายในเซลล์ยีสต์จะมีแวกิวโอลอยู่หนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งแวกิวโอลซึ่งมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเมื่อย้อมสี ในเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโตภายในแวกิวโอลจะไม่มีโครงสร้างที่เป็นชิ้นส่วน แต่เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ “stationary phase” แวกิวโอลจะมีสารแกรนูลเพิ่มขึ้น อาจเป็นเมตาฟอสเฟต (metaphosphate) พอลิฟอสเฟต (polyphosphate) หรือลิพิด สารที่อยู่ในแวกิวโอลที่แยกได้ ได้แก่ เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการไฮโดรไลซ์ปฏิกิริยาต่างๆ เช่น โปรตีนเอส (protease) ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease) และเอสเทอเรส (esterase) จากการที่พบเอนไซม์ไฮโดรเลสในแวกิวโอล จึงคาดว่าแวกิวโอลเปรียบเหมือนไลโซโซม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.8 อินclusionชั้นต่างๆ (inclusion) เซลล์ยีสต์ที่แก่จะมีผนังเซลล์หนาขึ้นและสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น ความร้อน ความแห้งแล้ง และสารเคมี ยีสต์บางชนิดสะสมสารต่างๆ ไว้จำนวนมาก เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือโปรตีน บางชนิดมีรงควัตถุสีเหลือง ส้ม ชมพู น้ำตาลหรือคำ รงควัตถุเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นคาโรทีนอยด์ที่ละลายในไขมัน นอกจากนี้รงควัตถุ เช่น ไซโตโครม เฟลวิน ฮีโมโกลบิน และอื่นๆ ที่พบในเซลล์พืชและสัตว์ชั้นสูงก็พบในยีสต์ด้วยแหล่งเก็บสะสมอาหารและไฮโดรไลติก เอนไซม์

2.1.1.9 โครงสร้างอื่นๆภายในเซลล์ยีสต์ ได้แก่ ไรโบโซม ซึ่งเป็นแบบ 80 เอส เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม กอลจิบอดี และ เม็ดไขมัน

2.1.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ ได้แก่ (สาคิวรี, 2549)

2.1.2.1 อาหารที่ *S. cerevisiae* ใช้ได้ดี ได้แก่ น้ำตาล โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทสส่วนพอลิแซ็กคาไรด์ที่ใช้ได้คือ แป้ง ในสภาพไม่มีออกซิเจนน้ำตาลจะเข้าสู่กระบวนการหมักได้เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ในสภาพมีออกซิเจนและความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำยีสต์จะใช้น้ำตาลและเปลี่ยนไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ หรือเกิดกระบวนการหายใจเช่นเดียวกับในพืชและสัตว์

2.1.2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่ *S. cerevisiae* ยังสามารถเจริญได้ประมาณ 35-47 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญได้อยู่ระหว่าง 0-5 องศาเซลเซียส นอกจากอุณหภูมิมิผลต่อการเจริญแล้ว ยังมีผลต่อการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) ของยีสต์อีกด้วย อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแอสโคสปอร์ของ *S. cerevisiae* อยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส สูงสุดประมาณ 35 องศาเซลเซียส และต่ำสุด 11-12 องศาเซลเซียส

2.1.2.3 ออกซิเจน *S. cerevisiae* เป็นพวก facultative anaerobe แต่เจริญในสภาพมีออกซิเจนได้ดี ส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจนจะเจริญได้ช้า ในสภาพมีออกซิเจน *S. cerevisiae* ใช้น้ำตาล โดยการออกซิเดชันโดยสมบูรณ์ได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจนยีสต์ใช้น้ำตาล โดยการหมักส่วนใหญ่เป็นการให้เอทานอล หากมีออกซิเจน *S. cerevisiae* จะใช้น้ำตาลและเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แทนการหมักให้เอทานอล มีผลทำให้การหมักถูกยับยั้งโดยการหายใจ เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า "Pasteur effect" แต่ถ้าหากอาหารมีน้ำตาลความเข้มข้นสูง ยีสต์จะหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอลแทนการหายใจที่ได้คาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ ทำให้การหายใจถูกยับยั้งด้วยการหมัก ("Reverse Pasteur effect" "Grabtree effect")

2.1.2.4 พีเอช(pH) *S. cerevisiae* เจริญได้ในพีเอชช่วงกว้าง พีเอชต่ำสุดที่ *S. cerevisiae* สามารถเจริญได้คือ 1.5 ส่วนพีเอชสูงสุดคือ 8.0 นอกจากนี้พีเอชมีผลต่อการเจริญแล้วยังมีผลต่อการสร้างแอสโคสปอร์ของ *S. cerevisiae* อีกด้วย พีเอชในการสร้างสปอร์ของ *S. cerevisiae* สูงสุดคือ 9.1-9.2 ที่ต่ำสุดคือ 2.4-2.6

2.1.3 ความสำคัญของ *Saccharomyces cerevisiae* ในการผลิตอาหารและแอลกอฮอล์

2.1.3.1 ใช้ในการหมักพุด (puto) ซึ่งเป็นอาหารของชาวฟิลิปปินส์ มีลักษณะคล้ายข้าวหมากทำจากข้าวบดผสมผสมน้ำและหมักด้วยยีสต์เพื่อให้เกิดกรดและก๊าซ (คุชณิ, 2546)

2.1.3.2 ใช้ในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (single cell protein หรือ SCP) เพื่อเป็นแหล่งโปรตีนในอาหารของมนุษย์และสัตว์ อาหารที่ใช้ในการผลิตจุลินทรีย์เซลล์เดียวของยีสต์ชนิดนี้คือ กากน้ำตาล กระบวนการผลิตคือ เพิ่มจำนวนของเซลล์ยีสต์โดยกระบวนการหมักโดยทั่วไปจะใช้ระบบ submerged fermentation ซึ่งต้องการอากาศปริมาณมาก การเก็บเกี่ยวผลผลิต ทำโดยการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำไปทำให้แห้ง (สมใจ, 2550) การลดปริมาณกรดนิวคลีอิกในยีสต์ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอาร์เอ็นเอ เพราะเซลล์ยีสต์มีปริมาณกรดนิวคลีอิกอยู่สูง หากมนุษย์บริโภคจะทำให้เกิดกรดยูริก (uric acid) ในเลือดปริมาณมาก ทำให้เป็นโรคเก๊าท์ การลดปริมาณกรดนิวคลีอิกทำได้โดยการเปลี่ยนแปลงการเจริญของจุลินทรีย์ การใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ (คุชณิ, 2546)

2.1.3.3 ใช้ในการผลิตไวน์ (Wine) วัตถุดิบหลักที่ใช้ในการผลิตไวน์คือ ผลองุ่น โดยนำมาเคঁดก้านออก แล้วบดเพื่อให้เปลือกและเนื้อองุ่นถึงขาด (สิทธิสิน, 2542)

2.1.4 การใช้ยีสต์ *s.cerevisiae* ในการดูดจับสารพิษ

Shetty และ Jespersion (2006) ทำการทดลองนำยีสต์ *S. cerevisiae* กับ Lactic acid bacteria มาใช้ในการลดการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อรา(mycotoxin) พบว่าสามารถลดปริมาณของสารพิษ ที่ปนเปื้อนในอาหารได้ดีและมีความปลอดภัยด้วย เพราะ โดยปกติยีสต์ก็ถูกใช้เป็นก๊อปปี้เชื้อ (starter culture) ของกระบวนการหมักในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มอยู่แล้ว ดังนั้นยีสต์และ Lactic acid bacteria จึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพที่จะนำมาใช้ในการแก้ปัญหการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในอาหารได้

Shetty และคณะ (2007) พบว่า ยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากอาหารหมักในประเทศ Ghana และ West Africa สามารถดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁ ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยพบว่ายีสต์ 3 สายพันธุ์สามารถดูดจับอะฟลาทอกซิน B₁ ได้มากกว่าร้อยละ 40 นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตบางสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการดูดจับสารพิษได้ไม่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

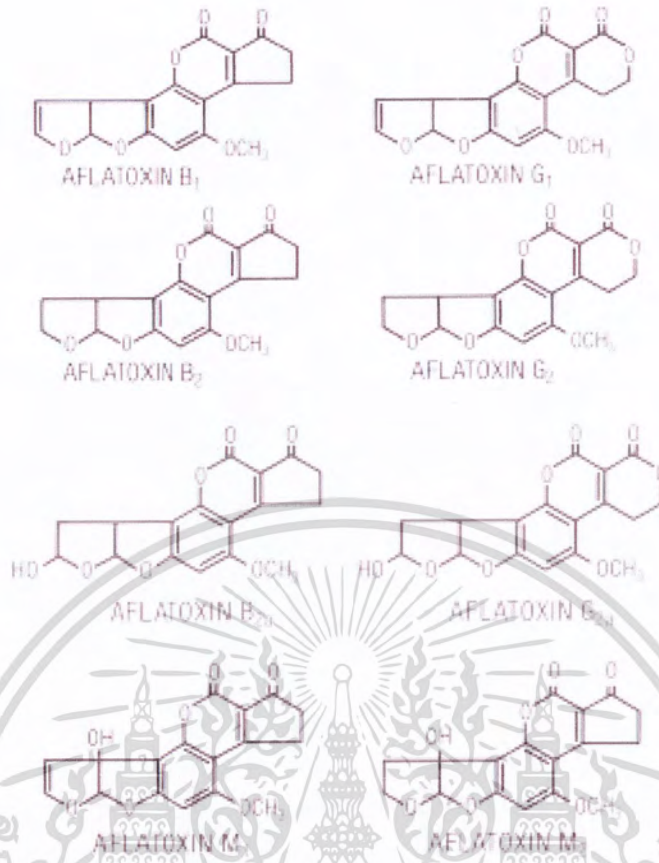
Santin และคณะ (2003) พบว่าในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ โดยปกติจะมีการเติมเซลล์ของ *S. cerevisiae* ในอาหารไก่เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติก (Probiotic) โดยยีสต์ที่เติมในอาหารไก่นั้น จะเป็นส่วนผนังเซลล์ซึ่งเป็นผลพลอยได้ (By-Product) จากกระบวนการผลิตเบียร์ การทดลองโดยให้หนูที่ได้รับสารอะฟลาทอกซิน B₁ กินอาหารที่ผสมด้วยยีสต์แห้งและผนังของเซลล์ยีสต์พบว่าความเป็นพิษที่เกิดจากสารอะฟลาทอกซิน B₁ จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

2.2 อะฟลาทอกซิน

สารพิษอะฟลาทอกซินถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 ที่ประเทศอังกฤษ ทำให้ไก่วงงเกิดพิษที่ตับและมีการตายมากกว่าหนึ่งแสนตัว แต่ยังไม่ทราบสาเหตุของโรคโดยแท้จริงว่าเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใด จึงเรียกโรคนี้อีกว่า Turkey X disease (Blount, 1961 และ Goldblatt, 1969) ภายหลังได้มีรายงานเกี่ยวกับโรคระบาดชนิดเดียวกันเกิดขึ้นกับเป็ดและไก่ฟ้า ในประเทศเคนยา และยูกันดา และโรคระบาดในปลาเทราท์ในประเทศสหรัฐอเมริกา จากการศึกษาค้นคว้าจึงพบว่าโรคนี้เกี่ยวข้องกับถั่วลิสง จึงมีการประชุมกลุ่มทำงานจาก 5 แห่งในประเทศอังกฤษ เรียกว่า กลุ่มทำงานวิจัยการเกิดพิษในถั่วลิสง ร่วมกันพิจารณาตั้งชื่อสารพิษจากเชื้อราเหล่านี้ว่า “อะ-ฟลา-ทอกซิน (A-fla-toxin)” โดยพิจารณาคำว่า “อะ (A)” มาจาก “แอสเปอร์จิลลัส (Aspergillus)” และคำว่า “ฟลา (fla)” มาจาก ฟลาวัส (flavus)” สารนี้จัดเป็น “สารพิษ หรือทอกซิน (toxin)” จึงนำมาเรียกรวมกันว่า “อะฟลาทอกซิน (Aflatoxin)”

2.2.1 ชนิดของอะฟลาทอกซิน

สารพิษอะฟลาทอกซินมีหลายชนิด (รูปที่ 2.5) คือ สารพิษอะฟลาทอกซินชนิด B₁, B₂, B_{2a}, G₁, G₂, G_{2a}, GM₁, M₁, M₂, P₁, Q₁ และ R₀ ชนิดที่มีความเป็นพิษร้ายแรงได้แก่ อะฟลาทอกซิน ชนิด B₁, B₂, G₁ และ G₂ โดยเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* สามารถผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁ ในปริมาณที่สูงกว่าสารพิษชนิดอื่นๆ อะฟลาทอกซิน B₁ มีพิษร้ายแรงมากที่สุด และเป็นสารพิษที่ทำให้เกิดมะเร็งตับของสัตว์ทดลองได้ดีที่สุด รองลงมาคือ G₁, B₂ และ G₂ (ศุภกิจ และคณะ, 2520) สำหรับอะฟลาทอกซิน M₁ และ M₂ เป็นเมทาบอลิท์ของ อะฟลาทอกซิน B₁ และ B₂ มักพบในน้ำนมและปัสสาวะของสัตว์ที่ได้รับอะฟลาทอกซิน B₁ และ B₂ (ชาญยุทธ และ อุทัย, 2538)



รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของอะฟลาทอกซิน B₁, B₂, G₁, G₂, B_{2a}, G_{2a}, M₁ และ M₂
ที่มา: Palmgren and Hayes (1987)

2.2.2 สูตรโครงสร้างของอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินเป็นสารเคมีที่เป็นอนุพันธ์ของ coumarin ต่อกับ bifuran ring ในกรณีของอะฟลาทอกซิน B₁ จะมี cyclopentanone ring จับกับ coumarin ทางด้านขวา ในกรณีของอะฟลาทอกซิน G₁ จะมี 6-member lactone ring จับกับ coumarin ทางด้านขวา เมื่อ furan ring ของ อะฟลาทอกซิน B₁ และอะฟลาทอกซิน G₁ เกิด saturation ด้วย ไฮโดรเจน 2 อะตอม จะเปลี่ยนเป็นสารอะฟลาทอกซิน B₂ และ อะฟลาทอกซิน G₂ ซึ่งความเป็นพิษจะน้อยกว่า อะฟลาทอกซิน B₁ และอะฟลาทอกซิน G₁ สำหรับอะฟลาทอกซิน M₁ และอะฟลาทอกซิน M₂ เกิดจากการเติมหมู่ไฮดรอกซิล 1 หมู่เข้าที่ตำแหน่งที่ 4 ของ furan ring ในอะฟลาทอกซิน B₁ และอะฟลาทอกซิน B₂ ตามลำดับ แต่ถ้าเติมหมู่ไฮดรอกซิลดังกล่าวเข้าที่ตำแหน่งที่ 2 ของ furan ring ในอะฟลาทอกซิน B₁ และอะฟลาทอกซิน G₁ จะเกิดเป็นสารอะฟลาทอกซิน B_{2a} และอะฟลาทอกซิน G_{2a} ตามลำดับ (ศรีสิทธิ์, 2540; Steyn และ Stander, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 อะฟลาทอกซินมีคุณสมบัติ ดังนี้ (ไมตรี, 2531)

2.2.3.1 สามารถเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตในช่วงความยาวคลื่น 256-365 นาโนเมตร โดยอะฟลาทอกซิน B₁ และ B₂ เรืองแสงสีน้ำเงิน อะฟลาทอกซิน G₁ และ G₂ เรืองแสงสีเขียว

2.2.3.2 ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์เคมีหลายชนิด เช่น เมทานอล เอทานอล อะซิโตนและคลอโรฟอร์ม แต่ไม่ละลายในอีเทอร์

2.2.3.3 มีอุณหภูมิหลอมเหลวสูง (ตารางที่ 2.1) ดังนั้นการใช้ความร้อนในรูปของการต้ม อบ คั่ว นึ่ง หรือการใช้ความดันไอน้ำเพื่อทำลายอะฟลาทอกซิน จึงไม่ค่อยได้ผล

2.2.3.4 สามารถถูกทำลายได้โดยไฮโปคลอไรท์ แอมโมเนีย ค่างแก่ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเสื่อมสภาพได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แสงแดด และรังสีแกมมา

ตารางที่ 2.1 แสดงสูตรโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุลและจุดหลอมเหลวของอะฟลาทอกซิน

| ชนิดของอะฟลาทอกซิน | สูตรโมเลกุล | น้ำหนักโมเลกุล | จุดหลอมเหลว (°C) |
|--------------------|--|----------------|------------------|
| B ₁ | C ₁₇ H ₁₂ O ₆ | 312 | 268-269 |
| B ₂ | C ₁₇ H ₁₄ O ₆ | 314 | 286-289 |
| G ₁ | C ₁₇ H ₁₂ O ₇ | 328 | 244-246 |
| G ₂ | C ₁₇ H ₁₄ O ₇ | 330 | 237-240 |
| M ₁ | C ₁₇ H ₁₂ O ₇ | 328 | 299 |
| M ₂ | C ₁₇ H ₁₄ O ₇ | 330 | 293 |

ที่มา: Marth (1990)

2.2.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

2.2.4.1 ชนิดของรา *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. bombycis*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii* และ *A. nomius* เป็นเชื้อราที่สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ (Kurtzman และคณะ, 1987; Goto, 1996; Steyn และ Stander, 1999)

2.2.4.2 อุณหภูมิ ราสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิประมาณ 25-30 °ซ Ayerst (1969) พบว่า *A. parasiticus* และ *A. flavus* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 10-43 °ซ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 32-33 °ซ และสารพิษอะฟลาทอกซินจะถูกสร้างขึ้นมาในอุณหภูมิช่วงประมาณ 12-40 °ซ

2.2.4.3 พีเอช ราจะสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชที่กว้างคือตั้งแต่ 2-8.5 แต่ส่วนใหญ่มักชอบพีเอชที่เป็นกรด (สุมาลี, 2539) โดย Buchanan และ Ayres (1976) พบว่า *A. parasiticus* สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ได้ในช่วงพีเอช 3.0-8.0

2.2.4.4 ความชื้นและความชื้นสัมพัทธ์ ความชื้นมีความสำคัญมากต่อการเจริญของ ราถ้าความชื้นสัมพัทธ์สูงจะทำให้ความชื้นสูงด้วย ความชื้นประมาณร้อยละ 14-30 และความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 80-100 ดังนั้นการเก็บวัตถุดิบอาหารสัตว์ ควรทำให้ความชื้นลดลงต่ำกว่าร้อยละ 13 และเก็บวัตถุดิบไว้ในที่ที่มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อรา (Ayerst, 1969)

2.2.4.5 ก๊าซออกซิเจน ความเข้มข้นของก๊าซออกซิเจนและการรับอนไดออกไซด์ จะมีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษจากรา ถ้าลดปริมาณของออกซิเจน หรือเพิ่มปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ จะทำให้การเจริญของราต่ำลง และลดปริมาณการสร้างสารพิษ ถ้าลดออกซิเจนโดยการบรรจุหีบห่อ หรือการใช้ oxygen scavenger จะสามารถยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินจาก *A. parasiticus* และ *A. flavus* ได้ (Ellis และคณะ, 1994)

2.2.5 การเปลี่ยนแปลงของสารอะฟลาทอกซินภายในร่างกาย

อะฟลาทอกซินเมื่อเข้าสู่ร่างกายสัตว์จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายทางลำไส้เล็กประมาณร้อยละ 10-20 และจะถูกกำจัดออกจากร่างกายประมาณร้อยละ 80-90 โดยจะถูกกำจัดออกทางมูลมากที่สุดคือประมาณร้อยละ 50-60 และในปัสสาวะประมาณร้อยละ 20-30 สำหรับอะฟลาทอกซินที่อยู่ในอวัยวะต่าง ๆ นั้นพบว่ามีการสะสมมากที่สุดในระดับ และไต ส่วนในอวัยวะอื่นจะมีปริมาณต่ำกว่าร้อยละ 0.1 ดังนั้น อะฟลาทอกซินจึงเป็นพิษต่อตับมากที่สุด อะฟลาทอกซินถูกกำจัดออกนอกร่างกายได้เกือบหมดภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะไม่มีมีการสะสมภายในร่างกาย เมื่อสัตว์ได้รับอะฟลาทอกซินเข้าไปเพียงครั้งเดียว แต่อาจมีการสะสมได้เช่นกัน ถ้าหากได้รับอะฟลาทอกซินเข้าสู่ร่างกายอย่างต่อเนื่อง (อุริธิดา, 2543 และ Wogan, 1966) เมื่อสารพิษอะฟลาทอกซินรวมตัวกับดีเอ็นเอ หน้าที่ทางชีวภาพของดีเอ็นเอจะถูกเปลี่ยนแปลงทำให้เอนไซม์นิวคลีอิกแอซิดพอลิเมอร์เอส (nucleic acid polymerase) ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ การสังเคราะห์โปรตีนต่างๆ จะหยุดชะงักลง (Ueno, 1983)

2.2.6 ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินในหลอดทดลอง

อะฟลาทอกซินเป็นพิษในสัตว์ทดลองทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง ค่า LD₅₀ แตกต่างกันมากแล้วแต่ชนิดของสัตว์ทดลอง สัตว์ขนาดใหญ่ เช่นหนูพุก หนูตะเภา หนูแฮมสเตอร์ หมู แกะ วัว และลิง เมื่อได้รับอะฟลาทอกซินจะมีพิษต่อตับ ตับจะอักเสบ มีไขมันคั่งในเซลล์ ตับแข็ง ท่อน้ำดีมีขนาดใหญ่มากขึ้น เลือดออกในตับและตายในที่สุด (ไมตรี, 2543) กลไกในการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของอะฟลาทอกซินทำให้สารกลุ่มนี้โดยเฉพาะ อะฟลาทอกซินB₁ จัดเป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อกลายพันธุ์ (มาลินี, 2527)

ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินมีพิษรุนแรงต่อตับทำให้เกิดโรคตับอักเสบที่รุนแรงในสัตว์หลายชนิดรวมทั้งคนและทำให้เกิดมะเร็งที่ตับสัตว์แต่ละชนิดจะแสดงอาการและ

ความไวต่ออะฟลาทอกซิน ต่างกันขึ้นอยู่กับชนิด สายพันธุ์ อายุของสัตว์ รวมทั้งสภาพแวดล้อม และปริมาณของอะฟลาทอกซินที่ได้รับ พวกสัตว์ปีก เช่น เป็ด, ไก่, ไก่วง มีความไวต่ออะฟลาทอกซินมากที่สุด รองลงมาได้แก่ สุกร, สุนัข, ปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout), หนู และคน ส่วนสัตว์เคี้ยวเอื้องมีความต้านทานต่ออะฟลาทอกซินมากกว่าสัตว์อื่น ยกเว้นในลูกสัตว์เหล่านี้ซึ่งจะมีความไวต่อสารพิษอะฟลาทอกซินมากกว่าสัตว์ที่โตเต็มวัย (เบญจมาศ, 2539)

2.2.7 ภาวะการเกิดพิษของอะฟลาทอกซินในคน

อะฟลาทอกซินเป็นสารก่อมะเร็งในระดับของคนและสัตว์ ถ้ามีการบริโภคอาหารที่มีอะฟลาทอกซินอย่างต่อเนื่องจะมีผลในการทำลายตับ ซึ่งจัดเป็นมะเร็งชนิดหนึ่งที่ถูกกระตุ้นโดยอะฟลาทอกซินทำให้เกิดการสะสมของไขมันที่ตับ ถ้ามีปริมาณมากจะเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏของตับจากสีม่วงแดงเป็นสีเหลืองแดง ตับอักเสบ ตับแข็ง เนื้องอกในตับ มะเร็งตับ และตายในที่สุด (อรุณศรี, 2540 และ สุรสิทธิ์, 2538) อะฟลาทอกซินสามารถผ่านจากมารดาสู่ทารกในครรภ์โดยทางรกทั้งคนและสัตว์ และสามารถก่อให้เกิดผลเสียต่อตัวอ่อนได้ เช่น การตายในครรภ์ การเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ และการเกิดเนื้องอกในตัวอ่อน (มุกดา, 2536)

อาการเป็นพิษเฉียบพลันเนื่องจากอะฟลาทอกซินจะเกิดขึ้นเฉพาะในเด็ก ส่วนอาการพิษเรื้อรัง การเกิดไขมันมากในตับ (fatty liver) ตับอักเสบและเกิดพังผืดในตับ (liver fibrosis) ตับแข็ง (cirrhosis) และมะเร็งตับ (hepatoma) พยาธิสภาพดังกล่าวจะเกิดขึ้นในผู้ใหญ่เป็นการสะสมพิษทีละน้อยจนเกิดพิษขึ้นมา (ไมตรี, 2543)

ในประเทศไทยมีรายงานการตายของเด็กทุกปีเนื่องจากผลของสารพิษอะฟลาทอกซิน (Hayes, 1992) ตัวอย่างของการเกิดโรคที่รุนแรงเกิดเมื่อปี พ.ศ. 2511 มีรายงานการป่วยของเด็กอายุ 1-7 ปี ที่จังหวัดอุดรธานี พบว่าเด็กที่มีร่างกายแข็งแรงมีอาการป่วยอย่างเฉียบพลันเริ่มจากมีไข้ ชักไม่รู้สติตัว อาการทรุดลงอย่างรวดเร็วและถึงแก่ความตายใน 48-72 ชั่วโมง จากการตรวจสอบเด็กที่เสียชีวิต พบว่าสมองบวม ตับโต ต่อม้ำเหลืองบวม ไตและกล้ามเนื้อหัวใจผิดปกติ และพบอะฟลาทอกซินและเมทาบอลไลท์ของอะฟลาทอกซินอยู่ตามอวัยวะต่างๆ ของเด็กด้วย โรคดังกล่าวมีอาการคล้ายกับอาการโรคไรย์ (Reye's syndrome) ซึ่งกลุ่มอาการโรคไรย์ เป็นกลุ่มอาการของโรคที่เกิดขึ้นในเด็กก่อนวัยเรียนมีอาการปวดท้อง ตัวร้อน อาเจียน มักถึงแก่ชีวิตภายใน 24-48 ชั่วโมง จากการตรวจศพพบสมองบวม ไขมันแทรกระหว่างเซลล์ของอวัยวะต่างๆ มีเลือดออกเป็นจุดเล็กๆ มีรายงานครั้งแรกจากจังหวัดอุดรธานี จึงเรียกว่า Udom encephalopathy จากการตรวจสอบพบว่าเด็กรับประทานข้าวเหนียวหนึ่งที่ค้างหลายวัน มีเชื้อราหลายสายพันธุ์ปนเปื้อน เมื่อนำอวัยวะของเด็กมาตรวจพบอะฟลาทอกซินในปริมาณที่สูง นอกจากนั้นมียารักษาโรคพบประชากรในจังหวัดราชบุรี และนครปฐม เกิดมะเร็งที่ตับและตาย เนื่องจากบริโภคอาหารที่มีอะฟลาทอกซินปนเปื้อน (Shank และคณะ, 1972)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.8 อาหารที่ตรวจพบอะฟลาทอกซิน

ในประเทศไทยผลผลิตทางการเกษตรที่ตรวจพบอะฟลาทอกซินได้แก่ ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ปลายข้าว ถั่วเหลือง มันสำปะหลัง ปลาป่น กระจุกป่น เป็นต้น (อนงศ์, 2546) และพบการปนเปื้อนในอาหารสัตว์ นอกจากนี้ยังตรวจพบในมันสำปะหลัง พริก หัวกระเทียม แยม แม้แต่ในน้ำมันพืช (จักรพันธุ์, 2542)

สำหรับในต่างประเทศนั้น นอกจากจะพบอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงแล้วยังสามารถพบจากอาหารชนิดอื่นอีก เช่น ข้าวโพด ข้าวบาเลย์ ถั่ว นม (Ciegler และคณะ, 1966) เมล็ดฝ้าย ข้าวโอ๊ต ข้าว ถั่วเหลือง ข้าวสาลี สปาเกตตี้ มันสำปะหลัง ถั่วเขียว กากถั่วเหลือง (จักรพันธุ์, 2542)

เนื่องจากสารพิษอะฟลาทอกซินรุนแรงมาก แม้ในปริมาณน้อย ก็สามารถทำให้เกิดอันตรายได้ หน่วยกำหนดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน จึงมักกำหนดเป็นส่วนในพันล้านส่วน (ppb) หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม บางครั้งอาจใช้เป็นส่วนในล้านส่วน (ppm) ปริมาณสูงสุดของอะฟลาทอกซินที่อนุญาตให้มีในผลิตผลทางการเกษตร ในอาหารสัตว์และอาหารคนนั้น มีกำหนดแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ค่ากำหนดปริมาณสารอะฟลาทอกซินต่ำสุดที่ยอมให้มีในอาหารต่างๆในบางประเทศ

| ชนิดของสาร | ประเทศ | ชนิดของอาหาร | ค่าต่ำสุดที่ยอมให้มีได้ (พิพิบ) |
|------------------------|-------------|--------------------|---------------------------------|
| 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 |

ที่มา : อมรา (2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.9 วิธีการลดปริมาณการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซิน

วิธีการลดการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซินในผลผลิตทางการเกษตร โดยวิธีทางกายภาพ เคมี และชีววิทยา มีดังนี้

2.2.9.1 วิธีทางกายภาพ

การคัดเลือกเมล็ดพืช โดยการคัดเลือกที่มีเชื้อรา หรือมีลักษณะลีบเล็ก นำหนักเบา และเปลี่ยนสีจากเดิมออกจากกอง เพราะว่ามีเมล็ดที่มีลักษณะดังกล่าว มักมีอะฟลาทอกซินปนเปื้อน การคัดเลือกอาจจะใช้เครื่องเป่า เพราะเมล็ดที่ถูกทำลายย่อมมีน้ำหนักเบากว่าปกติ (จักรพันธุ์, 2542) ในงานวิจัยของ Park และ Liang (1993) พบว่าปริมาณสารอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงจากไร่เกษตรกรจำนวน 40,000 กิโลกรัม ลดลงได้ถึงร้อยละ 99 เมื่อผ่านกระบวนการคัดแยกด้วยมือและเครื่องมือคัดต่างๆ

การใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต โรงงานอาหารสัตว์บางแห่งใช้วิธีตรวจหาอะฟลาทอกซิน โดยการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตบนเมล็ด และคัดเลือกเมล็ดที่เรืองแสงสีเขียวหรือสีฟ้าออก ในกรณีนี้ใช้ได้เฉพาะเมล็ดที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในปริมาณสูง และอยู่ที่ผิวเมล็ดเท่านั้น (จักรพันธุ์, 2542) การฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตช่วยลดความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินและทำลายอะฟลาทอกซินในน้ำมันได้

การร่อนเมล็ดธัญพืชเพื่อกำจัดเศษฝุ่นละอองออกและการล้างจะเป็น วิธีหนึ่งที่สามารถกำจัดสารพิษออกจากเมล็ดธัญพืชได้ แต่วิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดก็คือการอบเมล็ดพืช แต่ต้องมีการออกแบบเครื่องอบพิเศษ วิธีนี้มีข้อดีคือ ช่วยให้เมล็ดธัญพืชแห้งสนิท (Charmley และคณะ, 1995)

ดินเหนียวสมกไทด์ (smactile clay mineral) เหมาะที่จะนำมาใช้ดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁ (คมกริช, 2547) มีความสามารถในการแลกเปลี่ยนแคทไอออนสูง มีขนาดอนุภาคที่เล็ก และสามารถเข้าสู่พื้นที่ระหว่างชั้นได้ ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้ดินเหนียวชนิดนี้มีความสามารถในการจับกับอะฟลาทอกซิน B₁ ได้สูงกว่าดินเหนียวชนิดอื่น

2.2.9.2 วิธีทางชีววิทยา ได้แก่

ไมตรี (2531) พบว่าการใช้ steroid-hydroxylating fungi และ *Acinetobacter calcoaticus* สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอะฟลาทอกซิน และออกราทอกซิน เอ (Ochratoxin A) ให้เป็นสารที่ไม่เป็นพิษได้

คุชณี และคณะ (2539) พบว่าการใช้เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* เติบโตในถั่วเหลืองหนึ่งสามารถยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ในระหว่างการผลิตเทมเป้

Thanaboripat และคณะ (1997) พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus lactis* ร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* โดยการใส่เชื้อ *S. lactis* หลังจากที่ *A. parasiticus* เจริญแล้วเป็นเวลา 3 วัน พบว่าในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงสารพิษอะฟลาทอกซินลดลงจาก 108.33 เป็น 94.18 และ 31.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อเลี้ยง *S. lactis* เป็นเวลา 3 วันก่อนทำการใส่สปอร์ *A. parasiticus* พบว่า *A. parasiticus* สามารถผลิตอะฟลาทอกซินได้เพียง 58.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

ธีระยุทธ และชัยวัฒน์ (2524) พบว่าเชื้อ *Flavobacterium aurantiacum* สามารถดูดซับอะฟลาทอกซิน B₁ ออกจากอาหารชนิดเหลวได้ ซึ่งเชื้อชนิดนี้จะไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอะฟลาทอกซิน B₁ ให้เป็นสารเคมีตัวใหม่ และสามารถลดสารอะฟลาทอกซินได้ถึงร้อยละ 74 เมื่อบ่มสารพิษไว้กับเซลล์ของแบคทีเรียนาน 68 ชั่วโมง

Gratz และคณะ (2007) พบว่าเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* สายพันธุ์ GG สามารถดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁ ในถั่วลิสงได้โดยกลไกเมแทบอลิซึมและความเป็นพิษในคาโก 2 เซลล์ (caco-2 cell) ซึ่งมีการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยประยุกต์ใช้คาโก 2 เซลล์ (caco-2 cell) ร่วมกับ ไซโตโครม พี 450 (cytochrom P 450) ผลที่ได้จากการลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินทำให้ลดความรุนแรงต่อการเป็นมะเร็งตับได้

Mendoza และGusman (2009) พบว่า Lactic acid bacteria สามารถดูดซับอะฟลาทอกซิน B₁ ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนจึงทำให้เชื้อชนิดนี้สามารถดูดซับอะฟลาทอกซินในอาหารหมักและในถั่วลิสงของคนและสัตว์ได้

Calistru และคณะ (1997) รายงานว่า 4 ใน 9 ไอโซเลตของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ที่แยกได้จากธรรมชาติ 2 สายพันธุ์ คือ *T. harzianum* และ *T. viride* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *F. moniliforme*

2.2.9.3 วิธีทางเคมี ได้แก่

ไมตรี และคณะ (2529) รายงานว่าการใช้เกลือ เช่น แอมโมเนียมคาร์บอเนต ร้อยละ 3 และร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซิน B₁ 515-645 พีพีบี ในถั่วลิสงคั่วป่นได้ถึงร้อยละ 64-69 และสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซิน B₁ 160 พีพีบี ในเมล็ดข้าวโพดได้ร้อยละ 59-81.5 และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซิน B₁ ในข้าวโพดและถั่วลิสงได้ร้อยละ 60 และ 54 ตามลำดับ แคลเซียมไฮโปคลอไรด์ ร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซิน B₁ ได้ถึงร้อยละ 60

คุณฉวี และคณะ(2542) รายงานว่าการใช้เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 4 และ 5 เกลือแอมโมเนียมคาร์บอเนตและโซเดียมไบซัลไฟด์ร้อยละ 2 หรือมากกว่า สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษของอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thanaboripat และคณะ (2007) ได้มีการศึกษาถึงการนำสารสกัดจากสมุนไพรเครื่องเทศ และน้ำมันหอมระเหย ในการยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* น้ำมันหอมระเหยหลายชนิด เช่น ตะไคร้ ตะไคร้หอม อบเชย เสมีดขาว มีผลในการลดปริมาณของเชื้อราและปริมาณอะฟลาทอกซินได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.)
เทคโนโลยีแห่งชาติ 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 B₁ (Aflatoxin B₁) บริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน

3.2.1.4 กรดอะซิติก (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 ฐัน (Agar)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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 กระบอกป็นเหยียง 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 เข็มฉีดยา
- 3.2.2.16 เครื่องชั่ง รุ่น BA 610 บริษัท Sartorius ประเทศเยอรมัน

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อยีสต์

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

3.4.1.2 ถ่ายเชื้อจากอาหาร MYGP ที่มีค่าความเข้มข้น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเมื่อนำมาวัดความขุ่นจะได้ค่า Optical density (O.D.) เป็น 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.4.1.3 เก็บเกี่ยวเซลล์ที่มีความเข้มข้นตามที่กำหนด มาปั่นเหยียง (centrifuge) เพื่อแยกเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline, pH 6.0) (ภาคผนวก ก.) ปั่นเหยียงเซลล์ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีทุกครั้ง ที่ทำการล้างเซลล์

3.4.1.4 นับจำนวนเซลล์โดยใช้วิธี haemocytometer (ภาคผนวก ข.)

3.4.1.5 นำเซลล์ไปทำให้แห้งโดยการนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman no.1 นำไปอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

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

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

3.4.2.2 ถ่ายเซลล์ลงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน 10 มิลลิลิตร ปรับสภาพเซลล์โดยการใช้ความร้อน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หรือปรับสภาพเซลล์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงพร้อมกับเขย่าเบาๆ

3.4.2.3 นำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน ปั่นเหวี่ยงเซลล์ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีทุกครั้งที่ทำการล้างเซลล์

3.3.3 การเตรียมสารพิษอะฟลาทอกซินมาตรฐาน

เจือจางสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁ ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเมทานอล จากนั้นปรับความเข้มข้นให้ได้ 160, 80, 40, 20 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.4 การทดสอบความสามารถในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน

3.4.4.1 นำเซลล์ที่ล้างด้วยบัฟเฟอร์ปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 10⁹ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ประมาณ 30 มิลลิลิตรของน้ำหนักเซลล์แห้ง)

3.4.4.2 ชั่งเซลล์ให้มีน้ำหนัก 300 มิลลิกรัม นำไปบดให้ละเอียด

3.4.4.3 ผสมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน ปริมาตร 9.50 มิลลิลิตร และสารละลายมาตรฐานที่มีสารอะฟลาทอกซิน B₁ เข้มข้น 10.0 ไมโครกรัม ปริมาตร 0.50 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันกับตัวเซลล์ ทำชุดควบคุมโดยผสมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินและสารละลายมาตรฐานที่มีสารอะฟลาทอกซิน B₁

3.4.4.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พร้อมกับเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

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

3.4.4.6 คัดเลือกเก็บเฉพาะส่วนใส (supernatant)

3.4.4.7 เตรียมชุดควบคุม (Control) ที่มีเฉพาะสารพิษมาตรฐานอะฟลาทอกซิน ไม่มีเชื้อ *S. cerevisiae* นำไปวิเคราะห์ด้วยด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณสารอะฟลาทอกซิน

นำสารละลายส่วนที่สกัดได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง และทำการเปรียบเทียบผลการทดลองทำได้โดยทำการฉีดสารตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าเครื่องโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง ที่ต่อด้วยคอลัมน์ (column) ชนิด reverse phase column (supercosil TMLC - 18) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 250 x 4.6 มิลลิเมตร และ mobile phase ที่ใช้คือ น้ำ : กรดแอซิดิก: เมทานอล ในอัตราส่วน (45:5:50) ค่าอัตราการไหล (Flow rate) คือ 1 มิลลิิตรต่อนาที ตรวจวัดที่ 365 นาโนเมตร เปรียบเทียบผลกับกราฟมาตรฐาน

3.4.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

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



บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁

จากการศึกษาความสามารถในการดูดจับสารอะฟลาทอกซิน B₁ จากเชื้อ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ TISTR 5013, TISTR 5047, TISTR 5094, TISTR 5278 และ TISTR 5337 โดยการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการเก็บเกี่ยวเชื้อเมื่อมีค่าความเข้มข้น (OD₆₀₀) เท่ากับ 0.1 นำเชื้อในรูปผงปริมาณ 0.3000 กรัม ผสมลงในสารอะฟลาทอกซิน B₁ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน นำไปเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยง เพื่อนำส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินที่เหลือจากการดูดจับ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.1

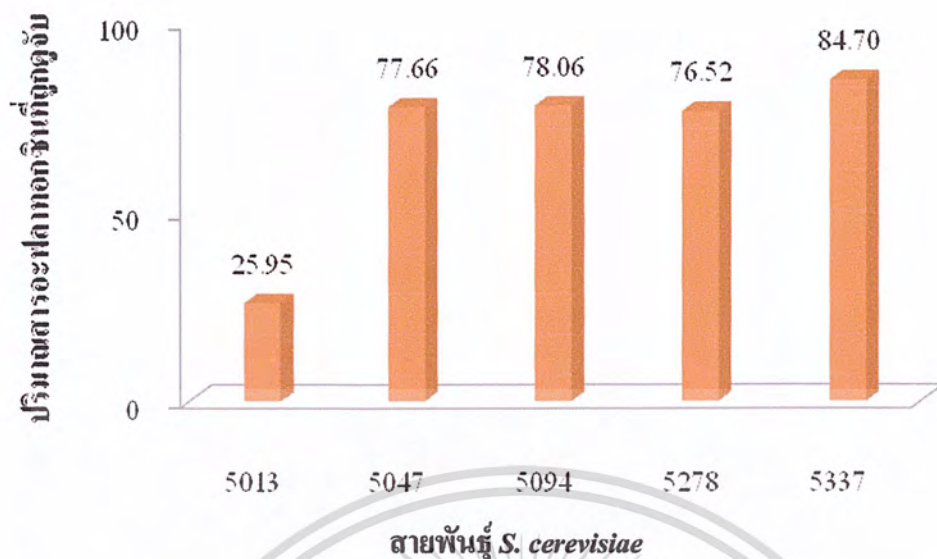
จากตารางจะเห็นได้ว่าเชื้อ *S. cerevisiae* แต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการดูดจับสารอะฟลาทอกซิน B₁ ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีการดูดจับอย่างเฉพาะเจาะจง เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นสารอะฟลาทอกซินเริ่มต้นที่ 10.4736 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าร้อยละของปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่ถูกดูดจับโดยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ TISTR 5013, TISTR 5047, TISTR 5094, TISTR 5278 และ TISTR 5337 เป็น 25.95, 77.66, 78.06, 76.52 และ 84.70 ตามลำดับ โดยสายพันธุ์ของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่มีความสามารถในการดูดจับสารอะฟลาทอกซินมากที่สุด คือ TISTR 5337 และสายพันธุ์ที่มีการดูดจับได้น้อยที่สุดคือ TISTR 5013

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพของยีสต์ *S. cerevisiae* ในการดูดจับสารอะฟลาทอกซินหลังจากบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

| ยีสต์ | ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่ถูกดูดจับโดยยีสต์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ปริมาณสารพิษที่เหลือจากการดูดจับ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | ร้อยละของสารพิษอะฟลาทอกซินที่ถูกดูดจับโดยยีสต์ |
|-----------|---|--|--|
| หูดควบคุม | - | 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 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงถึงร้อยละของสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁ ที่ถูกดักจับโดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่าง ๆ

4.2 การวิเคราะห์ทางสถิติของยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ใช้ในการดักจับสารอะฟลาทอกซิน

จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของคินแคน (Duncan's new multiple rang test, DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($p \leq 0.05$) โดยค่าเฉลี่ยโปรแกรม SPSS พบว่า ยีสต์ 5 สายพันธุ์มีการดักจับสารอะฟลาทอกซินที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นยีสต์สายพันธุ์ TISTR 5047 และสายพันธุ์ TISTR 5094 ที่การดักจับสารอะฟลาทอกซินไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณร้อยละของการยับยั้งสารอะฟลาทอกซิน โดย *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ

| สายพันธุ์ <i>S. cerevisiae</i> | ร้อยละการยับยั้ง |
|--------------------------------|--------------------------------|
| 5337 | 84.6995 ^a ± 0.08622 |
| 5094 | 78.0571 ^b ± 0.07506 |
| 5047 | 77.6606 ^b ± 0.68973 |
| 5278 | 76.5164 ^c ± 0.57709 |
| 5013 | 25.9495 ^d ± 0.94733 |

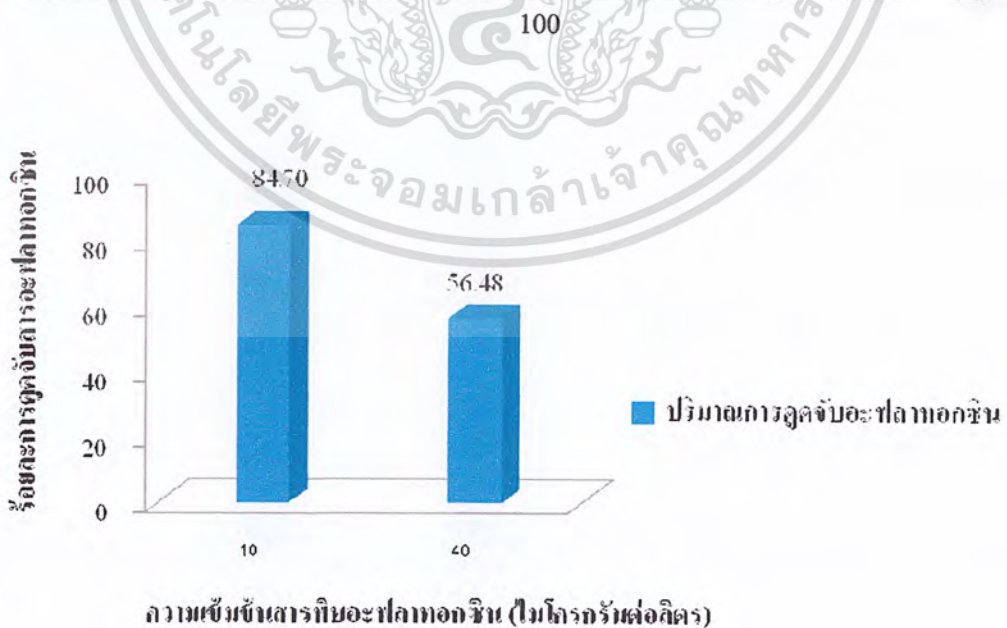
*ตัวอักษรที่เหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ 0.05 ($p \leq 0.05$)

4.3 ผลการศึกษาหาความเข้มข้นของสารอะฟลาทอกซินที่เหมาะสมต่อการดูดซับ

จากการทดลองพบว่ายีสต์สายพันธุ์ TISTR 5337 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการดูดซับสารอะฟลาทอกซิน B₁ ดังนั้นจึงคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์นี้มาศึกษาหาความเข้มข้นของสารพิษอะฟลาทอกซินที่เหมาะสมต่อการดูดซับโดยยีสต์ โดยควบคุมความเข้มข้นของสารพิษอะฟลาทอกซินที่ความเข้มข้น 10 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (อ้างอิงจากงานวิจัยของ Shetty และคณะ, 2007 เพราะเป็นระยะเวลาที่ยีสต์ดูดซับสารอะฟลาทอกซินได้ดีที่สุด)

จากการทดลองพบว่าเชื้อ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 สามารถดูดซับสารอะฟลาทอกซินได้สูงถึงร้อยละ 84.70 เมื่อมีการเติมสารอะฟลาทอกซินลงไป 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถดูดซับสารอะฟลาทอกซินได้ร้อยละ 56.48 (รูปที่ 4.2) ซึ่งจะมีการดูดซับสารอะฟลาทอกซินที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อคำนวณหาจำนวนสารอะฟลาทอกซินที่ถูกดูดซับอย่างสมบูรณ์แล้ว พบว่าปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่ถูกดูดซับจะเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารอะฟลาทอกซิน โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 จะดูดซับสารอะฟลาทอกซินที่ความเข้มข้น 10 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้เท่ากับ 8.46 และ 22.59 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารอะฟลาทอกซินมีผลอย่างมากต่อการดูดซับสารอะฟลาทอกซินอย่างจำเพาะเจาะจง โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

ร้อยละการดูดซับอะฟลาทอกซิน x ความเข้มข้นอะฟลาทอกซิน(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



รูปที่ 4.2 แสดงร้อยละการดูดซับของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพในการดูดซับสารอะฟลาทอกซินโดย *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5037 ที่สภาวะต่างๆ

เมื่อนำเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5337 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ในการดูดซับสารอะฟลาทอกซิน B₁ ในสภาวะปกติ มาทดลองในสภาวะต่าง ๆ เพื่อศึกษาผลการดูดซับสาร อะฟลาทอกซิน B₁ ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำเซลล์ไปให้ความร้อนโดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่ายีสต์สามารถดูดซับอะฟลาทอกซินได้ร้อยละ 57.76 และเมื่อนำเซลล์ผ่านการทรีทเมนต์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซินเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผลที่ได้คือ สามารถดูดซับสารได้ร้อยละ 59.55 สำหรับที่สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยีสต์สามารถดูดซับสารอะฟลาทอกซินได้ร้อยละ 56.48

เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับสารอะฟลาทอกซินโดยยีสต์ในสภาวะต่างๆ พบว่า เซลล์ยีสต์ที่ผ่านการทรีทเมนต์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จะให้ค่าการดูดซับอะฟลาทอกซินที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณร้อยละการดูดซับสารอะฟลาทอกซินของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ 5037 หลังจากผ่านการทดลองทรีทเมนต์เซลล์ด้วยการให้ความร้อนและกรด

| ชุดการทดลอง(Treatment) | การดูดซับสารอะฟลาทอกซิน (ระยะเวลา 2 ชั่วโมง) |
|------------------------|--|
| | สายพันธุ์ 5037 |
| 30°C (control) | 56.4833 ^b ± 0.90716 |
| 120°C (20 นาที) | 57.7567 ^b ± 0.60451 |
| 2M HCl (60 นาที) | 59.5533 ^a ± 0.69745 |

*ตัวอักษรที่เหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ 0.05 ($p \leq 0.05$)

จากการทดลองการคัดเลือกเชื้อ *S. cerevisiae* ที่มีความสามารถดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซิน พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์สามารถดูดซับสารอะฟลาทอกซินได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) ยกเว้นสายพันธุ์ TISTR 5047 กับสายพันธุ์ TISTR 5094 ที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ถึงแม้จะมีการเพาะเลี้ยงและทำการทดลองภายใต้สภาวะเดียวกัน

จากการนำเชื้อ *S. cerevisiae* มาปรับสภาพเซลล์เพื่อปรับปรุงให้มีความสามารถในการดูดจับสารอะฟลาทอกซินให้ได้ในปริมาณมาก แม้แต่ในการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นสูง (40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) การดูดจับสารโดยที่ไม่มีการอิมมู้นจะแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเชื้อสายพันธุ์นั้นๆ ว่ามีศักยภาพที่ดีในการดูดจับสารอะฟลาทอกซินในอาหาร

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

Shetty และคณะ (2007) ทดลองนำเซลล์มาให้ความร้อน (heat treatment) โดยให้ความร้อนด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำและการนำเซลล์ไปทรีทเมนต์กับกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดจับ ทำให้เซลล์มีความสามารถในการดูดจับที่สูงขึ้น

Zlotnik และคณะ (1984) กล่าวว่า ความร้อนอาจทำให้ชั้นนอกของผนังเซลล์ เกิดการซึมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการสลายของแมนแนน (mannan) เพียงบางส่วนจากผิวด้านนอก เมื่อเกิดการสลายมากขึ้นจนกระทั่งมากพอที่จะไปปกคลุมตำแหน่งการดูดจับสารพิษ และในสภาวะที่เป็นกรดจะมีผลต่อพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งสืบเนื่องมาจากการสลายตัวของมอนอเมอร์ (releasing monomer) นอกจากนี้ยังทำให้สายของไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) แยกออกจากกัน กลายเป็นอัลดีไฮด์ (aldehyde) ที่มีลักษณะเป็นท่อนๆ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเคมี จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งต่างๆ ภายในผนังเซลล์ในระหว่างที่มีการให้ความร้อนแก่เซลล์นอกเหนือไปจากการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งการดูดจับที่ได้แสดงผลออกมา

Bejaoui และคณะ (2004) กับ Yiannikouris และคณะ (2004) พบว่าผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* มีโครงสร้างทางเคมีเป็นลักษณะ bi-layer องค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ประมาณร้อยละ 85-90 ประกอบด้วยแมนโนโปรตีน และ β -D glucan ซึ่งเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β 1,3-linkage และ β 1,6-linkage การกำจัดสารพิษจากเชื้อราโดยยีสต์นั้น ตัวสารพิษจะถูกจับที่ผนังเซลล์ ไม่ได้เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ดังนั้นเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้วก็สามารถใช้ในการกำจัดสารพิษได้ด้วย โดยพบว่าแมนแนนที่ผนังเซลล์จะเป็นตัวที่จับอะฟลาทอกซินและออกราทอกซิน และ β -D-glucan จะเป็นตัวจับกับซีราลีโนน (zearalenone)

Bejaoui และคณะ (2004) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงการดูดจับออกราทอกซิน เอ (OTA) จากเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่มีการให้ความร้อน (heat treatment) โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* ผลการดูดจับออกราทอกซิน เอ (OTA) หลังจากบ่ม 5 นาที จะเกิดปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วถึงร้อยละ 90 และจะคงที่เข้าสู่สมดุลเมื่อผ่านไป 72 ชั่วโมง และการศึกษาของ Santose และคณะ (2000) พบว่าการใช้เชื้อยีสต์ที่มีความไว (sensitive) จะได้ผลที่รวดเร็วและทำปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ภายใน 2 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shetty และ Jespersen (2006) พบว่า การกำจัดสารพิษของเชื้อราโดยใช้แมนแนนโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Mannan – Oligosaccharide) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* ผสมกับสารอะฟลาทอกซิน B₁ พบว่าแมนแนนโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถจับกับอะฟลาทอกซิน B₁ ได้ถึงร้อยละ 95 น้ำหนักต่อน้ำหนัก

จากการศึกษาขั้นต้นนี้พบว่า การนำเซลล์ยีสต์มาปรับสภาพด้วยความร้อนจะมีบริเวณที่ใช้ในการดูดซับสารพิษมากขึ้นจึงทำให้มีความสามารถในการดูดซับสารอะฟลาทอกซินที่คงเหลืออยู่ในอาหารที่ปรุงแต่งเสร็จแล้ว และในสถานะที่มีความเป็นกรดสูงทั้งในผลิตภัณฑ์และในกระเพาะอาหารจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับสารพิษได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ TISTR 5013, TISTR 5047, TISTR 5094, TISTR 5278 และ TISTR 5337 มีความสามารถในการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁ ได้ โดยสายพันธุ์ TISTR 5337 สามารถดูดจับได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า การดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซินด้วยเซลล์ที่ไม่มีชีวิต (non-viable) ที่นำไปทริทเมนต์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกนั้น คุณสมบัติทางกายภาพเกิดการเปลี่ยนแปลงซึ่งจะทำให้มีการดูดจับสารพิษได้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้นำไปปรับสภาพ (control) สำหรับการนำเซลล์ไปให้ความร้อนที่ 120 องศาเซลเซียสพบว่าการดูดจับสารพิษอะฟลาทอกซินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้วก็สามารถใช้ในการกำจัดสารพิษได้ด้วย ซึ่งสายพันธุ์ที่กล่าวมานี้มีความสามารถในการดูดจับสารพิษจากเชื้อราและมีศักยภาพที่ดีในการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น การใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter culture) ในอาหารหมักในครัวเรือนหรือระดับโรงงานอุตสาหกรรม

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการดูดจับสารพิษ
2. การระบุโครงสร้างผิวการดูดจับของผิวภายนอกเซลล์
3. การศึกษาการเปรียบเทียบการดูดจับสารพิษของเซลล์ยีสต์แห้งและการตรึงยีสต์ในรูปแบบไลโอไฟแนนหรือในรูปแบบอื่นๆ เพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะสม
4. วิเคราะห์ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในเซลล์ยีสต์หลังจากนำไปดูดจับสารพิษ
5. ศึกษาหาระยะเวลาที่ใช้บ่มยีสต์กับสารพิษ เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมยิ่งขึ้น
6. ศึกษาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการดูดจับ
7. ศึกษาการดูดจับสารพิษ ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2540. สารพิษจากเชื้อรา: การควบคุมและป้องกัน. ใน เปล่งศรี อินคินันท์. (บรรณาธิการ). การประชุมทางวิชาการในวาระ 80 ปีแห่งการสถาปนาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เรื่อง สารพิษจากเชื้อรา: ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- คมกริช พิมพ์ภักดี, บัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล และพนารัตน์ ขัตติยพันธ์ 2547. การศึกษาประสิทธิภาพของสารดูดซับ (commercial adsorbents) ในการดูดซับสารอะฟลาทอกซิน B₁. 1(2): 40-43.
- จักรพันธ์ ปัญจะสุวรรณ. 2542. พิษภัยในอาหาร. บริษัทโอเคเอ็นสโตร์, กรุงเทพฯ.
- ชาญยุทธ จรูญเกียรติกำจร และ อุทัย คັນ โธ. 2538. ผลของอะฟลาทอกซินต่อสัตว์เลี้ยง. สัตว์เศรษฐกิจ. 12(268): 73-76.
- คุณณี ธนะบริพัฒน์, พนอ รวยสูงเนิน, สายชล นุชน้อง และ เหมือนหมาย จันทราพันธกุล. 2539. การยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในระหว่างการผลิตเทมเป้. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 12(2): 8-15.
- คุณณี ธนะบริพัฒน์. 2542. การควบคุมการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินจากเชื้อรา *Aspergillus Parasiticus* ในข้าวโพด โดยเกลือชนิดต่างๆ. หนังสือนรวมบทคัดย่อ ผลงานวิจัยของคณาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษาไทย ในระหว่างปี 2540-2542 (หน้า 413-414)
- คุณณี ธนะบริพัฒน์. 2546. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. (พิมพ์ครั้งที่ 3). ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และ ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว. 2524. สารพิษของเชื้อรากับปัญหาในวงการปศุสัตว์. วารสารสัตวแพทย์ 1(3): 211-223.
- เบญจมาศ มโหสถนันท์. 2539. สารพิษเชื้อราในอาหารโคนม. ใน พิระศักดิ์ จันทรประทีป (บรรณาธิการ). ประมวลความรู้เกี่ยวกับ โคนม (หน้า 117-123). กรุงเทพฯ:คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มาลินี ลิ้ม โภคา. 2527. พิษวิทยาและปัญหาที่พบในสัตว์. (พิมพ์ครั้งที่ 2). ภาควิชาเภสัชวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มุกดา ศรีสกุล. 2536. การติดตามการได้รับอะฟลาทอกซินระหว่างอยู่ในครรภ์ของเด็กแรกเกิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ไมตรี สุทธจิตต์, วิบูลย์ รัตนปนนท์, อุคมภักข์ ขาลสุวรรณ, นภาพร โออริยกุล และ ทรงพรรณ หวังใจสุข. 2529. รายงานการวิจัยเรื่อง การศึกษาหาวิธีทำลายอะฟลาทอกซินในอาหารที่ตรวจพบ. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมตรี สุทนต์. 2531. สารพิษรอบตัวเรา. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ไมตรี สุทนต์. 2543. สารเคมีก่อมะเร็ง. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ศรีสิทธิ์ การุณยะวณิช. 2540. มาตรการควบคุมอะฟลาทอกซินในอาหารประเภทถั่ว กระจ่าง
สาธารณสุข โครงการรณรงค์การลดปัญหาอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง. ใน สุกัญญา
กองเงิน, นันทวรรณ สุโรบล, ชูทิพย์ ชนะเสนีย์ และสมศักดิ์ สุริโย. (บรรณาธิการ).
คู่มือวิชาการเรื่องอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง. (หน้า 66-82). กองส่งเสริมพืชไร่นา กรม
ส่งเสริมการเกษตร.

ศุภกิจ อังสุภากร, วิทยา ธรรมวิทย์ และ สมพงษ์ สหพงศ์. 2520. โรคของสัตว์เศรษฐกิจที่เกิดจาก
พิษของเชื้อรา. เวชสารสัตว์แพทย์ 7(2): 127-143.

สมใจ ศิริโชค. 2550. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. บริษัทพิมพ์ดีจำกัด, กรุงเทพฯ.

สาวตรี ลีทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุมาลี เหลืองสกุล. 2539. จุลชีววิทยาทางอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทร
วิโรฒประสานมิตร.

สุรียกษณ์ รอดทอง. 2538. จุลินทรีย์และโรคซึ่งเกิดจากอาหาร. สำนักวิชาวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สิทธิสิน บวรสมบัติ. 2542. อาหารไม่ทำลายสุขภาพ. วารสารแม่ใจปริทัศน์. 1(2): 100-102.

อนงค์ บินทวิหค. 2546. สารพิษจากเชื้อรา : อะฟลาทอกซิน. การเกิดสารพิษจากเชื้อรา
อะฟลาทอกซิน. (พิมพ์ครั้งที่ 1). จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อมรา ชินภูติ. 2547. ปัญหาสารพิษ Aflatoxin ในถั่วลิสงและการวิเคราะห์สารพิษ Aflatoxin ในถั่ว
ลิสง. เอกสารประกอบการฝึกอบรมการถ่ายทอดเทคโนโลยีการแปรรูปถั่วลิสงปลอดสารพิษ
Aflatoxin. (หน้า 14-31). สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรม
เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรุณศรี วงษ์อุไร. 2540. อะฟลาทอกซินในถั่วลิสง. ใน สุกัญญา กองเงิน, นันทวรรณ สุโรบล, ชู
ทิพย์ ชนะเสนีย์ และสมศักดิ์ สุริโย. (บรรณาธิการ). คู่มือวิชาการเรื่องอะฟลาที่อกซินในถั่ว
ลิสง. (หน้า 41-47). กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร.

อรุณดา เฟื่องปาน. 2543. การวิเคราะห์ติดตามการได้รับอะฟลาทอกซินในคน. วิทยานิพนธ์
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาพิษวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

Ayerst, G. 1969. The effect of moisture and temperature on growth and spore germination in
some fungi. Journal of Stored Product Research. 5,127-141.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 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.
- 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 W.P., 1961. Turkey X disease. *Turkeys* 9(2), 55–58.
- Buchanan, R. L. and Ayres, J. C. 1976. Effect of sodium acetate on growth and aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *Journal Food Science* 41, 128-132.
- Calistru, C., Mc Lean, M. and Berjak, P 1997 In vitro studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *trichoderma* species. *Mycopathologia* 137:115-124
- Charmley, L. L., Trenholm, H. L. and Prelusky, D. B. 1995. Mycotoxin: Their origin, impact and importance: Insights into common methods of control and elimination. *Biotechnology in the feed industry. Proceedings of Alltech's 11th Annual Symposium*, pp. 41-63. Lyons, T.P. and Jacques, K. A. (eds.). Nottingham University, UK.
- Ciegler, A., Lillehoj, E.B., Peterson, R.E., Hall, H.H., 1966. Microbial detoxification of aflatoxin. *Applied Microbiology* 14, 934–939.
- Ellis, W. O., Smith, J. P., Simpson, B. K., Ramaswamy, H. and Doyon, G. 1994. Novel techniques for controlling growth of and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in packaged peanuts. *Food Microbiology*. 11, 357-368.
- 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.
- Goldblatt, L.A., 1969. Aflatoxin. Academic Press, London.
- Goto, T., Wicklow, D. T. and Ito, Y. 1996. Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by a sclerotium-producing *Aspergillus tamarii* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(11), 4036-4038.
- Gratz, S., Wu, K.Q., Mykkanen, H. and El-Nezami, H. 2007. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG reduces aflatoxin B1 transport, metabolism, and toxicity in Caco-2. *Journal of Microbiology*. 68:2470–2474.

Hayes, P. R. 1992. *Food Microbiology and Hygiene* 2nd ed. Elsevier Applied Science, London.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญูยู่ติเหินาไปเซประยชนดานการค้
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kurtzman, C. D., Horn, B. W. and Hesselline, 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. A Taxonomic Study, 4th ed. pp.3-5. C.P. Kurtzman and J.W. Fell (eds.) Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Marth, E. H. 1990. Mycotoxins. In Foodborne disease. pp. 137-157. Cliver, D. O. (ed.) Academic Press, California.
- Mendoza, H.A., and Gusman, D., 2009. Key role of teichoic acids on aflatoxin B1 binding by probiotic bacteria. Journal of Applied Microbiology 107, 395-403.
- Moss, M.O. 1998 Recent studies of mycotoxins. Journal of Applied Microbiology, Symposium Supplement 84, 62S–76S.
- Palmgren, M. S. and Hayes, A. W. 1987. Aflatoxins in food. In Mycotoxins in Food, pp. 65-95. Krogh, P. (ed.). Academic Press, London
- Park, D.L. and Liang, B. 1993. Perspective on aflatoxin control for human food and animal feed. Trends in Food Science and Technology, 4, 334-335.
- 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.
- Shank, R.C., Bhamarapravati, N., Gordon, J.E. and Wogan, G.N. 1972. Dietary aflatoxin and human liver cancer. IV. Incidence of primary liver cancer in two municipal populations of Thailand. Food and Cosmetic Toxicology, 10, 171-179.
- 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
- 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Steyn, P. S. and Stander, M. A. 1999. Mycotoxins with special reference to the carcinogenic mycotoxins: aflatoxins, ochatoxins and fumonisins. In General and Applied toxicology, pp. 2145-2176. Ballantyne, B., Marrs, T. and Syversen, T. (eds.), Macmillan Reference Limited, London
- 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., 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.
- Ueno, Y. 1983. Mycotoxins. Bangkok: Mahidol University.
- Wogan, G. N. 1966. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. Bacteriol. Rev.30: 460.
- 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 บรรจุอาหารที่เตรียมได้ลงในขวดรูปชมพู่ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 °C เวลา 15 นาที

2. Phosphate buffer saline (PBS)

| | | |
|---|------|-----------|
| โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) | 8 | กรัม |
| โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) | 0.2 | กรัม |
| ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) | 1.44 | กรัม |
| โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) | 0.24 | กรัม |
| น้ำกลั่น | 1000 | มิลลิลิตร |
| ปรับพีเอช 6.0 | | |

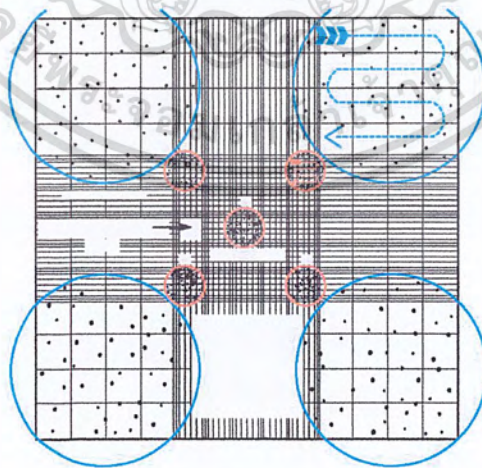
ภาคผนวก ข

การนับสเปร์โดย Haemocytometer

เครื่องมือวัดความเข้มข้นที่เรียกว่า Haemocytometer ซึ่งเป็นอุปกรณ์ขนาดเล็ก มีรูปร่างดังใน (รูปที่ ข.1) ลักษณะของ Haemocytometer คล้ายสไลด์ มีความหนาแน่นมากกว่าสไลด์แก้วธรรมดา ตรงกลางมีร่องเป็นรูปตัว H ซึ่งทำให้เกิดบริเวณที่ใช้ในการตรวจนับ 2 บริเวณ ตรงกลางตัว H ซึ่งทำเป็น scale ที่ใช้ในการตรวจนับเพื่อกำหนดหาความเข้มข้นของสารแขวนลอย เช่น สเปร์ หรือ เซลล์ต่างๆ (รูปที่ ข.2)

รูปที่ ข.1 แสดงลักษณะและขนาดของ Haemocytometer

ที่มา http://www.thesciencefair.com/Merchant2/graphics/00000001/BloodCountSlideB-4005_M.jpg



รูปที่ ข.2 แสดงลักษณะและตำแหน่งสำหรับการตรวจนับจำนวนสเปร์ของเชื้อราด้วย Haemocytometer

ที่มา http://www.tpub.com/content/medical/14295/img/14295_279_1.jp

การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ Haemocytometer

1. ในกรณีที่สปอร์หรือเซลล์ที่ต้องการนับมีขนาดเล็ก การนับควรใช้บริเวณ E ตรงกลาง ซึ่งประกอบไปด้วยช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก (small square) ทั้งหมด 25 ช่อง และแต่ละช่องเล็กนั้นประกอบไปด้วยช่องขนาดเล็กที่สุด (smallest square) อยู่ 16 ช่อง การนับสปอร์จะนับจำนวนทั้งหมดที่อยู่บริเวณนี้ รวมทั้งสปอร์ที่อยู่บริเวณขอบของตารางทุกช่องด้วย
2. พื้นที่บริเวณ E เท่ากับ $25 \times 16 \times \frac{1}{400}$ ตารางมิลลิเมตร
3. หากคิดเป็นปริมาตร (มีความลึก $\frac{1}{10}$ มิลลิเมตร) จะเท่ากับ $25 \times 16 \times \frac{1}{400} \times \frac{1}{10}$ ลูกบาศก์ต่อมิลลิเมตร หรือ 0.1 ลบ.ซม.
4. สมมตินับสปอร์ในบริเวณ E ได้รวมทั้งหมดเท่ากับ Y สปอร์ ใน 0.1 ลบ. มม.
5. 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 = $Y \times 1000 \times \frac{1}{0.1}$ สปอร์

6. ในกรณีสปอร์ หรือ เซลล์มีขนาดใหญ่ ควรนับจำนวนสปอร์หรือเซลล์ทุกบริเวณ A B C D และ E จากนั้นนำค่าที่ได้มารวมกัน และหาค่าเฉลี่ย โดยหาร 5 อีกครั้ง ก่อนนำไปคำนวณความเข้มข้น เช่น สมมติจำนวนสปอร์รวมกันได้รวมกันเท่ากับ Z สปอร์ ดังนั้นความเข้มข้นของสปอร์ต่อ 1 มล. = $\frac{Z}{5} \times 1000 \times \frac{1}{0.1}$ สปอร์ / มล.
7. การตรวจนับความเข้มข้นจะให้ผลใกล้เคียงมากที่สุด จะต้องทำให้ Suspension กระจายตัวมากที่สุด หรืออาจจำเป็นจะต้องมีการนับหลายๆครั้งขึ้น 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 จากนั้นใช้ Cover slip ปิดทับ กดเบาๆ หากใส่หยดของ Spore suspension พอดีจะไม่มีเชื้อเหลือล้นออกมาจากสไลด์
8. นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนสปอร์หรือเซลล์ของเชื้อ แล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้น โดยวิธีคำนวณข้างต้น ซึ่งความเข้มข้นที่มักใช้ในการปลูกเชื้อโดยทั่วไป เช่น เชื้อราจะอยู่ในช่วง $10^5 - 10^6$ สปอร์ต่อ มล. เป็นต้น

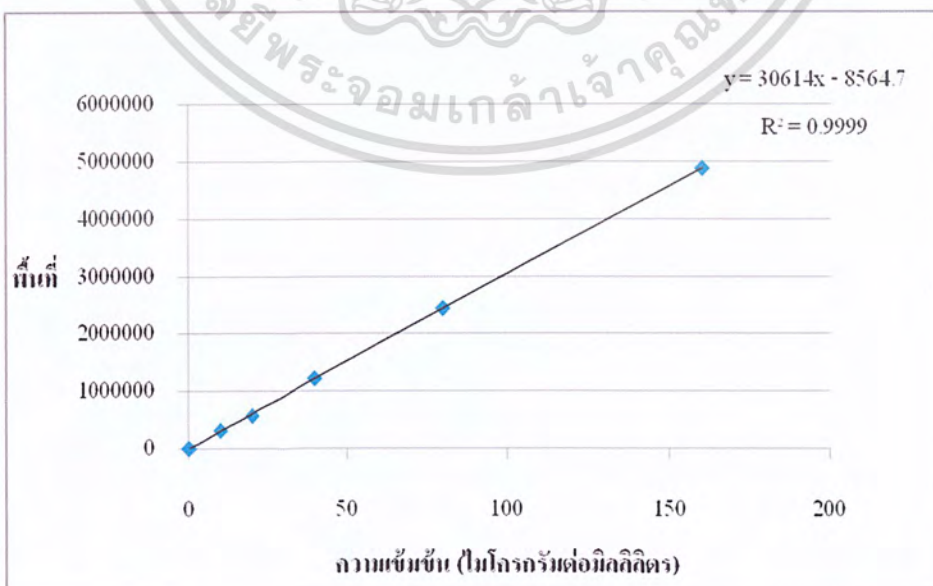
ภาคผนวก ก.

ข้อมูลดิบ

ค-1 การเตรียมสารพิษอะฟลาทอกซินมาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยเจือจางจากความเข้มข้นเริ่มต้น 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ค-1.1 แสดงปริมาณความเข้มข้นต่างๆของอะฟลาทอกซิน เมื่อเจือจางจากความเข้มข้นที่ 2,000 ไมโครกรัมต่อลิตร

| ยีสต์ | ปริมาณอะฟลาทอกซิน ที่ถูกดูดซับโดยยีสต์ (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร) | ปริมาณสารพิษที่ เหลือจากการดูดซับ (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร) | ร้อยละของ สารพิษอะฟลา ทอกซินที่ถูกดูด ซับโดยยีสต์ | น้ำหนักเซลล์ ยีสต์แห้ง (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร) |
|-----------|--|---|--|--|
| ชุดควบคุม | - | 10.4736 | - | - |
| 5013 | 2.7179 | 7.7557 | 25.9495 | 30.0013 |
| 5047 | 7.6603 | 2.3397 | 77.6606 | 30.0009 |
| 5094 | 8.1754 | 2.2982 | 78.0571 | 30.0012 |
| 5278 | 8.0140 | 2.4596 | 76.5164 | 30.0007 |
| 5337 | 8.8711 | 1.6025 | 84.6995 | 30.0011 |



รูปที่ ค-1.1 แสดงกราฟมาตรฐานของสารพิษอะฟลาทอกซินที่ความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อผู้ผู้ใดเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค-2 ผลการศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการดูดจับสารอะฟลาทอกซิน B₁ ตารางที่ ค-2.1 ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁ ที่เหลือจากการดูดจับโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 5 สายพันธุ์

| สายพันธุ์ <i>S.cerevisiae</i> | จำนวนซ้ำ | ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร) | พื้นที่ ใต้กราฟ | ร้อยละของการยับยั้ง สารพิษอะฟลาทอกซิน |
|----------------------------------|-----------|--|--------------------|--|
| 5013 | 1 | 7.6529 | 225721 | 26.93157939 |
| | 2 | 7.8505 | 231770 | 25.04503285 |
| | 3 | 7.7639 | 229118 | 25.87213178 |
| | ค่าเฉลี่ย | 7.7557 | 228869.7 | 25.94958134 |
| 5047 | 1 | 2.2755 | 61098 | 78.27377657 |
| | 2 | 2.4177 | 65452 | 76.91586227 |
| | 3 | 2.3260 | 62642 | 77.79223783 |
| | ค่าเฉลี่ย | 2.3397 | 63064 | 77.66062556 |
| 5094 | 1 | 2.2902 | 61549 | 78.13311985 |
| | 2 | 2.2988 | 61811 | 78.05140797 |
| | 3 | 2.3056 | 62018 | 77.98684934 |
| | ค่าเฉลี่ย | 2.2982 | 61792.67 | 78.05712572 |
| 5278 | 1 | 2.5229 | 68697 | 75.91168842 |
| | 2 | 2.4026 | 65013 | 77.06026967 |
| | 3 | 2.4532 | 66562 | 76.57732929 |
| | ค่าเฉลี่ย | 2.4596 | 66757.33 | 76.51642913 |
| 5337 | 1 | 1.6125 | 40799 | 84.6045764 |
| | 2 | 1.5942 | 40239 | 84.77922776 |
| | 3 | 1.6009 | 40445 | 84.71498101 |
| | ค่าเฉลี่ย | 1.6025 | 40494.33 | 84.69959506 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-2.2 ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน B₁ ที่เหลือจากการดูดซับ โดยยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ 5337 ที่ความเข้มข้น 40.9820 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

| สภาวะของ <i>S. cerevisiae</i> สายพันธุ์ 5337 | จำนวนซ้ำ | ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | พื้นที่ที่ได้กราฟ | ร้อยละของการยับยั้งสารพิษอะฟลาทอกซิน |
|--|-----------|-------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| 30 องศาเซลเซียส | 1 | 17.0651 | 513867 | 57.51922064 |
| | 2 | 17.7597 | 535129.5 | 55.79029115 |
| | 3 | 17.6143 | 530678 | 56.15225845 |
| | ค่าเฉลี่ย | 17.4797 | 526558.2 | 56.48725675 |
| 120 องศาเซลเซียส | 1 | 16.7521 | 504284 | 58.29844845 |
| | 2 | 17.2309 | 518941 | 57.10663566 |
| | 3 | 16.9201 | 509427 | 57.88025283 |
| | ค่าเฉลี่ย | 16.9677 | 510884 | 57.76177898 |
| กรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ | 1 | 16.5656 | 498576 | 58.76258623 |
| | 2 | 16.0375 | 482407 | 60.07734512 |
| | 3 | 16.1346 | 485379 | 59.83568123 |
| | ค่าเฉลี่ย | 16.2459 | 488787.3 | 59.55853752 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ง-1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติสำหรับ การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด ใน การควบคุมสารพิษอะฟลาทอกซิน ปี1

ตารางที่ ง-1.1 แสดงค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อน

| Descriptives | | | | | | | | |
|--------------------------------|----|---------|-------------------|------------|-------------------------------------|-------------|---------|---------|
| <i>S. cerevisiae</i> stains | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| | | | | | 5013.00 | 3 | | |
| 5047.00 | 3 | 77.6567 | .68973 | 0.39822 | 75.9433 | 79.3701 | 76.91 | 78.27 |
| 5094.00 | 3 | 78.0533 | .07506 | 0.04333 | 77.8669 | 78.2398 | 77.98 | 78.13 |
| 5278.00 | 3 | 76.5133 | .57709 | 0.33318 | 75.0798 | 77.9469 | 75.91 | 77.06 |
| 5337.00 | 3 | 84.6933 | .08622 | 0.04978 | 84.4792 | 84.9075 | 84.60 | 84.77 |
| Total | 15 | 68.5727 | 22.26522 | 5.74886 | 56.2426 | 80.9027 | 25.04 | 84.77 |

ตารางที่ ง-1.2 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน

| ANOVA | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|----------|------|
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | 6936.924 | 4 | 1734.231 | 5043.520 | .000 |
| Within Groups | 3.439 | 10 | .344 | | |
| Total | 6940.363 | 14 | | | |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-1.3 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT)

| <i>S. cerevisiae</i> stains | N | Subset for alpha = 0.05 | | | |
|-----------------------------|---|-------------------------|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 5013.00 | 3 | 25.9467 | | | |
| 5278.00 | 3 | | 76.5133 | | |
| 5047.00 | 3 | | | 77.6567 | |
| 5094.00 | 3 | | | 78.0533 | |
| 5337.00 | 3 | | | | 84.6933 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | .427 | 1.000 |

ง-2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณการดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซิน บี 1 ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย *S. cerevisiae* สายพันธุ์ 5337

ตารางที่ ง-2.1 แสดงค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและค่าความคลาดเคลื่อน

| Descriptives | | | | | | | | |
|----------------------------------|---|---------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| <i>S. cerevisiae</i> stains 5337 | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| | | | | | 30 °C | 3 | | |
| 120 °C | 3 | 57.7567 | .60451 | .34901 | 56.2550 | 59.2584 | 57.10 | 58.29 |
| 2 M HCl | 3 | 59.5533 | .69745 | .40267 | 57.8208 | 61.2859 | 58.76 | 60.07 |
| Total | 9 | 57.9311 | 1.48425 | .49475 | 56.7902 | 59.0720 | 55.79 | 60.07 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-2.2 แสดงการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน

| ANOVA | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | 14.274 | 2 | 7.137 | 12.784 | .007 |
| Within Groups | 3.350 | 6 | .558 | | |
| Total | 17.624 | 8 | | | |

ตารางที่ ง-2.3 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test (DMRT)

| <i>S. cerevisiae</i> stains 5337 | N | Subset for alpha = 0.05 | |
|----------------------------------|---|-------------------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| 30 °C | 3 | 56.4833 | |
| 120 °C | 3 | 57.7567 | |
| 2 M HCl | 3 | | 59.5533 |
| Sig. | | .082 | 1.000 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้