

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ประสิทธิภาพของผงตะไคร้และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้
ต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา

Aspergillus flavus IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด

THE EFFECT OF LEMONGRASS POWDER AND ESSENTIAL OIL
ON GROWTH AND AFLATOXIN PRODUCTION BY

Aspergillus flavus IMI 242648 IN MAIZE



T117170

มนัสนันท์ เกิดหอม
สุชาดา รักฝั่ง

เลขหมู่ 117170
เลขทะเบียน 19 ก.ค. 2554
วันเดือนปี

b. 102.100.01
i.

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**THE EFFECT OF LEMONGRASS POWDER AND ESSENTIAL OIL
ON GROWTH AND AFLATOXIN PRODUCTION BY
Aspergillus flavus IMI 242648 IN MAIZE**



**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 ประสิทธิภาพของผงตะไคร้และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้
ต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน
ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด
The Effect of Lemongrass Powder and Essential Oil on Growth
and Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus* IMI 242684
in Maize

ชื่อนักศึกษา นางสาวมนัสนันท์ เกิดหอม รหัสนักศึกษา 50050852
นางสาวสุชาดา รักผึ้ง รหัสนักศึกษา 50050879

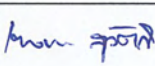
ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.คุณณี ชนะบริพัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.เขาวพา สุวัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา
จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชรวัลย์	
รศ.ดร. นवलพรรณ ณ ระนอง	
ดร.เขาวพา สุวัฒน์	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	ประสิทธิภาพของผงตะไคร้และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด
ชื่อนักศึกษา	นางสาวมนัสนันท์ เกิดหอม นางสาวสุชาดา รักผึ้ง
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2553
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.คุณณี ฐานะบริพัทธ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.เขาวพา สุวดี

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเปรียบเทียบฤทธิ์ของผงตะไคร้และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด โดยนำน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 และผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ได้ดีทุกระดับความเข้มข้น ส่วนผงตะไคร้ยับยั้งได้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 50 เมื่อนำผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10, 20, 30, 40 และ 50 มาทดสอบการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา พบว่า ผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10, 20 และ 30 สามารถยับยั้งปริมาณสปอร์ของเชื้อราในเมล็ดข้าวโพดได้ 3 วัน และผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 50 ยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราได้ 7 วัน

คำสำคัญ : น้ำมันหอมระเหย, ผงตะไคร้, *Aspergillus flavus*, สปอร์เชื้อรา, เมล็ดข้าวโพด

Title	The Effect of Lemongrass Powder and Essential Oil on Growth and Aflatoxin Production by <i>Aspergillus flavus</i> IMI 242684 in Maize
Students	Miss Manatsanun Kurdhom Miss Suchada Rakphung
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2010
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Dusanee Thanaboripat
Co- Advisor	Dr. Yaowapa Suvathi

ABSTRACT

The inhibitory effect of lemongrass powder and essential oil on the growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* IMI 242684 in maize was studied. When lemongrass essential oil at 1, 2, 3, 4 and 5% and lemongrass powder at 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, and 50% were tested against *A. flavus* IMI 242684 in maize for 7 days, it was found that lemongrass oil could inhibit fungal growth at all concentrations whereas lemongrass powder could only inhibit fungal growth at 40 and 50%. When lemongrass powder at concentrations of 10, 20, 30, 40 and 50% were further tested for aflatoxin inhibition, the results show that lemongrass powder at 10, 20 and 30% could inhibit aflatoxin production in maize for 3 days and lemongrass powder at 40 and 50% could inhibit aflatoxin production for 7 days.

Keywords : Essential Oil, Lemongrass Powder, *Aspergillus flavus*, Aflatoxin, Maize

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต โดยสามารถสำเร็จลุล่วงด้วยดี ด้วยความร่วมมือและการให้ความช่วยเหลือจาก รศ.ดร.คุณณี ณะบริพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ และ ดร.เขาวา สุวัทธิ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการพิเศษ ที่เสียสละเวลาให้แนวทางและคำแนะนำต่างๆ ที่เกี่ยวกับการทดลอง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชรวัลย์ ประธานกรรมการ และ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง กรรมการ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะแนวทางการปฏิบัติงาน ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการทำให้โครงการมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้คำแนะนำสั่งสอนตลอดจนเป็นที่ปรึกษาที่ดีมาโดยตลอด และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดาและญาติพี่น้อง ที่ให้การสนับสนุนและส่งเสริมการศึกษา ตลอดจนการทำโครงการพิเศษนี้ และคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา

ขอขอบพระคุณ คุณดวงกมล เพชรทิพย์ ที่ช่วยแนะนำทั้งยังคอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำการทดลองในครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษาปริญญาตรี โทและเอกทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา ตลอดจนผู้ที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ที่ได้มีส่วนช่วยให้โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

หากโครงการพิเศษฉบับนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่องคณะผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วนคุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากโครงการพิเศษฉบับนี้ คณะผู้วิจัยขอบอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

มนัสนันท์ เกิดหอม

สุชาดา รักฝั่ง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VII
สารบัญรูป	VIII

บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ความหมายของสารพิษอะฟลาทอกซิน	3
2.2 ประวัติการศึกษาและลักษณะของสารพิษอะฟลาทอกซิน	3
2.3 ชนิดของสารพิษอะฟลาทอกซิน	3
2.4 คุณสมบัติที่สำคัญของสารพิษอะฟลาทอกซิน	5
2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน	5
2.6 อันตรายจากสารพิษอะฟลาทอกซิน	7
2.7 วิธีการตรวจสอบอะฟลาทอกซิน	9
2.8 วิธีการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ <i>A. flavus</i> และสารพิษอะฟลาทอกซิน	10
2.9 น้ำมันหอมระเหย (Essential Oil)	12
2.10 ตะไคร้ (Lemongrass)	12
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	16
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	16
3.2 วัตถุดิบ	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 อุปกรณ์ สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	16
3.4 สมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง	17
3.5 วิธีการทดลอง	17
3.5.1 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> IMI 242684	17
3.5.2 การเตรียมผงตะไคร้	17
3.5.3 การทดสอบอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ และผงตะไคร้เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> IMI 242684	18
3.5.4 การทดสอบอิทธิพลของผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้น ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน ของเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> IMI 242684	19
3.5.5 การวิเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซิน	19
3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ	21
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	22
4.1 การทดสอบอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ และผงตะไคร้เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> IMI 242684	22
4.2 การทดสอบอิทธิพลของผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้น ที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน ของเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> IMI 242684	26
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	31
เอกสารอ้างอิง	33

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ก	36
ภาคผนวก ข	46
ภาคผนวก ค	54
ภาคผนวก ง	61
ภาคผนวก จ	62
ภาคผนวก ฉ	63



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 4.1 แสดงการเจริญของเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด	23
ตารางที่ 4.2 จำนวนโคโลนีของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด	25
ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน ในเมล็ดข้าวโพดที่ฆ่าเชื้อ	27
ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน ในเมล็ดข้าวโพดที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อ	28
ตารางที่ ก-1 การเจริญของเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด	36
ตารางที่ ก-2 แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ที่นับได้ในจานอาหาร	39
ตารางที่ ก-3 แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242864 ในเมล็ดข้าวโพด 20 กรัม	40
ตารางที่ ก-4 ค่าเฉลี่ยจำนวน โคโลนีในวันที่ 7 ของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด	41
ตารางที่ ก-5 ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินเชิงคุณภาพ ในเมล็ดข้าวโพดที่ฆ่าเชื้อ	42
ตารางที่ ก-6 ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินเชิงคุณภาพ ในเมล็ดข้าวโพดที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อ	43
ตารางที่ ก-7 การวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยตะไคร้และผงตะไคร้ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242864 ในเมล็ดข้าวโพด	44
ตารางที่ ก-8 การวิเคราะห์ความแปรปรวน	45
ตารางที่ ก-9 การวิเคราะห์ความแตกต่าง	45
ตารางที่ ข-1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร	47
ตารางที่ ข-2 แสดงค่า % maximal binding ของสารพิษอะฟลาทอกซินมาตรฐาน	48
ตารางที่ ข-3 แสดงค่า % maximal binding ของเมล็ดข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	48
ตารางที่ ข-4 แสดงค่า % maximal binding ของเมล็ดข้าวโพดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ	49

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 อะฟลาทอกซินบี 1 บี 2 จี 1 และจี 2	4
2.2 เมแทบอลิท์ของอะฟลาทอกซิน	7
2.3 ตะไคร้บ้าน (<i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Staph)	13
ข-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง (% maximal binding) กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐาน (พีพีบี) ของสารสกัดอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด ในวันที่ 0	50
ข-2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง (% maximal binding) กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐาน (พีพีบี) ของสารสกัดอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด ในวันที่ 3	51
ข-3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง (% maximal binding) กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐาน (พีพีบี) ของสารสกัดอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด ในวันที่ 5	52
ข-4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง (% maximal binding) กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐาน (พีพีบี) ของสารสกัดอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด ในวันที่ 7	53
ค-1 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-5 วันที่ 3 เทียบกับชุดควบคุม	54
ค-2 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-5 วันที่ 3 เทียบกับชุดควบคุม	54

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
ค-3 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของผงดะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10-50 วันที่ 3 เทียบกับชุดควบคุม	55
ค-4 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 1-5 วันที่ 5 เทียบกับชุดควบคุม	55
ค-5 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของผงดะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-5 วันที่ 5 เทียบกับชุดควบคุม	56
ค-6 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของผงดะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10-50 วันที่ 5 เทียบกับชุดควบคุม	56
ค-7 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 1-5 วันที่ 7 เทียบกับชุดควบคุม	57
ค-8 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของผงดะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-5 วันที่ 7 เทียบกับชุดควบคุม	57
ค-9 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. flavus</i> IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของผงดะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10-50 วันที่ 7 เทียบกับชุดควบคุม	58

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่

หน้า

ค-10 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684

ในเมล็ดข้าวโพด โดยวิธี spread plate ของผงตะไคร้

ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-5 วันที่ 7 เทียบกับชุดควบคุม

58

ค-11 การเกิดปฏิกิริยาของสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus*

IMI 242684 ที่สกัดจากเมล็ดข้าวโพด วันที่ 0, 3, 5 และ 7

เทียบกับชุดควบคุม

59

ค-12 การเกิดปฏิกิริยาของสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus*

IMI 242684 ที่สกัดจากเมล็ดข้าวโพด วันที่ 0, 3, 5 และ 7

เทียบกับชุดควบคุม หลังจากหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม

stopping solution ก่อนนำไปวัดค่าความเข้มของสีด้วยเครื่อง

Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

60

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีผลผลิตทางการเกษตรจำนวนมาก ทั้งอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ ซึ่งจากสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยเป็นสภาพภูมิอากาศเขตร้อนชื้น ซึ่งทำให้ผลผลิตทางการเกษตรมักประสบปัญหาจากการเจริญของเชื้อราเนื่องจากสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อรา นอกจากประเทศไทยแล้ว ทั่วโลกก็มักจะประสบปัญหาเช่นเดียวกัน เชื้อราเป็นเชื้อที่สามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็วและพบได้ทั่วไปในโลก เนื่องจากเชื้อราเป็นเชื้อที่สามารถแพร่กระจายตัวได้ในอากาศ เชื้อราจึงสามารถแพร่กระจายไปโดยง่ายจากตำแหน่งทางธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมของพวกมัน ไปสู่พืชที่มีความต้านทานต่อเชื้อราต่ำและพืชผลทั่วโลก (Razzaghi-Abyaneh และคณะ, 2008) เชื้อราที่มีบทบาทสำคัญได้แก่ *Aspergillus* sp. โดยเฉพาะ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ซึ่งเชื้อราเหล่านี้จะสร้างสารพิษที่สำคัญคือ อะฟลาทอกซิน ซึ่งมักพบการปนเปื้อนในพืชผลหรือธัญพืช เช่น เมล็ดข้าวโพด ถั่วลิสง เมล็ดข้าว เมล็ดฝ้าย เป็นต้น

อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่ก่อให้เกิดปัญหาอย่างรุนแรง ทั้งทางตรงและทางอ้อม อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้น ชนิดที่สำคัญได้แก่ อะฟลาทอกซินบี 1, อะฟลาทอกซินบี 2, อะฟลาทอกซินจี 1 และอะฟลาทอกซินจี 2 ซึ่งอะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารพิษที่มีความรุนแรงที่สุด (Bluma และ Etcheverry, 2008) รองลงมาได้แก่ อะฟลาทอกซินจี 1, บี 2 และจี 2 ตามลำดับ อะฟลาทอกซินมีผลเป็นสารก่อมะเร็งที่สำคัญต่อตับ ซึ่งสามารถก่อให้เกิดมะเร็งตับ (hepatic carcinogen) ได้ หากได้รับสารปริมาณมาก สำหรับปัญหาทางผลผลิตทางการเกษตร ประเทศไทยประสบปัญหาอย่างมากจากการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในธัญพืชต่างๆ โดยเฉพาะข้าวโพด ซึ่งมักพบอะฟลาทอกซินจำนวนมาก ทำให้ส่งออกไม่ได้หรือนำไปใช้ในการเป็นอาหารสัตว์ต่อไปไม่ได้ จึงจำเป็นต้องหาวิธีการป้องกันและแก้ไขต่อไป จากปัญหาที่เกิดจากอะฟลาทอกซินทำให้มีการศึกษาค้นคว้าเพื่อที่จะหาวิธีในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดยใช้สารเคมี ถึงแม้ว่าสารเคมีมีผลในการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินและยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ก็มีผลกระทบต่อระบบของเซลล์ยูคาริโอต (eukaryotic) (Bluma และ Etcheverry, 2008) จึงเป็นเหตุผลสำคัญในการศึกษาหาสารใหม่มาทดแทน ซึ่งได้มาจากแหล่งธรรมชาติที่หลากหลาย เช่น จุลินทรีย์ แมลง พืช เป็นต้น

พืชสมุนไพรจำนวนมากได้ถูกนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ในการทดลองนี้จึงได้เห็นความสำคัญของพืชสมุนไพรที่จะนำมายับยั้งการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน โดยเลือกศึกษาประสิทธิภาพของผงตะไคร้ และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ อะฟลาทอกซินที่ผลิตโดย *Aspergillus flavus*

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของผงตะไคร้กับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด
- 2.เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด
- 3.เพื่อนำสมุนไพรตะไคร้มาใช้ประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทดสอบประสิทธิภาพของผงตะไคร้กับน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด โดยหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของผงตะไคร้และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด จากนั้นนำผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมไปทดสอบการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวโพด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.ทราบถึงประสิทธิภาพของผงตะไคร้และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด
- 2.ทราบถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของผงตะไคร้และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด
- 3.คัดเลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของผงตะไคร้และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 และคัดเลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของผงตะไคร้ต่อการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเก็บรักษา
- 4.สามารถนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้ในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความหมายของสารพิษอะฟลาทอกซิน

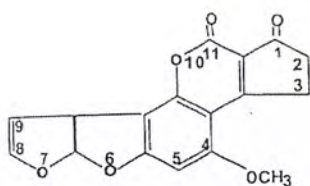
อะฟลาทอกซิน คือสารพิษที่เชื้อรา *Aspergillus flavus* สร้างขึ้นเมื่อมีอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ซึ่งก่อให้เกิดความเจ็บป่วยในคนและสัตว์ที่บริโภคหรือได้รับสารนั้น โดย A ย่อมาจากชื่อ จีนัส *Aspergillus* และ fla ย่อมาจาก ชื่อ *flavus* ต่อมาพบว่าเชื้อราอีกหลายชนิดที่สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ (สุกัญญา และคณะ, 2540)

2.2 ประวัติการศึกษาและลักษณะของสารพิษอะฟลาทอกซิน

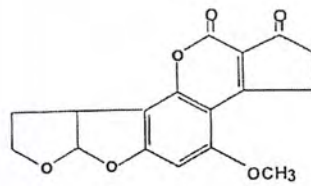
สารพิษอะฟลาทอกซินจัดเป็นสารทุติยภูมิ ซึ่งถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อราที่มีการศึกษาถึงสารพิษกันมาก ทั้งในด้านการผลิต ผลทางชีวภาพ ผลทางเศรษฐกิจ และการควบคุมโดยวิธีการต่างๆ เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น สารพิษนี้มีการผลิตในปริมาณสูงในพืชพวกถั่วลิสง ข้าวโพด เมล็ดฝ้าย และถั่วบราซิล ส่วนในข้าวสาลี ถั่วเหลือง ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เลย์ และข้าวโอ๊ต พบว่า มีสารพิษอะฟลาทอกซินอยู่ในปริมาณต่ำ สารพิษนี้ก่อให้เกิดมะเร็งในสัตว์ การกินอาหารที่มีสารพิษเข้าไปในระยะเวลาสั้นๆ ก็เพียงพอที่จะทำให้เกิดเนื้องอกได้ (อาร์นัต, 2536)

2.3 ชนิดของสารพิษอะฟลาทอกซิน

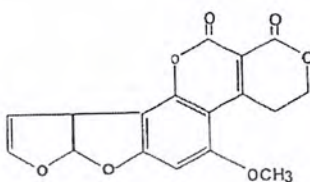
อะฟลาทอกซินเป็นกลุ่มสารเคมีพวกบิสฟูราโนคูมาริน (bisfuranocoumarin) ที่มีอนุพันธ์ของคูมาริน (coumarin) ต่อกับวงแหวน ไบฟิวแรน (bifuran ring) มี 17 ชนิด คือ บี 1, บี 2, จี 1, จี 2, บี 2เอ, จี 2เอ, เอ็ม 1, เอ็ม 2, จีเอ็ม 1, จีเอ็ม 2, เอ็ม2เอ, จีเอ็ม2, บี 3, พี 1, คิว 1 อะฟลาทอกซินคอล และไดไฮโดรอะฟลาทอกซินคอลที่แยกได้ แต่เดิมมีเพียง บี 1, บี 2, จี 1 และจี 2 (รูปที่ 2.1) ชนิดอื่นๆ ส่วนใหญ่เป็นผลมาจากเมแทบอลิซึมของอะฟลาทอกซินบี 1 (นงนุช, 2540)



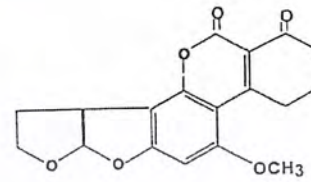
B1



B2



G1



G2

รูปที่ 2.1 อะฟลาทอกซินบี 1 บี 2 จี 1 และจี 2

ที่มา : นงนุช, 2540

ชื่อชนิดของสารพิษอะฟลาทอกซินตั้งขึ้นตามคุณสมบัติการเรืองแสงบนแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin-layer chromatographic plate) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365-366 นาโนเมตร โดยอะฟลาทอกซินบี 1 และบี 2 เรืองแสงสีน้ำเงิน (Blue) และอะฟลาทอกซินจี 1 และจี 2 เรืองแสงสีเขียว (Green) (อนงค์, 2546)

โครงสร้างของอะฟลาทอกซินบี 1 ประกอบด้วยไบฟิวแรน (Bifuran) คูมาริน (Coumarin) และวงแหวนไซโคลเพนทาโนน (Cyclopentanone ring) การที่อะฟลาทอกซินบี 1 มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 8-9 ในวงแหวนไบฟิวแรน (Bifuran ring) ทำให้อะฟลาทอกซินบี 1 มีความเป็นพิษมากกว่าอะฟลาทอกซินชนิดอื่นเพราะพันธะคู่นี้สามารถเปลี่ยนเป็นอีพอกไซด์ (Epoxide) ซึ่งอีพอกไซด์ (Epoxide) จะจับกับโมเลกุลดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนได้ง่าย นอกจากนี้การมีวงแหวนไซโคลเพนทาโนน ทำให้อะฟลาทอกซินบี 1 มีความเป็นพิษสูงกว่าพวกที่มีวงแหวนแลคโตน (Lactone ring) ซึ่งพบในอะฟลาทอกซินจี 1 และจี 2 ดังนั้นอะฟลาทอกซินชนิดที่เป็นพิษมากที่สุด จึงเรียงลำดับจากอะฟลาทอกซินบี 1 จี 1 บี 2 และจี 2 โดยพิจารณาจากพันธะคู่และวงแหวนแลคโตน (Lactone ring) สารตัวใดมีพันธะคู่เป็นพิษมากกว่าตัวที่ไม่มี อะฟลาทอกซินบี 1 กับจี 1 จึงเป็นพิษมากกว่าบี 2 และจี 2 ส่วนวงแหวนแลคโตน (Lactone ring) นั้นจะถูกสลายง่ายกว่า ความเป็นพิษย่อมน้อยกว่าเพราะโครงสร้างถูกเปลี่ยนแปลงไปแล้ว (วรนนท์, 2538)

2.4 คุณสมบัติที่สำคัญของสารพิษอะฟลาทอกซิน

สารพิษอะฟลาทอกซินมีคุณสมบัติที่สำคัญ ดังนี้ (สุกัญญา และคณะ, 2540)

2.4.1 การเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ขนาดคลื่น 365 นาโนเมตร จากคุณสมบัตินี้จะนำมาใช้ในการตรวจสอบชนิดของอะฟลาทอกซินได้

2.4.2 มีคุณสมบัติในการละลายได้ดีในไขมันและน้ำมัน ละลายได้บ้างในน้ำเกลือ

2.4.3 ละลายได้ดีในตัวทำละลายหลายชนิด เช่น เมทานอล (Methanol) คลอโรฟอร์ม (Chloroform) อะซีโตน (Acetone) เบนซีน (Benzene) จากคุณสมบัตินี้สามารถนำมาใช้ในการสกัดสารพิษออกจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ

2.4.4 ไม่ละลายในสารบางชนิด เช่น เฮกเซน (Hexane) อีเทอร์ (Ether) จากคุณสมบัตินี้สามารถนำมาใช้ในการทำให้สารพิษบริสุทธิ์

2.4.5 สารพิษนี้ถูกทำลายได้ง่ายด้วยสารละลายต่าง เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) จึงนำมาใช้ในการทำความสะอาดภาชนะเครื่องแก้วที่ใช้ในการวิเคราะห์สารพิษ

2.4.6 จุดหลอมตัวของอะฟลาทอกซินอยู่ที่ 250 องศาเซลเซียส ดังนั้นการใช้ความร้อนในรูปของการต้ม อบ คั่ว หรือหนึ่ง จึงไม่สามารถทำลายสารพิษนี้ได้ อย่างไรก็ตามอะฟลาทอกซินก็สามารถถูกทำลายได้บ้างด้วยแสงและความร้อนในรูปต่างๆ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลา และอุณหภูมิ

2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

ปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน (อนงค์, 2546) เช่น

2.5.1 เชื้อรา

เชื้อราที่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ ได้แก่ *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. tamari* and *A. pseudotamarii* (Bluma และ Etcheverry, 2008) เชื้อรา *A. flavus* มีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินได้แตกต่างกัน เพียงร้อยละ 80 ของเชื้อรา *A. flavus* ที่พบ สามารถผลิตอะฟลาทอกซินได้ ดังนั้น จึงเป็นไปได้ที่ในบางครั้งเมื่อตรวจพบเชื้อรา *A. flavus* แต่อาจไม่พบอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ด้วย

2.5.2 อาหารที่เชื้อราใช้ในการเจริญ

โดยปกติเชื้อรา *A. flavus* จะเจริญสร้างเส้นใยและสปอร์เท่านั้น จนกระทั่งปริมาณธาตุอาหารบางชนิด เช่น ฟอสเฟตและไนโตรเจน ถูกจำกัด มีผลให้การเจริญในระยะเส้นใยและการสร้างสปอร์ช้าลง เกิดการสะสมของไพรวูเวต (pyruvate) มาโลเนต (malonate) อะซิเตต (acetate) และทำให้เกิดกรดอะมิโน มีการพัฒนาและกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดให้สร้างสารทุติยภูมิขึ้นใน เชื้อรา *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษได้ จะเกิดกระบวนการสังเคราะห์โพลีลิไทด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(polyketide biosynthesis pathway) ซึ่งจะสังเคราะห์อะฟลาทอกซินขึ้นแทนการสังเคราะห์กรดไขมันตามปกติ

แหล่งอาหารที่เชื้อรา *A. flavus* ใช้ในการเจริญมีดังนี้

2.5.2.1 ธาตุไนโตรเจน กรดอะมิโนมีความสำคัญต่อการสร้างอะฟลาทอกซินมาก การเพิ่มกรดแอสปาทิกในสารอาหาร จะกระตุ้นให้เชื้อราสังเคราะห์อะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น แหล่งสารประกอบไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อรา *A. flavus* ผลิตอะฟลาทอกซินได้ดี คือเกลือแอมโมเนียมต่างๆ โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟต

2.5.2.2 ธาตุคาร์บอน ธาตุอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ซูโครส ไซโรส และไรโบส ซูโครสช่วยให้เชื้อราผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินได้ดีที่สุด

2.5.2.3 เกลือแร่ธาตุสังกะสี (Zn^{++}) และเกลือแร่บางชนิด มีส่วนช่วยให้เชื้อราผลิตอะฟลาทอกซินได้ดี

2.5.3 ปฏิกริยาระหว่างเชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์หลายชนิดมีผลกระทบต่อการเจริญและการผลิตสารพิษของ *A. flavus* ดังนี้

2.5.3.1 ปฏิกริยาของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่มีผลต่อการเจริญของ *A. flavus* เชื้อ *A. flavus* ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวโพดซึ่งฆ่าเชื้อแล้ว สามารถผลิตอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น 2 เท่าของเชื้อ *A. flavus* ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวโพดที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อ และมีเชื้อราอื่นๆ ขึ้นมาแข่งขัน

2.5.3.2 ปฏิกริยาของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีผลต่อการผลิตอะฟลาทอกซิน การแข่งขันของเชื้อราที่มีผลต่อการผลิตอะฟลาทอกซินบี1 โดยพบว่าข้าวโพดที่เก็บเกี่ยวขณะที่มีความชื้นสูง มีเชื้อรา *Fusarium* sp. และ *A. flavus* เจริญเป็นจำนวนมากแต่ไม่พบสารพิษอะฟลาทอกซินเลย

2.5.3.3 ปฏิกริยาที่เชื้อจุลินทรีย์อื่นทำลายสารพิษอะฟลาทอกซิน เช่น เชื้อ *Flavobacterium aurantiracum* สามารถทำลายพิษของอะฟลาทอกซินในอาหารได้ โดยการเปลี่ยนรูปโครงสร้างทางเคมี ทำให้พิษของอะฟลาทอกซินหมดไป

2.5.4 สภาพแวดล้อม

2.5.4.1 ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ และความชื้นภายในเมล็ดพืช จัดว่าเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราและการสร้างอะฟลาทอกซินมากที่สุด เชื้อราชนิดนี้เจริญได้น้อยเมื่ออากาศมีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่าร้อยละ 85 แต่เมื่อความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 86 ถึง 87 เชื้อราสามารถเจริญอย่างรวดเร็วและสร้างอะฟลาทอกซินได้

2.5.4.2 อุณหภูมิ เชื้อ *A. flavus* มีช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ค่อนข้างกว้าง ถ้าความชื้นพอเพียง เชื้อจะเจริญและผลิตอะฟลาทอกซินได้ ตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิ 6 ถึง 46 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญสูงสุดของเชื้อ *A. flavus* อยู่ในช่วง 29 ถึง 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

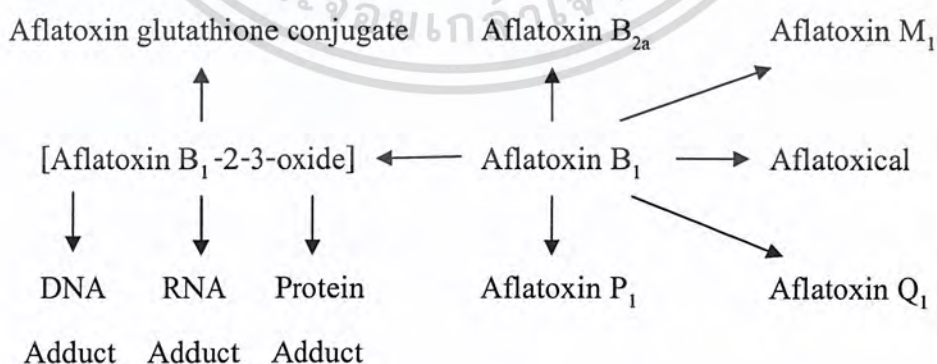
องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *A. parasiticus* คือ 30 ถึง 35 องศาเซลเซียส สำหรับระดับอุณหภูมิที่เชื้อรามีการสร้างสารพิษได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือที่ 25 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินบี 1 ของเชื้อ *A. flavus* และ อะฟลาทอกซินจี 1 ของเชื้อ *A. parasiticus*

2.5.4.3 แสงแดด มีผลทำลายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน จากการศึกษาการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อ *A. flavus* ภายใต้อุณหภูมิแวดล้อมต่างๆ พบว่า ในสภาพที่มีแสง พบสารพิษน้อยกว่าในที่มืดมาก

2.6 อันตรายจากสารพิษอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินเป็นสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์และสารก่อมะเร็งเป็นพิษต่อตับ ทำให้เกิดตับอักเสบ ตับแข็ง เนื้องอกในตับและมะเร็งที่ตับมีทั้งแบบเฉียบพลันและชนิดเรื้อรัง อาการแบบเฉียบพลันจะพบเลือดคั่งในตับ ตับมีไขมันสะสมมากขึ้นจนเกิดเป็นตับแข็ง และตาย แต่ถ้าเป็นแบบชนิดเรื้อรังจะพบว่าสัตว์จะเจริญเติบโตช้า มีอาการเบื่ออาหาร เชื่องซึม น้ำหนักตัวลดลง สัตว์ที่กำลังให้น้ำนมปริมาณการให้น้ำนมจะลดลง สัตว์ที่กำลังออกไข่จำนวนไข่จะลดลง และอาจเกิดมะเร็งที่ตับได้ โดยความเป็นพิษจะมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับปริมาณของสารพิษที่ได้รับ ความถี่ของการได้รับเข้าสู่ร่างกาย อายุ เพศ ชนิดพันธุ์สัตว์และสภาวะการทำงานของเอนไซม์ในตับ (สุกัญญา และคณะ, 2540)

เมื่อมีการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยสารพิษจากเชื้อราอะฟลาทอกซิน เช่น อะฟลาทอกซินบี 1 ถูกนำไปที่ตับที่มีเอนไซม์ต่างๆ ปฏิกริยากับอะฟลาทอกซินบี 1 ได้เป็นสารใหม่ (เมแทบอไลต์) ที่มีลักษณะโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไปจากอะฟลาทอกซินบี 1 เมแทบอไลต์บางตัวอาจมีความเป็นพิษมากกว่าอะฟลาทอกซินบี 1 แต่บางตัวมีความเป็นพิษน้อยกว่าได้ ดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 เมแทบอไลต์ของอะฟลาทอกซิน

ที่มา : Degen และ Neumann, 1978

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 โรคที่เกิดจากสารพิษอะฟลาทอกซิน (เปล่งศรี, 2540)

2.6.1.1 โรคตับแข็ง (cirrhosis) ก่อให้เกิดโรคตับแข็งได้ในลิง rhesus และอาจเป็นสาเหตุของโรคตับแข็งในเด็กของประเทศอินเดีย ซึ่งเป็นบริเวณที่พบสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหาร จากรายงานพบว่าเด็กที่มีอาการโรคขาดอาหารแบบ kwashiorkor ได้รับอาหารถั่วที่มีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน 0.3 มก.ต่อกก. ของอาหาร พบว่าเด็ก 3 ใน 20 คน เกิดโรคตับแข็งขึ้น เมื่อกินอาหารนี้ได้เพียง 17 วัน แต่เมื่อเปลี่ยนอาหาร อาการของเด็กดีขึ้น อย่างไรก็ตามมีรายงานจากประเทศฟิลิปปินส์ขัดแย้งกับรายงานจากประเทศอินเดีย

2.6.1.2 โรคมะเร็งตับ (Hepatocellular carcinoma) จากการทดลองในสัตว์ พบว่าการให้อาหารที่มีสารพิษอะฟลาทอกซินก่อให้เกิดมะเร็งในตับชัดเจน แต่สำหรับในคนซึ่งไม่สามารถจะทดลองโดยตรงได้ จากการสำรวจพบว่าแหล่งที่มีสารพิษอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในอาหารมาก มักพบมะเร็งในตับมาก เช่น ประเทศ Mozambique และประเทศฟิลิปปินส์ อาจสรุปได้ว่า สารพิษอะฟลาทอกซินน่าจะเป็นสาเหตุของมะเร็งในตับ ในประเทศไทยพบว่ามีสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหารหลายชนิด บางชนิดมีระดับสารพิษสูง เช่น ถั่วลิสงปน ผู้ชายเกิดโรคมะเร็งในตับง่ายกว่าผู้หญิง อากาศในเขตร้อนมีผลให้เชื้อ *Aspergillus flavus* เจริญได้ดีและยังบริเวณที่มีความชื้นสูงอย่างประเทศไทย การเก็บรักษาเมล็ดธัญพืชทำได้ไม่ดีพอ มีผลทำให้เชื้อราเจริญง่ายขึ้น

2.6.1.3 โรคตับอักเสบ (Hepatitis) มีรายงานพบว่าเมื่อปี พ.ศ. 2517 ที่ประเทศอินเดีย เด็กรับประทานข้าวโพดที่ขึ้นรา เกิดโรคตับอักเสบอย่างเฉียบพลัน มีผู้ป่วย 397 ราย และในจำนวนนี้ 106 รายถึงแก่ชีวิต ตรวจพบอะฟลาทอกซินในข้าวโพด 6-15 มก.ต่อกก. อาจสรุปได้ว่าอะฟลาทอกซินเป็นพิษต่อตับ (hepatotoxin) ในเด็กและสัตว์อ่อนมีความไวต่อสารพิษนี้ ถ้ารับประทานมากๆ ทำให้ถึงตายได้ ในผู้ใหญ่หรือสัตว์ที่มีอายุมีความไวน้อยกว่า ถ้ารับประทานน้อยเป็นเวลานาน สารพิษสามารถสะสมก่อมะเร็งได้ในคน ส่วนในสัตว์ทำให้การเจริญเติบโตช้า ตกลูกน้อย ปริมาณไข่และนมลดลง

2.6.1.4 กลุ่มอาการไรย์ (Reye's syndrome) เป็นกลุ่มอาการของโรคที่มักเกิดขึ้นในเด็กก่อนวัยเรียน (3-8 ปี) มีอาการตัวร้อน ปวดท้อง อาเจียน ชัก มักเสียชีวิตภายใน 24-72 ชั่วโมง ตรวจศพพบสมองบวม ไขมันแทรกระหว่างเซลล์ของอวัยวะต่างๆ และมีเลือดออกเป็นจุดเล็กๆ ภายในด้วย ในประเทศไทยมีรายงานครั้งแรกที่จังหวัดอุดรธานีจึงเรียกว่า "Udonencephalopathy" คล้ายกับกลุ่มอาการไรย์ ที่รายงานจากประเทศออสเตรเลีย ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากเชื้อไวรัส สารพิษ หรือแอสไพริน จากการศึกษาวิจัยที่จังหวัดอุดรธานี พบว่าเด็กรับประทานข้าวเหนียวหนึ่งที่ค้างมาหลายวัน มีเชื้อราหลายสายพันธุ์ปนเปื้อน เช่น *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* และตรวจพบอะฟลาทอกซิน เมื่อนำอวัยวะเด็กมาสกัดหาอะฟลาทอกซิน พบว่ามีสารตกค้างในปริมาณสูงพอสมควร เช่นเดียวกับโรคมะเร็งตับ มีผู้ตรวจพบเชื้อไวรัสในเด็กบางคนที่ตายด้วยโรคนี้ จึงยังสรุปหาสาเหตุที่แท้จริงไม่ได้

2.7 วิธีการตรวจสอบอะฟลาทอกซิน

การตรวจสอบอะฟลาทอกซินที่มีประสิทธิภาพและเชื่อถือได้มีอยู่หลายวิธี อาจจำแนกเป็น 3 ระดับ (รัตน, 2547) คือ

2.7.1 วิธีการสันนิษฐานในขั้นต้น (presumptive test) เป็นการตรวจสอบเพื่อให้รู้ว่าอาจจะมีอะฟลาทอกซินหรือไม่ในปริมาณที่มากหรือน้อยเท่านั้น โดยใช้วิธีการ BGJF (Bright Greenish Yellow Fluorescence) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร จุดเรืองแสงนี้เกิดจากเอนไซม์บางชนิดในเมล็ดข้าวโพดทำปฏิกิริยากับกรดโคจิก (Kojic) ที่สร้างขึ้นจากเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซิน ดังนั้นการที่ตรวจพบจุดเรืองแสงย่อมแสดงว่าข้าวโพดมีเชื้อราอยู่ แต่เนื่องจากไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ของเชื้อราที่สร้างสารพิษได้เพราะฉะนั้นการตรวจพบจุด BGJF ยังไม่สามารถชี้ชัดลงไปได้ว่ามีอะฟลาทอกซินอยู่จึงจัดวิธีการตรวจสอบ BGJF ไว้เป็นเพียงการสันนิษฐานในขั้นต้น จำเป็นต้องมีการตรวจสอบในขั้นต่อไปเพื่อให้รู้ว่ามีอะฟลาทอกซิน

2.7.2 วิธีตรวจสอบอย่างรวดเร็ว (rapid screening method) เพื่อให้รู้ว่ามีอะฟลาทอกซินหรือไม่ และมีปริมาณอยู่ในระดับใด มีวิธีการหลายวิธีแต่ที่ใช้กันแพร่หลายและได้ผลดี คือ วิธีมินิคอลัมน์ (minicolumn) เป็นวิธีการไม่ยุ่งยากนัก ใช้เวลาสั้นและค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ได้ในห้องปฏิบัติการที่มีเครื่องมือน้อย บอกปริมาณมีอะฟลาทอกซินโดยประมาณจากการอ่านค่าความเข้มขึ้นของแสงเปรียบเทียบกับมินิคอลัมน์มาตรฐาน (standard minicolumn) ที่รู้ความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินในระดับต่างๆ กัน เช่น 10 50 และ 100 พีพีบี (ppb)

2.7.3 วิธีการตรวจสอบปริมาณโดยละเอียด (quantitative method) โดยวิธีการนี้สามารถตรวจสอบชนิดและปริมาณของอะฟลาทอกซินได้ละเอียด แต่การปฏิบัติยุ่งยากซับซ้อน ใช้เครื่องมือมาก ต้องการความชำนาญพิเศษ ค่าใช้จ่ายสูง แต่อ่านผลได้ละเอียดและถูกต้อง สามารถอ่านค่าได้แม้ในปริมาณต่ำมาก ผลจากการวิเคราะห์เป็นที่ยอมรับทั่วไป โดยเฉพาะในด้าน กฎระเบียบ ข้อบังคับเกี่ยวกับปริมาณอะฟลาทอกซิน

ในการวิเคราะห์ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ แล้วนำไปผ่านวิธีการแยกชนิดและตรวจสอบปริมาณอะฟลาทอกซิน โดยทำการวัดความเข้มขึ้นของแสงที่เรืองแสงออกมาทั้งสีฟ้าและสีเขียวปนเหลือง เปรียบเทียบกับความเข้มขึ้นของการเรืองแสงจากอะฟลาทอกซินมาตรฐาน โดยวิธีต่างๆ เช่น TLC (Thin Layer Chromatography), HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) และ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) นอกจากนี้ยังมี Immunological method เป็นวิธีการที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงระหว่างสารพิษจากเชื้อราแอนติเจนและแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงระหว่างสารพิษชนิดนี้ เช่น RIA (Radio Immuno Assay) และ ELISA (Enzyme – Linked Immunosorbent Assay)

2.8 วิธีการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ *A. flavus* และสารพิษอะฟลาทอกซิน

แนวทางที่ดีที่สุดในการแก้ปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของเชื้อ *A. flavus* และอะฟลาทอกซิน คือการป้องกันซึ่งต้องมีความรู้เพียงพอในการดำเนินการ รวมทั้งต้องมีการพิจารณาหาวิธีการปนเปื้อนของเชื้อ มีการศึกษาหาวิธีการต่างๆ ในการควบคุมปริมาณอะฟลาทอกซิน (ฮาร์นัต, 2536) ดังต่อไปนี้

2.8.1 วิธีการทางกายภาพ (physical treatment)

2.8.1.1 การใช้ความร้อน (heating) การใช้อุณหภูมิไอน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้ร้อยละ 66 และถ้าใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส จะให้ผลดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังมีการใช้เครื่องอบ ซึ่งวิธีนี้อาจใช้ร่วมกับสารเคมีพวกแอมโมเนียก็จะได้ผลดีเช่นกัน

2.8.1.2 การใช้รังสี (irradiation) วิธีนี้ใช้ได้ผลในพวกเมล็ดพืชที่มีปริมาณไขมันมาก (oil seed meal) มีการทดลองใช้รังสีแกมมา พบว่า สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้ร้อยละ 90 แต่วิธีนี้ยังไม่นิยมใช้กันเพราะอาจมีผลในเรื่องคุณค่าทางอาหารและเป็นวิธีที่ยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง

2.8.2 วิธีการทางชีวภาพ (biological inactivation)

เชื้อจุลินทรีย์ที่พบอาจเป็นคู่แข่งกันหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้ในระหว่างเก็บรักษา ซึ่งอาจมีผลทำให้การสร้างสารพิษของเชื้อลดลงกว่าที่ควรจะเป็น การแข่งขันระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์รวมทั้งสภาพแวดล้อม เมื่อนำเชื้อจุลินทรีย์พวกเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์บางชนิด มาทดสอบเพื่อดูปฏิบัติการยับยั้งหรือการแปรสภาพของสารพิษอะฟลาทอกซินปี 1 พบว่า ในเมล็ดข้าวที่มีเชื้อ *A. glaucus* และ *A. condidis* อยู่ มีปริมาณอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในระดับที่ต่ำมาก ซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการบ่ม และสภาพแวดล้อมในระหว่างการเก็บรักษาด้วย เชื้อรา *A. niger* และ *Rhizoctonia solani* สามารถจำกัดการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และการผลิตสารพิษในสับสเตรทได้ เมื่อนำเชื้อ *Sclerotium bataticola* ที่เลี้ยงบนอาหารสกัคมอลต์ (malt extract agar) มาทดสอบพบว่า เชื้อนี้สามารถยับยั้ง *A. flavus* ได้ แต่ไม่พบการเกิดไลซิส (lysis) และยังพบว่าเชื้อ *S. bataticola* มีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *A. flavus* และพบว่าสายพันธุ์เชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถป้องกันการเจริญของเชื้อ *A. flavus* ได้ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อราบางชนิด เช่น *Macrophomina* sp., *Chaetomium* sp., *Choanephora* sp. และ *Penicillium* sp. ได้อีกด้วย

2.8.3 การใช้สารเคมี (chemical treatment)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.3.1 การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราบาง เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* เช่น การใช้สารเคมีไทอะเบนดาโซล (thiabendazole) หรือ เบนโนมิล (benomyl) ในอัตรา 10 พีพีบี ขึ้นไป หรือ แคพแทน (captan) สามารถยับยั้งเชื้อได้ แต่ต้องใช้อัตราความเข้มข้นสูงมาก นอกจากนี้มีการใช้สารเคมีอื่นๆ เช่น เมอร์คิวริก คลอไรด์ (mercuric chloride) ($HgCl_2$) การใช้สารเคมีในลักษณะนี้ ไม่สามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์สำหรับบริโภคได้ เนื่องจากมีพิษตกค้างค่อนข้างสูง

2.8.3.2 การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิด เช่น สารสกัดจากพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus* ได้ดีที่สุด ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10,000 พีพีเอ็ม ขึ้นไป รองลงมาได้แก่ กานพลู พริกไทย พริกหอม ดีปลี ชะเอมเทศ ดอกจันทร์ ขิงแก่ ใบกะวาน ใบยี่เก และเทียนขาว ตามลำดับ

2.8.3.3 การใช้สารเคมีเพื่อลดความเป็นพิษ เช่น ใช้วิธีแอมโมเนียเตชัน (ammoniation) โดยการนำแอมโมเนีย (NH_3) มาทดสอบเพื่อลดสารพิษอะฟลาทอกซินในข้าวโพด พบว่า แอมโมเนีย สามารถลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินจากเดิมที่มีค่ามากกว่า 1,000 พีพีบี ให้ลดต่ำลงจนเหลือน้อยกว่า 10 พีพีบี เป็นต้น การนำแอมโมเนียมาใช้ อาจใช้ได้ทั้งในสภาพก๊าซและของเหลว และอาจจะใช้แอมโมเนียเดี่ยวๆ หรือใช้ร่วมกับความร้อนก็ได้

โซเดียมไบซัลไฟด์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนีย ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ร้อยละ 1.0 และร้อยละ 2.0 กับข้าวโพดที่มีสารพิษอะฟลาทอกซินบี 1 และ บี 2 อยู่ 325 พีพีบี ความชื้นร้อยละ 20 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ทุกวิธีดัดแปรที่มีประสิทธิภาพสูงในการลดสารพิษอะฟลาทอกซินบี 1 และบี 2 และพบว่าโซเดียมไบซัลไฟด์มีประสิทธิภาพในการทำลายสารพิษสูงกว่า โซเดียมไฮดรอกไซด์และแอมโมเนียเหลว ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และร้อยละ 1.0 แต่ถ้าใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือแอมโมเนียเหลว ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 จะให้ประสิทธิภาพในการลดสารพิษอะฟลาทอกซินสูงกว่าโซเดียมไฮดรอกไซด์

นอกจากนี้ยังมีการทดลองนำสารเคมีพวกไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ฟอร์มาดีไฮด์ โซเดียมไฮโปคลอไรด์ และไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ มาทดสอบกับเมล็ดข้าวโพดและถั่วลิสงที่มีสารพิษอะฟลาทอกซินปนเปื้อนอยู่ พบว่ามีความแตกต่างกัน โดยพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 1.5 โซเดียมไฮโปคลอไรด์ร้อยละ 1 และไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 75 สามารถลดการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินให้อยู่ในระดับที่ไม่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatograph) แต่การใช้สารเคมีเหล่านี้มีข้อเสียคือ เสียค่าใช้จ่ายสูง และต้องใช้เครื่องมือบางอย่างที่ยุ่ยยาก ต่อมาก็มีการนำฟอร์มาดีไฮด์ร้อยละ 2 มาทดสอบ ก็พบว่า สามารถทำให้สารพิษอะฟลาทอกซินลดลงเหลือเพียง 10 พีพีบี ซึ่งเป็นค่า ที่ต่ำกว่ามาตรฐาน

2.9 น้ำมันหอมระเหย (Essential Oil)

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้น มักมีกลิ่นหอมและระเหยได้ง่าย โดยพืชหอมจะมีเซลล์พิเศษ ต่อมน้ำหรือท่อที่สร้างและกักเก็บน้ำมันหอมระเหย สามารถเห็นต่อมน้ำมันได้ชัดเจนบริเวณเปลือกผลของพืชตระกูลส้ม น้ำมันหอมระเหยสามารถพบได้ตามส่วนต่างๆ ของพืชหอม ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล เมล็ด เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติในการเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา ด้านอนุมูลอิสระ ด้านมะเร็ง บรรเทาอาการอักเสบหรือลดบวม คลายเครียดหรือกระตุ้นให้สดชื่น ทั้งนี้ขึ้นกับองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดและสามารถใช้เป็นสารธรรมชาติในการประกอบอาหารต่างๆ ได้ ซึ่งการศึกษาจะพบว่าน้ำมันหอมระเหยเป็นสารจำพวกเทอร์ปีน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน เช่น แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ คีโตน กรด และเอสเทอร์ และน้ำมันหอมระเหยบางชนิดจะประกอบด้วยสารพวกเอสเทอร์ ฟีนอล และอีเทอร์ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา (นงลักษณ์, 2548)

2.10 ตะไคร้ (Lemongrass)

ตะไคร้มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (รูปที่ 2.3) ชื่อท้องถิ่น เช่น จะไคร (ภาคเหนือ) ไคร (ภาคใต้) คาหอม (แม่ฮ่องสอน) เชิดเกรย เหลดเกรย (เขมร-สุรินทร์) ห่อวตะโป (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) เป็นพืชล้มลุก ความสูงประมาณ 4-6 ฟุต ใบยาวเรียว ปลายใบมีขนหนาม ลำต้นรวมกันเป็นกอ มีกลิ่นหอม เจริญเติบโตง่าย อาจมีพุ่มสูงถึง 1 เมตร มีลำต้นที่แท้จริง ประมาณ 4-7 เซนติเมตร ลำของต้นจะถูกห่อหุ้มไปด้วยกาบใบโดยรอบ ใบยาวแคบเส้นใบขนานกับก้านใบ ใบของตะไคร้อุดมไปด้วยน้ำมันหอมระเหย

สรรพคุณของตะไคร้ เช่น ใช้ส่วนของเหง้าและลำต้นแก่ ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารที่สำคัญหลายชนิด สรรพคุณทางยา เช่น บำรุงธาตุ แก้โรคทางเดินปัสสาวะ ขับลมในลำไส้ทำให้เจริญอาหาร แก้โรคหืด แก้อหิวาตกโรค บำรุงสมอง ช่วยให้สมาธิดี ต้มกับน้ำใช้ดื่มแก้อาเจียน ส่วนหัวสามารถใช้แก้โรคเกลื้อน ท้องอืดท้องเฟ้อ โรคนี้ว นอกจากนั้นยังสามารถทำเป็นยาช่วยนอนหลับ ช่วยลดความดันสูง เป็นต้น ตะไคร้เป็นพืชที่เติบโตง่ายและมีอยู่ทั่วไปในท้องถิ่น นอกจากสรรพคุณต่างๆ ไปแล้ว ยังพบว่าตะไคร้สามารถเป็นตัวยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และยับยั้งการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินได้อีกด้วย (นงลักษณ์, 2548)



รูปที่ 2.3 ตะไคร้บ้าน (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf)

ที่มา : <http://www.thaigoodview.com/library/contest2551/science03/35/Lemongrass.ht>

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาของ Bankole และ Joda (2004) ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของผงตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf) และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ในการลดฤทธิ์ของเชื้อราและการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในเมล็ดแตงโม (*Colocynthis citrullus* L.) โดยใช้ผงและน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาจากใบตะไคร้ที่แห้งแล้วในการควบคุมการเก็บรักษาและลดการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในเมล็ดแตงโม โดยใช้เชื้อรา 4 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. tamari* และ *Penicillium citrinum* และใช้ผงและน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาจากตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 ถึง 10 น้ำหนักต่อน้ำหนัก และร้อยละ 0.1 ถึง 1 ปริมาตรต่อปริมาตรตามลำดับผสมลงไปในเมล็ดแตงโม ผลที่ได้จากการทดลองคือ ผงตะไคร้สามารถลดการเสียของเมล็ดแตงโมที่เดิมเชื้อราลงไปได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดแตงโมที่ไม่ได้เติมน้ำมันหอมระเหยและผงตะไคร้ลงไป น้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.25 ปริมาตรต่อน้ำหนักและผงที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10 น้ำหนักต่อน้ำหนัก สามารถลดการเสียของเมล็ดแตงโมและการผลิตอะฟลาทอกซินในเมล็ดแตงโมที่เดิมเชื้อรา *A. flavus* ลงไป น้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นสูงร้อยละ 0.5 ถึง 1.0 ปริมาตรต่อน้ำหนัก สามารถยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินได้อย่างสมบูรณ์

จากการศึกษาของ Paranagama และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ในการฆ่าเชื้อราและการต้านสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวที่เก็บไว้ พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้น 0.6 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อราและฆ่าเชื้อรา *A. flavus* ได้ตามลำดับ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการใช้น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* นี้เป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายและมีความปลอดภัยกว่าการใช้สารเคมีในการฆ่าเชื้อรา เพราะน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ไม่ทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค

Thanaboripat และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินและการเจริญของ *Aspergillus flavus* ด้วยน้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอม (citronella oil) โดยการศึกษานี้ได้ทดลองกับเชื้อรา 4 ชนิดคือ *Aspergillus flavus* IMI 242684, *A. parasiticus* IMI 102566, *A. flavus* M 113 และ *A. flavus* S 156 สภาวะการเพาะเลี้ยงได้แบ่งออกเป็น 2 สภาวะคือเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA และเพาะเลี้ยงในเมล็ดข้าวโพด ในการเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ได้ใช้น้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ผสมลงในอาหาร PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 28 วัน วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีทุกๆ 7 วัน ส่วนการเพาะเลี้ยงในเมล็ดข้าวโพด จะนำเมล็ดข้าวโพด 50 กรัม ไปฆ่าเชื้อแล้วปรับความชื้นให้ได้ร้อยละ 22 ถึง 23 แล้วผสมน้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอมลงไปในระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 หลังจากนั้นเติมสปอร์ของ *A. flavus* IMI 242684 ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อกรัม และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 28 วัน นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ในวันที่ 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ปริมาตรต่อปริมาตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA ได้ ในขณะที่การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา การผลิตอะฟลาทอกซินและการผลิตสปอร์ในเมล็ดข้าวโพดสามารถยับยั้งได้ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 1.0 ขึ้นไป

Thanaboripat และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารสกัดมะกรูด (Kaffir lime) มะระขี้นก (Bitter cucumber) และยาสูบ (Tobacco) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 โดยนำสารสกัดของพืชทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA จากการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบของมะกรูด (Kaffir lime) มะระขี้นก (Bitter cucumber) และยาสูบ (Tobacco) สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร PDA ได้ โดยมะกรูด (Kaffir lime) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10 และต้นยาสูบ (Tobacco) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 8 ถึง 10 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้สูงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่มะระขี้นก (Bitter cucumber) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 6, 8 และ 10 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เช่นกัน

Thanaboripat และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหย 16 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ได้แก่ ดอกคำฝอย (*Carthamus tinctorius*), ดาวเรือง (*Tagetes erecta*), ผักชีไทย เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(*Coriandrum sativum*), ส้มโอ (*Citrus maxima*), มังคุด (*Garcinia mangostana*), กระชายดำ (*Kaempferia parviflora*), จิง (*Zingiber officinale*), พริกไทย (*Piper nigrum*), บอระเพ็ด (*Tinospora crispa*), ว่านหางจระเข้ (*Aloe vera*), ลาเวนเดอร์ (*Lavendula officinalis*), โรสแมรี่ (*Rosemarinus officinalis*), อบเชย (*Cinnamomum cassia*), ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus globules*), โหระพา (*Thymus vulgaris*), เสม์คขาว (*Melaleuca cajieputi*) ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบแบ่งออกเป็นร้อยละ 1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 และ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 วัน ต่อจากนั้นทำการคัดเลือกความเข้มข้นที่ดีที่สุดมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* เป็นระยะเวลา 28 วัน ผลการศึกษาพบว่าน้ำมันหอมระเหยเสม์คขาวให้ผลการยับยั้งสูงสุด รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยอบเชยและลาเวนเดอร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันนั้นยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยเสม์คขาวที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5625 ปริมาตรต่อปริมาตร และน้ำมันหอมระเหยอบเชยและลาเวนเดอร์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดี และน้ำมันหอมระเหยเสม์คขาวที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 25 ปริมาตรต่อปริมาตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 28 วันได้อย่างสมบูรณ์

Leimann และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับตะไคร้ ซึ่งตะไคร้เป็นน้ำมันหอมระเหยที่รู้จักกันเพื่อใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ การทดลองนี้เป็นการศึกษาการห่อหุ้มน้ำมันให้มีอนุภาคเล็กๆ โดยใช้ Poly vinyl alcohol และมีการเชื่อมโยงด้วย glutaraldehyde ซึ่งจะเป็นวิธีที่คล้ายกับการห่อหุ้มจุลินทรีย์ หรือที่เรียกว่า การตรึงเซลล์ ซึ่งวิธีนี้จะช่วยในการรักษาการเสื่อมสภาพของน้ำมันหอมระเหยได้ และได้มีการนำน้ำมันหอมระเหยที่ถูกห่อหุ้มมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยวิเคราะห์จากกิจกรรมของจุลินทรีย์ พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้

Naik และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ในการยับยั้งแบคทีเรีย เช่น *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่ง *S. aureus*, *B. cereus* และ *B. subtilis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และ *E. coli*, *K. pneumoniae* และ *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งด้วยน้ำมันหอมระเหยตะไคร้มาทดสอบความต่อยาปฏิชีวนะ และพบว่าผลการเจริญของแบคทีเรียลดลงและทำให้แบคทีเรียมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยแบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อยาปฏิชีวนะมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ยังมีประโยชน์ต่อการแพทย์ เมื่อใช้น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ตะไคร้ในการรักษาโรคติดเชื้อต่างๆ ที่เกิดขึ้นจากแบคทีเรีย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

Aspergillus flavus IMI 242684 จาก International Mycological Institute, UK

3.2 วัสดุดิบ

เมล็ดข้าวโพดอาหารสัตว์ จากร้านอาหารสัตว์ชนากร ตลาดท่าเรือ อำเภอนาทม
จังหวัดกาญจนบุรี

3.3 อุปกรณ์ สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่

- 1.หลอดทดลอง (test tube)
- 2.บีกเกอร์ (beaker)
- 3.ฟลาสก์รูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- 4.ขวดเตรียมอาหาร (deran flask)
- 5.เข็มฉีดยา (needle)
- 6.ผ้าขาวบาง (gauze)
- 7.สำลี (cotton)
- 8.ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow)
- 9.ปากคีบ (forceps)
- 10.ปิเปตต์ (pipette)
- 11.ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
- 12.Cork borer
- 13.กระบอกตวง (cylinder)
- 14.กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 15.ชุดสไลด์นับเซลล์ (heamacytometer)
- 16.เครื่องชั่ง (balance)
- 17.หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- 18.จานเพาะเชื้อ (plate)
- 19.ชุดกรอง
- 20.กระดาษกรอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21.ขวดสีชา

22.ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

23.ชุดทดสอบสารพิษอะฟลาทอกซินสำเร็จรูป (ELISA Test Kit) จากกรม
วิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

24. Micro ELISA Reader จาก Bio-Tek Instruments, USA

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1.ทวิน 80 (tween 80)

2.เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

Potato Dextrose Agar (PDA)

Aspergillus flavus/parasiticus Agar (AFPA)

3.4 สมุนไพรที่ใช้ในการทดลอง

3.4.1 น้ำมันหอมระเหยสำเร็จรูปตะไคร้บ้าน (*Cymbopogon citratus* (DC.) Staph) จาก
บริษัททองฮวด จำกัด สำนักงานใหญ่ เลขที่ 41-45 ถนนจักรวรรดิ เขตสัมพันธวงศ์ กรุงเทพฯ
10110

3.4.2 ต้นตะไคร้จากตลาดไท ตำบลคลอง 1 อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684

3.5.1.1 เชื้อเชื้อรา *Aspergillus flavus* จากอาหารแข็งเลี้ยง streak ลงบนอาหาร
PDA ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

3.5.1.2 ล้างสปอร์ด้วยสารละลายทวิน 80 (tween 80) ความเข้มข้นร้อยละ 0.05
ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่เตรียมไว้แล้ว โดยการปีปัดสารละลายทวิน 80 ลงไปในแต่ละหลอด แล้วใช้
เข็มเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกจากอาหาร นำสารละลายสปอร์ที่ได้ไปกรองด้วยชุดกรองสำลีที่ฆ่าเชื้อ
แล้ว

3.5.1.3 นำสารละลายสปอร์ที่ได้มานับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ โดย
สารละลายสปอร์มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา
เซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.5.2 การเตรียมผงตะไคร้ (Bankole และ Joda, 2004)

3.5.2.1 ตัดใบตะไคร้ออกจากต้น แล้วนำมาล้างทำความสะอาด

3.5.2.2 ผึ่งให้แห้ง ตัดใบตะไคร้ให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำมาใส่ถาดสแตนเลส แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 25-29 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน จนกระทั่งใบตะไคร้เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลลักษณะกรอบเปราะ

3.5.2.3 นำใบตะไคร้ที่ได้หลังจากการอบมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วนำส่วนที่บดได้มาร้อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 0.5 มิลลิเมตร

3.5.3 การทดสอบอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้และผงตะไคร้เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684

3.5.3.1 นำข้าวโพดจำนวน 1000 กรัม ไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็น

3.5.3.2 ทำการวัดความชื้นของข้าวโพดแล้วปรับความชื้นให้ได้ร้อยละ 25 โดยการเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไป (ภาคผนวก จ)

3.5.3.3 ชั่งข้าวโพดลงในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ถุงละ 20 กรัม

3.5.3.4 นำสารละลายสปอร์ของเชื้อราใส่ลงในแต่ละถุงพลาสติก ถุงละ 2 มิลลิลิตร (10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) คลุกให้สารละลายสปอร์ของเชื้อราและข้าวโพดเข้ากัน

3.5.3.5 นำน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 ถึง 5 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ที่เตรียมไว้ ใส่ลงในถุงพลาสติก (ทำความสะอาดเข้มข้นละ 3 ซ้ำ) และนำผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 ถึง 5 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และร้อยละ 10 ถึง 50 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ใส่ลงในถุงพลาสติก (ทำความสะอาดเข้มข้นละ 3 ซ้ำ) คลุกให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มไว้ในตู้ความชื้นสูงเป็นเวลา 7 วัน

3.5.3.6 สำหรับชุดควบคุมใส่เฉพาะสารละลายสปอร์ของเชื้อรา (ทำ 3 ซ้ำ) บ่มไว้ในตู้ความชื้นสูงเป็นเวลา 7 วัน เช่นกัน แบ่งการตรวจผลเป็น 2 แบบ คือ

3.5.3.6.1 การวัดการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด ด้วยวิธีการสังเกตด้วยตาเปล่า (Thanaboripat และคณะ, 2004)

ตรวจผลทุกวันวันที่ 0, 3, 5 และ 7 โดยการสังเกตการเจริญของเส้นใยราที่ขึ้นในเมล็ดข้าวโพด โดยกำหนดให้ระดับการเจริญของเส้นใยรา มี 4 ระดับ ดังนี้

0	คือ	ไม่มีการเจริญของเส้นใยปกคลุมเมล็ดข้าวโพด
1/8	คือ	มีการเจริญของเส้นใยเล็กน้อยปกคลุมเมล็ดข้าวโพด
1/4	คือ	มีการเจริญของเส้นใยปานกลางปกคลุมเมล็ดข้าวโพด
1/2	คือ	มีการเจริญของเส้นใยมากปกคลุมเมล็ดข้าวโพด
1	คือ	มีการเจริญของเส้นใยมากที่สุดปกคลุมเมล็ดข้าวโพด

3.5.3.6.2 การวัดการเจริญของ *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดด้วยเทคนิค spread plate (Pitt และ Hocking, 1989)

3.5.3.4.2.1 เติมสารละลายทวิน 80 (tween 80) ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่เตรียมไว้แล้ว ปริมาตร 180 มิลลิลิตร ลงในแต่ละถุง

3.5.3.4.2.2 ทำการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายทวิน 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่เตรียมไว้แล้ว

3.5.3.4.2.3 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร AFPA (Ronald, 1995) ที่เตรียมไว้ (ทำ 3 ซ้ำ) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 2 วัน โดยไม่ต้องคว่ำจานเพาะเชื้อ

3.5.3.4.2.4 นับจำนวนโคโลนีในแต่ละจานเพาะเลี้ยงเชื้อ โดยนับจำนวนโคโลนีที่อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี

3.5.4 การทดสอบอิทธิพลของผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 (Bankole และ Joda, 2004)

3.5.4.1 ทำการวัดความชื้นของข้าวโพด โดยแบ่งออกเป็นสองชุด ชุดที่หนึ่งเป็นข้าวโพดที่ไม่ได้นึ่งฆ่าเชื้อ ชุดที่สองเป็นข้าวโพดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

3.5.4.2 ทำการปรับความชื้นของเมล็ดข้าวโพดทั้งสองชุด ให้เป็นร้อยละ 25 โดยการเติมน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไป (ภาคผนวก จ)

3.5.4.3 ชั่งข้าวโพดใส่ลงในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ถุงละ 50 กรัม แล้วนำสารละลายสปอร์ของเชื้อรา ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในถุงพลาสติกที่มีข้าวโพด (ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร)

3.5.4.4 นำผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมมาใส่ลงในถุงพลาสติกที่มีเมล็ดข้าวโพดกับสารละลายสปอร์ของเชื้อราอยู่

3.5.4.5 สำหรับชุดควบคุมแบ่งออกเป็น 2 ชุด โดยชุดแรกไม่ต้องใส่สารละลายสปอร์ของเชื้อรา ส่วนชุดที่สองให้ใส่สารละลายสปอร์ของเชื้อรา ทั้ง 2 ชุดการทดลองไม่ต้องใส่น้ำมันหอมระเหยตะไคร้และผงตะไคร้ลงไป ทำการทดลองอย่างละ 5 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 3, 5 และ 7 สำหรับวิเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซิน

3.5.5 การวิเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซิน (อมรา และคณะ, 2552)

3.5.5.1 การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.5.5.1.1 เตรียมวอชิงบัฟเฟอร์ โดยนำวอชิงบัฟเฟอร์ (washing buffer) มาทำการเจือจางเป็น 0.001 M PBS-T โดยเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร

3.5.5.1.2 เตรียมเอนไซม์คอนจูเกต โดยเติมเอนไซม์คอนจูเกต 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดเอนไซม์คอนจูเกต 1 หลอด เขย่าเล็กน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.5.2 การสกัดสารพิษจากตัวอย่าง

3.5.5.2.1 บดตัวอย่างให้ละเอียด

3.5.5.2.2 ชั่งตัวอย่างจากแต่ละถุง จำนวน 20 กรัม ใส่ในพลาสติกและเติมเมทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 จำนวน 100 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกทุกพลาสติก (อัตราส่วนของตัวอย่างต่อเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เท่ากับ 1 ต่อ 5)

3.5.5.2.3 ปิดปากพลาสติกด้วยแผ่นพาราฟิน แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

3.5.5.2.4 นำสารสกัดที่ได้จากการเขย่ามาตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 ถึง 10 นาที แล้วจึงนำส่วนในสมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วเก็บส่วนที่กรองได้ไว้ในแก้วที่ปิดสนิท สารสกัดที่กรองได้จะมีความเข้มข้นเป็น 1 ต่อ 5 เท่า

3.5.5.3 การวิเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซินโดยวิธีอีไลซ่า (ELISA)

3.5.5.3.1 นำสารสกัดที่กรองได้มาทำการเจือจางเป็น 1 ต่อ 20 เท่า โดยใช้สารละลายวอชิงบัฟเฟอร์ (0.001 M PBS-T) ที่เตรียมไว้ โดยผสมส่วนที่กรองได้ 1 มิลลิลิตร ผสมกับวอชิงบัฟเฟอร์ 3 มิลลิลิตร

3.5.5.3.2 ทำการวิเคราะห์หาสารพิษโดยวิธี ELISA โดยหดยคสารพิษอะฟลาทอกซินมาตรฐาน ระดับความเข้มข้น 0, 0.2, 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ แล้วหดยคสารสกัดตัวอย่างที่เจือจางแล้ว จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบที่เหลือ

3.5.5.3.3 หดยคเอนไซม์คอนจูเกตที่เตรียมไว้ จำนวน 50 ไมโครกรัม ลงในหลุมทดสอบทุกหลุม เขย่าเล็กน้อยแล้วบ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

3.5.5.3.4 หลังจากครบเวลาการบ่มแล้ว เทสารในหลุมทดสอบทิ้ง โดยการคว่ำหลุมทดสอบ แล้วล้างโดยเติมวอชิงบัฟเฟอร์ลงในหลุมให้เต็มทุกหลุมแล้วคว่ำทิ้ง ล้างอย่างน้อย 3 ครั้ง คว่ำหลุมทดสอบและเกาะให้แห้ง

3.5.5.3.5 หดยคสับสเตรทจำนวน 100 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมทดสอบ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที จะเกิดปฏิกิริยาเป็นสีฟ้า ตามลำดับ ความเข้มข้นของสารพิษตัวอย่างที่มีสีฟ้าเข้มแสดงว่าไม่มีสารพิษหรือมีน้อย และตัวอย่างที่มีสีฟ้าจางหรือขาวแสดงว่ามีสารพิษมาก

3.5.5.3.6 หยุดปฏิกิริยาโดยเติม stopping solution (0.5 M Phosphoric acid) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง และอ่านค่าความเข้มของสีด้วย MicroELISA Reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ควรอ่านปฏิกิริยาภายใน 60 นาที หลังจากหยุดปฏิกิริยา

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การออกแบบการทดลองแต่ละการทดลองเป็นแบบสุ่มอิสระ โดยสมบูรณ์ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ค่าทางสถิติใช้ SPSS 17.0 (Statistic Package for Social Science) เปรียบเทียบโดยใช้การทดสอบของดันแคน (Duncan's new multiple range test) ทดสอบที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05



บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การทดสอบอิทธิพลของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้และผงตะไคร้เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684

4.1.1 ผลการวัดการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดด้วยการสังเกตด้วยตาเปล่า

เมื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด โดยใช้น้ำมันหอมระเหยตะไคร้และผงตะไคร้ (ในข้าวโพด 20 กรัม) ใส่ลงในข้าวโพดที่มีเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 นำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 3, 5 และ 7 เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่น้ำมันหอมระเหยตะไคร้และผงตะไคร้ ทำการวิเคราะห์โดยสังเกตการเจริญของเส้นใย ดังตารางที่ 4.1 พบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด โดยไม่มีการเจริญของเชื้อราทั้ง 7 วัน ผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด ส่วนผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10, 20 และ 30 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด โดยไม่มีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 3 และมีการเจริญของเชื้อราในวันที่ 5 และ 7 น้อยกว่าชุดควบคุม ผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 50 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด โดยไม่มีการเจริญของเชื้อราทั้ง 7 วัน

ตารางที่ 4.1 แสดงการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด

ชนิด วันที่		การเจริญของเส้นใยเชื้อราในเมล็ดข้าวโพด			
		0	3	5	7
ชุดควบคุม		0	1/8	1/4	1/2
น้ำมันหอมระเหย ตะไคร้ (ร้อยละ)	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
ผงตะไคร้ (ร้อยละ)	1	0	1/8	1/4	1/4
	2	0	0	1/4	1/4
	3	0	1/8	1/4	1/4
	4	0	1/8	1/8	1/4
	5	0	0	1/8	1/4
	10	0	0	1/8	1/4
	20	0	0	1/8	1/8
	30	0	0	1/8	1/8
	40	0	0	0	0
	50	0	0	0	0

หมายเหตุ	อัตราการเจริญของเส้นใยเชื้อรา
0	คือ ไม่มีการเจริญของเส้นใยปกคลุมเมล็ดข้าวโพด
1/8	คือ มีการเจริญของเส้นใยเล็กน้อยปกคลุมเมล็ดข้าวโพด
1/4	คือ มีการเจริญของเส้นใยปานกลางปกคลุมเมล็ดข้าวโพด
1/2	คือ มีการเจริญของเส้นใยมากปกคลุมเมล็ดข้าวโพด
1	คือ มีการเจริญของเส้นใยมากที่สุดปกคลุมเมล็ดข้าวโพด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลการวัดการเจริญเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด ด้วยเทคนิค

spread plate

เมื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร AFPA (*Aspergillus flavus/parasiticus* Agar) เป็นเวลา 7 วัน และวัดการเจริญของเชื้อราโดยนับจำนวนโคโลนี พบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 กับผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 มีอิทธิพลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ดังตารางที่ 4.2 เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 และผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 50 ให้ผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ



ตารางที่ 4.2 จำนวนโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด

ชนิด		จำนวนโคโลนี (CFUต่อกรัม)
ชุดควบคุม		5.27x10 ^{5a}
น้ำมันหอมระเหย ตะไคร้ (ร้อยละ)	1	<3.0x10 ^{2d}
	2	<3.0x10 ^{2de}
	3	<3.0x10 ^{2cf}
	4	<3.0x10 ^{2f}
	5	<3.0x10 ^{2ef}
ผงตะไคร้ (ร้อยละ)	1	3.9x10 ^{5a}
	2	3.83x10 ^{5a}
	3	3.33x10 ^{5a}
	4	4.37x10 ^{5a}
	5	5.0x10 ^{5a}
	10	3.8x10 ^{5a}
	20	<3.0x10 ^{2a}
	30	<3.0x10 ^{2a}
	40	4.77x10 ^{4b}
	50	<3.0x10 ^{2c}

หมายเหตุ ตัวเลขที่มีตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่แตกต่างกัน (p<0.05)

4.2 การทดสอบอิทธิพลของผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684

เมื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดที่ฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อ โดยใช้ผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10, 20, 30, 40 และ 50 ในเมล็ดข้าวโพด 50 กรัม (เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่เชื้อรามีการเจริญได้น้อยกว่าผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 ถึง 5) ใส่ลงในข้าวโพดที่มีเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 นำมาเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 3, 5 และ 7 เทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่ผงตะไคร้ 2 ชุด โดยชุดควบคุมที่ 1 ไม่มีการใส่สารละลายสปอร์ และชุดควบคุมที่ 2 ใส่สารละลายสปอร์ ทำการวิเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซินโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป (ELISA Test Kit) และวัดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในเชิงปริมาณของเมล็ดข้าวโพดที่ฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อ พบว่า ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวโพดน้อยกว่าชุดควบคุม ดังตารางที่ 4.3 และตารางที่ 4.4 เมื่อใช้เมล็ดข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วก่อนนำมาทดลอง พบว่าในวันที่ 3 ผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10, 20 และ 30 มีปริมาณอะฟลาทอกซิน 20 พีพีบี ผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 50 มีปริมาณอะฟลาทอกซิน 1.6 พีพีบี ซึ่งมีปริมาณอะฟลาทอกซินน้อยกว่าชุดควบคุมที่ใส่สารละลายสปอร์ซึ่งมีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน 40.4 พีพีบี ส่วนวันที่ 5 ผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10, 20 และ 30 มีปริมาณอะฟลาทอกซิน 40.4 พีพีบี ซึ่งมีปริมาณอะฟลาทอกซินใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ใส่สารละลายสปอร์ (41.6 พีพีบี) ส่วนผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 50 พบว่ามีปริมาณอะฟลาทอกซินเพียง 2 พีพีบี และวันที่ 7 ผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10, 20 และ 30 มีปริมาณอะฟลาทอกซิน 40.4 พีพีบี ซึ่งมีปริมาณอะฟลาทอกซินใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ใส่สารละลายสปอร์ (41.6 พีพีบี) ส่วนผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 มีปริมาณอะฟลาทอกซิน 10 พีพีบี และผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50 มีปริมาณอะฟลาทอกซิน 10 พีพีบี (ตารางที่ 4.3) และเมื่อใช้เมล็ดข้าวโพดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อก่อนนำมาทดลอง พบว่าในวันที่ 3 ผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10, 20 และ 30 มีปริมาณอะฟลาทอกซิน 20 พีพีบี ผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 50 มีปริมาณอะฟลาทอกซิน 1.6 พีพีบี ซึ่งมีปริมาณอะฟลาทอกซินน้อยกว่าชุดควบคุมที่ใส่สารละลายสปอร์ที่มีปริมาณอะฟลาทอกซิน 40 พีพีบี ส่วนวันที่ 5 ผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10, 20 และ 30 มีปริมาณอะฟลาทอกซิน 40.4 พีพีบี ซึ่งมีปริมาณอะฟลาทอกซินใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ใส่สารละลายสปอร์ (40.4 พีพีบี) ส่วนผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 50 มีปริมาณอะฟลาทอกซินเพียง 2 พีพีบี และวันที่ 7 ผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10, 20 และ 30 มีปริมาณอะฟลาทอกซิน 40.4 พีพีบี ซึ่งมีปริมาณอะฟลาทอกซินใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ใส่สารละลายสปอร์ (40.4 พีพีบี) ส่วนผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้น

ร้อยละ 40 มีปริมาณอะฟลาทอกซิน 10 พีพีบี ผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50 มีปริมาณอะฟลาทอกซิน 10 พีพีบี (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวโพดที่ฆ่าเชื้อ

ชนิด วันที่		ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน (พีพีบี)			
		0	3	5	7
ชุดควบคุมที่ 1		0	0	0	0
ชุดควบคุมที่ 2		0	40.4	41	41.6
ผงตะไคร้ (ร้อยละ)	10	0	20	40.4	40.4
	20	0	20	40.4	40.4
	30	1.6	20	40.4	40.4
	40	0	1.6	2	10
	50	0	1.6	2	4

หมายเหตุ ชุดควบคุมที่ 1 ไม่ใส่สารละลายสปอร์
ชุดควบคุมที่ 2 ใส่สารละลายสปอร์

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวโพดที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อ

ชนิด วันที่		ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน (พีพีบี)			
		0	3	5	7
ชุดควบคุมที่ 1		0	0	0	0
ชุดควบคุมที่ 2		1.6	40	40.4	40.4
ผงตะไคร้ (ร้อยละ)	10	1.6	4	40.4	40.4
	20	0	20	40.4	40.4
	30	0	4	20	40.4
	40	0	1.6	4	12.4
	50	0	0	0	5.6

หมายเหตุ ชุดควบคุมที่ 1 ไม่ใส่สารละลายสปอร์
ชุดควบคุมที่ 2 ใส่สารละลายสปอร์

เนื่องจากการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง ข้าวโพด และผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรต่างๆ เป็นอันตรายต่อการบริโภค ดังนั้นแต่ละประเทศจึงมีการกำหนดค่าการปนเปื้อนต่ำสุดเพื่อป้องกันสุขภาพอนามัยของผู้บริโภค โดยในประเทศไทยกำหนดให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม หรือ 20 พีพีบี (ในอาหารมนุษย์) และไม่เกิน 40 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม หรือ 40 พีพีบี (ในอาหารสัตว์) (ดวงจันทร์ และ วนิดา, 2545) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า ผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 50 สามารถลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวโพดที่ฆ่าเชื้อจาก 41.6 พีพีบี ให้เหลือเพียง 10 และ 4 พีพีบี ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 7 วัน และลดปริมาณสารพิษในเมล็ดข้าวโพดที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อจาก 40.4 พีพีบี ให้เหลือเพียง 12.4 และ 5.6 พีพีบี ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งน้อยกว่าเกณฑ์ที่กำหนด ดังนั้นจึงมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

จากการศึกษาของ Parra และคณะ (2001) โดยการนำน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้เข้าทางกระเพาะอาหารกระด่าย พบว่ามีค่า LD₅₀ มากกว่า 5 กรัมต่อกิโลกรัม ส่วนพิษในหนูขาวไม่ชัดเจน และเมื่อป้อนสารสกัดใบด้วยแอลกอฮอล์และน้ำ (1 ต่อ 1) ขนาด 460 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระเพาะอาหารหนูถีบจักร พบว่ามีพิษ แต่สารสกัดใบด้วยน้ำ ขนาด 20 ถึง 40 ซีซีต่อกิโลกรัม เมื่อให้ทางปากไม่พบพิษ และไม่เป็นพิษต่อตัวอ่อน และไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวของหนูขาว และมีการศึกษาพิษของน้ำมันหอมระเหย พบว่าอัตราส่วน LD₅₀/TD เท่ากับ 6.9 การป้อนยาขิงตะไคร้ให้หนูขาวในขนาด 20 เท่าของขนาดที่ใช้ในคนเป็นเวลา 2 เดือน ไม่พบความเป็นพิษ การศึกษาพิษเฉียบพลันของน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ขนาด 1,500 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 60 วัน พบว่าหนูขาวกลุ่มที่ได้รับตะไคร้ โตเร็วกว่ากลุ่มควบคุม แต่ค่าเคมีเลือดไม่เปลี่ยนแปลง

จากการศึกษาของ Wohrl และคณะ (2001) โดยการทดสอบพิษของชาที่เตรียมจากตะไคร้ พบว่า เมื่อให้อาสาสมัครสุขภาพดีรับประทานชาตะไคร้ 1 ครั้ง หรือรับประทานวันละครั้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางเคมี เลือดและปัสสาวะ มีบางรายเท่านั้นที่ปริมาณบิลิรูบิน และ amylase ขึ้น จึงนับว่าปลอดภัย น้ำมันตะไคร้เมื่อผสมในน้ำหอม โดยผสมน้ำมันตะไคร้ร้อยละ 0.8 พบว่ามีอาการแพ้ แต่อาจเกิดจากสารอื่น

จากการศึกษาการยับยั้งการผลิตอะฟลาทอกซินและการเจริญของ *Aspergillus flavus* ด้วยน้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอม (citronella oil) พบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (ปริมาตรต่อปริมาตร) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA ได้ ในขณะที่การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา การผลิตอะฟลาทอกซินและการผลิตสปอร์ในเมล็ดข้าวโพดสามารถยับยั้งได้ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 1.0 ขึ้นไป การเจริญของ *A. flavus* M 113, *A. flavus* S 156 บนอาหาร PDA สามารถยับยั้งได้ด้วยน้ำมันหอมระเหยตะไคร้หอมที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ในขณะที่การเจริญของ *A. parasiticus* IMI 10256 สามารถยับยั้งได้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (Thanaboripat และคณะ, 2004)

จากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* โดยใช้ น้ำมันหอมระเหยทั้งหมด 16 ชนิด พบว่าน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาว (*Melaleuca cajuputi*) ให้ผลการยับยั้งสูงสุด รองลงมาคือน้ำมันหอมระเหยอบเชย (*Cinnamomum cassia*) และลาเวนเดอร์ (*Lavandula officinalis*) ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิดที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันนั้นยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยเสม็ดขาวที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5625 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และน้ำมันหอมระเหยอบเชยและลาเวนเดอร์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 50 (ปริมาตรต่อปริมาตร) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 บนอาหาร PDA ได้ (Thanaboripat และคณะ, 2007)

จากการศึกษาของ Wannissorn และคณะ (1996) ได้ใช้สารสกัดตะไคร้จากเอทานอล และน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ ความเข้มข้น 40 และ 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งน้ำมันตะไคร้จากใบซึ่งมีสาร citral และ myrcene เป็นส่วนประกอบหลัก สามารถต้านเชื้อรา

Trichophyton mentagrophytes, *T. rubrum*, *Epidermophyton floccosum* และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Microsporum gypsum ที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนัง และพบว่าน้ำมันตะไคร้ที่มีสาร citral และ myrcene เป็นส่วนประกอบหลักมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราดังกล่าว โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง (MIC) เท่ากับ 122.5, 135, 115, 235 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และความเข้มข้นต่ำสุดของ น้ำมันตะไคร้ที่มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราดังกล่าว (MLC) มีค่าเท่ากับ 135, 147.5, 125, 310 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำน้ำมันตะไคร้ไปพัฒนาเป็นครีมต้านเชื้อรา พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 และ 3.0 ให้ผลในการต้านเชื้อราดังกล่าวได้ดีที่สุดและเหมาะที่จะพัฒนาเป็นยาต่อไป

จากการศึกษาของ อัจฉรา และคณะ (2532) ได้นำน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดตะไคร้ จาก เฮกเซน คลอโรฟอร์ม เอทานอล และน้ำ มาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา 4 ชนิด คือ *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypsum*, *T. mentagrophytes* และ *T. rubrum* ด้วยวิธี Agar diffusion พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยปริมาตร สามารถต้านเชื้อราดังกล่าวได้ โดยมีค่า MIC เท่ากับร้อยละ 5, 10, 10 และ 20 ตามลำดับ และสารสกัดตะไคร้ด้วยเฮกเซนที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถต้านเชื้อราดังกล่าวได้ทุกชนิด และมีค่า MIC ของสารสกัดเฮกเซนต่อเชื้อราดังกล่าว เท่ากับ 62.5, 125, 125 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสารสกัดคลอโรฟอร์มมีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้น้อย คือที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อราอย่างคงเจริญได้ร้อยละ 50 ส่วนสารสกัดเอทานอล และน้ำ ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราดังกล่าวที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจากผลการทดลองยังพบว่าสารประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหย และในสารสกัด เฮกเซนที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ดี คือ สาร citral

จากการศึกษาของ Rauber และคณะ (2004) ได้นำน้ำมันตะไคร้ ความเข้มข้น 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อรา *T. mentagrophytes* และ *M. gypsum* ได้ร้อยละ 100 ซึ่งพบว่าค่า MIC ของน้ำมันตะไคร้ ต่อเชื้อดังกล่าวมีค่าเท่ากับร้อยละ 0.08 ปริมาตรต่อปริมาตร ซึ่งสาร citral, citronellal, citronellol และ geraniol ที่เป็นสารประกอบหลักในน้ำมันตะไคร้มีฤทธิ์ต้านเชื้อราดังกล่าวได้ดีเมื่อเทียบกับน้ำมันตะไคร้ ในขณะที่ dipentene, myrcene, limonene ไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราดังกล่าว และพบตะไคร้ในรูปของ emulsion และ nanocapsule ที่ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้สามารถรักษาโรคผิวหนังที่เกิดจากเชื้อรา *E. floccosum*, *Microsporum canis* และ *T. rubrum* โดยไปยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเซลล์ของเชื้อรา

จากการศึกษาประสิทธิภาพของผงตะไคร้ (*Cymbopogon citratus* Stapf) และน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ในการลดฤทธิ์ของเชื้อราและการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในเมล็ดแตงโม (*Colocynthis citrullus* L.) พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ 0.25 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) และผงที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) มีระดับนัยสำคัญในการลดการเสื่อมลงและการผลิตอะฟลาทอกซินในเมล็ดแตงโม (Bankole และ Joda, 2004) ซึ่งสารที่ยับยั้ง คือ สาร citral

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สวชนไวสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 กับผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด โดยการวัดการเจริญด้วยวิธีการสังเกตด้วยตาเปล่า พบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 กับผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 50 สามารถให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งได้เป็นเวลา 7 วัน ส่วนการวัดการเจริญด้วยเทคนิค spread plate โดยการนับจำนวนโคโลนี พบว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 กับผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 50 สามารถให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งได้เป็นเวลา 7 วัน จะเห็นว่าการทดสอบน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 4 และ 5 กับผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 50 ทั้งสองวิธีมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวโพด จึงนำผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10, 20, 30, 40 และ 50 มาทดสอบการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน โดยเก็บตัวอย่างทุกวันที่ 0, 3, 5 และ 7 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม เมื่อนำไปวัดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน พบว่าชุดควบคุมในวันที่ 0 ให้ปริมาณอะฟลาทอกซิน 0 พีพีบี วันที่ 3 ให้ปริมาณอะฟลาทอกซิน 40.4 พีพีบี วันที่ 5 ให้ปริมาณอะฟลาทอกซิน 41 พีพีบี และวันที่ 7 ให้ปริมาณอะฟลาทอกซิน 41.6 พีพีบี ส่วนผงตะไคร้ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10, 20 และ 30 มีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินน้อยกว่าชุดควบคุมและสามารถยับยั้งได้เป็นเวลา 3 วัน ผงตะไคร้ร้อยละ 40 และ 50 มีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินน้อยกว่าชุดควบคุมและสามารถยับยั้งได้เป็นเวลา 7 วัน สำหรับปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวโพดที่ไม่ฆ่าเชื้อจะมีน้อยกว่าเมล็ดข้าวโพดที่ฆ่าเชื้อ เนื่องจากในเมล็ดข้าวโพดที่ไม่ฆ่าเชื้อจะมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญอยู่ ทำให้มีการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* เป็นผลให้มีการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินน้อยกว่าเมล็ดข้าวโพดที่ฆ่าเชื้อ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าน้ำมันหอมระเหยตะไคร้และผงตะไคร้สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดได้ โดยคาดว่าสารในตะไคร้ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราอาจเป็นสาร citral และเมื่อมีการเจริญของเชือราน้อยลงทำให้การสร้างสารพิษลดน้อยลงไปด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองจะใช้ส่วนของใบตะไคร้มาทำเป็นผงตะไคร้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา อาจศึกษาเพิ่มเติมโดยการใช้ส่วนประกอบอื่นๆ ของตะไคร้มาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา
2. ศึกษาวิธีการ ขั้นตอน เพื่อที่จะสามารถทำให้เกิดการยับยั้งเชื้อราที่นานขึ้น
3. ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการขยายขนาดการทดลอง เพื่อที่สามารถนำไปใช้กับทางเกษตรกรรมในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา

Aspergillus flavus



เอกสารอ้างอิง

ดวงจันทร์ สุขประเสริฐ และ วณิดา ยุธยาติ, 2545. สารพิษอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในเครื่องเทศ.

วารสารสุขภาพอาหาร. 4(2), 33-37.

นงนุช วณิดยธนาคม, 2540. วิทยาเชื้อราการแพทย์. คณะแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นงลักษณ์ ปานเกิดดี, 2548. น้ำมันหอมระเหยไทย. กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

เปล่งศรี อิงคินันท์, 2540. สารพิษจากเชื้อรา. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ดีธรรสาร.

รัตนา อินทรานุปกรณ์, 2547. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพฯ : บริษัทแอคทีฟ พรินท์ จำกัด.

วรินทร์ ศุภพิพัฒน์, 2538. โภชนาการและสารเคมี. กรุงเทพฯ : แสงการพิมพ์.

สุกัญญา กองเงิน, นันทวรรณ สโรบล, ชูทิพย์ ชนะเสนีย์ และสมศักดิ์ สุริโย, 2540. อะฟลาทอกซินในถั่วลิสง. กรุงเทพฯ : สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (สมอ.).

อนงค์ บินทวิหก, 2546. สารพิษจากเชื้อรา : อะฟลาทอกซิน. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อมรา ชินภูติ, ขวเลิศ ตรีภรณ์สวัสดิ์, สุภรา อัคระสาระกุล, 2552. ชุดเครื่องมือตรวจสอบสารอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์เกษตร DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit. กลุ่มตรวจสอบและรับรองคุณภาพสินค้าเกษตร. สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการ หลังเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลการเกษตร.

อารันต์ พัฒโนทัย, 2536. งานวิจัยถั่วลิสงในประเทศไทย ถึงปี 2532. ขอนแก่น : คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อัจฉรา เหมทานนท์, สุมาลี เหลืองสกุล และ ชารารัตน์ สุขศิริ, 2532. ฤทธิ์ของสารสกัดจากตะไคร้ ในการต้านเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคผิวหนังบางชนิด. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 5(2), 115-123.

AOAC, 1995. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 16th ed. Arlington: The Association of official Analytical Chemist.

Bankole, S.A. and Joda, A.O. 2004. Effect of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) powder and essential oil on mould deterioration and aflatoxin contamination of melon seeds (*Colocynthis citrullus* L.). African Journal of Biotechnology, 3, 52-59.

Bluma, R.V. and Etcheverry, M.G. 2008. Application of essential oils in maize grain: Impact on *Aspergillus* section *Flavi* growth parameters and aflatoxin accumulation. Food Microbiology, 25, 324-334.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งมอบไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Degen, G. H. and Neumann, H. G. 1978. The major metabolite of aflatoxin B₁ in the rat is a glutathione conjugate. *Chemico-Biological Interactions*, 22, 239-255.
- Leimann, F.A., Goncalves, O.H., Machado, R.A.F. and Bolzan, A. 2009. Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. *Materials Science and Engineering*, 29, 430-436.
- Naik, M.I., Fomda, B.A., Jaykumar, E. and Bhat, J.A. 2010. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 1, 535-538.
- Paranagama, P.A., Abeysekera, K.H.T., Abeywickrama, K. and Nugaliyadde, L. 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 86-90.
- Parra, A.L., Yhebra, R.S., Sardinas, I.G. and Buella, L.I. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395-400.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. 1989. *Aspergillus* and related telemorphs. *Fungi and Food Spoilage*. Third edition. London, England.
- Rauber, C.S., Henriques, A., Teresinha, G., Silvia, S. and Schapoval, E.E.S. 2004. Pharmaceuticals for treatment of skin infections caused by *Candida* and dermatophytic fungi employing essential oil of *Cymbopogon citratus*. Patent: Braz Pedido.
- Razzaghi-Abyaneh, M., Shams-Ghahfarokhi, M., Yoshinari, T., Rezaee, M., Jaimand, K., Nagasawa, H. and Sakuda, S., M.G. 2008. Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Microbiology*, 123, 228-233.
- Ronald, M. A. 1995. *Handbook of Media for Environmental Microbiology*. Boca Raton.
- Thanaboripat, D., Chareonsettasilp, S., Pandee, K., and Udomwongsup, K. 2006. Inhibitory effect of kaffir lime, bitter cucumber and tobacco extracts on the growth of *Aspergillus flavus*. *KMITL Science and Technology Journal*, 6(1), 18-24.
- Thanaboripat, D., Mongkontanawat, N., Suvathi, Y. and Ruangrattanamatee, V. 2004. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by citronella oil. *KMITL Science and Technology Journal*, 4(1), 1-8.

- Thanaboripat, D., Suvathi, Y., Srilohasin, P., Sripakdee, S., Patthanawanichai, O. and Charoensettasilp, S. 2007. Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Aspergillus flavus*. KMITL Science and Technology Journal, 7(1), 1-7.
- Wannissorn, B., Jarikasem, S. and Soontorntanasart, T. 1996. Antifungal activity of lemon grass oil and lemon grass oil cream. Phytotherapy Research, 10, 551-554.
- Wohrl, S., Hemmer, W., Focke, W., Gotz, M. and Jarisch, R. 2001 The significance of fragrance mix, balsam of Peru, colophony and propolis as screening tools in the detection of fragrance allergy. British Journal of Dermatology, 145(2), 268-73.



ภาคผนวก ก

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ก-1 การเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด

ชนิด	วันที่ จำนวนซ้ำ	การเจริญของเส้นใยราในเมล็ดข้าวโพด			
		0	3	5	7
ชุดควบคุม	1	0	1/4	1/4	1/2
	2	0	1/8	1/4	1/2
	3	0	1/8	1/4	1/2
	เฉลี่ย	0	1/8	1/4	1/2
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ร้อยละ 1	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	เฉลี่ย	0	0	0	0
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ร้อยละ 2	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	เฉลี่ย	0	0	0	0
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ร้อยละ 3	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	เฉลี่ย	0	0	0	0
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ร้อยละ 4	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	เฉลี่ย	0	0	0	0
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ ร้อยละ 5	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	เฉลี่ย	0	0	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานในหอสมุดเฉพาะเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ภายนอก
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก-1 (ต่อ) การเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด

ชนิด	วันที่ จำนวนซ้ำ	การเจริญของเส้นใยราในเมล็ดข้าวโพด			
		0	3	5	7
ผงตะไคร้ร้อยละ 1	1	0	1/8	1/4	1/4
	2	0	1/8	1/4	1/4
	3	0	1/8	1/4	1/4
	เฉลี่ย	0	1/8	1/4	1/4
ผงตะไคร้ร้อยละ 2	1	0	0	1/8	1/4
	2	0	0	1/4	1/4
	3	0	0	1/4	1/4
	เฉลี่ย	0	0	1/4	1/4
ผงตะไคร้ร้อยละ 3	1	0	1/8	1/4	1/4
	2	0	1/8	1/4	1/4
	3	0	1/8	1/4	1/4
	เฉลี่ย	0	1/8	1/4	1/4
ผงตะไคร้ร้อยละ 4	1	0	0	1/8	1/4
	2	0	1/8	1/4	1/4
	3	0	1/8	1/8	1/4
	เฉลี่ย	0	1/8	1/8	1/4
ผงตะไคร้ร้อยละ 5	1	0	0	1/8	1/4
	2	0	1/8	1/4	1/4
	3	0	0	1/8	1/4
	เฉลี่ย	0	0	1/8	1/4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก-1(ต่อ) การเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด

ชนิด	วันที่ จำนวนซ้ำ	การเจริญของเส้นใยราในเมล็ดข้าวโพด			
		0	3	5	7
ผงตะไคร้ร้อยละ 10	1	0	0	1/8	1/4
	2	0	0	1/8	1/4
	3	0	0	1/8	1/4
	เฉลี่ย	0	0	1/8	1/4
ผงตะไคร้ร้อยละ 20	1	0	0	1/8	1/8
	2	0	0	1/8	1/8
	3	0	0	1/8	1/8
	เฉลี่ย	0	0	1/8	1/8
ผงตะไคร้ร้อยละ 30	1	0	0	1/8	1/8
	2	0	0	1/8	1/8
	3	0	0	0	0
	เฉลี่ย	0	0	1/8	1/8
ผงตะไคร้ร้อยละ 40	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	เฉลี่ย	0	0	0	0
ผงตะไคร้ร้อยละ 50	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	เฉลี่ย	0	0	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก-2 แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่นับได้ในงานอาหาร

ชนิด		จำนวนโคโลนี (CFU/กรัม)		
		1	2	3
ชุดควบคุม		52×10^4	59×10^4	47×10^4
น้ำมันหอมระเหย ตะไคร้ (ร้อยละ)	1	<300	<300	<300
	2	<300	<300	<300
	3	<300	<300	<300
	4	<300	<300	<300
	5	<300	<300	<300
ผงตะไคร้ (ร้อยละ)	1	52×10^4	44×10^4	$<30 \times 10^4$
	2	34×10^4	35×10^4	46×10^4
	3	32×10^4	36×10^4	32×10^4
	4	36×10^4	53×10^4	42×10^4
	5	41×10^4	52×10^4	57×10^4
	10	33×10^4	33×10^4	48×10^4
	20	$<30 \times 10^4$	$<30 \times 10^4$	$<30 \times 10^4$
	30	$<30 \times 10^4$	$<30 \times 10^4$	$<30 \times 10^4$
	40	58×10^3	45×10^3	40×10^3
	50	$<30 \times 10^2$	$<30 \times 10^2$	$<30 \times 10^2$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก-3 แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242864 ในเมล็ดข้าวโพด 20 กรัม

ชนิด		จำนวนโคโลนีต่อเมล็ดข้าวโพด 20 กรัม		
		1	2	3
ชุดควบคุม		2.34x10 ⁶	2.66x10 ⁶	2.12x10 ⁶
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (ร้อยละ)	1	3.60x10 ²	2.25x10 ²	3.15x10 ²
	2	3.60x10 ²	1.35x10 ²	0.45x10 ²
	3	0.45x10 ²	0.45x10 ²	0.90x10 ²
	4	0.45x10 ²	0.90x10 ²	0
	5	0.45x10 ²	0.45x10 ²	0.45x10 ²
ผงตะไคร้ (ร้อยละ)	1	2.34x10 ⁶	1.98x10 ⁶	9.45x10 ⁵
	2	1.53x10 ⁶	1.58x10 ⁶	2.07x10 ⁶
	3	1.44x10 ⁶	2.39x10 ⁶	1.44x10 ⁶
	4	1.62x10 ⁶	2.39x10 ⁶	1.89x10 ⁶
	5	1.85x10 ⁶	2.34x10 ⁶	2.57x10 ⁶
	10	1.49x10 ⁶	1.49x10 ⁶	2.16x10 ⁶
	20	7.65x10 ⁵	1.31x10 ⁶	9.45x10 ⁵
	30	8.55x10 ⁵	1.17x10 ⁶	6.75x10 ⁵
	40	2.61x10 ⁵	2.03x10 ⁵	1.80x10 ⁵
	50	4.50x10 ³	2.25x10 ³	1.80x10 ⁴

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก-4 ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีในวันที่ 7 ของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด

ชนิด		จำนวนโคโลนีต่อเมล็ดข้าวโพด 20 กรัม
ชุดควบคุม		2.37x10 ^{6a}
น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ (ร้อยละ)	1	3.0x10 ^{2d}
	2	1.8x10 ^{2de}
	3	0.6x10 ^{2ef}
	4	0.45x10 ^{2f}
	5	0.45x10 ^{2f}
ผงตะไคร้ (ร้อยละ)	1	1.75x10 ^{6a}
	2	1.73x10 ^{6a}
	3	1.5x10 ^{6a}
	4	1.97x10 ^{6a}
	5	2.25x10 ^{6a}
	10	1.71x10 ^{6a}
	20	1.01x10 ^{6a}
	30	9.0x10 ^{5a}
	40	2.15x10 ^{5b}
	50	8.25x10 ^{3c}

หมายเหตุ ชนิดของตัวอย่างที่มีตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ (p<0.05)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก-5 ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินเชิงคุณภาพ ในเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้า

ชนิด วันที่		ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน (พีพีบี)			
		0	3	5	7
ชุดควบคุมที่ 1		0	0	0	0
ชุดควบคุมที่ 2		0	>40	>40	>40
ผงตะไคร้ (ร้อยละ)	10	0	>20	>40	>40
	20	0	>20	>40	>40
	30	0	>20	>40	>40
	40	0	<4	<4	>10
	50	0	0	<4	<4

หมายเหตุ ชุดควบคุมที่ 1 ไม่ใส่สารละลายสปอร์
ชุดควบคุมที่ 2 ใส่สารละลายสปอร์

ตารางที่ ก-6 ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินเชิงคุณภาพ ในเมล็ดข้าวโพดที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อ

ชนิด วันที่		ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน (พีพีบี)			
		0	3	5	7
ชุดควบคุมที่ 1		0	0	0	0
ชุดควบคุมที่ 2		0	>40	>40	>40
ผงตะไคร้ (ร้อยละ)	10	0	>20	>40	>40
	20	0	>20	>40	>40
	30	0	>4	>20	>40
	40	0	<4	<4	>10
	50	0	0	0	>4

หมายเหตุ ชุดควบคุมที่ 1 ไม่ใส่สารละลายสปอร์
ชุดควบคุมที่ 2 ใส่สารละลายสปอร์

ตารางที่ ก-7 การวิเคราะห์น้ำมันหอมระเหยตะไคร้และผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242864 ในเมล็ดข้าวโพด

Descriptives								
Colony								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
control	3	5.7197	.04948	.02857	5.5967	5.8426	5.67	5.77
oil 1%	3	1.8157	.10518	.06073	1.5544	2.0770	1.70	1.90
oil 2%	3	1.4601	.45179	.26084	.3378	2.5824	1.00	1.90
oil 3%	3	1.1003	.17380	.10034	.6686	1.5321	1.00	1.30
oil 4%	3	.7670	.68109	.39323	-.9249	2.4589	.00	1.30
oil 5%	3	1.0000	.00000	.00000	1.0000	1.0000	1.00	1.00
powder 1%	3	5.5606	.20957	.12100	5.0400	6.0812	5.32	5.72
powder 2%	3	5.5794	.07243	.04182	5.3995	5.7594	5.53	5.66
powder 3%	3	5.5222	.02953	.01705	5.4488	5.5956	5.51	5.56
powder 4%	3	5.6346	.08456	.04882	5.4245	5.8447	5.56	5.72
powder 5%	3	5.6949	.07385	.04263	5.5114	5.8783	5.61	5.76
powder 10%	3	5.5728	.09395	.05424	5.3394	5.8061	5.52	5.68
powder 20%	3	5.3384	.11681	.06744	5.0482	5.6285	5.23	5.46
powder 30%	3	5.2899	.11983	.06919	4.9923	5.5876	5.18	5.41
powder 40%	3	4.6729	.08247	.04761	4.4680	4.8778	4.60	4.76
powder 50%	3	2.7670	.20751	.11981	2.2515	3.2825	2.60	3.00
Total	48	3.9685	2.00994	.29011	3.3848	4.5521	.00	5.77

ตารางที่ ก-8 การวิเคราะห์ความแปรปรวน

ANOVA					
Colony					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	188.152	15	12.543	233.082	.000
Within Groups	1.722	32	.054		
Total	189.874	47			

*แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ

ตารางที่ ก-9 การวิเคราะห์ความแตกต่าง

Colony							
Duncan ^a							
Treatment	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
oil 4%	3	.7670					
oil 5%	3	1.0000					
oil 3%	3	1.1003	1.1003				
oil 2%	3		1.4601	1.4601			
oil 1%	3			1.8157			
powder 50%	3				2.7670		
powder 40%	3					4.6729	
powder 30%	3						5.2899
powder 20%	3						5.3384
powder 3%	3						5.5222
powder 1%	3						5.5606
powder 10%	3						5.5728
powder 2%	3						5.5794
powder 4%	3						5.6346
powder 5%	3						5.6949
control	3						5.7197
Sig.		.105	.067	.070	1.000	1.000	.060

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การคำนวณหาความเข้มข้นของปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง เทียบกับกราฟมาตรฐาน

การอ่านผลเชิงปริมาณ

1.คำนวณค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างหรือสารพิษมาตรฐานที่ระดับต่าง ๆ (B) ในกรณีที่มีการทำซ้ำ และค่าการดูดกลืนแสงของสารพิษมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้น 0 พีพีบี (B_0)

2.คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง (% maximal binding) ของสารพิษมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น และของตัวอย่าง ดังนี้

$$\% \text{ maximal binding} = \frac{B}{B_0} \times 100$$

3.นำค่าเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง (B/B_0) ของสารพิษมาตรฐานทุกความเข้มข้นมาพล็อตกราฟ โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นแกน y และให้ค่าความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐานเป็นแกน x บนกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

4.นำค่าเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง (B/B_0) ของแต่ละตัวอย่างมาพล็อตลงบนกราฟมาตรฐานบนแกน y แล้วลากเส้นตรงขนานกับแกน x มาตัดเส้นโค้งมาตรฐาน (standard curve) ลากเส้นตรงจากจุดตัดลงมาที่แกน x ค่าที่อ่านได้บนแกน x ต้องคูณด้วย 20 (dilution factor) ได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่างเป็นปริมาณพีพีบี ($\mu\text{g/kg}$ หรือ ng/gm)

ตารางที่ ข-1 แสดงค่าการดุดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

วันที่ ชนิด		ค่าการดุดกลืนแสง (450 นาโนเมตร)			
		0	3	5	7
สารพืษมาตรฐาน	0 พีพีบี	0.042	0.043	0.042	0.042
	4 พีพีบี	0.040	0.040	0.040	0.040
	10 พีพีบี	0.038	0.038	0.037	0.037
	20 พีพีบี	0.037	0.037	0.036	0.034
	40 พีพีบี	0.036	0.036	0.035	0.033
ตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	ชุดควบคุมที่ 1	0.042	0.043	0.042	0.042
	ชุดควบคุมที่ 2	0.042	0.035	0.033	0.031
	ผงตะไคร้รื้อยละ 10	0.042	0.037	0.034	0.032
	ผงตะไคร้รื้อยละ 20	0.042	0.037	0.034	0.032
	ผงตะไคร้รื้อยละ 30	0.041	0.037	0.034	0.032
	ผงตะไคร้รื้อยละ 40	0.042	0.042	0.041	0.037
	ผงตะไคร้รื้อยละ 50	0.042	0.042	0.041	0.040
ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ	ชุดควบคุมที่ 1	0.042	0.043	0.042	0.042
	ชุดควบคุมที่ 2	0.041	0.036	0.033	0.031
	ผงตะไคร้รื้อยละ 10	0.041	0.040	0.034	0.032
	ผงตะไคร้รื้อยละ 20	0.042	0.037	0.034	0.032
	ผงตะไคร้รื้อยละ 30	0.042	0.040	0.036	0.032
	ผงตะไคร้รื้อยละ 40	0.042	0.042	0.040	0.036
	ผงตะไคร้รื้อยละ 50	0.042	0.043	0.042	0.039

หมายเหตุ ชุดควบคุมที่ 1 ไม่ได้สารละลายสปอร์
 ชุดควบคุมที่ 2 ได้สารละลายสปอร์

ตารางที่ ข-2 แสดงค่า % maximal binding ของสารพิษอะฟลาทอกซินมาตรฐาน

วันที่ สารมาตรฐาน(พีพีบี)	% maximal binding			
	0	3	5	7
0	100	100	100	100
4	95.23	93.02	95.23	95.23
10	90.47	88.37	88.09	88.09
20	88.09	86.04	85.71	80.95
40	85.71	83.72	83.33	78.57

ตารางที่ ข-3 แสดงค่า % maximal binding ของเมล็ดข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

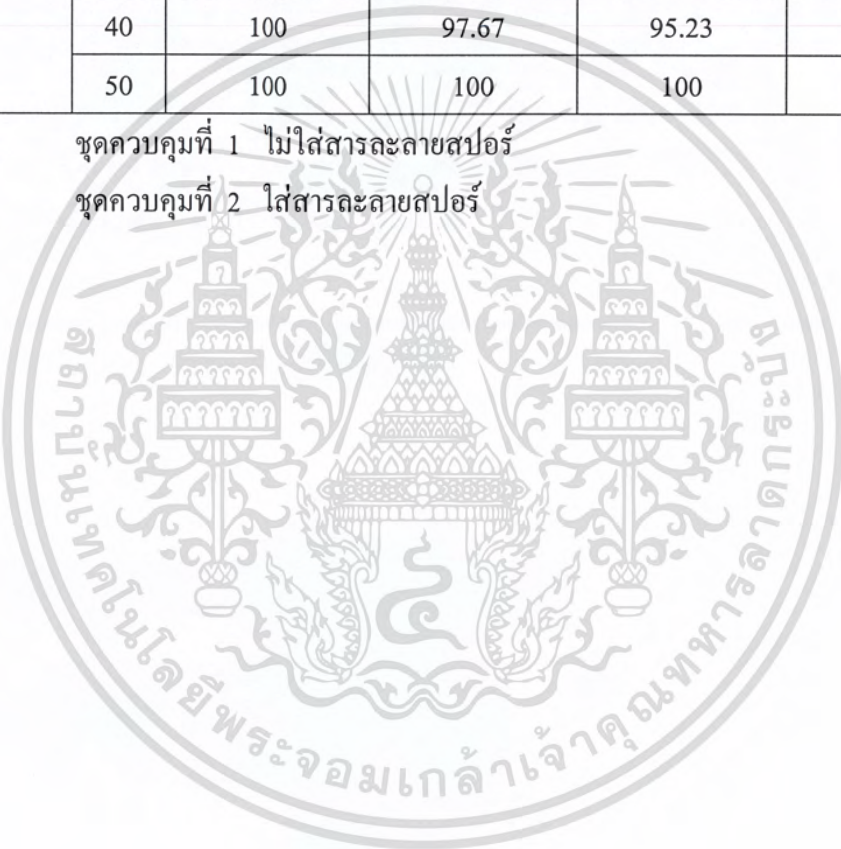
ชนิด วันที่	% maximal binding			
	0	3	5	7
ชุดควบคุมที่ 1	100	100	100	100
ชุดควบคุมที่ 2	100	81.39	80.95	76.19
ผงตะไคร้ (รื้อยละ)	10	100	86.04	80.95
	20	100	86.04	80.95
	30	97.61	86.04	80.95
	40	100	97.67	97.61
	50	100	97.67	97.61

หมายเหตุ ชุดควบคุมที่ 1 ไม่ใช่สารละลายสปอร์
 ชุดควบคุมที่ 2 ใส่สารละลายสปอร์

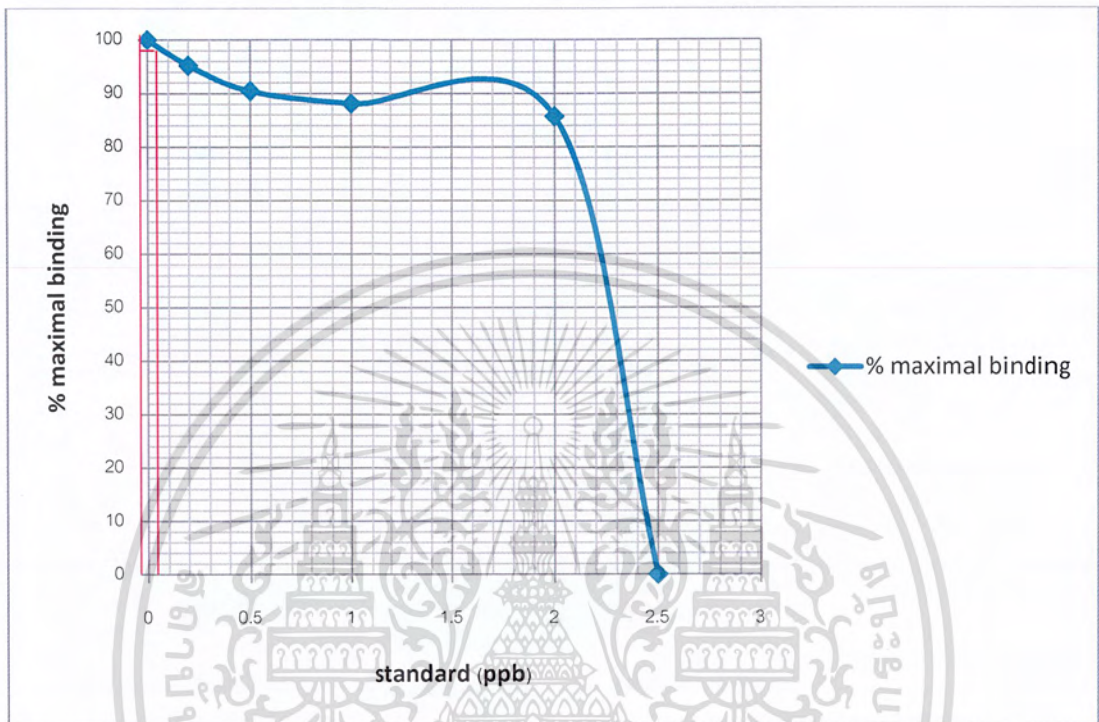
ตารางที่ ข-4 แสดงค่า % maximal binding ของเมล็ดข้าวโพดที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

วันที่ ชนิด		% maximal binding			
		0	3	5	7
ชุดควบคุมที่ 1		100	100	100	100
ชุดควบคุมที่ 2		97.61	83.72	78.59	73.80
ผงตะไคร้ (ร้อยละ)	10	97.61	93.02	80.95	76.19
	20	100	86.04	80.95	76.19
	30	100	93.02	85.71	76.19
	40	100	97.67	95.23	85.71
	50	100	100	100	92.85

หมายเหตุ ชุดควบคุมที่ 1 ไม่ใส่สารละลายสปอร์
ชุดควบคุมที่ 2 ใส่สารละลายสปอร์

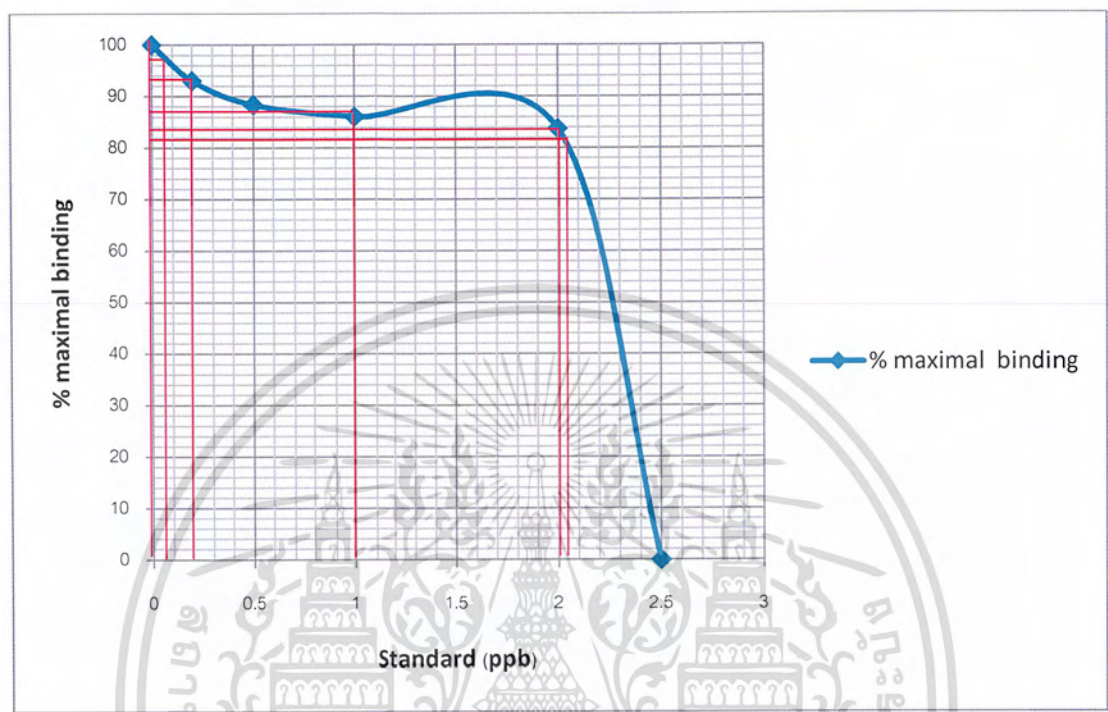


รูปที่ ข-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง (% maximal binding) กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐาน (พีพีบี) ของสารสกัดอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด ในวันที่ 0



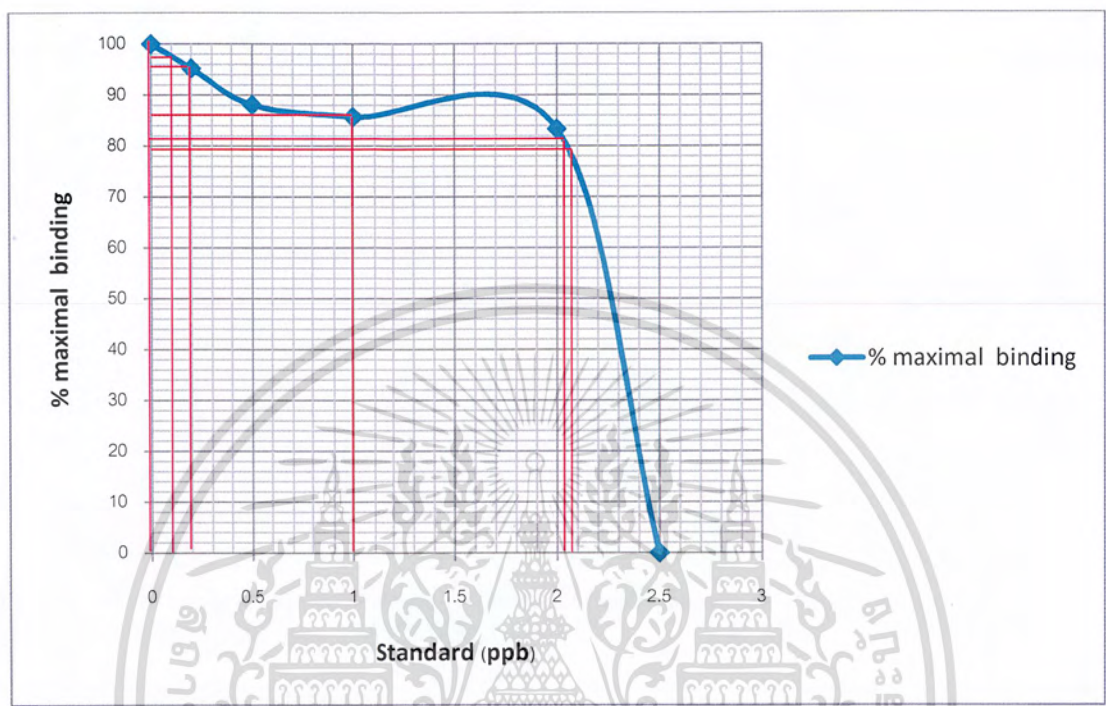
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ข-2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง (% maximal binding) กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐาน (พีพีบี) ของสารสกัดอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด ในวันที่ 3



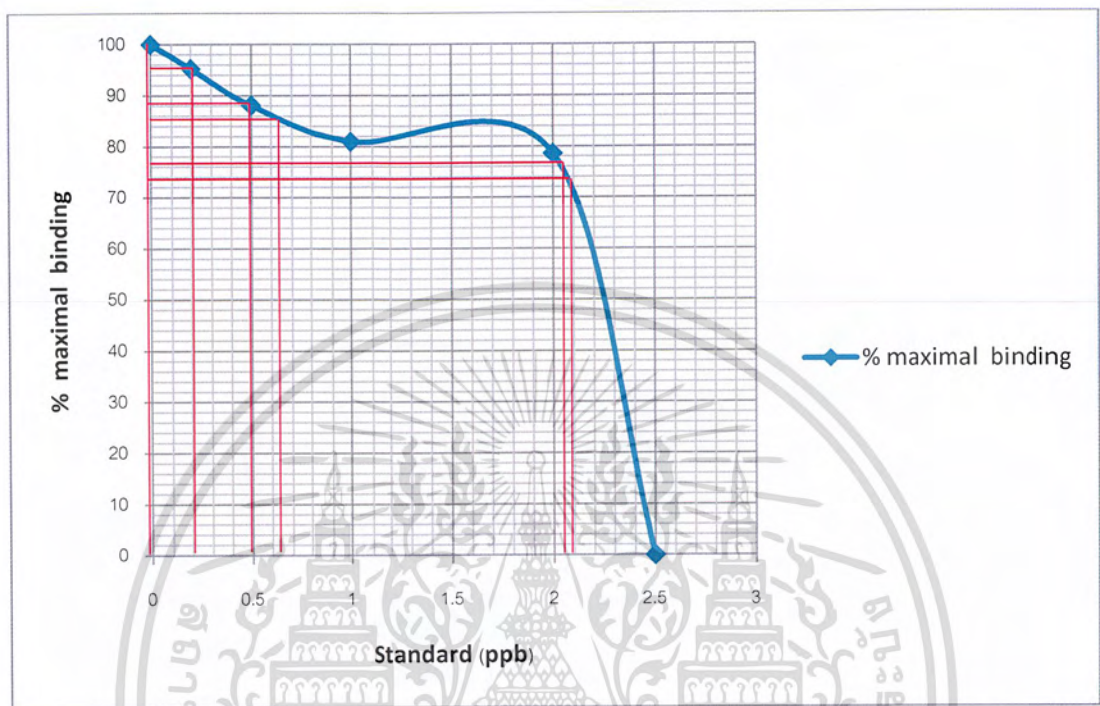
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ข-3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง (% maximal binding) กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐาน (พีพีบี) ของสารสกัดอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด ในวันที่ 5



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

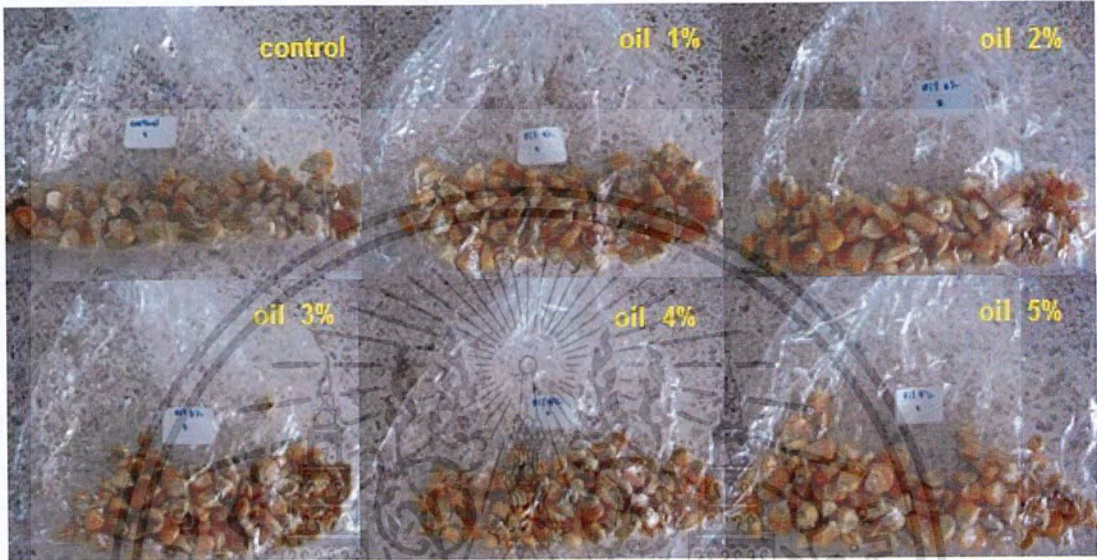
รูปที่ ข-4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง (% maximal binding) กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐาน (พีพีบี) ของสารสกัดอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพด ในวันที่ 7



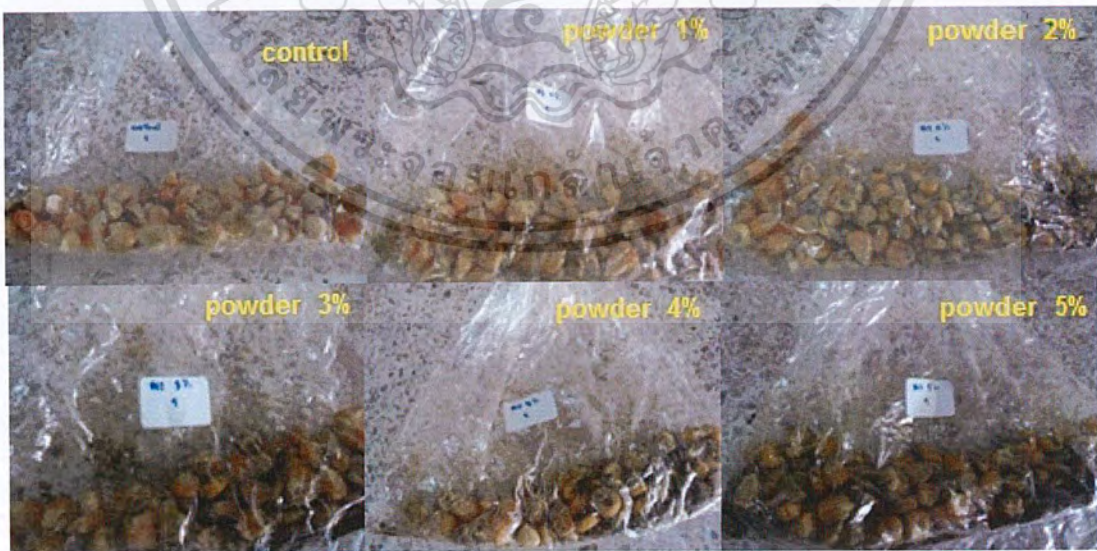
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

รูปผลการทดลอง

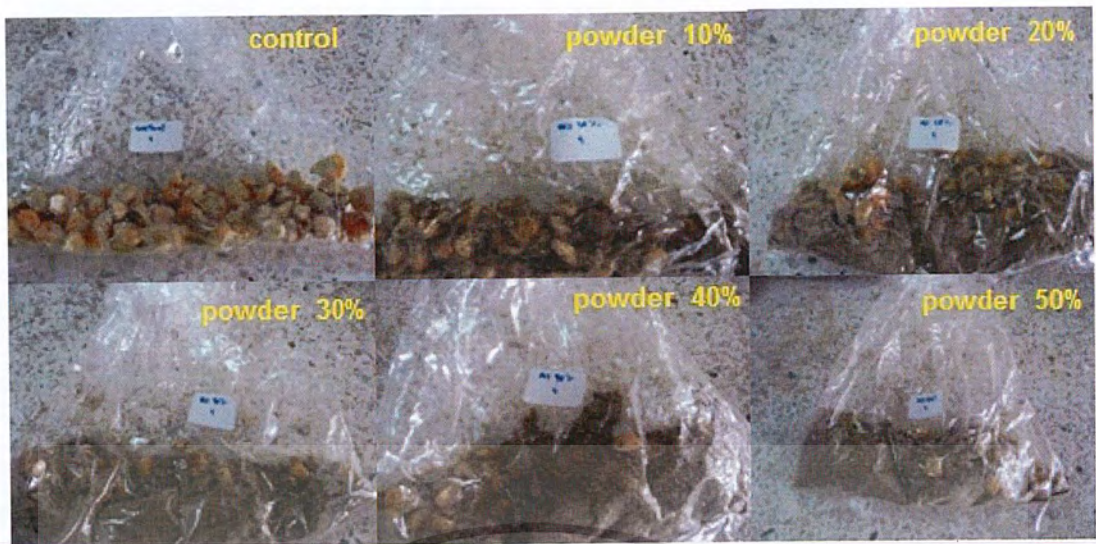


รูปที่ ก-1 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-5 วันที่ 3 เทียบกับชุดควบคุม

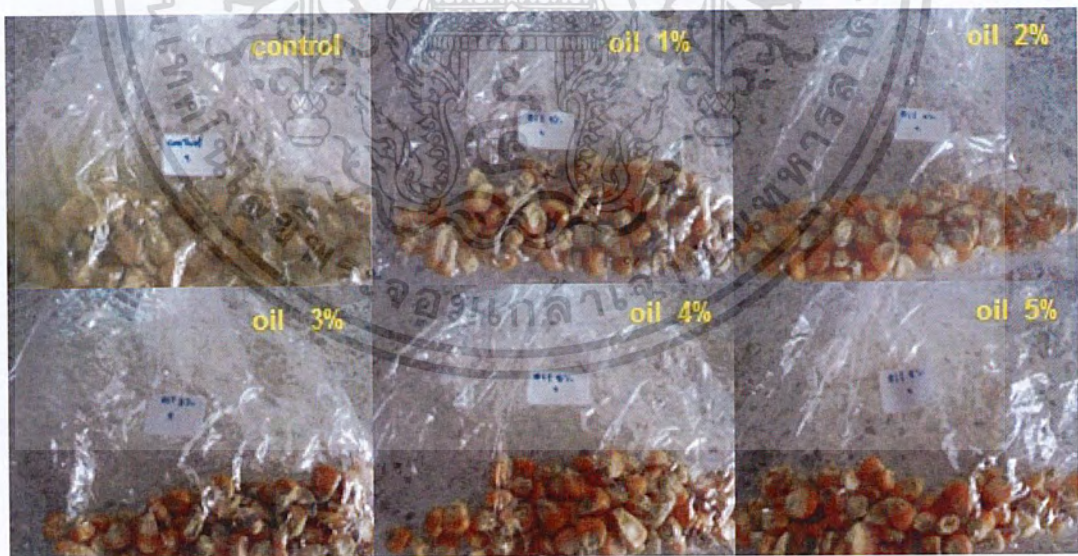


รูปที่ ก-2 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-5 วันที่ 3 เทียบกับชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-3 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10-50 วันที่ 3 เทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ ค-4 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-5 วันที่ 5 เทียบกับชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

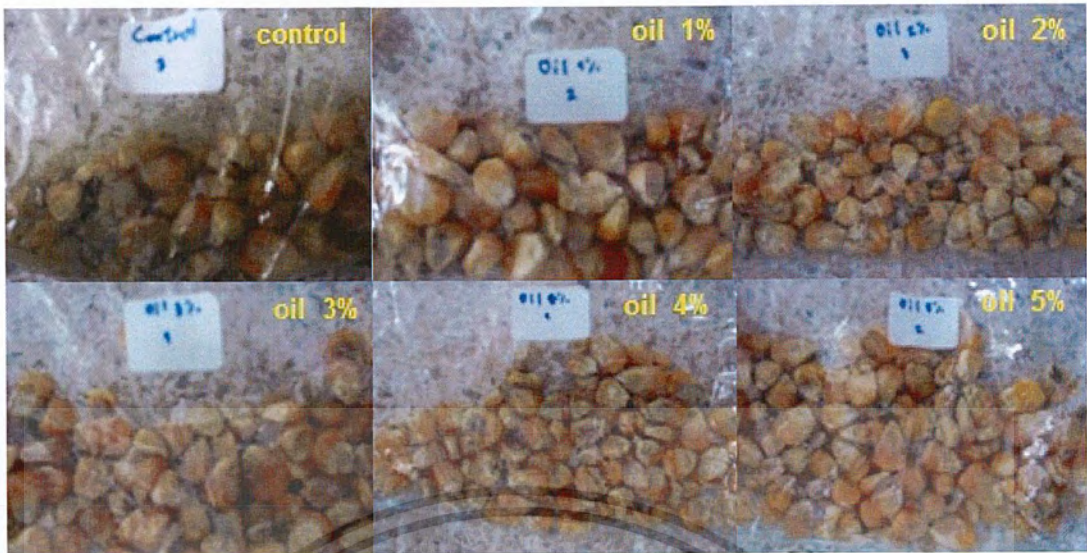


รูปที่ ค-5 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-5 วันที่ 5 เทียบกับชุดควบคุม



รูปที่ ค-6 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10-50 วันที่ 5 เทียบกับชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-7 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-5 วันที่ 7 เทียบกับชุดควบคุม

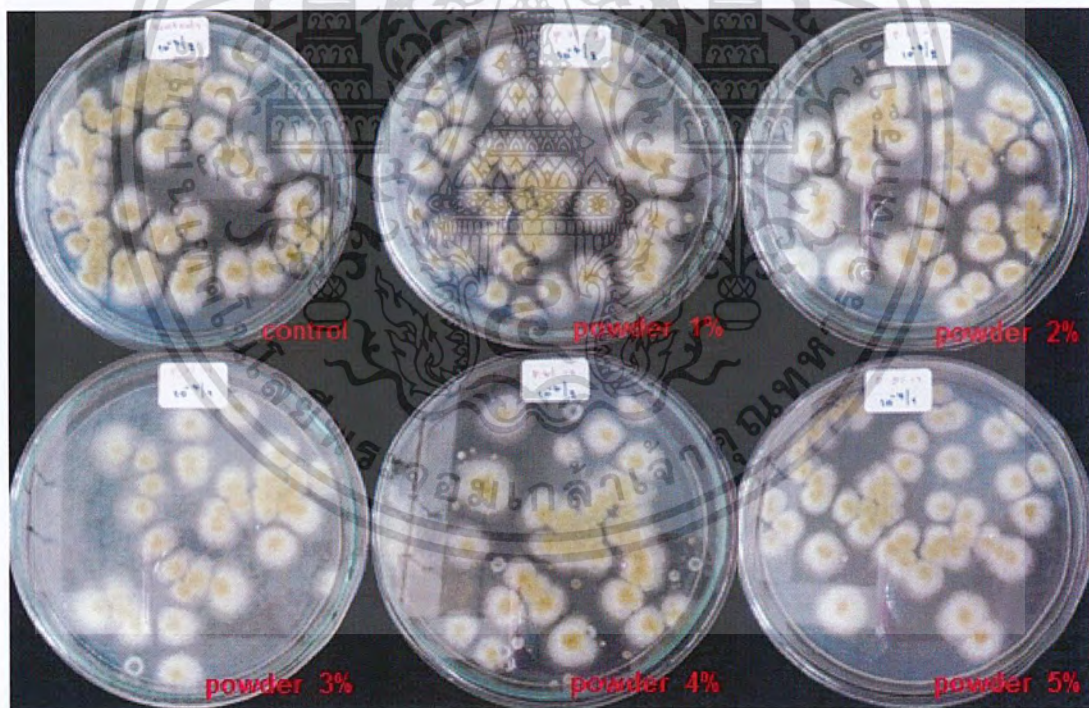


รูปที่ ค-8 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-5 วันที่ 7 เทียบกับชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

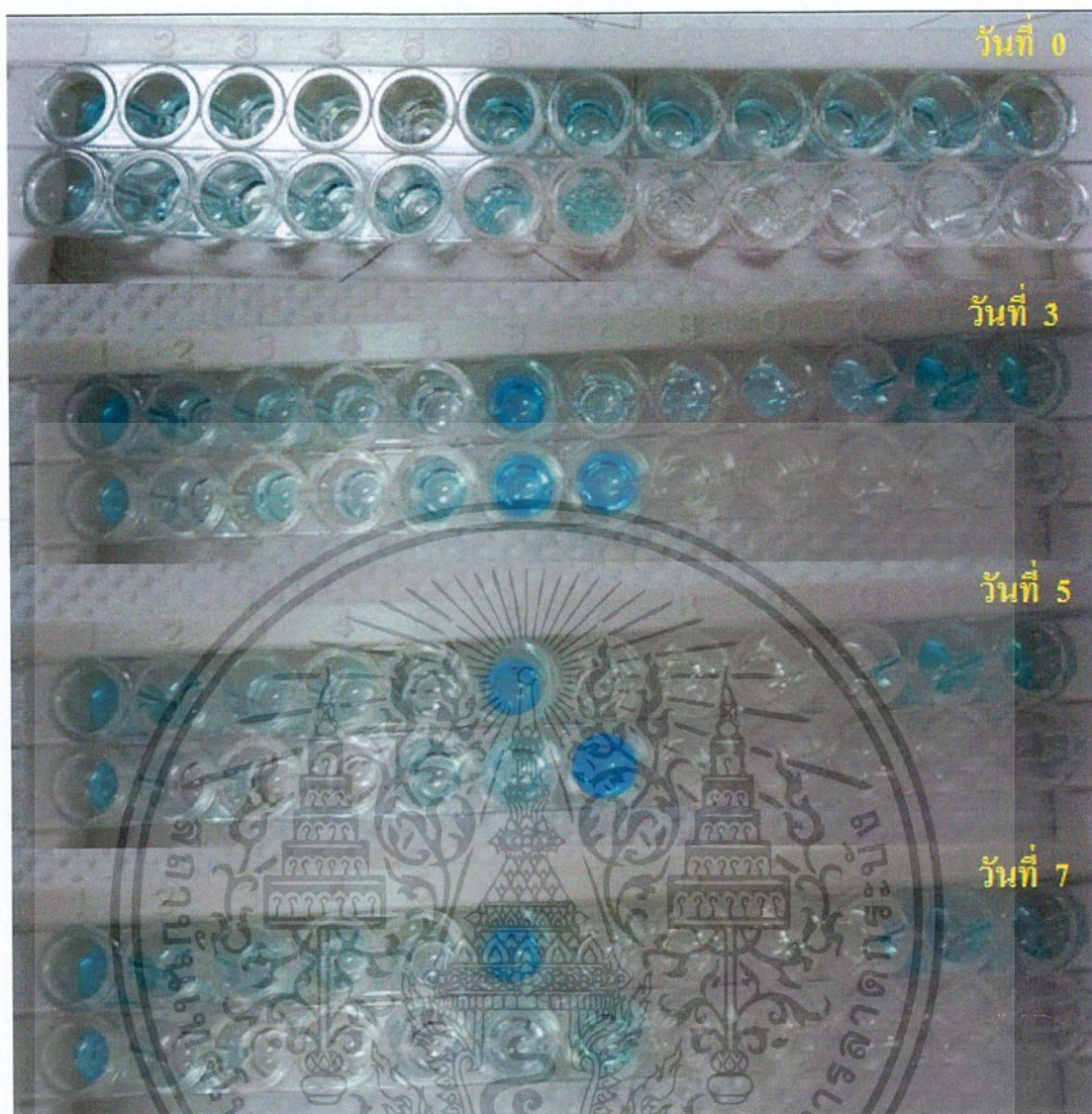


รูปที่ ค-9 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดของผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10-50 วันที่ 7 เทียบกับชุดควบคุม



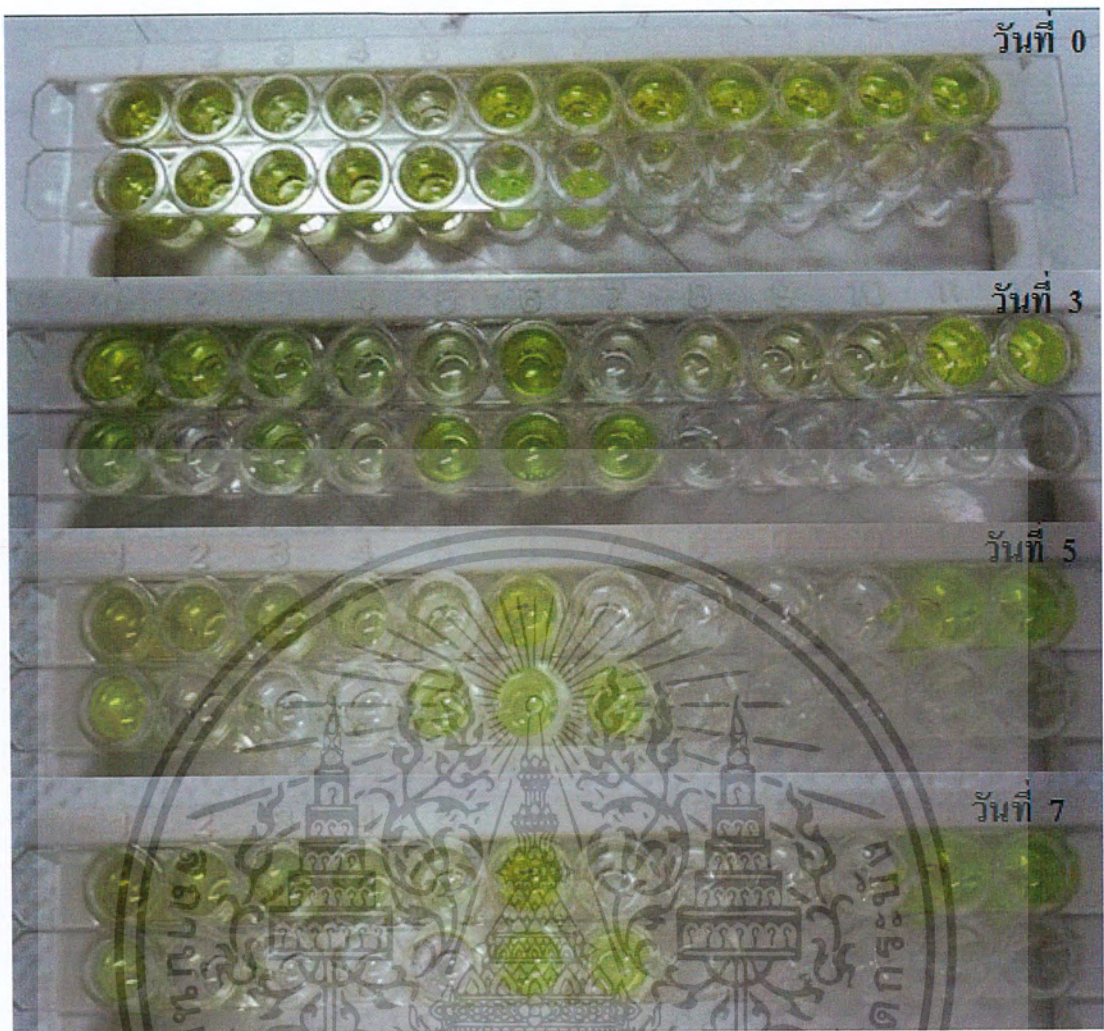
รูปที่ ค-10 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ในเมล็ดข้าวโพดโดยวิธี spread plate ของผงตะไคร้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-5 วันที่ 7 เทียบกับชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-11 การเกิดปฏิกิริยาของสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่สกัดจากเมล็ดข้าวโพด วันที่ 0, 3, 5 และ 7 เทียบกับชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-12 การเกิดปฏิกิริยาของสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* IMI 242684 ที่สกัดจากเมล็ดข้าวโพด วันที่ 0, 3, 5 และ 7 เทียบกับชุดควบคุม หลังจากหยุดปฏิกิริยาโดยการเติม stopping solution ก่อนนำไปวัดค่าความเข้มของสีด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

Glucose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Potato,influsion from	4.0	กรัม

อาหาร *Aspergillus flavus/parasiticus* Agar (Ronald , 1995)

Agar	20.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Nacl	30.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.0	กรัม
MgSO ₄	0.5	กรัม
Botran solution	6.0	มิลลิลิตร
(acetone 90.0 มิลลิลิตร และ Botron 30.0 มิลลิกรัม)		
Antibiotic solution	5.0	มิลลิลิตร
(น้ำกลั่น 20.0 มิลลิลิตร chlorotetracycline 0.2 กรัม และ Streptomycin sulfate 0.2 กรัม)		

ภาคผนวก จ

การหาความชื้นในเมล็ดข้าวโพด

วิธีการหาความชื้นในเมล็ดข้าวโพด

โดยนำถั่ววัดความชื้นไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกมาทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนของถั่ววัดความชื้น ต่อจากนั้นชั่งตัวอย่างข้าวโพดที่ต้องการหาความชื้น ใส่ในถั่ววัดความชื้นที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ประมาณ 10 กรัม บันทึกเป็นน้ำหนักข้าวโพดก่อนอบ จากนั้นก็นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกมาทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ น้ำหนักที่หายไปจะเป็นปริมาณน้ำที่มีในเมล็ดข้าวโพด

สูตรการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดข้าวโพด (AOAC, 1995)

$$P = \frac{(A - B)100}{C}$$

เมื่อ	P	คือ	เปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดข้าวโพด
	A	คือ	น้ำหนักของถั่ววัดความชื้นกับน้ำหนักของข้าวโพดก่อนอบ
	B	คือ	น้ำหนักของถั่ววัดความชื้นกับน้ำหนักของข้าวโพดหลังอบ
	C	คือ	น้ำหนักข้าวโพดก่อนอบ

ภาคผนวก จ

การคำนวณความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยตะไคร้ และผงตะไคร้

สูตรคำนวณ

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

1. น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 1% ต่อข้าวโพด 20 กรัม (ปริมาตรต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (1)(20)$$

$$V_1 = 0.2 \text{ มิลลิลิตร}$$

2. น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 2% ต่อข้าวโพด 20 กรัม (ปริมาตรต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (2)(20)$$

$$V_1 = 0.4 \text{ มิลลิลิตร}$$

3. น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 3% ต่อข้าวโพด 20 กรัม (ปริมาตรต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (3)(20)$$

$$V_1 = 0.6 \text{ มิลลิลิตร}$$

4. น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 4% ต่อข้าวโพด 20 กรัม (ปริมาตรต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (4)(20)$$

$$V_1 = 0.8 \text{ มิลลิลิตร}$$

5. น้ำมันหอมระเหยตะไคร้ 5% ต่อข้าวโพด 20 กรัม (ปริมาตรต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (5)(20)$$

$$V_1 = 1.0 \text{ มิลลิลิตร}$$

6.ผงตะไคร้ 1% ต่อข้าวโพด 20 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (1)(20)$$

$$V_1 = 0.2 \text{ กรัม}$$

7.ผงตะไคร้ 2% ต่อข้าวโพด 20 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (2)(20)$$

$$V_1 = 0.4 \text{ กรัม}$$

8.ผงตะไคร้ 3% ต่อข้าวโพด 20 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (3)(20)$$

$$V_1 = 0.6 \text{ กรัม}$$

9.ผงตะไคร้ 4% ต่อข้าวโพด 20 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (4)(20)$$

$$V_1 = 0.8 \text{ กรัม}$$

10.ผงตะไคร้ 5% ต่อข้าวโพด 20 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (5)(20)$$

$$V_1 = 1.0 \text{ กรัม}$$

11.ผงตะไคร้ 10% ต่อข้าวโพด 20 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (10)(20)$$

$$V_1 = 2.0 \text{ กรัม}$$

12.ผงตะไคร้ 20% ต่อข้าวโพด 20 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (20)(20)$$

$$V_1 = 4.0 \text{ กรัม}$$

13.ผงตะไคร้ 30% ต่อข้าวโพด 20 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (30)(20)$$

$$V_1 = 6.0 \text{ กรัม}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14.ผงตะไคร้ 40% ต่อข้าวโพด 20 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (40)(20)$$

$$V_1 = 8.0 \text{ กรัม}$$

15.ผงตะไคร้ 50% ต่อข้าวโพด 20 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (50)(20)$$

$$V_1 = 10.0 \text{ กรัม}$$

16.ผงตะไคร้ 10% ต่อข้าวโพด 50 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (10)(50)$$

$$V_1 = 5.0 \text{ กรัม}$$

17.ผงตะไคร้ 20% ต่อข้าวโพด 50 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (20)(50)$$

$$V_1 = 10.0 \text{ กรัม}$$

18.ผงตะไคร้ 30% ต่อข้าวโพด 50 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (30)(50)$$

$$V_1 = 15.0 \text{ กรัม}$$

19.ผงตะไคร้ 40% ต่อข้าวโพด 50 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (40)(50)$$

$$V_1 = 20.0 \text{ กรัม}$$

20.ผงตะไคร้ 50% ต่อข้าวโพด 50 กรัม (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$100(V_1) = (50)(50)$$

$$V_1 = 20.0 \text{ กรัม}$$