

ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยในการต่อต้านเชื้อรา  
ที่สร้างสารพิษที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง

EFFICACY OF THAI MEDICINAL PLANT ESSENTIAL OILS  
AGAINST MYCOTOXIGENIC MOLDS CONTAMINATED IN  
PEANUT AND PEANUT PRODUCTS



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม  
คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาเอกสารนี้และส่งถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปีการศึกษา 2554

**EFFICACY OF THAI MEDICINAL PLANT ESSENTIAL OILS  
AGAINST MYCOTOXIGENIC MOLDS CONTAMINATED IN  
PEANUT AND PEANUT PRODUCTS**



**A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE  
INDUSTRIAL MICROBIOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ลงวันเรสหรือการงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นว่าเป็นประโยชน์ในการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกหรือเผยแพร่เอกสารฉบับนี้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ACADEMIC YEAR 2011**

หัวข้อโครงการพิเศษ ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยในการต่อต้านเชื้อราที่สร้างสารพิษที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง  
(Efficacy of thai medicinal plant essential oils against mycotoxigenic molds contaminated in peanut and peanut products)

ชื่อนักศึกษา นายณพพร กิตติสุขมงคล นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 51050947  
นางสาวนุชนาฏ หมั่นพลศรี นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 51050955  
นางสาวปณิธาน กัณหา นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 51050959

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา ชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขาวิชาจุลชีววิทยา อุตสาหกรรมประจำปีการศึกษา 2554

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ. ลินจง สุขลำพู	คหณ วรสิงห์
กรรมการ ดร. สุทธิจิต ศรีวัชรกุล	สุทธิจิต ศรีวัชรกุล
กรรมการ รศ. ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ	รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ



(รศ.ดวงใจ โอชัยกุล)

ประธานสาขาวิชาชีววิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่มีเหตุใดแต่เพียงอย่างเดียว และต้องขอสงวนสิทธิ์ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยในการต่อต้านเชื้อราที่สร้างสารพิษที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง
ชื่อนักศึกษา	นายนพพร กิตติสุขมงคล นางสาวนุชนาฏ หมั่นพลศรี นางสาวปณิธาน กัณหา
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2554
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ

### บทคัดย่อ

ในการศึกษารุ่นนี้ได้สุ่มตัวอย่างถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง ได้แก่ ถั่วลิสงดิบ ถั่วลิสงทอด ถั่วลิสงคั่วบด และถั่วลิสงตัด ชนิดละ 10 ตัวอย่างมาศึกษาการปนเปื้อนเชื้อรา สำหรับถั่วลิสงดิบและถั่วลิสงทอดศึกษาโดยวิธี directing plating ส่วนถั่วลิสงคั่วบดและถั่วลิสงตัดศึกษาโดยวิธี dilution plating พบว่าถั่วลิสงดิบมีการปนเปื้อนของเชื้อรามากที่สุด (ร้อยละ 86.2) รองลงมาคือ ถั่วลิสงทอด (ร้อยละ 76.2) ส่วนถั่วลิสงคั่วบดและถั่วตัดพบเชื้อราและยีสต์ค่อนข้างน้อย ( $<10 - 7.0 \times 10^3$ ) เชื้อราที่พบมากที่สุดในตัวอย่างถั่วลิสงทั้ง 4 ชนิดคือ *Aspergillus* spp. รองลงมาเป็น *Rhizopus* spp. และ *Penicillium* spp.

เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity (DPPH) และวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) พบว่าน้ำมันกานพลู (*Syzygium aromaticum*) มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดรองลงมาคือน้ำมันเทียนตาตักแตน (*Anethum graveolens*) และน้ำมันกระวาน (*Amomum testaceum*) โดยน้ำมันที่มีสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดคือ น้ำมันกานพลู (0.71 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของน้ำมัน) รองลงมาคือ น้ำมันเทียนตาตักแตน (0.55 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของน้ำมัน) และน้ำมันกระวาน (0.44 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของน้ำมัน) ในการหาความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ของน้ำมันกระวาน น้ำมันกานพลูและน้ำมันเทียนตาตักแตนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus ochraceus* TISTR 3557, *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276, *Aspergillus terreus* TISTR 3109, *Aspergillus versicolor* TISTR 3460, *Alternaria alternata* TISTR 3282, *Penicillium citrinum* TISTR 3437 และ *A. flavus* PN-09 ที่แยกได้จากถั่วลิสงดิบ พบว่าเชื้อราส่วนใหญ่ที่ทดสอบมีความไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมัน

กานพลูมากที่สุดโดยมีค่า MIC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นเชื้อรา *A. versicolor* ที่มีความไวต่ำกว่าค่าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้านทานต่อน้ำมันกานพลู น้ำมันที่มีประสิทธิภาพรองลงมาคือน้ำมันเทียนตาตึกแตนซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อราเกือบทุกชนิดโดยมีค่า MIC เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นเชื้อรา *A. ochraceus* และ *A. versicolor* ซึ่งค่อนข้างต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันเทียนตาตึกแตน ส่วนน้ำมันกระวานมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราทุกชนิดค่อนข้างต่ำ โดยมีค่า MIC เท่ากับ 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงได้นำน้ำมันกานพลูและน้ำมันเทียนตาตึกแตนมาประยุกต์ใช้ในภาชนะบรรจุผลิตภัณฑ์ถั่วลิสงดิบทั้งเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วย *A. flavus* TISTR 3041 และ *A. flavus* PN-09 ที่แยกได้จากถั่วลิสงดิบหลังจากการเก็บรักษาครบ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ได้ตรวจหาปริมาณการเจริญของเชื้อราและปริมาณอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง โดยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและน้ำมันเทียนตาตึกแตนทำให้การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* ทั้งสองสายพันธุ์ที่ผิวของถั่วลิสงลดลง อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูและน้ำมันเทียนตาตึกแตนไม่มีผลช่วยลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน

**คำสำคัญ :** น้ำมันหอมระเหย ถั่วลิสง อะฟลาทอกซิน เชื้อรา กระวาน กานพลู เทียนตาตึกแตน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	Efficacy of thai medicinal plant essential oils against mycotoxigenic molds contaminated in peanut and peanut products
<b>Students</b>	Nopporn Kittisupamongkon Nuchanat Munphonsri Panithan Gunha
<b>Degree</b>	Bachelor of Science
<b>Major Program</b>	Biology
<b>Academic Year</b>	2011
<b>Advisor</b>	Asst.Prof.Dr. Suree Nanasombat

### ABSTRACT

In this study, peanut and peanut samples such as raw whole peanut, fried whole peanut, ground roasted peanut and sweet peanut (10 samples each) were collected for analysis of fungal contamination. Raw whole peanut and fried peanut samples were analysed for fungal contamination by direct plating method, while ground roasted peanut and sweet peanut samples were analysed for total yeast mold counts by dilution plating method. The results showed that raw whole peanut samples (86.2%) were highly contaminated with mold, but fried peanut samples (76.2%) had lower proportion of mold contamination. However, ground roasted and sweet peanut samples has less number of total yeast and mold counts ( $<10 - 7.0 \times 10^3$ ).

Essential oils of clove, dill and cardamom were determined for their antioxidant activities by radical scavenging activity (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The clove oil was the best potent antioxidant, followed by dill oil and cardamom oil, respectively. Clove oil had the highest amount of phenolic content (0.71 mg GAE/mg oil), followed by dill oil (0.55 mg GEA/mg oil) and cardamom oil (0.44 mg GEA/mg oil).

The minimum inhibition concentrations (MICs) of clove (*Syzygium aromaticum*), dill (*Anethum graveolens*) and cardamom (*Amomum testaceum*) against *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus ochraceus* TISTR 3557, *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276, *Aspergillus terreus* TISTR 3109, *Aspergillus versicolor* TISTR 3460, *Alternaria alternata* TISTR 3282, *Penicillium citrinum* TISTR 3437 and *A. flavus* PN-09 were determined. Most fungal species were sensitive to clove oil with the MIC of 1 mg/ml, except for *A. versicolor* which was resistant

to clove oil. Dill oil was less effective to inhibit growth of most mold species tested (4 mg/ml).  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MIC). However, *A. ochraceus* and *A. versicolor* were more resistant mold species to dill oil. Finally, cardamom oil was found to be less effective oil for inhibition of all mold species tested (16 mg/ml MIC). Therefore, clove oil and dill oil were selected for use in peanut packaging. Clove and dill oils were applied in packaging of raw whole peanut with 100% contamination of *A. flavus* TISTR 3041 and *A. flavus* PN-09 isolated from raw peanut. After 7 day storage at 30 °C, 75% RH, the amount of fungal growth and aflatoxin content in peanut were determined. Increasing concentration of these oils resulted in decreasing of fungal growth on surface of peanut seeds. However, addition of these two oils to the packaging did not result in decreasing of aflatoxin content in peanut seeds.

**Keywords :** essential oils, peanut, aflatoxin, fungal, cardamom, clove, dill



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ผู้ให้คำแนะนำแนวทางในการแปลเอกสารทำรูปเล่ม รวมทั้งสละเวลามาช่วยปรับปรุงแก้ไขและตรวจทานโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์ ทั้งยังอำนวยความสะดวกในการยืมเครื่องมือและอุปกรณ์ตลอดการทดลอง

ขอขอบคุณ ผศ.ลินจง สุขคำภู และดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่สละเวลาให้คำแนะนำและร่วมเป็นคณะกรรมการสำหรับการสอบโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณบิดาและมารดา ที่ช่วยผลักดันและสนับสนุนการทำโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่นักวิทย์ที่ได้อำนวยความสะดวกในการยืมเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องธุรการที่ได้อำนวยความสะดวกในการจัดหาห้องสอบในครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนทุกคนที่ช่วยให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน

ผู้จัดทำ

นาย นพพร กิตติสุขมงคล

นางสาว นุชนาฏ หมั่นพลศรี

นางสาว ปณิธาน กัณหา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	VIII
สารบัญรูป	X
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	<b>3</b>
2.1 ถั่วและผลิตภัณฑ์จากถั่ว	3
2.2 จุลินทรีย์และสารพิษอะฟลาทอกซินที่พบในผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง	8
2.3 สารต้านอนุมูลอิสระและวิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ	14
2.4 การควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราในถั่วลิสงด้วยน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย	18
2.5 น้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยที่ใช้ในการต้านเชื้อรา	21
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	26
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย</b>	<b>27</b>
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	27
3.2 วิธีการทดลอง	28
3.2.1 การศึกษาเชื้อราในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง	28
3.2.2 การศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา	30
3.2.3 การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการหาปริมาณ	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 สารประกอบฟีนอลในน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การประยุกต์ใช้น้ำมันกานพลูและเทียนตาตั๊กแตน ในการลดการปนเปื้อนและการสร้างอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง	33
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล</b>	36
4.1 ผลการศึกษาเชื้อราในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง	36
4.2 ผลของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา	41
4.3 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันกระวาน กานพลู และเทียนตาตั๊กแตน	43
4.4 ผลการประยุกต์ใช้น้ำมันกานพลูและเทียนตาตั๊กแตนต่อการชะลอการเจริญ และการลดการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i> ในถั่วลิสง	45
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b>	49
เอกสารอ้างอิง	50
ภาคผนวก (ก)	60
ภาคผนวก (ข)	62
ภาคผนวก (ค)	64
ภาคผนวก (ง)	80
ภาคผนวก (จ)	88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1 การปนเปื้อนของเชื้อราในถั่วลิสงดิบและถั่วลิสงทอดทั้งเมล็ด	39
ตารางที่ 4.2 จำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดในถั่วลิสงคั่วบดและถั่วลิสงคั่วคั่ว	40
ตารางที่ 4.3 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้ในสมุนไพรแต่ละชนิด	41
ตารางที่ 4.4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยน้ำมันกระวาน กานพลูและเทียนตาตั๊กแตน	43
ตารางที่ 4.5 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกของสมุนไพร	44
ตารางที่ 4.6 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและเทียนตาตั๊กแตนต่อการเจริญ และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา <i>Aspergillus flavus</i>	47
ตารางที่ ก.1 ปริมาตรของน้ำมันหอมระเหย และน้ำกลั่นที่ใช้ในการปรับ ความเข้มข้นให้ ได้ระดับต่างๆ	61
ตารางที่ ค.1 ผลได้ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จาก กระวาน กานพลูและเทียนตาตั๊กแตน	64
ตารางที่ ค.2 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันกระวานที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical	65
ตารางที่ ค.3 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันกานพลูที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical	66
ตารางที่ ค.4 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical	67
ตารางที่ ค.5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานบีเอชทีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical	68
ตารางที่ ค.6 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานแอลฟา-โทโคฟีรอลที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรและร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical	69
ตารางที่ ค.7 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันกานพลูที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร และปริมาณความเข้มข้นของ $Fe^{2+}$ -TPTZ ในน้ำมันกานพลู	71
ตารางที่ ค.8 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร และปริมาณความเข้มข้นของ $Fe^{2+}$ -TPTZ ในน้ำมันเทียนตาตั๊กแตน	72
ตารางที่ ค.9 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันกระวานที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร และปริมาณความเข้มข้นของ $Fe^{2+}$ -TPTZ ในน้ำมันกระวาน	72
ตารางที่ ค.10 ค่าการดูดกลืนแสงของวิตามินอีที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร และปริมาณความเข้มข้นของ $Fe^{2+}$ -TPTZ ในวิตามินอี	73

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นให้ มิมีเหตุใดเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอยู่ ภายใต้อาณัติของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.11	ค่าการดูดกลืนแสงของบีเอชทีที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร และปริมาณความเข้มข้นของ $Fe^{2+}$ -TPZ ในบีเอชที	74
ตารางที่ ง.1	ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี1	80
ตารางที่ ง.2	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างถั่วลิสงที่ปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินที่สร้างโดย <i>Aspergillus flavus</i> PN-09	80
ตารางที่ ง.3	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างถั่วลิสงที่ปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินที่สร้างโดย <i>Aspergillus flavus</i> TISTR 3041	81
ตารางที่ ง.4	เปอร์เซ็นต์ของ maximal binding และค่าปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่อ่านค่าได้จากกราฟมาตรฐาน (กานพลูซ้ำที่ 1)	83
ตารางที่ ง.5	ปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างถั่วลิสง (กานพลูซ้ำที่ 1)	83
ตารางที่ ง.6	เปอร์เซ็นต์ของ maximal binding และค่าปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่อ่านค่าได้จากกราฟมาตรฐาน (เทียนตาตักแตนซ้ำที่ 1)	84
ตารางที่ ง.7	ปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างถั่วลิสง (เทียนตาตักแตนซ้ำที่ 1)	84
ตารางที่ ง.8	เปอร์เซ็นต์ของ maximal binding และค่าปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่อ่านค่าได้จากกราฟมาตรฐาน (กานพลูซ้ำที่ 2)	85
ตารางที่ ง.9	ปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างถั่วลิสง (กานพลูซ้ำที่ 2)	85
ตารางที่ ง.10	เปอร์เซ็นต์ของ maximal binding และค่าปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่อ่านค่าได้จากกราฟมาตรฐาน (เทียนตาตักแตนซ้ำที่ 2)	86
ตารางที่ ง.11	ปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างถั่วลิสง (เทียนตาตักแตนซ้ำที่ 2)	86
ตารางที่ ง.12	ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินบี1 ในตัวอย่างถั่วลิสงที่เก็บภายในบรรจุภัณฑ์ร่วมกับน้ำมันหอมระเหย	87
ตารางที่ จ.1	ผลการวิเคราะห์หาคาร์บอนปนเปื้อนของเชื้อราในตัวอย่างถั่วลิสงคืบด้วยวิธี Direct Plating	99
ตารางที่ จ.2	ผลการวิเคราะห์หาคาร์บอนปนเปื้อนของเชื้อราในตัวอย่างถั่วลิสงทอดด้วยวิธี Direct Plating	100
ตารางที่ จ.3	ผลการวิเคราะห์หาคาร์บอนปนเปื้อนในตัวอย่างถั่วลิสงคั่วบดด้วยวิธี Dilution Plating	101
ตารางที่ จ.4	ผลการวิเคราะห์หาคาร์บอนปนเปื้อนในตัวอย่างถั่วลิสงคั่วด้วยวิธี Dilution Plating	102
ตารางที่ จ.5	เชื้อที่แยกได้จากถั่วลิสงคืบ	103
ตารางที่ จ.6	เชื้อที่แยกได้จากถั่วลิสงคั่ว	104

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านธุรกิจการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 การแปรรูปถั่วเมล็ด	5
รูปที่ 2.2 สูตรโครงสร้างของสารพิษอะฟลาทอกซิน	10
รูปที่ 2.3 โครงสร้างของบีเอชเอ	14
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของบีเอชที	15
รูปที่ 2.5 โครงสร้างของ Tertiary Butyl Hydroquinone	15
รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ Propyl Gallate	15
รูปที่ 2.7 การหาขีดความสามารถในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ	16
รูปที่ 2.8 กานพลู	22
รูปที่ 2.9 ผล GC-MS ของน้ำมันกานพลู	23
รูปที่ 2.10 เทียนตาตึกเตน	24
รูปที่ 2.11 ลูกกระวาน	25
รูปที่ 4.1 ลักษณะของ <i>Aspergillus flavus</i> PN-09	38
รูปที่ ก.1 ขั้นตอนการเตรียม Stock solution ของน้ำมันหอมระเหย	60
รูปที่ ค.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical กับความเข้มข้นของน้ำมันกระวานครั้งที่ 1	65
รูปที่ ค.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical กับความเข้มข้นของน้ำมันกระวานครั้งที่ 2	65
รูปที่ ค.3 กราฟมาตรฐานเฟอริซัลเฟตครั้งที่ 1	70
รูปที่ ค.4 กราฟมาตรฐานเฟอริซัลเฟตครั้งที่ 2	71
รูปที่ ค.5 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก	74
รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง (%maximal binding) กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐาน (พีพีบี) ครั้งที่ 1	81
รูปที่ ง.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง (%maximal binding) กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐาน (พีพีบี) ครั้งที่ 2	82
รูปที่ ง.3 การหาปริมาณอะฟลาทอกซินซึ่งอ่านได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์ maximal biding กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐานอะฟลาทอกซิน (กานพลูซ้ำที่ 1)	82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ง.4 การหาปริมาณอะฟลาทอกซินซึ่งอ่านได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์ maximal binding กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐานอะฟลาทอกซิน (เทียบตาคัสแตนซ์ที่ 1)	83
รูปที่ ง.5 การหาปริมาณอะฟลาทอกซินซึ่งอ่านได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์ maximal binding กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐานอะฟลาทอกซิน (กานพลูซั้ที่ 2)	84
รูปที่ ง.6 การหาปริมาณอะฟลาทอกซินซึ่งอ่านได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์ maximal binding กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐานอะฟลาทอกซิน (เทียบตาคัสแตนซ์ที่ 2)	85
รูปที่ จ.1 a-j ลักษณะของคอนิดีโอฟอร์, คอนิดีโอจีนัสเซลล์ และการสร้างคอนิเดีย	89
รูปที่ จ.2 a-b การพัฒนาของซัลลิก	90
รูปที่ จ.3 a-f การพัฒนาบลาสติก	91
รูปที่ จ.4 a-e. การพัฒนาของ Phialidic	92
รูปที่ จ.5 การพัฒนาของ Annelidic, แสดง โครงสร้างส่วนยอดของคอนิเดีย (truncate conidia) และ ส่วนที่ยึดออกของเซลล์คอนิดีโอจีเนียส	92
รูปที่ จ.6 <i>Phoma</i>	96
รูปที่ จ.7 <i>Trichothedium</i>	96
รูปที่ จ.8 <i>Wallemia</i>	96
รูปที่ จ.9 <i>Aspergillus</i>	96
รูปที่ จ.10 <i>Scopulariopsis</i>	96
รูปที่ จ.11 <i>Memnoniella</i>	96
รูปที่ จ.12 <i>Paecilomyces</i>	96
รูปที่ จ.13 <i>Penicillium</i>	96
รูปที่ จ.14 <i>Acremonium</i>	96
รูปที่ จ.15 <i>Trichoderma</i>	96
รูปที่ จ.16 <i>Fusarium</i>	96
รูปที่ จ.17 <i>Phialophora/Lecythophora</i>	96
รูปที่ จ.18 <i>Stachybotrys</i>	96
รูปที่ จ.19 <i>Chrysonilia</i>	96
รูปที่ จ.20 <i>Oidiodendron</i>	96
รูปที่ จ.21 <i>Geotichum</i>	97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ จ.22 <i>Geomyces</i>	97
รูปที่ จ.23 <i>Walleimia</i>	97
รูปที่ จ.24 <i>Monillella</i>	97
รูปที่ จ.25 <i>Botrytis</i>	97
รูปที่ จ.26 <i>Aureobasidium</i>	97
รูปที่ จ.27 <i>Epicoccum</i>	97
รูปที่ จ.28 <i>Moniliella</i>	97
รูปที่ จ.29 <i>Cladosporium</i>	97
รูปที่ จ.30 <i>Curbularia</i>	97
รูปที่ จ.31 <i>Alternaria</i>	97
รูปที่ จ.32 <i>Ulocladium</i>	97
รูปที่ จ.33 โคโคนี <i>Aspergillus flavus</i> บนอาหาร Czapek agar และ โคโคนี <i>Aspergillus flavus</i> บนอาหาร MEA	98



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ถั่วลิสงจัดอยู่ในวงศ์ Fabacea มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Arachis hypogaea* L. เป็นพืชที่ปลูกในประเทศต่างๆทั่วโลก ประเทศที่ปลูกถั่วลิสงมากที่สุดในโลก ได้แก่ ประเทศจีนและประเทศอินเดีย ตามมาด้วยประเทศสหรัฐอเมริกา เมล็ดถั่วลิสงมีคุณค่าทางอาหารสูง ในเมล็ดถั่วลิสงประกอบด้วยน้ำมันร้อยละ 40-60 โปรตีนร้อยละ 20-40 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 10-20 นอกจากนี้ยังอุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุหลายชนิด เช่น วิตามินอี ( $\alpha$ -tocopherol) ไนอาซิน (niacin) แคลเซียม (calcium) ฟอสฟอรัส (phosphorus) แมกนีเซียม (magnesium) สังกะสี (zinc) ธาตุเหล็ก (iron) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ไตรเอมีน (triamine) และโพแทสเซียม (potassium) ถั่วลิสงนิยมนำมาทานโดยตรง ใช้ในอุตสาหกรรมขนมหวาน ใช้ในการสกัดเป็นน้ำมันสำหรับการทำอาหาร และยังใช้เป็นวัตถุดิบหลักที่ให้โปรตีนในการผลิตอาหารสัตว์ จากประโยชน์ที่หลากหลายจึงทำให้ถั่วลิสงเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่ทำรายได้ในการค้าทั้งในประเทศและระหว่างประเทศ (Pandey และคณะ, 2012)

การปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราพบได้ทั่วไปในถั่วลิสง สาเหตุหลักๆมักมาจากการเก็บรักษาที่ไม่ถูกวิธี เช่นการเก็บในสถานะที่มีความชื้นสูง มีรายงานการปนเปื้อนของเชื้อราหลายชนิดในถั่วลิสง ส่วนมากจะเป็นเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. โดยเฉพาะเชื้อรา *A. flavus* ที่พบในถั่วลิสงได้มากที่สุด (Nakai และคณะ, 2008; Shukla และคณะ, 2009) ซึ่งเชื้อรา *A. flavus* จะสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินชนิด บี1 บี2 จี1 และจี2 โดยเฉพาะสารอะฟลาทอกซินบี1 ที่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ ซึ่งสารพิษชนิดนี้จะสะสมอยู่ภายในตับ ทำให้เกิดโรคมะเร็งตับ และยังพบว่ามีส่วนในการทำลายระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนเช่น ไวรัสตับอักเสบบชนิดบีได้ (Ding และคณะ, 2012; Williams และคณะ, 2004)

น้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรหลายชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา มีรายงานมากมายที่เกี่ยวข้องกับสมุนไพรที่มีกลิ่นหอมซึ่งอาจจะมีสารประกอบบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เช่น อบเชย กานพลู เทียนตาตักแดน ไทม์ กระจวาน ใบพลู มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. ได้ (Matan และคณะ, 2006; Soliman และคณะ, 2002; Shukla และคณะ, 2009) และน้ำมันหอมระเหยบางชนิดยังมีประสิทธิภาพดีกว่ายาฆ่าเชื้อราอีกด้วย (Kazemi และคณะ, 2012) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรหลาย

ชนิดเช่น โรสแมรี่ กานพลู อบเชย เทียนตาตักแดน เร่ว โป๊ยกั๊ก ดอกจันทร์เทศและขมิ้นอ้อย มีไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (Özcan และ Arslan, 2001; Nanasombat และ Wimuttigoso1, 2011) จากที่กล่าวมาข้างต้น จึงน่าสนใจที่จะนำน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร ได้แก่ กระจวาน กานพลูและเทียนตาตั๊กแตนมาศึกษาสมบัติการต้านเชื้อราและสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งนำมาทดลองประยุกต์ใช้ในบรรจุภัณฑ์สำหรับถั่วลิสง เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อราและลดการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและการจำแนกชนิดเชื้อราจากถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง

1.2.2 เพื่อหาความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของน้ำมันกระวาน กานพลูและเทียนตาตั๊กแตนในการยับยั้งเชื้อราและเพื่อหาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

1.2.3 เพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้น้ำมันกานพลูและน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนต่อการยับยั้งการเจริญและสร้างสารพิษของเชื้อรา *Aspergillus flavus*

## 1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ทำการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อรา แยกเชื้อและจำแนกชนิดของเชื้อราจากถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่พบจากถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสงที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสีย และทำให้เกิดสารพิษในถั่วต่างๆ จากนั้นนำน้ำมันหอมระเหยมาประยุกต์ใช้ในการยืดอายุของอาหาร

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบถึงผลของการใช้น้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสงทำให้เก็บไว้ได้นานและปลอดภัยต่อผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ถั่วและผลิตภัณฑ์จากถั่ว

ในบรรดาพืชเศรษฐกิจของเมืองไทยที่สำคัญหลายชนิดของเมืองไทย ถั่วลิสงนับเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจและปลูกกันอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เพราะเป็นพืชที่ปลูกง่าย ปลูกได้ดีในดินแทบทุกชนิด ปลูกได้ตลอดปี มีอายุการเก็บเกี่ยวสั้นและมีการปฏิบัติดูแลรักษา ง่ายเมื่อเทียบกับพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น ปัจจุบันเกษตรกรนิยมปลูกถั่วลิสงเป็นพืชหมุนเวียนและเป็นพืชแซมกับพืชไร่ต่างๆ โดยพบว่าการปลูกถั่วลิสงกันปีละประมาณเกือบหนึ่งล้านไร่และให้ผลผลิตถึงปีละ 200,000 ตัน แหล่งปลูกส่วนใหญ่จะอยู่ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งจังหวัดที่มีการปลูกถั่วลิสงกันมากได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง น่าน พะเยา เพชรบูรณ์ นครสวรรค์ กำแพงเพชร สุโขทัย อุตรดิตถ์ นครราชสีมา ศรีสะเกษ บุรีรัมย์ กาฬสินธุ์ และสุรินทร์ (ภูวนาถ, 2531)

ปริมาณถั่วลิสงที่ผลิตได้ภายในประเทศมีการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศน้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากความต้องการถั่วภายในประเทศสูงขึ้น จึงไม่เหลือพอที่จะส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศ และยิ่งไปกว่านั้นประเทศไทยยังนำถั่วลิสงเข้ามาเพื่อใช้บริโภคอีกด้วย (ภูวนาถ, 2531)

ถั่วเมล็ดแห้ง คือ เมล็ดของพืชในฝัก (pod) ที่มนุษย์นำมาบริโภคเป็นอาหาร เป็นพืชในตระกูล Leguminosae ถ้าบริโภคขณะที่ยังเขียว เช่น ถั่วเหลือง ถั่วพู ฯลฯ ซึ่งจัดเป็นผัก ยังมีน้ำเป็นส่วนประกอบหลัก แต่ถ้าทิ้งให้ฝักแห้งและนำเมล็ดที่แห้งแข็งมาเป็นอาหาร จัดเป็นกลุ่มถั่วเมล็ดแห้ง ซึ่งจะมีความชื้นน้อย มีสารอาหารต่างๆเข้มข้นมากขึ้น สารอาหารสำคัญในถั่วเมล็ดแห้ง ได้แก่ (ภูวนาถ, 2531)

1. คาร์โบไฮเดรต ปริมาณจะแตกต่างกันไปตามชนิดของถั่ว เช่น ถั่วเขียวมีคาร์โบไฮเดรตประมาณร้อยละ 60 ขณะที่ถั่วเหลืองมีร้อยละ 30 ถั่วลิสงมีเพียงร้อยละ 13 เป็นต้น ถั่วเมล็ดแห้งที่มีคาร์โบไฮเดรตในรูปแป้งมาก จะถูกนำมาสกัดแป้งเพื่อใช้ประโยชน์ นอกจากแป้งแล้วในถัวยังมีคาร์โบไฮเดรตในรูปของน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides) ที่มีชื่อเรียกว่า แรฟฟิโนส (raffinose) และสตาร์ชิโอส (starchyose) ซึ่งน้ำตาลทั้งสองชนิดนี้ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ แต่จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารบางชนิดใช้ได้ ทำให้เกิดการหมักและเกิดก๊าซมากในทางเดินอาหาร (ภูวนาถ, 2531)

2. ไขมัน ถั่วเมล็ดแห้งส่วนใหญ่มีไขมันน้อย ประมาณร้อยละ 1 - 2 ยกเว้นถั่วเหลือง มีไขมันร้อยละ 20 และถั่วลิสง ซึ่งมีไขมันสูงถึงร้อยละ 50 จึงสามารถสกัดน้ำมันพืชเพื่อใช้ประกอบอาหาร

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของไขมันในถั่วมีคุณค่าทางโภชนาการดีกว่าไขมันสัตว์ เนื่องจากมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวมาก และมีกรดไขมันจำเป็น คือ กรดลิโนเลอิก (linoleic acid) และ กรดลิโนเลนิก (linolenic acid) ด้วย นอกจากนี้การไม่มีโคเลสเตอรอล (cholesterol) ทำให้น้ำมันถั่ว เช่น น้ำมันถั่วเหลือง เป็นน้ำมันที่เหมาะสมสำหรับผู้บริโภคที่มีภาวะไขมันสูงในเลือด (ภูวนาด, 2531)

3. โปรตีน ถั่วเมล็ดแห้งเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่สำคัญ ผู้เป็นมังสวิรัติสามารถบริโภคถั่วเมล็ดแห้งและผลิตภัณฑ์จากถั่วเมล็ดแห้งทดแทนเนื้อสัตว์ ถั่วเมล็ดแห้งมีโปรตีนประมาณร้อยละ 20 - 40 เช่น ถั่วเหลืองมีโปรตีนประมาณร้อยละ 34 ถั่วลิสงมีร้อยละ 28 เป็นต้น แต่โปรตีนในถั่วขาดกรดอะมิโนจำเป็นคือ เมทไธโอนีน (methionine) ดังนั้นเด็กที่กำลังเจริญเติบโตจึงไม่ควรกินอาหารแบบมังสวิรัติ หรือควรใช้ผลิตภัณฑ์จากถั่วที่มีการเสริมด้วยเมทไธโอนีนเท่านั้น (ภูวนาด, 2531)

4. วิตามินถั่วเมล็ดแห้งเป็นแหล่งที่ดีของวิตามินที่ละลายน้ำ (water-soluble vitamins) ได้แก่ วิตามินบี1 วิตามินบี2 ในอะซิน และกรดโฟลิก แต่ถั่วไม่มีวิตามินบี12 ผู้ที่กินอาหารมังสวิรัติอาจมีปัญหาคารขาดวิตามินนี้ได้ นอกจากนี้การประกอบอาหารจากถั่วมักต้องผ่านการแช่น้ำหรือการหุงต้มนานและถ้ามีการทิ้งน้ำนั้นไป จะทำให้สูญเสียวิตามินที่มีประโยชน์ไปมาก (ภูวนาด, 2531)

5. เกลือแร่ ถั่วเมล็ดแห้งเป็นแหล่งของเกลือแร่มากมายหลายชนิด เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แมกนีเซียม สังกะสี ฯลฯ แต่กระบวนการหุงต้มหรือแปรรูปมักทำให้มีการสูญเสียเกลือแร่ได้มาก โดยเฉพาะถ้ามีการทิ้งน้ำที่ใช้ในการหุงต้มไป (ภูวนาด, 2531)

นอกจากสารอาหารข้างต้นแล้วในถัวยังมีสารที่มีประโยชน์อื่นๆ เช่น แทนนิน (tannin) สารประกอบโพลีฟีนอล (polyphenols) ซึ่งช่วยยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย สารประกอบในกลุ่มของเอสโตรเจนจากพืช (phytoestrogens) มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนสเตียรอยด์ช่วยลดการเกิดโรคกระดูกพรุน (osteoporosis) ซึ่งในปัจจุบันจัดสารต่างๆเหล่านี้เป็นไฟโตเคมีคอล และมีการรณรงค์ให้บริโภคถั่วเมล็ดแห้งหรือผลิตภัณฑ์จากถั่วเมล็ดแห้งกันมากขึ้น (ภูวนาด, 2531)

แต่การบริโภคถั่วก็มีข้อเสียบ้าง เช่น การเกิดก๊าซถั่วบริโภคมาก เนื่องจากแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่สามารถใช้น้ำตาลเร피โนสและสตาร์ชิโอสที่มีในถั่วและผลิตภัณฑ์ขึ้น ในถัวยังมีสารที่มีข้อเสียอื่น ๆ อีก เช่น มีสารยับยั้งเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน (protease inhibitors) ตัวอย่างเช่น สารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (trypsin inhibitors) ในลำไส้เล็ก เป็นต้น นอกจากนี้ซาโปนิน (saponin) และเลคติน (lectins) ในถัวยังมีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงแตกได้ แต่การหุงต้มถั่วให้สุกจะทำลายสารเหล่านี้ จึงควรบริโภคแต่ถั่วที่ผ่านการทำให้สุกแล้วเท่านั้น ในถัวยังมีไฟเตท (phytate) ซึ่งอาจขัดขวางการดูดซึมเกลือแร่บางชนิด เช่น ธาตุเหล็ก ธาตุสังกะสี และมีเอนไซม์ไลโปออกซิเจเนส (lipoxygenase) ที่จะทำให้เกิดกลิ่นถั่ว (beany flavour) ซึ่งบางคนไม่ชอบกลิ่นนี้ การแช่ถั่วในน้ำร้อนหรือน้ำที่มีความเป็นด่าง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์จะช่วยยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์และลดการเกิดกลิ่นถั่วลงได้บ้าง (ภูวนาด, 2531)

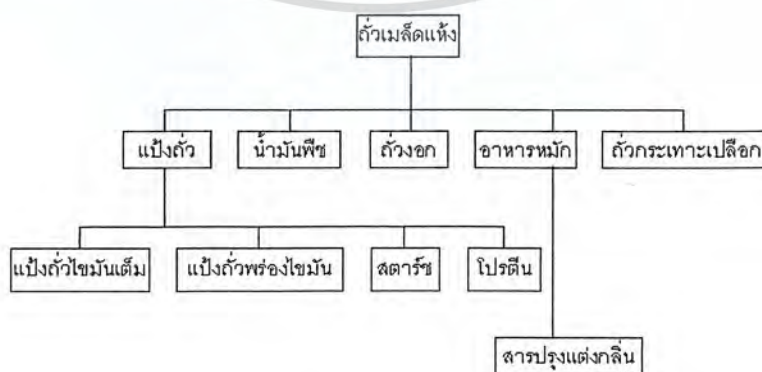
### 2.1.1 ลักษณะทั่วไปของพืชตระกูลถั่ว

พืชตระกูลถั่วผลิตเมล็ด (grain legume) นั้น ได้ถูกจัดให้อยู่ในวงศ์ Leguminosae ซึ่งจะประกอบด้วย 3 วงศ์ย่อยด้วยกัน ได้แก่ Papalionoideae, Caesalpinoideae และ Mimosoideae พืชตระกูลถั่วผลิตเมล็ดส่วนใหญ่ที่มนุษย์ใช้เป็นประโยชน์ในด้านอาหารและอุตสาหกรรมนั้น ถูกจำแนกไว้ในวงศ์ย่อย Papalionoideae และได้แบ่งออกเป็นเผ่าต่างๆกัน เช่น Phaseoleae, Viciae, Aeschynomeneae และ Cicereae เป็นต้น (อภิพรธ, 2533)

พืชตระกูลถั่วที่กล่าวถึงและอยู่ภายใต้วงศ์ Legumilosea นี้ มีอยู่ด้วยกันประมาณ 2,000 ชนิด และ 750 สกุล โดยทั่วไปจากถั่วได้ว่า พืชตระกูลถั่วเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นพืชที่เจริญเติบโตฤดูกาลเดียว (annual crop) เมล็ดและส่วนต่างๆของพืชใช้บริโภคได้ ซึ่งบ่อยครั้งทำให้มีการเรียกชื่อพืชตระกูลถั่วผลิตเมล็ดเหล่านี้ว่า พืชตระกูลถั่วใช้บริโภค (food legumes) สลับกันไปมากับคำว่า พืชตระกูลถั่วผลิตเมล็ด (grain legume) พืชตระกูลถั่วเหล่านี้จัดว่ามีคุณค่าทางอาหารแก่มนุษย์และสัตว์ ปริมาณ โปรตีนในเมล็ดพืชตระกูลถั่วเหล่านี้อยู่ในระหว่างร้อยละ 20 – 30 เทียบกับปริมาณโปรตีนในถั่วเหลืองมีอยู่ถึงร้อยละ 50 (อภิพรธ, 2533)

### 2.1.2 ถั่วลิสงในระดับอุตสาหกรรม

ภายหลังการเก็บเกี่ยวฝักถั่วและทำให้เมล็ดของถั่วแห้งโดยการตากแดดจนมีความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 14 เพื่อป้องกันการงอกและการเจริญของจุลินทรีย์ ถั่วบางชนิด เช่น ถั่วลิสง ซึ่งฝักจะอยู่ในดิน จึงอาจมีรา *Aspergillus flavus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน (aflatoxins) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง การบริโภคถั่วลิสงจึงต้องเลือกเมล็ดที่ไม่มีราขึ้น หรือเก็บรักษาถั่วในที่แห้งไม่อับชื้นที่จะทำให้ราสามารถเจริญได้ นอกจากนั้นการที่ถั่วเมล็ดแห้งมีสารอาหารต่างๆในปริมาณมาก ทำให้ระหว่างการเก็บรักษาอาจจะมีสัตว์กัดแทะทำลายผลผลิต จึงต้องเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ที่ป้องกันปัญหานี้ด้วย ผลผลิตจากถั่วเมล็ดแห้งสามารถนำมาบริโภคได้ในหลายลักษณะโดยทำการแปรรูปถั่วเมล็ดแห้งดังนี้ (วุฒิศักดิ์และคณะ, 2542)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดรูปที่ 2.1 การแปรรูปถั่วเมล็ดเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.1.3 การแปรรูปถั่วลိสง

### 2.1.3.1 การแช่น้ำ (soaking)

การแช่น้ำเย็นหรือน้ำร้อนก่อนนำไปหุงต้มมีความสำคัญ เพราะช่วยให้เชื้อหุ้มเมล็ดถั่ว นิ่มและถั่วสุกได้ง่ายขึ้น ลดเวลาและเชื้อเพลิงที่ใช้ในการทำให้ถั่วสุกได้มาก ระยะเวลาในการแช่น้ำ ขึ้นอยู่กับชนิดของถั่ว ความเก่าใหม่ของถั่ว โดยปกติมักแช่ค้างคืน (6 - 18 ชั่วโมง) หรือถ้าใช้น้ำร้อน ก็ใช้เวลาลดลงได้ การแช่นานเกินไปและทิ้งน้ำที่แช่ไปจะทำให้สูญเสียสารอาหารต่าง ๆ ที่ ละลายน้ำ เช่น น้ำตาล วิตามิน เกลือแร่ จึงควรนำน้ำที่แช่มาบริโภคด้วย (วุฒิสักดิ์ และคณะ, 2542)

### 2.1.3.2 การงอก (sprouting หรือ germination)

ภายหลังแช่น้ำให้เปลือกถั่วนิ่มแล้ว ถ้าเก็บในที่ที่มีความชื้นมากและอุณหภูมิพอเหมาะ ถั่ว จะมีการงอก ภายในเมล็ดจะมีการเปลี่ยนแปลงสารอาหารต่างๆที่เก็บสะสมไว้ เช่น การสลายแป้ง โปรตีน ไขมัน ฯลฯ และมีการสังเคราะห์วิตามินหลายชนิดเพิ่มขึ้น เช่น วิตามินซี ไรโบเฟลวิน วิตามินบี1 วิตามินอี กรดแพนโทธิก ดังนั้นการบริโภคถั่วงอกจากถั่วเขียวหรือถั่วงอกหัวโตจากถั่ว เหลือง จะได้รับสารอาหารต่าง ๆ คล้ายการบริโภคผักมากกว่าการบริโภคถั่วเมล็ดแห้ง (วุฒิสักดิ์ และคณะ, 2542)

### 2.1.3.3 การแยกเชื้อหุ้มเมล็ด (dehulling)

การแยกเชื้อหุ้มเมล็ดแบบเปียก คือ แช่น้ำให้เชื้อหุ้มนิ่ม ทุบให้ร่อนหลุด เทออกไปกับน้ำ หรือ ถั่วแยกแบบแห้ง คือ คั่วให้แห้ง (roasting) แล้วบดด้วยลูกกลิ้ง (rollers) แล้วผัดหรือใช้ลมเป่าออก จะได้ผลิตภัณฑ์ถั่วกะเทาะเปลือก (วุฒิสักดิ์ และคณะ, 2542)

### 2.1.3.4 การหมัก (fermentation)

ถั่วเมล็ดแห้งสามารถนำมาแปรรูปเป็นอาหารหมักได้หลายชนิด เช่น ถั่วงอกคอง เต้าหู้ยี้ เต้าเจี้ยว เต้าเจี้ยวญี่ปุ่นหรือมิโซะ (miso) ซีอิ๊ว ซอส ถั่วเหลืองหมักหรือถั่วเน่า (natto) ถั่วเหลืองหมัก ของอินโดนีเซียที่เรียกว่าเทมเป้ (tempeh) (วีรวุฒิ และคณะ, 2542)

### 2.1.3.5 การใช้ความร้อนทำให้สุก (thermal processing)

การใช้ความร้อนทำให้ถั่วนิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะถ้าเป็นความร้อนชื้น (moist heat) เช่น การ นึ่งหรือต้ม นอกจากนั้นยังทำให้กลิ่นดีขึ้น และทำลายสารยับยั้งการใช้สารอาหาร รวมทั้งการยับยั้ง การทำงานของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกลิ่นถั่ว ความร้อนที่เป็นความร้อนแห้ง (dry heat) เช่น การอบ ในตู้อบลมร้อนหรือการคั่ว มักจะทำให้เกิดกลิ่นหอมของถั่วมากขึ้น โดยเฉพาะถั่วลိสง (วีรวุฒิ และ คณะ, 2542)

### 2.1.3.6 การแปรรูปเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบอาหารอื่น

ได้แก่ การสกัดไขมัน แป้ง โปรตีน ออกจากถั่วเพื่อใช้ในการประกอบอาหาร หรือเป็น วัตถุดิบสำหรับการแปรรูปอาหารอื่น เช่น ถั่วเหลือง สามารถสกัดไขมันเป็นน้ำมันถั่วเหลือง บดเป็น ผงเป็นแป้งถั่ว ซึ่งอาจเป็นแป้งถั่วเหลืองไขมันเต็ม (full-fat soy flour) หรือถั่วมีการสกัดไขมันออก

ก็จะได้แป้งถั่วเหลืองพร่องไขมัน (defatted soy flour) ใช้เป็นวัตถุดิบในการแปรรูปขนมขบเคี้ยว (snacks) หรือถ้าใช้กระบวนการสกัดโปรตีนในถั่วเหลืองออกมาเป็นโปรตีนถั่วเหลืองเข้มข้น (soy protein concentrate; SPC) ซึ่งมีโปรตีนประมาณร้อยละ 72 – 81 หรือโปรตีนถั่วเหลืองไอโซเลต (soy protein isolate; SPI หรือ isolated soy protein; ISP) ซึ่งมีโปรตีนมากกว่าร้อยละ 90 ใช้เป็นสารผสมอาหารในการแปรรูปอาหารหลายประเภท นอกจากนั้นยังมีการแปรรูปถั่วเหลืองเป็นผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ เช่น น้ำเต้าหู้ เต้าหู้ เต้าฮวย ฟองเต้าหู้ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ได้ใช้แป้งถั่วเหลืองไขมันเต็มมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์จากถั่วชนิดต่างๆ ออกจำหน่าย เช่น เนื้อเทียม (meat analog หรือ texturized vegetable protein; TVP) นมถั่วเหลืองเข้มข้น เนื้อเทียม ขนมหิงเกษตร อาหารเด็กอ่อนเกษตร บะหมี่เกษตร ซึ่งช่วยให้มีการใช้โปรตีนจากถั่วเหลืองทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์ที่มีราคาแพง (วีรวุฒิ และคณะ, 2542)

ถั่วชนิดอื่น ๆ เช่น ถั่วงอก นิยมใช้เป็นส่วนผสมในการทำเป็นขนมขบเคี้ยว เพราะมีกลิ่นหอมและมีความมัน ส่วนถั่วเขียวมักใช้ทำถั่วงอก ถั่วเขียวกะเทาะเปลือกที่เรียกว่าถั่วทอง ใช้บดทำขนมหวานหรือใส่ขนม นอกจากนั้นยังมีการแยกโปรตีนในถั่วเขียวออกเหลือเป็นสตาร์ช ใช้ทำวุ้นเส้นหรือแป้งซาลาหมิ้น ส่วนโปรตีนถั่วเขียวที่แยกออกมาจะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการทำซอสปรุงรสหรืออาหารสัตว์ ถั่วชนิดอื่น เช่น ถั่วแดง ถั่วดำ ถั่วพุ่ม มีการบริโภคมากในบางท้องถิ่น แต่มีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ น้อยกว่าถั่วเหลือง ถั่วลิสง และถั่วเขียว (วีรวุฒิ และคณะ, 2542)

นอกจากถั่วจะเป็นอาหารที่คุณค่าทางโภชนาการดีแล้ว ที่ปมรากของพืชตระกูลถั่วจะมี *Rhizobium* และ *Bradyrhizobium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ช่วยตรึงไนโตรเจน เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้มีความสามารถดึงก๊าซไนโตรเจนในอากาศมาเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียในดิน (nitrogen-fixing bacteria) ซึ่งเป็นปุ๋ยของพืชตามธรรมชาติได้ (Chansa-Ngavej และSinghaboonpong, 1996) การปลูกถั่วจึงช่วยให้ดินดีโดยไม่ต้องใช้ปุ๋ยเคมีหรือปุ๋ยคอก (วีรวุฒิ และคณะ, 2542)

ปัญหาของการแปรรูปถั่วเมล็ดแห้งในประเทศ คือ ผลผลิตต่อไร่ยังต่ำมาก ทำให้ผลิตได้ไม่พอใช้ในประเทศ ต้องนำเข้าจากต่างประเทศโดยเฉพาะถั่วเหลือง โดยนำเข้าในรูปของกากถั่วเหลืองเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบในการทำอาหารสัตว์ ดังนั้นรัฐบาลควรดำเนินการให้มีการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะปลูกหรือพื้นที่สำหรับการเพาะปลูกถั่วต่างๆ ให้มากขึ้น เพราะอาจช่วยลดการนำเข้าปุ๋ยนอกจากนั้นผลิตภัณฑ์จากถั่วอาจใช้บริโภคแทนการสัง่เนื้อสัตว์หรือนมจากต่างประเทศลงได้ เพราะถั่วเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่ราคาถูกกว่าเนื้อสัตว์ สามารถแปรรูปให้เป็นผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด แต่การแปรรูปถั่วเมล็ดแห้งยังคงต้องมีการพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์ให้ถูกรสนิยมหรือความชอบของคนไทย เช่น ไม่ให้มีกลิ่นถั่วที่รุนแรงเนื่องจากผู้บริโภคบางคนไม่ชอบหรือมีการเสริมคุณค่าทางโภชนาการบางชนิด เช่น เติมนครดอะมิโนเมทไรโอนีน เติมน้ำตาลเทียมที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์เพื่อการศึกษาค้นคว้า ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้อยในถั่ว หรือใช้กระบวนการแปรรูปที่สามารถทำลายสารพิษบางชนิดที่มีในถั่วด้วย (วีรวุฒิ และคณะ, 2542)

#### 2.1.4 คุณค่าทางอาหารและประโยชน์ของถั่วลิสง

องค์ประกอบทางเคมีของถั่วลิสง โดยทั่วไปนั้นจะมีโปรตีนร้อยละ 25.0-28.0 น้ำมันร้อยละ 1.0-1.5 เส้นใยร้อยละ 3.5-4.5 เถ้าร้อยละ 4.5-5.0 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 62.0-65.0 โดยน้ำหนักแห้ง เป็นธรรมชาติของพืชตระกูลถั่วที่ปริมาณของกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ เช่น เมทไอโอนีน และซิสทีนจะมีอยู่ค่อนข้างน้อย แต่จะมีกรดอะมิโนชนิดไลซีนอยู่มาก ทำให้พืชชนิดนี้สามารถเป็นอาหารร่วมกับธัญพืชได้เป็นอย่างดี ถึงแม้ว่าถั่วเขียวจะมีทริปซินซึ่งทำให้เกิดการย่อยยากในกระเพาะอาหารของมนุษย์ แต่ทริปซินนั้นมักจะสลายตัวเมื่อมีการหุงต้มหรือถั่วเขียวออก (อภิพรธม, 2533)

## 2.2 จุลินทรีย์และสารพิษอะฟลาทอกซินที่พบในผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง

จากการพบการปนเปื้อนของเชื้อราในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและวัตถุดิบที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและทางเภสัชวิทยา ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วลิสง พริก ลูกเดือย งาคั่ว งามูกข้าวสาลี มะขามแห้ง บอระเพ็ด กาแฟ มะม่วงหิมพานต์ มะพร้าวแห้ง ข้าวกล้อง ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ถั่วแดง เมล็ดฝ้าย และสมุนไพรอีกหลายชนิด โดยพบเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *A. ochraceous*, *Penicillium*, *Rhizopus* sp. และ *Fusarium* sp. เป็นต้น โดยเฉพาะถั่วลิสงซึ่งเป็นพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เป็นแหล่งอาหารประเภทโปรตีนและพลังงาน (ธีรยุทธและชัยวัฒน์, 2524)

### 2.2.1 ประวัติของสารพิษอะฟลาทอกซิน

ในช่วงปี ค.ศ.1960 นักวิทยาศาสตร์ได้มีความสนใจในการศึกษาถึงอันตรายของอาการตับเป็นพิษในตุรกีซึ่งมีผลกระทบต่อสัตว์ในหลายๆพื้นที่ทั่วโลก เนื่องจากมีการรายงานถึงอาการ Turkey "X" disease ซึ่งรายงานถึงเหตุการณ์ที่ลูกไก่และลูกเป็ดในอังกฤษตายเนื่องจากได้รับสารพิษ โดยลักษณะอาการคือเซลล์ตับถูกทำลายอย่างรุนแรง มีของเหลวคั่งในน้ำดี เบื่ออาหาร ปีกไม่มีแรง และเชื่องซึม อาการและความเสียหายของเนื้อเยื่อคล้ายกันนี้ได้เริ่มแพร่ระบาดในสัตว์ปีกในเวลาต่อมา และสารพิษที่พบเป็นสารชนิดเดียวกับสารเมตาบอไลต์จาก *Aspergillus flavus* บางสายพันธุ์ ซึ่งนักวิทยาศาสตร์แยกได้จากเชื้อราที่ขึ้นบนถั่วลิสงซึ่งสหรัฐอเมริกา นำมาจากประเทศบราซิล (Sargeant และคณะ, 1961) สารพิษที่พบนี้ถูกเรียกว่า "อะฟลาทอกซิน" นอกจากนี้ในช่วงเวลาต้นยุค 1960 ก็มีการรายงานถึงการแสดงออกของอาการป่วยของสัตว์อีกหลายสายพันธุ์ ทั้งที่มีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของสารพิษนี้ในอาหารสัตว์ และจากการทดลองโดยตรง (Eaton และ Groopman, 1994)

นอกจากสัตว์เลี้ยงแล้ว สารพิษอะฟลาทอกซินยังมีอันตรายต่อมนุษย์อีกด้วย โดยมีรายงานไม่ว่าในระหว่างสงครามโลกครั้งที่ 2 เชลยสงครามชาวเกาหลีมีอาการตับอักเสบเนื่องจากสารพิษในพืช

ค.ศ.1967 มีการรายงานถึงผู้ป่วยเป็นโรคตับ เนื่องจากการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในมันสำปะหลังในยูกันดาและข้าวในไต้หวัน นอกจากนี้ยังมีรายงานซึ่งกล่าวถึงการแพร่ระบาดของโรคตับอักเสบเนื่องจากสารพิษอะฟลาทอกซินในมนุษย์ซึ่งมีหลักฐานเป็นเนื้อเยื่อของเชื้อรา สารพิษจากเชื้อราและการก่อโรคในประเทศอินเดีย เมื่อปี ค.ศ.1975 กับในเคนยาเมื่อปี ค.ศ.1982 และมีรายงานซึ่งไม่มีการยืนยันในมาเลเซียเมื่อปี ค.ศ.1988 (Champ และคณะ, 1991)

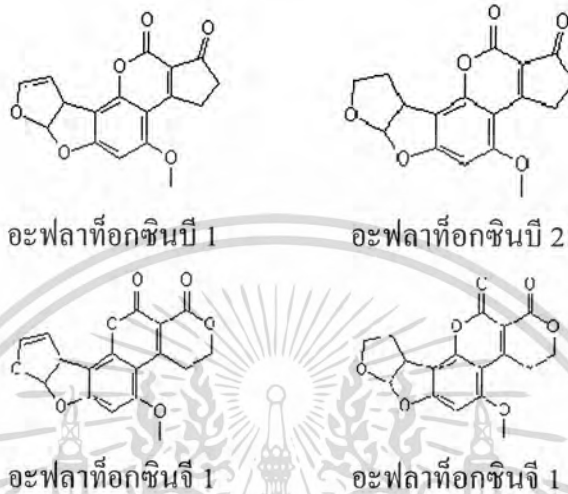
นอกจากนี้สารพิษอะฟลาทอกซินยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับกลุ่มอาการอื่นๆที่เกิดขึ้นกับมนุษย์ ความเกี่ยวข้องที่พบมากเป็นไปในลักษณะของการตรวจพบสารพิษอะฟลาทอกซินในของเหลวที่ไต่จากผู้ป่วย แต่ยังไม่สามารถระบุถึงความสัมพันธ์ทางสาเหตุและผลกระทบที่แน่นอนได้ สิ่งสำคัญอีกเรื่องคือ นอกจากอาการมะเร็งตับในระยะแรกแล้ว ไม่มีรายงานเกี่ยวกับอาการของโรคเดียวกันนี้ในบริเวณอื่นๆของโลก ซึ่งมีการพบอะฟลาทอกซินอย่างแพร่หลายอีกเลย (Champ และคณะ, 1991)

โรคมะเร็งตับระยะแรกเป็นหนึ่งในโรคมะเร็งที่พบได้มากในทวีปเอเชียและอเมริกา จากการศึกษาในประเทศจีน ไทย ฟิลิปปินส์ เคนยา สวาซิแลนด์ โมซัมบิก และยูกันดา มีหลักฐานถึงความเกี่ยวข้องในการได้รับอะฟลาทอกซินในสาเหตุของโรคมะเร็งตับ ปัญหาหลักที่สร้างความสับสนในการศึกษาผลของอะฟลาทอกซินต่อการเกิดโรคมะเร็งในครั้งนี้คืออาการตับอักเสบเนื่องจากไวรัสตับอักเสบนิกิตีซึ่งมักเป็นโรคประจำตัว อธิบายได้โดยการตรวจวัดอะฟลาทอกซินผ่านการศึกษาทางเนื้อเยื่อแบบล่องหน้าและย้อนหลัง ด้วยวิธีการนี้จะสามารถหาความสัมพันธ์อย่างหยาบจากตัวอย่างอาหารที่ปนเปื้อนได้ และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการศึกษาการวิเคราะห์โดยใช้สารอะฟลาทอกซิน-อัลบูมิน ซึ่งสามารถตรวจพบอะฟลาทอกซินบี 1 ในเลือดได้ (Champ และคณะ, 1991)

สารพิษอะฟลาทอกซินเป็นสารประกอบในกลุ่มบิสฟูราโนคูมาริน (bisfuranocoumarin) ถูกสร้างขึ้นจากเชื้อราในกลุ่มอะฟลาทอกซินฟิงไจ เช่น *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. Nomius* และ *A. tamari* เป็นต้น สารพิษอะฟลาทอกซินแบ่งออกเป็น อะฟลาทอกซินบี 1 บี 2 เอ บี 3 จี 1 จีเอ็ม 1 จี 2 จี 2 เอ เอ็ม 1 เอ็ม 2 เอ็ม 2 เอ จีเอ็ม 2 พี 1 คิว 1 อาร์ 0 และอนุพันธ์อะซีทอกซี โดยมีสูตรโครงสร้างดังแสดงไว้ในรูปที่ 2 อย่างไรก็ตามมีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีความสำคัญและพบได้บ่อยได้แก่ ชนิดบี 1 ซึ่งพบเป็นสารประกอบตามธรรมชาติและชนิดเอ็ม 1 ซึ่งพบในนมและผลิตภัณฑ์จากนม สารพิษอะฟลาทอกซินมักปนเปื้อนอยู่ในถั่วและเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวโพด ข้าวสาลี ฝ้าย ถั่วเหลือง ถั่วลิสง เมล็ดดอกทานตะวัน น้ำมันมะพร้าว น้ำมันจากเมล็ดฝ้าย น้ำมันมะกอก มันสำปะหลัง มันเทศ อัลมอนต์ เมล็ดกาแฟ เมล็ดโกโก้ รวมไปถึงอาหารสัตว์ซึ่งส่งผลให้พบอะฟลาทอกซินในสัตว์ที่กินอาหารนั้นๆ เช่น กุ้ง ปลา วัว นมวัวและเนยเป็นต้น โดย FAO ได้รายงานไว้ในปี ค.ศ.1990 ถึงการพบสารพิษอะฟลาทอกซินในหลายประเทศ ได้แก่ บังคลาเทศ ภูฏาน เมียนมา จีน ไทวอร์ โทท อียิปต์

เอธิโอเปีย แคมเบีย กาน่า ยองคเวีย อินโดนีเซีย อิหร่าน อิรัก อิสราเอล ญี่ปุ่น เคนยา เกาหลี

มาลาวี มาเลเซีย โมซัมบิก เนปาล ไนจีเรีย ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ เซเนกัล เซียร์รา ลิงคโปร์ ศรีลังกา  
 ชูดาน สวาซิแลนด์ ใต้หวัน แทนซาเนีย ไทย ตูนิเซีย ตุรกี ยูกันดา เวียดนาม แซมเบีย และซิมบับเว  
 โดยสารพิษชนิดนี้จะถูกสร้างขึ้นในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติเขตร้อน เขตอบอุ่น และเขตเมดิ  
 เตอร์เรเนียน (Champ และคณะ,1991)



รูปที่ 2.2 สูตร โครงสร้างของสารพิษอะฟลาทอกซิน

Gqaleni และคณะ (1997) ได้รายงานถึงผลกระทบของอุณหภูมิ ปริมาณน้ำที่ใช้ในกิจกรรม  
 ของเซลล์ (water activity :  $a_w$ ) และเวลาต่อการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน โดย *A. flavus* ที่พบใน  
 อาหาร Yeast Extract Sucrose Agar และ Czapek's Yeast Autolysate Agar โดยกล่าวไว้ว่า อุณหภูมิ  
 ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตคือ 30 องศาเซลเซียสและมีค่า  $a_w$  ที่ 0.996 โดยสามารถสร้างสารพิษได้  
 มากคือ 0.306 – 0.330 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กรัมเมื่อบ่มเป็นเวลา 15 วัน และจะไม่มีการสร้าง  
 สารพิษเลยเมื่อมี  $a_w$  ที่ 0.90 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และบ่มเป็นเวลา 15 วัน ในขณะที่ *A.*  
*flavus* สามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหาร Czapek's solution agar ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส โดยมี  
 เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4.8-5.6 เซนติเมตรเมื่อมีอายุ 2 สัปดาห์

สารพิษอะฟลาทอกซินมีสารตั้งต้นหลักคือ sterigmatocystin ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นอะฟลา  
 ทอกซินชนิดบี1 โดยเอนไซม์เมทิลทรานสเฟอเรส จากนั้นอะฟลาทอกซินบี1 จะเป็นตัวกลางในการ  
 เปลี่ยนเป็นอนุพันธ์ชนิดอื่นๆต่อไป ต่อมา Yabe และคณะ (1999) ได้ศึกษากระบวนการสังเคราะห์  
 สารพิษอะฟลาทอกซินและความสัมพันธ์ระหว่างการสังเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซินชนิดบี1  
 และบี2 กับชนิดจี1 และจี2 และรายงานว่าเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตสารพิษชนิดนี้จากอะ  
 ซิทิลโคเอนไซม์เอ็นนั้นมีมากกว่า 18 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าในกรณีที่มี NADPH ในกระบวนการ  
 สังเคราะห์สารพิษอะฟลาทอกซินชนิดจี1 และจี2 จะถูกสร้างขึ้นจาก *O*-methylsterigmatocystin

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
 ไม่ว่าใครเห็นแต่เพียงคนเดียว หากมีเหตุขัดแย้งเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งทมิควรนำเอาไป

ชนิดบี1 บี2 หรือ Sterigmatin ดังที่เคยเข้าใจในอดีต และสรุปว่าการสังเคราะห์อะฟลาทอกซินชนิดบีไม่ขึ้นกับอะฟลาทอกซินชนิดบี

### 2.2.2 การสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง

อาหารในท้องตลาดที่นำมาตรวจหาชนิดของเชื้อราที่ขึ้นปะปนอยู่เช่นถั่วลิสง ซึ่งถั่วเหล่านี้มีเชื้อราชนิดต่างๆ ขึ้นอยู่มากกว่าร้อยละ 50 (Shank และคณะ, 1972) การทดลองหาชนิดของเชื้อราที่ขึ้นอยู่บนอาหารจากท้องตลาดในประเทศไทยก็ได้ผลคล้ายคลึงกัน กล่าวคือถั่วลิสงมีเชื้อรา *Aspergillus* ขึ้นอยู่มากที่สุด (Glinsukon และคณะ, 1976) เชื้อราที่สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้คือ *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. tamari* และ *A. bombycis* (Thanaboripat และคณะ, 2004)

ก. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษในถั่วลิสง ได้แก่

1. เชื้อรา ในประเทศไทยพบว่าเชื้อรา *A. flavus* มีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินได้แตกต่างกัน เพียงร้อยละ 80 ของเชื้อรา *A. flavus* ที่พบสามารถผลิตอะฟลาทอกซินได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่บางครั้งเมื่อตรวจพบเชื้อราที่มีการเจริญแต่อาจไม่พบสารอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ด้วย (Glinsukon และคณะ, 1976)

2. แหล่งอาหาร การจำกัดธาตุอาหารบางชนิด เช่น ฟอสเฟต และไนโตรเจน มีผลให้การเจริญในระยะเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อราช้าลง เกิดการสะสมของ pyruvate, malonate, acetate และ amino acid ทำให้เกิดการพัฒนาและกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดให้สร้างสารทุติยภูมิขึ้น ใน *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษได้ กระบวนการ polyketide biosynthesis pathway จะสังเคราะห์กรดไขมันตามปกติ (Nessbitt และคณะ, 1962)

ข. แหล่งอาหารที่เชื้อราใช้ในการเจริญมีดังนี้

1. ธาตุไนโตรเจน กรดอะมิโนมีความสำคัญต่อการสร้างอะฟลาทอกซินมาก การเพิ่ม aspartic acid ในสารอาหารจะกระตุ้นให้เชื้อราสังเคราะห์อะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น (Reddy และคณะ, 1971) แหล่งสารประกอบไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อรา *A. flavus* ผลิตอะฟลาทอกซินได้ดีคือ เกลือแอมโมเนียมต่างๆ โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟต แต่การผลิตยังน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารที่สกัดจากข้าวโพด หรือกรดอะมิโน สารสกัดจากยีสต์ และเปปโติน (Lin และ Dianese, 1976)

2. ธาตุคาร์บอน ธาตุอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่เชื้อรา ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ซูโครส ฟรักโทส ไซโรส และไรโบส ซูโครสช่วยทำให้เชื้อราผลิตสารอะฟลาทอกซินได้ดีที่สุด (Lin และ Dianese, 1976)

3. เกลือแร่ธาตุสังกะสี ( $Zn^{++}$ ) และเกลือแร่บางชนิด มีส่วนทำให้เชื้อราผลิตอะฟลาทอกซินได้ดี (Perchase, 1972) volatile metabolites หลายชนิดที่พืชขับออกมามีผลช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ตลอดจนถึงกระบวนการผลิตอะฟลาทอกซิน สารประกอบที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อคือ bionone ซึ่งเป็นตัวจำกัดการเจริญ การสร้างและการผลิตสารอะฟลาทอกซินของเชื้อราทั้งสองชนิดนี้ (Wilson และคณะ, 1983)

ผลของธาตุอาหารรองต่อการผลิตอะฟลาทอกซิน และรายงานว่าอนุมูลสังกะสีและอนุมูลแคลเซียมมีผลในการกระตุ้นการสร้างอะฟลาทอกซิน ส่วน  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{Fe}^{+++}$  และ  $\text{Mn}^{++}$  มีผลเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่สำหรับอนุมูลแบเรียมนั้นมีผลในการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซิน (Lee และคณะ, 1966) ธาตุอาหารและสารประกอบของโลหะซึ่งเป็น chelating agent ในธรรมชาติ อาทิเช่น phytic acid มีความสำคัญในการควบคุมการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าวโพด จากการนำแร่ธาตุอาหารหลายชนิดมาทดสอบกับเชื้อ *A. flavus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า benzoic acid และเกลือ benzoate สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ได้ แต่ sodium acetate จะกระตุ้นการเจริญและผลิตสารพิษของเชื้อ (Lillehoj และคณะ, 1974)

#### ค. ปฏิกริยาระหว่างเชื้อจุลินทรีย์

1. ในอาหารหรือวัตถุดิบต่าง ๆ มักมีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดขึ้นปะปนกัน จุลินทรีย์เหล่านี้มีปฏิกริยาต่อกัน มีผลกระทบต่อ การเจริญและการผลิตสารพิษของ *A. flavus* เจริญได้น้อย *A. flavus* ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวโพดซึ่งฆ่าเชื้อแล้ว สามารถผลิตอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น 24-117 เท่าของเชื้อรา *A. flavus* ที่เลี้ยงบนเมล็ดข้าวโพดที่ไม่ได้ฆ่าเชื้อและมีเชื้อราอื่น ๆ ขึ้นมาแข่งขัน (Sargeant และคณะ, 1961)
2. ปฏิกริยาของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ทำให้เชื้อ *A. flavus* ไม่ผลิตอะฟลาทอกซิน Sauer และ Burroughs (1980) รายงานว่า การแข่งขันของเชื้อราที่มีผลจำกัดการผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 โดยพบว่าข้าวโพดที่เก็บเกี่ยวขณะที่มีความชื้นสูง มีเชื้อรา *Fusarium* sp. และ *A. flavus* เจริญเป็นจำนวนมาก แต่ไม่พบสารพิษอะฟลาทอกซินเลย (Sargeant และคณะ, 1961)
3. ปฏิกริยาที่เชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นไปทำลายสารพิษอะฟลาทอกซินได้ เช่น เชื้อ *Flavobacterium aurantiracum* สามารถทำลายสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหารได้ โดยการเปลี่ยนรูปโครงสร้างทางเคมี ทำให้พิษของอะฟลาทอกซินหมดไป (Sargeant และคณะ, 1961)

#### ง. สภาพแวดล้อม

1. ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ และความชื้นภายในเมล็ดพืชจัดว่าเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราและการสร้างอะฟลาทอกซินมากที่สุด (Diener และ Devis, 1977) เชื้อราชนิดนี้เจริญได้น้อยเมื่ออากาศมีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่าร้อยละ 85 หรือเมล็ดมีความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 16 แต่เมื่อมีความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 86-87 เชื้อราสามารถเจริญอย่างรวดเร็วและสร้างสารอะฟลาทอกซินได้ (Sauer และ Burroughs, 1980) ในเมล็ดถั่วลิสงที่มีความชื้นร้อยละ 9 และความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศร้อยละ 80 เชื้อ *A. flavus* จะถูกจำกัดการเจริญ (Dinner และ Davis, 1977) ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้น ระดับความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส มีผลต่อการตายของสปอร์ของเชื้อ *A. flavus* แต่ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 45 องศาเซลเซียส ค่าความชื้นสัมพัทธ์จะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 81 เป็นต้น (Teitell, 1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อุณหภูมิเชื้อรา *A. flavus* มีช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ค่อนข้างกว้าง ถ้าความชื้นเพียงพอเชื้อจะเจริญและผลิตอะฟลาทอกซินได้ตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิ 6-46 องศาเซลเซียส (Shantha และ Sreenivas, 1981) แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญสูงสุดของเชื้อ *A. flavus* อยู่ในช่วง 29-35 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *A. parasiticus* คือ 30-35 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เชื้อรามีการสร้างสารพิษได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อคือที่ 25 องศาเซลเซียส โดยเฉพาะการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินบี1 ของเชื้อ *A. flavus* และอะฟลาทอกซินจี1 ของเชื้อ *A. parasiticus* ในถั่วลิสง (Diener และ Devis, 1986) นอกจากนี้เชื้อราจะผลิตอะฟลาทอกซินได้สูงสุดที่ระดับอุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาเลี้ยงใน rich media และถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 18 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส การสร้างสารพิษจะลดลงหรือถูกยับยั้งไป (Sorenson และคณะ, 1967) สำหรับในประเทศไทยอุณหภูมิและความชื้นในบรรยากาศของประเทศไทยเหมาะสมต่อเชื้อราที่จะสร้างอะฟลาทอกซินได้เป็นอย่างดีในระยะ 7-14 วัน (ธีรยุทธและชัยวัฒน์, 2524) ในระยะเก็บเกี่ยว ถ้ามีการตากเมล็ดให้แห้ง ทำให้ความชื้นของเมล็ดลดต่ำลงและอุณหภูมิสูงๆมีผลทำให้เชื้อราเจริญเติบโตน้อยลง เป็นการลดการปนเปื้อนของเชื้อในระยะเริ่มแรกได้ (Sauer, 1986)

3. แสง แสงแดดมีผลทำลายการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน (Shotwell, 1972) จากการศึกษาการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อ *A. flavus* ภายใต้สภาพแวดล้อมต่างๆพบว่า ในสภาพที่มีแสงพบสารพิษน้อยกว่าในที่มืดมาก (Joffe และ Lisker, 1969)

#### จ. การขาดน้ำของพืช

การขาดน้ำของพืชมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของพืช เป็นผลให้เกิดอะฟลาทอกซินปนเปื้อนก่อนการเก็บเกี่ยว พบว่าถ้าข้าวโพดอยู่ในสภาพแล้งอย่างหนักในขณะที่ฝักกำลังพัฒนา จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ available nutrient ในเนื้อเยื่อพืช โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบคาร์บอนและไนโตรเจนในเมล็ดขณะกำลังพัฒนา และเกิดการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนในทางที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายของ *A. flavus* และการสร้างอะฟลาทอกซิน (Hageman และ Flesher, 1960) จากการทดลองในแปลงปลูกข้าวโพดโดยควบคุมปริมาณน้ำในแปลงก่อนและหลังการเลี้ยงเชื้อ *A. flavus* บนฝักข้าวโพด พบว่าเปอร์เซ็นต์เมล็ดเป็นโรคไม่แตกต่างกัน แต่ในฝักที่มี water stress หลังเลี้ยงเชื้อแล้ว มีการสะสมอะฟลาทอกซินบี1 สูงมาก เมื่อเทียบกับตัวควบคุม ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการขาดน้ำไม่มีอิทธิพลต่อการเข้าทำลายเมล็ดพืชของเชื้อรา แต่จะมีอิทธิพลต่อการเกิดสารพิษ (Jones และคณะ, 1981)

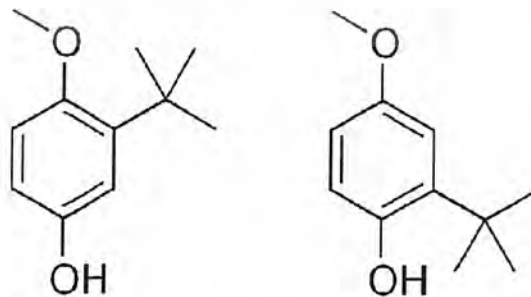
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 สารต้านอนุมูลอิสระและวิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือโมเลกุลของสารที่สามารถจับกับตัวรับและสามารถยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของโมเลกุลสารอื่นๆ ได้ ปฏิกิริยาออกซิเดชันเป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอนจากสารหนึ่งไปยังตัวออกซิไดซ์ ปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถให้ผลิตภัณฑ์เป็นสารอนุมูลอิสระ (free radical) ซึ่งสารอนุมูลอิสระเหล่านี้จะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่และทำลายเซลล์ของร่างกาย สารต้านอนุมูลอิสระจะเข้าหยุดปฏิกิริยาออกซิเดชันเหล่านี้ด้วยการเข้าจับกับสารอนุมูลอิสระและยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยถูกออกซิไดซ์ ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระจึงถือว่าเป็นตัวรีดิวซ์ เช่น โพลีฟีนอล (polyphenol) (Baillie และคณะ, 2009) ซึ่งในพืชและสัตว์จะรักษาสมดุลของปฏิกิริยาโดยสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ กลูตาไธโอน (glutathione) วิตามินซี และวิตามินอี สารต้านอนุมูลอิสระถูกนำมาใช้เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหลายชนิด เพื่อรักษาสุขภาพและป้องกันโรคมะเร็ง ในตอนแรกมีงานวิจัยให้การสนับสนุนถึงการเติมสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ช่วยให้สุขภาพดี แต่ภายหลังการศึกษาในระยะคลินิกพบว่าสารที่เติมลงไปไม่ได้ช่วยหรือก่อให้เกิดประโยชน์แก่ผู้บริโภค แต่ยังทำให้เกิดอันตรายจากการรับประทานที่มากเกินไป (Bjelakovic และคณะ, 2007)

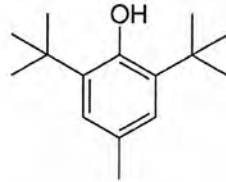
### 2.3.1 สารต้านอนุมูลอิสระจากการสังเคราะห์ทางเคมี

สารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน ได้แก่ บิวทิลเลดไฮดรอกซีอะนิซอล (butylated hydroxyanisole, BHA) และบิวทิลเลดไฮดรอกซีโทลูอีน (butylated hydroxytoluene, BHT) ซึ่งบีเอชเอคือสารต้านอนุมูลอิสระที่ประกอบด้วยวงไฮโซเมอร์ของสารประกอบอินทรีย์ทั้งหมดสองวง ได้แก่ 2-tert-butyl-4-hydroxyanisole และ 3-tert-butyl-4-hydroxyanisole สามารถเตรียมบีเอชเอได้จาก 4-methoxyphenol และ isobutylene หน้าที่ของบีเอชเอคือเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและใช้เป็นสารกันหืนในอาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ บรรจุภัณฑ์ต่างๆ เครื่องสำอางค์ ยาง และผลิตภัณฑ์จากปิโตรเลียม นอกจากนี้บีเอชเอยังนิยมใส่ในยา เช่น isotretinoin, lovastatin และ simvastatin และอื่นๆอีกมากมาย



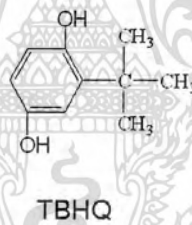
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษา **รูปที่ 2.3** โครงสร้างของบีเอชเอ อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บีเอชที หรือที่ส่วนใหญ่รู้จักกันทั่วไปว่า butylhydroxytoluene คือ สารอนุพันธ์ของฟีนอลที่มีสารประกอบอินทรีย์ lipophilic สามารถละลายในไขมัน มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระยุโรปและสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้ใช้ในอาหารในปริมาณน้อย เพราะเป็นสารที่อันตรายอาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ถ้ารับในปริมาณมาก



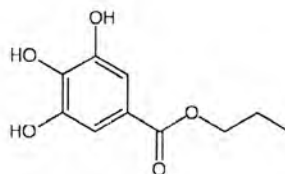
รูปที่ 2.4 โครงสร้างของบีเอชที

เทอร์เทียรีบิวทิลไฮโดรควิโนน (tertiary butyl hydroquinone, TBHQ) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่เพิ่มลงไปในการ ไขมันและน้ำมันพืชเพื่อช่วยชะลอการเสื่อมสภาพที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) โดยทั่วไปแล้ว TBHQ เป็นสารเคมีที่ใช้กันบูดและใช้ในการถนอมอาหาร



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของ Tertiary Butyl Hydroquinone

โพรพิล แกลเลต (propyl gallate, PG) หรือ propyl 3,4,5-trihydroxybenzoate เป็นเอสเทอร์ที่เกิดจากการรวมตัวกันของ gallateacid และ propanol และได้เริ่มมีการใส่สารชนิดนี้ลงในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำมันและไขมันเพื่อยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับภาาใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
รูปที่ 2.6 โครงสร้างของ Propyl Gallate  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

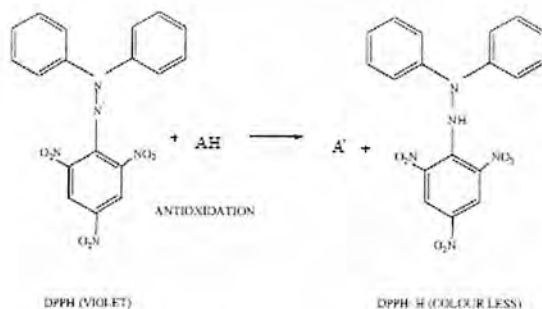
### 2.3.2 สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ

Phenolic compounds คือสารที่สูตรโครงสร้างมีหมู่ OH บน aromatic ring ตั้งแต่ 1 กลุ่มขึ้นไป สารในกลุ่มนี้จึงมีคุณสมบัติที่จะละลายน้ำได้ดี พบได้ในพืช ผักและผลไม้ทั่วไป อาจแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ 1.กรดฟีนอลิก (simple phenols/phenolic acid) และอนุพันธ์ เช่น กรดแกลลิก (gallic acid) กรดแทนนิก (tannic acid) วานิลิน (vanillin) และซาลิไซลิก (salicylic acid) เป็นต้น สารกลุ่มนี้พบได้ในผลไม้หลายชนิด เช่น ราสเบอร์รี่ แบล็คเบอร์รี่ เป็นต้น 2.ฟีนิลโพรพานอยด์ (phenylpropanoids) ได้แก่ สารประกอบของฟีนอลิกที่บริเวณ aromatic ring มี three-carbon side chain เกาะอยู่ แยกย่อยออกได้หลายกลุ่ม ได้แก่ กรดไฮดรอกซินนามิก (hydroxycinnamic acids) คูมาริน (coumarins) ลิกแนน (lignans) ซึ่งพบได้ใน แอปเปิล ลูกแพร์ และกาแฟ 3.ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นกลุ่มสำคัญของสารประกอบฟีนอลิก ได้แก่ สารที่มีสูตรโครงสร้างเป็น C6-C3-C6 แยกย่อยออกได้เป็นหลายกลุ่ม ได้แก่ catechins, proanthocyanins, anthocyanidins, flavones flavonols, flavonones และ isoflavones จากการที่พบฟลาโวนอยด์ได้อย่างกว้างขวางทั้งพืช ผัก ผลไม้รวมทั้งเครื่องดื่มที่ได้จากพืช เช่น ชา ซึ่งพบว่าเป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์เป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย และเป็นสารยับยั้งจากภาวะ lipid peroxidation (Okushio และคณะ, 1998)

### 2.3.3 วิธีการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ

#### 2.3.3.1 วิธี DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

วิธี DPPH เป็นการวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการกำจัดสาร DPPH ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระของไนโตรเจนที่มีเสถียรภาพ อยู่ในรูปของอนุมูลและสามารถรับอิเล็กตรอนได้อีกเพื่อเปลี่ยนเป็น โมเลกุลที่ไม่เป็นอนุมูลอิสระและเมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้สารดังกล่าวไม่เป็นอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ ทำการวัดโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์วัดการลดลงของสีเมื่อเติมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปด้วย โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
รูปที่ 2.7 การหาขีดความสามารถในการเป็นตัวต้านอนุมูลอิสระ  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นแต่มีเหตุขัดแย้งและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นได้มีการพัฒนานำอนุมูล DPPH มาใช้หาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ เรียกว่า Antiradical Efficiency (AE) ซึ่งคำนวณได้จากสมการ

$$AE = \frac{1}{EC_{50} TE_{50}}$$

$EC_{50}$  = ความเข้มข้นของสารทดสอบที่สามารถลดปริมาณ DPPH เริ่มต้นลงได้ร้อยละ 50

$TE_{50}$  = เวลาที่ใช้ในการลดปริมาณอนุมูลอิสระให้ได้  $EC_{50}$

ดังนั้นความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระที่ศึกษานี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระที่เสถียรในสารละลาย ข้อดีของวิธีนี้คือง่ายต่อการใช้เครื่องมือและเครื่องมือมีทั่วไป จึงนิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารธรรมชาติ ข้อเสียของวิธีนี้คืออนุมูล DPPH มีความคงตัวไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลที่เกิดในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่สามารถที่จะใช้จัดอันดับที่มีอนุมูลที่มีความไวสูงได้ นอกจากนี้สารรีดิวซ์สามารถทำให้มีอนุมูล DPPH จางลงได้อีกด้วย (โอภา, 2550)

#### 2.3.3.2 วิธี FRAP (ferric reducing antioxidant power assay)

วิธี FRAP เป็นวิธีการหาค่าความสามารถรวมในการต้านออกซิเดชันโดยตรง โดยมีหลักการคือ สารต้านออกซิเดชันในร่างกายที่ทำหน้าที่ให้อิเล็กตรอนจัดเป็นสารรีดิวซ์ ดังนั้นการต้านออกซิเดชันจึงเป็นความสามารถในการรีดิวซ์ วิธีนี้จะใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก  $Fe^{3+}$ -TPTZ (Ferric tripyridyltriazine) เป็นสารทดสอบ อะตอมเหล็กในสารนี้จะถูกรีดิวซ์ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส  $Fe^{2+}$ -TPTZ (ferrous tripyridyltriazine) ซึ่งมีสีน้ำเงิน ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร วิธี FRAP เป็นการวิเคราะห์หาค่าความสามารถในการรีดิวซ์ซึ่งเกิดอย่างรวดเร็วภายใน 4-6 นาที แต่ในการวิเคราะห์สารต้านออกซิเดชันจากพืชจำพวกโพลีฟีนอล พบว่าการดูดกลืนแสงที่ 594 นาโนเมตร จะเพิ่มขึ้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ ดังนั้นการวัดครั้งเดียวตามเวลาที่กำหนดจึงอาจไม่ใช่ค่าที่เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ วิธี FRAP มีข้อดีคือเป็นวิธีที่ง่าย ใช้เวลาน้อย ไม่แพง และไม่มีการใช้เครื่องมือพิเศษ ข้อเสียคือกลไกของปฏิกิริยาที่ใช้ในการวิเคราะห์ไม่เกี่ยวข้องกับกลไกภายในร่างกาย (โอภา, 2550)

#### 2.3.3.3 วิธีการหาสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

วิธีการหาสารประกอบเชิงซ้อนฟีนอลิกด้วย folin-ciocalteau colorimetry (FC) อยู่บนพื้นฐานการลดลงทางปฏิกิริยาเคมีของส่วนผสมของทังสแตน (tungsten) และ โมลิบดีนัมออกไซด์ (molybdenum oxides) เป็นวิธีการดัดแปลง โดยผลิตภัณฑ์ที่มีการลดลงของโลหะออกไซด์ที่มีสีฟ้าจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นกว้างสุดอยู่ที่ 765 นาโนเมตร ความเข้มจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นนี้เป็นสัดส่วนเดียวกับความเข้มข้นของสารฟีนอล วิธีนี้เป็นวิธีการที่ได้รับการรับรองอย่าง

เป็นทางการแล้วจากสำนักงาน International de la Vigne et du Vin (OIV) ซึ่งเป็นหนึ่งองค์กร  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่างประเทศที่รับรองวิธีการเฉพาะสำหรับการวิเคราะห์หาสารฟีนอลิกให้เป็นที่ยอมรับ ขั้นตอนการทดสอบหาสารประกอบฟีนอลิกโดยเตรียมตัวอย่างและสารมาตรฐานกรดแกลลิกอย่างละ 1 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำประมาณ 70 มิลลิลิตร จากนั้นเติม FC 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มเป็นเวลา 1-8 นาที ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 15 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร (Nanasombat และ Wimuttigosol, 2011)

## 2.4 การควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราในถั่วลิสงด้วยน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทย

แนวทางที่ดีที่สุดในการแก้ไขปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของเชื้อ *A. flavus* และอะฟลาทอกซินคือ การป้องกัน ซึ่งต้องมีความรู้ความสามารถในการดำเนินการ รวมทั้งต้องมีการพิจารณาหาวิธีการปนเปื้อนของเชื้อ แนวทางในการป้องกันสารพิษจากเชื้อราในระดับฟาร์มใหญ่ๆควรมีการควบคุมทั้งในระยะปลูก ระยะเก็บเกี่ยว และในระยะเก็บรักษา แต่อย่างไรก็ตามปัญหาในเรื่องการผลิตและการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินก็ยังคงเกิดขึ้นอยู่ แม้ว่าจะได้ทำการป้องกันแล้วก็ตาม จึงได้มีการศึกษาหนทางอื่นมาควบคุมปริมาณอะฟลาทอกซิน (ธรรมศักดิ์, 2540) ดังต่อไปนี้

### 2.4.1 วิธีทางกายภาพ

1. การคัดแยกเมล็ด (physical separation) โดยคัดเลือกเมล็ดถั่วลิสงที่มีเชื้อ *A. flavus* และสารพิษปนเปื้อนอยู่ออกไป วิธีการคัดแยกเมล็ดที่เสียดออกไปนี้อาจใช้วิธีทางกล เช่น ใช้เครื่องแยกไฟฟ้า (electronic sieving) หรือใช้วิธีการคัดแยกด้วยมือ (hand sorting) วิธีดังกล่าวนี้ในเมล็ดถั่วลิสงทำได้ดีกว่าเมล็ดข้าวโพด เนื่องจากสามารถสังเกตเห็นเมล็ดที่มีเชื้อราขึ้นปะปนได้ชัดเจนกว่า โดยดูจากส่วนของเมล็ดที่ถูกทำลายและสีที่เปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่าวิธี physical separation นี้มีประสิทธิภาพต่ำถ้าเมล็ดมีสารพิษอะฟลาทอกซินตามธรรมชาติอยู่ในปริมาณต่ำ (Anderson, 1983; Breakke และคณะ, 1975)

2. การใช้ความร้อน (heating) การใช้อุณหภูมิไอน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้ร้อยละ 66 และถ้าใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส จะให้ผลดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังมีการใช้เครื่องอบ ซึ่งวิธีนี้อาจใช้ร่วมกับสารเคมีพวกแอมโมเนียก็จะได้ผลดีเช่นกัน (Anderson, 1983)

3. การใช้รังสี (irradiation) วิธีนี้ใช้ได้ผลในพวกเมล็ดน้ำมัน มีการทดลองใช้รังสีแกมมาพบว่าสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้ร้อยละ 90 แต่วิธีนี้ยังไม่เป็นที่นิยมใช้กัน เพราะอาจมีผลในเรื่องคุณค่าทางอาหาร และเป็นวิธีที่ยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง (Anderson, 1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ห้ามเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
4. การป้องกันไม่ให้เมล็ดหรือฝักถั่วลิสงเสียหาย เพราะอาจเป็นหนทางให้เชื้อ *A. flavus* เข้าทำลายได้ง่าย ควรตากเมล็ดให้แห้งเพื่อให้ความชื้นลดลงอย่างรวดเร็วหลังเก็บเกี่ยวและนำไป

เก็บรักษาในโรงเก็บที่เหมาะสม หากเป็นโรงเก็บที่มีอุณหภูมิต่ำด้วยยิ่งเป็นการดีจะช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินได้มาก (Anderson, 1983)

## 5. การควบคุมสภาพความชื้นทั้งในระยะก่อนและหลังเก็บเกี่ยว

### 2.4.2 วิธีทางชีววิทยา

เชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่พบในเมล็ดถั่วลิสงอาจเป็นตัวแข่งขันหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้ในระหว่างเก็บรักษาซึ่งอาจมีผลทำให้การพัฒนาการสร้างสารพิษของเชื้อลดลงกว่าที่ควรจะเป็น การแข่งขันระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์รวมทั้งสภาพแวดล้อม นำเชื้อจุลินทรีย์พวกเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์บางชนิดมาทดสอบเพื่อดูปฏิบัติการยับยั้ง หรือการแปรสภาพของสารพิษอะฟลาทอกซินปี 1 พบว่าในเมล็ดข้าวมีเชื้อ *A. glaucus* และ *A. candidus* อยู่ มีปริมาณอะฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในระดับที่ต่ำมาก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระดับปริมาณเชื้อเริ่มต้น และสภาพแวดล้อมในระหว่างการเก็บรักษาด้วย (Doyle และ Marth, 1978) พบว่าเชื้อรา *A. niger* และ *Rhizoctoniasolani* สามารถจำกัดการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และการผลิตสารพิษในสับเสตรทได้ ในประเทศอิสราเอลมีรายงานว่ามี *A. niger* บริเวณดินรอบๆ ฝักถั่วจะพบการเข้าทำลายของเชื้อ *A. flavus* น้อยมาก (Ashworth, 1965) นอกจากนี้ยังมีผู้รายงานว่ามีเชื้อ *Sclerotium bataticola* ที่เลี้ยงบน malt extract agar มาทดสอบพบว่า เชื้อนี้สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ได้ แต่ไม่พบการเกิด lysis และยังพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *S. bataticola* มีผลต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *A. flavus* ในเมล็ดด้วย (Jackson, 1965) จากการทดสอบ isolate เชื้อ *Bacillus subtilis* จากเมล็ดถั่วลิสงในนิวเม็กซิโก โอคาโฮมา และเท็กซัสพบว่าสามารถป้องกันการเจริญของเชื้อ *A. flavus* ในเมล็ดได้ นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งเชื้อราบางชนิด เช่น *Macrophomina* spp., *Chaetomium* spp., *Choanephora* spp. และ *Penicillium* spp. ได้อีกด้วย (Pettit และคณะ, 1968) นอกจากนี้พบว่าการใช้สารเคมี *B. subtilis* จะช่วยลดความเสียหายจาก *A. flavus* ได้ (Sommatya และคณะ, 1988)

### 2.4.3 การใช้สารเคมี

1. การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อราบางชนิด เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasitic* เช่น การใช้สารเคมี thiabendazole หรือ benomyl ในอัตรา 10 พีพีเอ็มขึ้นไป หรือ captan ก็สามารถยับยั้งเชื้อได้ แต่ต้องใช้ในอัตราความเข้มข้นสูงกว่ามาก นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเคมีอื่นๆ อีก เช่น mercuric chloride ( $HgCl_2$ ) เป็นต้น การใช้สารเคมีในลักษณะนี้ไม่สามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์สำหรับบริโภคได้ เนื่องจากมีพิษตกค้างอยู่ค่อนข้างสูง (Garcia และคณะ, 1986: ทิพย์วรรณ และธรรมศักดิ์, 2531)

2. การใช้สารเคมีเพื่อลดความเป็นพิษ มีการวิจัยในถั่วลิสงและพวกถั่วเมล็ดฝ้ายเพื่อหาวิธีการลดความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน อาทิเช่น ใช้แอมโมเนีย ( $NH_3$ ) โดยการนำแอมโมเนียมาทดสอบเพื่อลดสารพิษอะฟลาทอกซิน จากเดิมที่มีค่ามากกว่า 1,000 พีพีบี ให้ลดต่ำลงจนเหลือน้อย

กว่า 10 พีพีบี เป็นต้น การนำแอมโมเนียมาใช้ อาจใช้ได้ทั้งในสภาพก๊าซและของเหลวและอาจจะใช้แอมโมเนียอย่างเดียวหรืออาจใช้ร่วมกับความร้อนก็ได้ (Anderson, 1983)

#### 2.4.4 การลดความเป็นพิษ

มีนักวิจัยหลายท่านที่มุ่งเน้นความสนใจไปที่การลดความเป็นพิษ (detoxification) เช่น สารพิษจะลดลงร้อยละ 70-80 ถ้าคลุกและอบเมล็ดถั่วถึงสงด้วย ammonium solution ร้อยละ 1 เป็นเวลา 6-16 วัน แต่ถั่วถึงสงจะมีสีคล้ำ ไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค (เกศรา, 2527) Wangjasuk และคณะ (1989) ได้ทดลองให้อุณหภูมิ 40-80 องศาเซลเซียส และใช้เวลาไม่น้อยกว่าคือ ใช้เพียง 1-7 วัน ก็ได้ผลเช่นกัน

การลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในน้ำมันถั่วถึงสงธรรมชาติลงให้ต่ำกว่า 20 พีพีบีสามารถทำได้โดยใช้ดินฟอกสีดูดสารพิษนี้ เมื่อกวาดดินฟอกสีร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ลดปริมาณอะฟลาทอกซินจาก 76 พีพีบี เป็น 7.85 พีพีบี คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันถั่วถึงสงซึ่งผ่านกรรมวิธีนี้แล้วจะมีมาตรฐานตามที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนดไว้ การลดปริมาณอะฟลาทอกซินโดยวิธีนี้ได้ผลดี กรรมวิธีไม่ยุ่งยาก อุปกรณ์ที่ใช้ก็มีเพียงถังกวนซึ่งสร้างขึ้นได้เองและเครื่องกรองที่มีอยู่ในโรงงานผลิตน้ำมันถั่วถึงสงแล้ว ค่าใช้จ่ายก็ไม่สูงนัก ปัจจุบันโรงงานผลิตน้ำมันถั่วถึงสงได้นำกรรมวิธีนี้ไปใช้แล้ว (เกศรา, 2527) คลุกผลผลิตถั่วถึงสงด้วยกรดต่างๆ (benzoic, propionic และ sorbic) พบว่า สารพิษลดลงและเมื่อนำไปเป็นอาหารสัตว์ เช่น ไก่ พบว่าไม่เป็นสารก่อมะเร็ง (Niyomka และ Suttajit, 1988)

#### 2.4.5 วิธีการทางเกษตรกรรม

วิธีปฏิบัติทางเกษตรกรรมที่เหมาะสมก็สามารถนำมาใช้เพื่อลดปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของเชื้อ *A. flavus* และอะฟลาทอกซิน ในระยะก่อนเก็บเกี่ยวถั่วถึงสงได้ วิธีทางเกษตรกรรมดังกล่าวได้แก่

1. การเลือกพื้นที่ปลูก ควรเลือกพื้นที่ที่ไม่มีรายงานว่ามีเชื้อ *A. flavus* ระบาดอยู่
2. การเลือกใช้พันธุ์พืช การพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์ถั่วถึงสงให้ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อและการพัฒนาการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน จัดว่าเป็นวิธีที่ดีวิธีหนึ่ง (Mixon, 1977) ส่วนเมื่อนำฝักถั่วถึงสงสายพันธุ์ "Tennessee Red" และ "Virginia 46-2" มาถายเชื้อ *A. flavus* พบว่าเชื้อราสามารถแทงทะลุเข้าไปในฝักแต่จะไม่แพร่กระจายเข้าไปสู่เชื้อหุ้มเมล็ด (Lindsey, 1970) ถั่วถึงสงพันธุ์ PI3377394F และ PL3377409 ซึ่งมีความต้านทานต่อการ colonize ของเชื้อรา *A. flavus* บนเมล็ด แต่ข้อเสียของถั่วถึงสงสายพันธุ์ต้านทาน คือ มักจะให้ผลผลิตต่ำ (Mixon และ Rogers, 1973)

3. การปลูกพืชหมุนเวียน การปลูกถั่วถึงสงติดต่อกัน ไปเรื่อยๆทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อ *A. flavus* และอะฟลาทอกซินมากกว่าการปลูกถั่วถึงสงสลับกับพืชชนิดอื่นที่ไม่ใช่พืชอาศัย การปลูกพืชหมุนเวียนเป็นวิธีที่สามารถลด sclerotial inoculum ของเชื้อได้ (ทิพย์วรรณและธรรมศักดิ์, 2531)

4. วิธีการไถพรวนและตากดิน มีผลต่อ sclerotial inoculum ในส่วนดินชั้นบน (ทิพย์วรรณ และธรรมศักดิ์, 2531)

5. วิธีทางเกษตรกรรมอื่นๆ ที่เหมาะสม เช่น วันปลูก อัตราปลูกที่เหมาะสม การควบคุม วัชพืช การใช้ปุ๋ยที่เหมาะสม การใช้หลายๆวิธีร่วมกันทำให้สามารถลดสารพิษอะฟลาทอกซินในระยะก่อนเก็บเกี่ยวได้ (Widstrom และ Zuber, 1983)

#### 2.4.6 การใช้สารสกัดจากพืช

ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับพืชสมุนไพรเพื่อนำมาใช้ประโยชน์จากสารสกัดสมุนไพรหลายชนิดเพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่เป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดโรคในพืชหลายชนิด เพื่อลดการใช้สารเคมีลงเนื่องจากสารเคมีเหล่านี้เป็นสารเคมีสังเคราะห์และเป็นวัตถุมีพิษเมื่อใช้กันมากจะทำให้มีการสะสมสารพิษในสิ่งแวดล้อมจนเป็นอันตรายต่อชีวิตและสุขภาพของมนุษย์ ดังนั้นจึงมีการนำพืชสมุนไพร เครื่องหอม พืชหอม วัชพืช หรือ พืชท้องถิ่นที่มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยเฉพาะ โรคพืช ที่สามารถนำมาใช้ได้อย่างปลอดภัยเนื่องจากสารที่มีอยู่ในพืชเป็นสารที่สลายตัวได้ง่ายมีความปลอดภัยอย่างสูงต่อผู้บริโภคและผู้ใช้ สารที่สกัดได้จากพืชเหล่านี้จะอยู่ในกลุ่มสารอินทรีย์ โดยสารเหล่านี้เป็นสารเชิงซ้อนที่มีสะสมอยู่ใน ใบ ดอก ลำต้น ซึ่งมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ และเชื้อรา ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพืช เช่น พืชสมุนไพร และเครื่องเทศ เช่น กานพลูซึ่งมีสาร eugenol (ร้อยละ 80 – 87) และ eugenolacetatechavicol สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. versicolor* เป็นต้น (แสงมณี, 2539) การใช้สารสกัดจากพืชสมุนไพรบางชนิด สารสกัดจากพลูมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus* ได้ดีที่สุดในที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 10,000 พีพีเอ็มขึ้นไป รองลงมาได้แก่ กานพลู พริกไทย พริกหอม ดีปลี ชะเอมเทศ ดอกจันทร์ จิงแก่ ใบกระวาน โป๊ยกั๊ก และเทียนขาว ตามลำดับ (ชัยวัฒน์, 2528)

ในปัจจุบันส่วนใหญ่มักใช้ข่ามาแมลงในการกำจัดศัตรูพืช ทำให้เกิดปัญหาต่างๆ มากมาย คือ มีค่าใช้จ่ายสูง เกิดความกังวลเกี่ยวกับสารเคมีตกค้างในอาหาร ภัยต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม (Paster และ Bullerman, 1988) ความตระหนักเหล่านี้ได้เพิ่มความสนใจที่จะเลือกใช้สารป้องกันแมลงที่ได้จากพืชธรรมชาติแทนข่ามาแมลง (Nikos และ Costas, 2007)

#### 2.5 น้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยที่ใช้ในการต้านเชื้อรา

น้ำมันหอมระเหยเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สกัดได้จากวัสดุจากพืช มักมีกลิ่นหอมระเหยง่าย พืชจะสร้างและกักเก็บน้ำมันหอมระเหยที่เซลล์พิเศษ ต่อม หรือท่อ โดยจะเห็นต่อมน้ำมันได้ชัดในส่วนใบและเปลือกของพืชจำพวกส้ม พบได้ตามส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล และเมล็ด ซึ่งมีสารออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา ด้านอนุโมลิสระ ด้านมะเร็ง และสามารถใช้เป็นสารธรรมชาติในการประกอบอาหารต่างๆ ได้ (Teissedre และ Waterhouse, 2000; Soliman และ

Badeaa, 2002) ซึ่งการศึกษาจะพบว่าน้ำมันหอมระเหยจำพวกเทอร์ปีน ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของออกซิเจน เช่น แอลกอฮอล์ แอลดีไฮด์ คีโตน กรด และเอสเทอร์ และน้ำมันหอมระเหยบางชนิดจะประกอบด้วยสารพวกเอสเทอร์ฟีนอล และอีเทอร์ มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา (Nikos และ Costas, 2007)

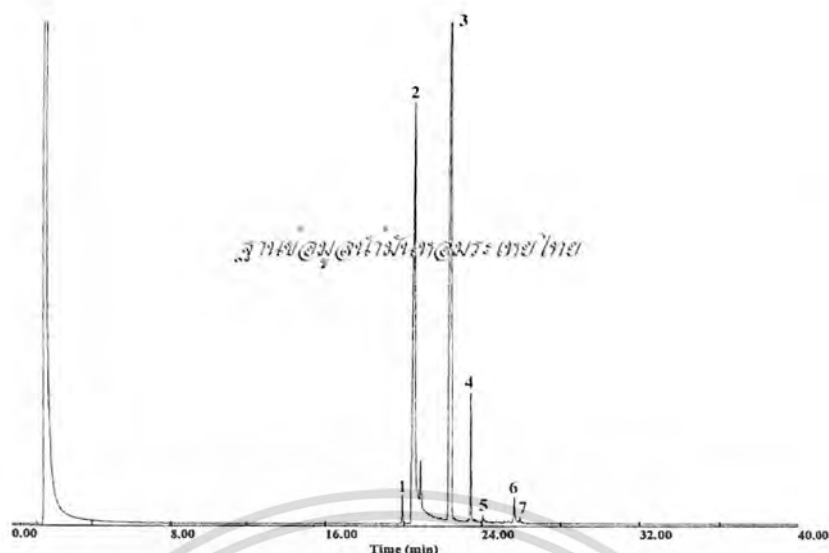
กานพลู (*Eugenia caryophyllus*) เป็นไม้ยืนต้นไม่ผลัดใบ ขนาดเล็ก สูง 5-20 เมตร เรือนยอดทึบมีกิ่งเล็ก ๆ มาก ยอดอ่อนใบสีแดงแกมน้ำตาล ใบเดี่ยว ออกตรงข้ามก้านใบยาว 1-3 เซนติเมตร โคนก้านใบ โติงออกแดง รูปไข่กลับถึงขอบขนานแกมรี ขนาดกว้าง 3-6 เซนติเมตร และยาว 6-13 เซนติเมตร ปลายใบแหลม โคนใบสอบมาก เส้นกลางใบ และเส้นใบชัดเจน แผ่นใบด้านบนเป็นมัน มีต่อมน้ำมันมาก ดอกช่อสั้นแบบแยกแขนง แขนงย่อย ออกเป็นกระจุก 3 ดอก ออกที่ปลายกิ่งหรือตรงซอกใบ จำนวน 6-20 ดอก อาจพบถึง 40 ดอก ดอกสมบูรณ์เพศ รั้งไข่อ้อยู่ได้วงกลีบ ดอกตูมยาว 1-2 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง โคนเป็นหลอดติดกับรั้งไข่อ้อยู่ รูปคล้าย กิ่งทรงกระบอก ถึงคล้ายมีมุมสี่เหลี่ยม ยาว 1-1.5 เซนติเมตร มีสีเขียวแกมเหลืองแต้มสีแดงปน ปลายมี 4 กลีบ รูปสามเหลี่ยมแกมรูปไข่ ยาว 0.2-0.4 เซนติเมตร กลีบดอกมี 4 กลีบ เรียงชิดติดกัน รูปกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร แต้มสีแดง (รูปที่ 2.8) ดอกบานคล้ายหวนกเปิด ดอกตูมสีเขียวจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและชมพูก่อนเริ่มบาน เกสรเพศผู้มีจำนวนมาก ยาว 0.7 เซนติเมตร และมีสีขาว เกสรเพศเมีย ก้านเกสรยาว 0.3-0.4 เซนติเมตร ยอดเกสรปลายแยก 2 หยัก รั้งไข่อ้อยู่ได้ฐานรองดอก รูปยาวรี ผลเดี่ยวมีเมล็ดเดียว รูปไข่หัวกลับแกมรี ยาว 2-2.5 เซนติเมตร สีแดงคล้ำ ๆ เมล็ดยาว 1.5 เซนติเมตร (Backer และ Bakhuizen, 1968)

ดอกกานพลูช่วยกระจายเสมหะ แก้เสมหะเหนียว แก้เลือดออกตามไรฟัน แก้ปวดฟัน แก้รำมะนาด ขับลม แก้ปวดท้อง แก้ท้องเสีย (เสถียร, 2522) ดอกกานพลูยังใช้เป็นเครื่องเทศในอุตสาหกรรมอาหารประเภทเนื้อ ขนมัน และสุรา ดอกกานพลูแห้งเมื่อนำมาสกัดน้ำมันหอมระเหย โดยการต้มกลั่น (hydrodistillation) ได้น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 6.0 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันวิเคราะห์โดย GC และ GC-MS ตามรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.8 กานพลู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 ผล GC-MS ของน้ำมันผักชีลาว 1.a-cubebene (1.05), 2.eugenol (36.75), 3.trans-caryophyllene (51.47), 4.a-humulene (4.93), 5.epi-bicyclosesquiphellandrene (0.31), 6.d-cadinene (1.09), 7.eugenol acetate (0.20)

เทียนตาคักแดน (*Anethum graveolens*) เป็นชื่อเรียกเมล็ดผักชีลาวของทางภาคกลาง ซึ่งผักชีลาวเป็นพืชล้มลุกตระกูลเดียวกับผักชี ลำต้นมีสีเขียวเข้มขนาดเล็ก สูง 20-60 เซนติเมตร ทุกส่วนของต้นมีกลิ่นหอม ลักษณะใบเป็นใบประกอบแบบขนนกมีสีเขียวสดออกเรียงสลับกัน ดอกมีขนาดเล็กสีเหลืองออกเป็นช่อ ก้านช่อดอกมีลักษณะคล้ายกับซี่ร่ม 2 ชั้น ก้านดอกยาว 4-20 เซนติเมตร ก้านช่อดอก 5-20 ก้าน ยาว 1.5-7.5 เซนติเมตร ดอกย่อยมีกลีบเลี้ยง 5 กลีบติดกันเป็นถ้วยเล็กๆ กลีบดอก 5 กลีบสีขาว หักเว้าเป็น 2 ลอน หลุดร่วงเร็ว ผลแก่เป็นรูปไข่แบน มีสีน้ำตาลอมเหลือง ถ้านำไปใช้เป็นเครื่องเทศจะเก็บได้ก็ต่อเมื่อดอกเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล (รูปที่ 2.10) แต่ส่วนใหญ่จะพบในรูปของการทานเป็นผักสดมากกว่า ซึ่งควรเก็บก่อนที่จะออกดอก ผักชีลาวมีสองชนิด คือ ชนิดที่มาจากยุโรป (dill) และชนิดที่มีกำเนิดในเอเชียเขตร้อน (indian dill) ในประเทศไทยมีการปลูกเพื่อใช้ทานเป็นผักมากกว่าปลูกเพื่อใช้ผลมาทำเครื่องเทศเพราะมีคุณภาพน้อยกว่าประเทศอินเดีย มีสรรพคุณทางยาในส่วนของต้นทั้งต้น แก้ไข้อันบังเกิดแก่ชาง บำรุงธาตุ แก้สะอึก แก่ร้อนในกระหายน้ำ แก่คลื่นเหียนอาเจียน แก้ไข้หัว ไข้พิษ แก้เจ็บตา ผล ขับลมในลำไส้ บำรุงธาตุ แก้ไตพิการ เจริญอาหาร ขับลม แก่ท้องขึ้น ท้องเฟ้อจุกเสียดแน่น ส่วนของรากมีฤทธิ์กระทุ้งพิษ ใช้ส่วนหัวแก่ระคายเคืองคอ น้ำมันผักชีลาว (dill seed oil) ได้จากการนำผลแก่แห้งไปกลั่นด้วยไอน้ำ สารสำคัญที่พบคือ คาร์บอน ดี-ไลโมนีน และอัลฟา-เพลเลนดรีน ส่วนสารอื่นที่มีปริมาณรองลงมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คือ ไคไฮโครคาร์โวน ยูจีนอล ไพนิน และอะนิโทล เป็นต้น น้ำมันผักชีลาวมักใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เช่น สบู่ โลชั่นบำรุงผิว เป็นต้น



รูปที่ 2.10 เทียนดาตักแดน

กระวาน (round siam cardamom, best cardamom, clustered cardamom และ camphor seeds ) เป็นเครื่องเทศ (spice) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Amomum krervanh Pierre* ในวงศ์ Zingiberaceae เป็นพืชล้มลุก มีเหง้า สูงประมาณ 2 เมตร กาบใบหุ้มซ้อนกันทำให้ดูคล้ายลำต้น ใบเดี่ยว แลวยาว รูปขอบขนาน ยาว 15-25 ซม. ปลายแหลมช่อดอกออกจากเหง้าชูขึ้นมาเหนือพื้นดิน รูปทรงกระบอก ยาว 6-15 ซม. ก้านช่อดอกยาว 5-15 เซนติเมตร ใบประดับสีเหลืองนวล มีขนคายเรียงซ้อนสลับกันตลอดช่อ กลีบดอกสีเหลือง เป็นหลอดแคบ ช่อดอกกระวานจะ โผล่ขึ้นมาจากพื้นดินเล็กน้อยและเจริญเติบโตเป็นผล ลักษณะเป็นพวงเกสรเพศผู้ไม่สมบูรณ์แปรสภาพเป็นกลีบขนาดใหญ่ สีขาว มีแถบสีเหลืองตรงกลางผลกลีบเปลือกเกลี้ยงเป็นพู่ ผลมีสีขาวนวล (รูปที่ 2.11) ในผลมีเมล็ดขนาดเล็กสีน้ำตาลแก่จำนวนมาก เมล็ดอ่อนสีขาวมีเยื่อหุ้มเมื่อแก่เปลี่ยนเป็นสีดำ ทั้งผลและเมล็ดมีกลิ่นหอมคล้ายการบูร ช่วงเวลาที่ออกดอกจนผลแก่ใช้เวลาประมาณ 5 เดือน อีกชนิดหนึ่งคือ *Elettaria cardamomum* (L.) Maton ในวงศ์เดียวกันเรียกว่ากระวานเทศ มาจากประเทศอินเดีย ตอนใต้ อาจเรียกว่า เอลา ลูกเอ็ด หรือ ลูกเอ็น ในประเทศไทยพบกระวานขึ้นอยู่ตามป่าเช่นแถบเขาสอยดาวจังหวัดจันทบุรีป่าที่มีความชื้นสูงในที่อื่นๆ เช่น ตำบลปากทวารจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (สถาพร, 2534)

ชาวยุโรปรู้จักกระวานไทยมาตั้งแต่คริสต์ศตวรรษที่ 17 ในนามของ *Amomum* มีรายงานว่ากรุงเทพฯเป็นแหล่งใหญ่ของกระวาน มีการส่งกระวานเป็นสินค้าส่งออกทางเรือจากกรุงเทพฯ ไปยังอังกฤษ จีน และญี่ปุ่น ในปี ค.ศ.1857 ได้มีการซื้อขายกระวานที่ตลาดที่กรุงลอนดอน ในปี ค.ศ.

1871 มีการส่งกระวานจากเมืองไทยไปยังจีนและสิงคโปร์ นำหนักถึง 623,733 ปอนด์ กระวานไทยไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้เข้าไปอยู่ในตำรายา French Codex และ Dublin Pharmacopeia นอกจากนี้มีรายงานว่ากระวานที่ส่งออกไปจากประเทศไทยใช้ชื่อ 2 ชื่อ คือ best cardamoms และ bastard cardamoms best cardamoms มาจากพืชที่ปลูกที่หุบเขาของจังหวัดจันทบุรีและตราดคือ *Amomum krervanh* Pierre การตัดไม้ทำลายป่าทำให้ความชื้นลดลงการเพาะปลูกกระวานก็ลดลงด้วย (สถาพร, 2534)

ผลกระวานใช้ในอาหารเช่น ผงพะโล้ แกงกะหรี่ มัสมัน ขนบั้ง คับบด แซม ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ หน่ออ่อนของกระวานนิยมบริโภคในอาหารพื้นเมืองของภาคตะวันออกและภาคใต้เป็นเครื่องเทศปรุงแต่งรสและกลิ่นของอาหารประเภทแกงป่า ผัดเผ็ด ต้มยำ ปัจจุบันเกษตรกรนิยมปลูกกระวานเพื่อขายหน่อบริโภคมากขึ้น เป็นที่นิยมรู้จักมากกว่าผลกระวานด้วยซ้ำ โดยเกษตรกรจะปลูกกระวานผสมผสานในสวนผลไม้ คั้นแก้ตัดทิ้งมีกลิ่น ได้แมลงในสวนลดการใช้สารเคมีในสวน หน่ออ่อนกระวานสามารถขยายทุกวันได้ราคาหน่อละ 3-5 บาท สามารถสร้างรายได้เสริมเดือนละไม่น้อยตลอดจนสามารถรักษาสภาพแวดล้อมด้วย ผลิตภัณฑ์จากกระวานอื่นๆ ของชุมชนได้แก่ ชาใบกระวาน คีน่าทดลองไม้น้อย คนอินเดียนอกจากจะใช้กระวานในอาหารแล้วยังใส่ในเครื่องคั้นประเภทชาด้วย ชาวอาหรับนิยมคั้น กาหว่า คือกาแฟกระวานที่แรง มีกระวานเป็นส่วนประกอบร้อยละ 90 ถึงร้อยละ 10 เป็นกาแฟ เชื่อว่าทำให้เลือดเย็นซึ่งเป็นสิ่งที่ดีสำหรับประเทศที่มีอุณหภูมิสูง

กระวานมีสรรพคุณทางสมุนไพรได้ทุกอย่าง ส่วน ทั้งราก ลำต้น หน่อ เปลือกลำต้น แก่นของลำต้น ใบ ผลแก่ เมล็ดแห้งอ่อน ใช้แก้ท้องอืด แน่น จุก เสียด ขับเสมหะ รักษาโรคผิวหนัง แก้ลมท้องเสียผลกระวานอยู่ในรายชื่อสมุนไพรที่มีการขึ้นทะเบียนยาแผนโบราณของกระทรวงสาธารณสุขถึง 949 ทะเบียน ฯลฯ กระวาน มีน้ำมันหอมระเหยซึ่งมีกลิ่นหอมคล้ายการบูรและพิมเสน เมื่อกลิ้นด้วยไอน้ำจะให้ น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 4.5 ประกอบด้วย camphor,  $\alpha$ -pinene, myrcene, limonene, linalool, borneol และ  $\alpha$ -terpineol limonene, myrcene เป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงกว่าชนิดอื่น กระวานที่ปลูกที่จังหวัด จันทบุรี ถือว่าเป็นกระวานที่มีคุณภาพดีที่สุดในประเทศไทย จึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศมาก ราคาสูงกว่ากระวานจากแหล่งอื่น ๆ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.11 ลูกกระวาน

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Shukla และคณะ (2009) ได้สกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบพืชสดของ *Lippia alba* ร่วมกับสารประกอบในน้ำมันหอมระเหย 2 ชนิดคือ geranial และ neral ในอาหาร Czapek's dox agar น้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 0.25 -1 ไมโครลิตรต่อมิลลิกรัม และสารประกอบของน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 1 ไมโครลิตรต่อมิลลิกรัม มาทดสอบกับเชื้อราที่เจริญในเมล็ดถั่ว 11 ชนิด ผลคือสามารถต้านเชื้อราทุกไอโซเลตที่ทดสอบได้ดี มีช่วงการยับยั้งอยู่ในช่วงร้อยละ 32.1-100 ค่าต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญ (MIC) กับความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ฆ่าเชื้อรา (MFC) สำหรับเชื้อรา *A. flavus* นั้นมีค่าต่ำกว่าการใช้สารเคมีฆ่าเชื้อรา และยังช่วยส่งเสริมการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ดถั่ว

Paranagama และคณะ (2003) ได้ทำการทดลองแยกเชื้อรา *A. flavus* จากข้าวที่เก็บไว้และระบุว่าเป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน นำมาทดสอบกับน้ำมันตะไคร้ ซึ่งยับยั้งได้ดีที่ความเข้มข้น 0.1-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม และสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์และเส้นใยของเชื้อราที่ความเข้มข้น 2.80 และ 3.46 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม ได้ตามลำดับ

Paster และคณะ (1995) ได้นำตัวอย่างน้ำมันหอมระเหยจากใบออริกาโนและใบโหระพามาทดสอบการเจริญของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus*, *A. niger* และ *A. orchraceus* ที่แยกได้จากข้าวสาลี ผลที่ได้ ค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้ง (MIC) ของน้ำมันจากออริกาโน คือ 2.0 ไมโครลิตรต่อลิตร ส่วนการยับยั้งสปอร์โดยสมบูรณ์จะอยู่ที่ 2.0-2.5 ไมโครลิตรต่อลิตร ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากใบโหระพาจะยับยั้งได้น้อยกว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบออริกาโน

Soliman และ Radeaa (2002) ได้ทดสอบน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากสมุนไพร 12 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus*, *A. niger*, *A. orchraceus* และ *Fusarium moniliforme* โดยพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบโหระพาและอบเชยให้ผลในการยับยั้งที่ดีมาก รองลงมาคือโป๊ยกั๊กกับยี่ห่วย ซึ่งมีผลต่อการเจริญของเชื้อราบนเมล็ดข้าวสาลีอีกด้วย

Belmont และคณะ (1998) ได้ทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร 11 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ในข้าวโพด น้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งเชื้อรา ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชย โหระพา สะระแหน่ กานพลู ซึ่งลดการปนเปื้อนของเชื้อราและไม่มีผลกระทบต่อการงอกและเจริญของเมล็ดข้าวโพด

Rasooli และ Abyane (2003) ได้ทำการทดสอบน้ำมันหอมระเหยจากใบโหระพา 2 สายพันธุ์ เพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* ซึ่งผลที่ได้สามารถยับยั้งการเจริญและผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินจากเชื้อราชนิดนี้ได้ดี และสามารถนำมาใช้เพื่อแทนสารเคมีฆ่าเชื้อราได้ดียิ่งอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

#### 3.1.1 วัสดุดิบ

วัสดุดิบที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ถั่วลิสงดิบ (*Arachis hypogaea*) และผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง 3 ชนิด ได้แก่ ถั่วลิสงทอดทั้งเมล็ด ถั่วลิสงคั่วป่น และถั่วตัด จำนวนชนิดละ 10 ตัวอย่าง โดยจะทำการเก็บตัวอย่างจากตลาดสดและจากห้างสรรพสินค้าในบริเวณเขตประเวศ ลาดกระบัง มีนบุรี บางกะปิ และบางนา จังหวัดกรุงเทพมหานคร โดยเก็บตัวอย่างบรรจุไว้ในถุงโพลีเอทิลีนเพื่อป้องกันการปนเปื้อนและเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส วัสดุดิบที่ใช้ในการสกัดน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ ลูกกระวาน (*Amomum testaceum*) กานพลู (*Syzygium aromaticum*) และเทียนตาคักแต่น (*Anethum graveolens*)

#### 3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เชื้อ *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus ochraceus* TISTR 3557, *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276, *Aspergillus terreus* TISTR 3109, *Aspergillus versicolor* TISTR 3460, *Alternaria alternata* TISTR 3282, *Penicillium citrinum* TISTR 3437 ที่ได้จากศูนย์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยและเชื้อ *Aspergillus flavus* PN-09 ที่แยกได้จากถั่วลิสงดิบ

#### 3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้แก่อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA; Scharlau chemie S.A. ประเทศสเปน) ที่ปรับพีเอชให้ได้ 3.5 ด้วยสารละลายกรดทาร์ตริกความเข้มข้นร้อยละ 10 (acidified PDA) อาหาร Dichloran ร้อยละ 18 Glycerol Agar (DG-18) ปรับค่าปริมาณน้ำอิสระของอาหารโดยใช้กลีเซอรอล และอาหารจำลองจากถั่ว

#### 3.1.4 สารเคมีและชุดทดสอบ

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ สารละลายกรดทาร์ตริกความเข้มข้นร้อยละ 10 น้ำตาลกลูโคส สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ผงวุ้น (agar) โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) กลีเซอรอล (glycerol) ไดคลอแรนและคลอแรมเฟนิคอล (dichloran และ chloramphenicol) DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Fluka, Germany) วิตามินอี ( $\alpha$ -tocopherol, Fluka, Switzerland) อะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 3.6 (acetate buffer, Merck, Germany) TPTZ (2,4,6-tripyridyl-5-triazine, Fluka, Switzerland) กรดไฮโดรคลอริก (VWR International S.A.S, France)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฟอร์ริกคลอไรด์ (ferric chloride hexahydrate, POCH, Poland) สารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate heptahydrate, Merck, Germany) สารละลายกรดแกลลิก (gallic acid, Fluka, Spain) แคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate, Merk, Germany) สารละลายอิมตัวของแมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride, Merck, Germany) Folin-Ciocalteu (Folin-Ciocalteu's phenol, Fluka, Switzerland) บิวเทอิลไฮดรอกซีโทลูอีน (butylated hydroxytoluene, FoodEQ) เมทานอลและชุดทดสอบ DOA-aflatoxin ELISA ของกรมวิชาการเกษตรซึ่งประกอบด้วยสารอะฟลาทอกซินบี1 มาตรฐาน AFB<sub>1</sub>-HRP conjugate substrate (TMB) stopping solution conjugate buffer และ washing buffer

### 3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow; Clean รุ่น V6 บริษัท แลปเซอร์วิส) ตู้หม้อนึ่ง (บริษัท Memmert GmbH+co.KG ประเทศญี่ปุ่น) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave; ToMy รุ่น ES-315 บริษัท ToMy kogyo ประเทศญี่ปุ่น) เครื่องวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (เครื่องวัด  $a_w$ ; AquaLAB รุ่น 3TE ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องผสมสาร (vortex mixer; Scientific Industries รุ่น G560E บริษัท Scientific industries Inc. ประเทศญี่ปุ่น) ชุดกลั่นน้ำมันหอมระเหย เครื่องตีปั่น (stomacher) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (microscope; Olympus CH30 รุ่น CH3ORF 200 บริษัท ธิฟอว์แอลอินเตอร์เนชันแนล ประเทศญี่ปุ่น) ฮีมาไซมิเตอร์ (haemocytometer) เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (microplate reader; iEMS Reader MF บริษัท LabSystem) และเครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่างๆที่จำเป็น

## 3.2 วิธีการทดลอง

### 3.2.1 การศึกษาเชื้อราในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง

ทำการสุ่มตัวอย่างถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง ผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง ได้แก่ ถั่วลิสงดิบ ถั่วลิสงทอดทั้งเมล็ด ถั่วตัด และถั่วลิสงคั่วป่น ชนิดละ 10 ตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างถั่วทั้งหมดมาวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ และวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อรา โดยถั่วลิสงทั้งเมล็ดจะวิเคราะห์โดยวิธี direct plating และถั่วลิสงป่นกับถั่วตัดวิเคราะห์โดยวิธี dilution plating โดยเปรียบเทียบการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ acidified PDA และ DG-18 จากนั้นทำการจำแนกชนิดของเชื้อราที่พบซึ่งมีรายละเอียดของวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

#### ก) การวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ

นำมาตรวจสอบโดยใช้เครื่องวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ ( $a_w$ ) ด้วยเครื่องวัด  $a_w$  AquaLAB รุ่น 3TE โดยใส่ตัวอย่างลงในตลับพลาสติกที่ใช้สำหรับตรวจวัดปริมาณน้ำอิสระประมาณครึ่งหนึ่งของปริมาตรตลับทั้งหมด จากนั้นนำไปวัดค่าปริมาณน้ำอิสระที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็น (ข.) การวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อราและยีสต์ที่มีในตัวอย่างถั่วลิสงให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ. 1) การวิเคราะห์หาเชื้อราที่ปนเปื้อน โดยวิธี direct plating ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการวิเคราะห์หาเชื้อราที่ปนเปื้อนในเมล็ดถั่วลิสงโดยวิธี direct plating ตามวิธีของ Tournas และคณะ (2001) ดังนี้ ชั่งตัวอย่างถั่วลิสง 50 กรัม ใส่บีกเกอร์ปราศจากเชื้อปริมาตร 300 มิลลิลิตร เติมน้ำสะอาดละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ลงในบีกเกอร์แล้วเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 2 นาที เพื่อชะล้างผิวของตัวอย่างและล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำดีไอออไนซ์ที่ปลอดเชื้ออีก 1-2 ครั้งนำตัวอย่างเมล็ดถั่วมาวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ acidified PDA และ DG-18 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อควรใช้ทันทีที่เตรียม ไม่ควรเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำไว้นานเกิน 24 ชั่วโมง ในการวางตัวอย่างลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำโดยใช้ปากคีบที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 แล้วนำไปปนไฟ จากนั้นจึงนำไปคีบตัวอย่างถั่ววางลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แห้งตัวแล้ว ระวังอย่าให้ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเสียหาย โดยวางตัวอย่างประมาณ 10-20 เมล็ด ในแต่ละจาน (ขึ้นอยู่กับขนาดของเมล็ดถั่ว) แต่ละตัวอย่างทำทั้งหมด 50 เมล็ด ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด ควรใช้ปากคีบหลายอันเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดความร้อนสูงเกินไปเมื่อนำปากคีบไปปนไฟ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อราและนับจำนวนตัวอย่างที่มีเชื้อราขึ้น ถ้ายังไม่พบการเจริญของเชื้อราให้บ่มต่อไปอีกประมาณ 48 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ของเชื้อราที่เผชิญกับสภาพเครียดจากความร้อนหรือสารเคมี มีเวลาเพียงพอที่จะเติบโตได้ ค้นหาปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อราในตัวอย่างถั่วแต่ละชนิดโดยคิดเป็นร้อยละของจำนวนขึ้นตัวอย่างทั้งหมด เช่น หากพบการเจริญครบทั้ง 50 เมล็ดแสดงว่ามีการเจริญของเชื้อราร้อยละ 100 บนถั่วชนิดนั้นๆ

ข.2) การวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดในอาหารด้วยวิธี dilution plating

การวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดในถั่วลิสงป่นและถั่วตัดด้วยเทคนิค spread plate ตามวิธีของ Tournas และคณะ (2001) ซึ่งทำได้โดยชั่งตัวอย่างถั่วลิสงป่น 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อลงในถุงสำหรับตีป่น จากนั้นเติมน้ำสะอาดละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ระดับความเจือจาง  $10^{-1}$  แล้วนำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่น (stomacher) เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างต่อไปอีก 2 ระดับความเจือจาง จนถึงระดับความเจือจางที่  $10^{-3}$  จากนั้นเปิดตัวอย่างทั้ง 3 ระดับความเจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ acidified PDA และ DG-18 (แต่ละระดับความเจือจางทำซ้ำชนิดละ 2 หรือ 3 จาน) จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลปลอดเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนด 5 วันแล้วยังไม่พบการเจริญของเชื้อ บ่มเชื้อต่ออีก 48 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนโคโลนีของเชื้อราและยีสต์โดยนับเฉพาะจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 10-150 โคโลนี รายงานจำนวนเชื้อราและยีสต์ที่พบเป็นค่า CFU ต่อกรัม

ค.) การแยกเชื้อรา

ในการแยกเชื้อราจากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด จะทำหลังจากนับจำนวนโคโลนีเสร็จสิ้นแล้ว โดยขั้นแรกสังเกตสีของโคโลนี การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะเส้นใยที่เจริญบน

อาหาร กลิ่น ลักษณะหยดน้ำที่เกิดขึ้นบน โคลิโคนี เพื่อคุณลักษณะของเชื้อรา จากนั้นทำการเขียนสปอร์ของเชื้อราที่มีลักษณะแตกต่างกันด้วยเข็มเขียนเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ทำการจุดสามจุดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน สังเกตเชื้อที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อว่ามีความบริสุทธิ์หรือไม่ ถ้ายังไม่บริสุทธิ์ให้ทำการแยกเชื้อราซ้ำอีกหลายครั้งจนกว่าจะได้เชื้อราที่บริสุทธิ์เมื่อได้เชื้อราที่บริสุทธิ์แล้วถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหาร PDA เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการจำแนกชนิดของเชื้อราต่อไป

#### ง.) การจำแนกชนิดของเชื้อรา

นำเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้มาจำแนกชนิดด้วยวิธีการของ Samson และคณะ (2004) ซึ่งเริ่มได้จากการสังเกตกลุ่มของ โคลิโคนีด้วยวิธี direct macroscopic และสังเกตลักษณะ โครงสร้างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (วิธี direct microscopic) สำหรับวิธี direct macroscopic สามารถทำได้โดยนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อรามาส่องด้วยกล้อง stereomicroscope เพื่อสังเกตลักษณะของเส้นใย สีของเส้นใย ชนิดของสปอร์ ลักษณะของหัวสปอร์ สี ขนาด รูปร่าง การจัดเรียงตัวของอับสปอร์ ลักษณะของโคนิเดีย รูปร่างการจัดเรียงตัวของสเตริกมา และลักษณะ โครงสร้างของเชื้อรา ส่วนวิธี direct microscopic ทำได้โดยเขียนเชื้อราที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อมาทำ wet mount บนสไลด์เพื่อสังเกตลักษณะ โครงสร้างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยถ้าเชื้อราอยู่ในกลุ่ม Zygomycetes, Coelomycetes และยีสต์ ควรจะใช้น้ำกลั่นหรือ shear mounting fluid ในการทำ wet mount บนสไลด์ แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

#### 3.2.2 การศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

ทำการทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร 3 ชนิด ได้แก่ ลูกกระวาน กานพลูและเทียนตาดักแดนนที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจำนวน 9 ชนิด ซึ่งมีรายละเอียดของวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

#### ก.) การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร

นำสมุนไพร ได้แก่ ลูกกระวาน กานพลูและเทียนตาดักแดนนมากลั่น โดยใช้เครื่อง Clevenger's apparatus ทำการกลั่นน้ำมันหอมระเหยเป็นเวลา 3 ชั่วโมงและเก็บน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นได้ไว้ในขวดแก้วสีชาปอดเชื้อ ทำการบันทึกผลได้ของน้ำมันหอมระเหย จากนั้นเติมสาร Anhydrous sodium sulphate เพื่อขจัดน้ำที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหยออกแล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 (Tripathi และคณะ, 2004) เก็บรักษาน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยระมัดระวังอย่าให้โดนแสง

#### ข.) การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา

ทำการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่จะใช้ทดสอบจำนวน 9 ชนิดได้โดย นำเชื้อราบริสุทธิ์แต่ละชนิดที่เจริญอยู่บนอาหาร PDA ได้แก่ *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *A. ochraceus* TISTR 3557, *A. parasiticus* TISTR 3276, *A. terreus* TISTR 3109, *A. versicolor* TISTR

3460, *Alternaria alternata* TISTR 3282, *Penicillium citrinum* TISTR 3437 และ *A. flavus* PN-09 ที่แยกได้จากถั่วลิสงดิบ มาเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีส่วนผสมของ Tween 80 ร้อยละ 0.1 โดยเติมลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อราแต่ละชนิด จากนั้นเขี่ยเส้นใยให้หลุดออกจากผิวหน้าอาหารนำมากรองด้วยผ้าขาวบางปลอดเชื้อ 3-4 ชั้นเพื่อกรองเอาเศษขุ่นและเส้นใยเชื้อราออก นำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้ไปปรับความเข้มข้นของสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีส่วนผสมของ tween 80 ร้อยละ 0.1 ให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร

#### ค.) การเตรียมอาหารจำลองจากถั่ว (Peanut Agar Medium)

อาหารจำลองจากถั่วเตรียมได้โดยชั่งมันฝรั่ง 200 กรัม เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนเดือดเป็นเวลา 25 นาที จากนั้นเติมถั่วลิสงป่น 50 กรัมลงไปต้มอีก 5 นาที จากนั้นกรองเอาส่วนน้ำที่ต้มได้ ใส่วุ้น 15 กรัม น้ำตาลเต็ทซ์โตส 15 กรัม แล้วทำให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ง.) การศึกษาสมบัติการต้านการเจริญของเชื้อราโดยน้ำมันกระวาน กานพลูและเทียนตาคักแตน

ทำการหาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ กระวาน กานพลูและเทียนตาคักแตน ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 8 ชนิด *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *A. ochraceus* TISTR 3557, *A. parasiticus* TISTR 3276, *A. terreus* TISTR 3109, *A. versicolor* TISTR 3460, *Alternaria alternata* TISTR 3282 และ *Penicillium citrinum* TISTR 3437 โดยวิธี dilution ตามวิธีการของ Collin และ Lyne (2007) ขึ้นแรกเตรียม stock solution ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ความเข้มข้นร้อยละ 10 จากนั้นเตรียมอาหารจำลองจากถั่วที่มีน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างกันในช่วง 15 ระดับความเข้มข้น (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยเติมน้ำมันหอมระเหยจาก Stocksolution ความเข้มข้นที่เตรียมไว้ลงในจานเพาะเชื้อ โดยปริมาตรของน้ำมันหอมระเหยและปริมาตรน้ำกลั่นรวมกันได้ 1 มิลลิลิตร ซึ่งสามารถดูรายละเอียดได้จาก ภาคผนวก (ก.) จากนั้นทำการเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมอาหารจำลองจากถั่วซึ่งเตรียมได้จากขั้นตอนที่ 3.2.2 (ค) ที่ยังหลอมเหลวอยู่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 19 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่ว่างนกระทั่งอาหารแข็งตัว แล้วจึงหยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราชนิดต่างๆที่ได้เตรียมไว้ในขั้นตอนที่ 3.2.2 (ข) ลงไปตรงกลางของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อจาน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน โดยเนกาทีฟคอนโทรลให้ใช้น้ำกลั่นแทนน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำในทุกระดับความเข้มข้น เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการบ่มแล้วทำการประเมิน โดยดูที่จานเพาะเชื้อที่ไม่มีมีการเจริญของเชื้อราเกิดขึ้น โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญ (MIC) เป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันซึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์เปรียบเทียบกับค่า MIC ที่ได้และ

คัดเลือกน้ำมันที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจำนวน 2 ชนิดเพื่อมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

### 3.2.3 การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร

ก.) การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรด้วยวิธี DPPH

สามารถทำการทดลองได้ตามวิธีการของ Singh และคณะ (2008) โดยนำน้ำมันหอมระเหย ทั้ง 3 ชนิดมาทำความเข้าใจให้มีความเข้มข้นเหมาะสมตามที่ต้องการด้วยเมทานอล จากนั้นบีบอัด น้ำมันหอมระเหยที่เจือจางมา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร (ตามวิธีการในภาคผนวก ข) บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยชุดควบคุมจะใช้เมทานอลแทนน้ำมันหอมระเหย และใช้แอลฟา-โทโคเฟอรอลและบีโอซีที เป็น positive control ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในแต่ละความเข้มข้นนำไปคำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้งของ DPPH radical ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%I = \frac{(A_0 - A_s)}{A_s}$$

$A_0$  คือค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม

$A_s$  คือค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย

จากนั้นนำค่าร้อยละของการยับยั้ง โดย DPPH กับค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาค่า  $IC_{50}$  ซึ่งก็คือค่าความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่สามารถกำจัด DPPH radical ได้ร้อยละ 50

ข.) การศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรด้วยวิธี FRAP

ทำการทดลองตามวิธีการของ Lado และคณะ (2004) ซึ่งเป็นวิธีการศึกษาสมบัติการเป็นตัวรีดิวซ์ของน้ำมันหอมระเหย โดยจะหาความสามารถในการเปลี่ยนสารประกอบเชิงซ้อนของ  $Fe^{3+}$ -TPTZ (ferric tripyridyltriazine) ให้กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ  $Fe^{2+}$ -TPTZ (ferrous tripyridyltriazine) สารที่ใช้ในการทดสอบคือ FRAP reagent ซึ่งประกอบด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 3.6 ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร สารละลาย TPTZ reagent ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (ตามวิธีการในภาคผนวก ข) ทำได้โดยการบีบอัด FRAP reagent ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรใส่ลงใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า  
 หอดูดทดลองที่มีน้ำมันหอมระเหยอยู่ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส  
 ไม่วากรณ์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยใช้ FRAP reagent เป็นชุดควบคุมแทนน้ำมันหอมระเหย นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ในหน่วยมิลลิโมลาร์ต่อตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย 1 มิลลิกรัม

การสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 0-0.3 มิลลิโมลาร์ (ตามวิธีการในภาคผนวก ข) โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น แต่จะใช้สารละลายเฟอร์รัสซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ แทนน้ำมันหอมระเหย และสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับระดับความเข้มข้นของสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต ซึ่งจะได้ความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง และหาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ต่อไป

ค.) การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพร

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรจะทำตามวิธีการของ Dastmalchi และคณะ (2007) โดยเตรียมน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปิดน้ำมันหอมระเหยปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใสลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง (ultrapure water) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และเติมสาร folic acid reagent ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง ผสมแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 0 ถึง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตามวิธีการในภาคผนวก ข) ทำการทดลองเช่นเดียวกับวิธีข้างต้นแล้วนำมาเขียนกราฟเส้นตรงและหาสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของตัวอย่างน้ำมันหอมระเหย

### 3.2.4 การประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและเทียนตาตั๊กแตนในการลดการปนเปื้อนและการสร้างอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกน้ำมันจากสมุนไพร 2 ชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในบรรจุภัณฑ์สำหรับบรรจุถั่วลิสงดิบเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อราและลดการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดย *Aspergillus flavus* TISTR 3041 และ *Aspergillus flavus* PN-09 ที่แยกได้จากถั่วลิสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ก.) การเตรียมถั่วลิสง

นำตัวอย่างถั่วลิสงคิบใส่บีกเกอร์ปราศจากเชื้อปริมาตร 300 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ลงในบีกเกอร์ แล้วเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 2 นาที เพื่อชะล้างผิวของตัวอย่างและล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำดีไอออไนซ์ที่ปลอดเชื้ออีก 1-2 ครั้ง (Mecteau และคณะ, 2002)

### ข.) การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา

ทำการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่จะใช้ทดสอบจำนวน 2 ชนิดได้โดย นำเชื้อราบริสุทธิ์แต่ละชนิดที่เจริญอยู่บนอาหาร PDA ได้แก่ *A. flavus* TISTR 3041 และ *A. flavus* PN-09 ที่แยกได้จากถั่วลิสง มาเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีส่วนผสมของ Tween 80 ร้อยละ 0.1 ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อราแต่ละชนิด จากนั้นเขี่ยเส้นใยให้หลุดออกจากผิวหน้าอาหารนำมากรองด้วยผ้าขาวบางปลอดเชื้อ 3-4 ชั้น เพื่อกรองเอาเศษขุ่นและเส้นใยเชื้อราออก นำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้ไปปรับความเข้มข้นของสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีส่วนผสมของ tween 80 ร้อยละ 0.1 ให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร

### ค.) การประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยในภาชนะบรรจุถั่วลิสง

การศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยของสมุนไพรไทยต่อการลดการปนเปื้อนและการสร้างอะฟลาทอกซิน โดย *A. flavus* ทำตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Prakash และคณะ (2012) ซึ่งทำได้โดยนำถั่วที่ชะล้างผิวแล้วมาเติมสปอร์ของเชื้อรา 2 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus flavus* TISTR 3041 และ *Aspergillus flavus* PN-09 ที่เตรียมไว้ในขั้นตอน ก. โดยการนำถั่วลิสงทุกเมล็ดมาคลุกกับสารแขวนลอยสปอร์แล้วนำถั่วลิสงที่ปนเปื้อนด้วยสปอร์เชื้อราร้อยละ 100 ไปซั่งใส่ในจานเพาะเชื้อ 20 กรัมต่อจาน จากนั้นหยดน้ำมันหอมระเหยลงบนฝาจาน แต่ละจานมีความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยแตกต่างกัน ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยกานพลูความเข้มข้น 0, 1 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำมันหอมระเหยจากเทียนตาตั๊กแตนความเข้มข้น 0, 2, 4 และ 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไม้พินสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยน้ำมันบนฝาจานให้ทั่ว จากนั้นหักส่วนของหัวไม้พินสำลีที่มีน้ำมันหอมระเหยทิ้งไว้ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อก่อนจะปิดฝาให้สนิท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพควบคุมความชื้นร้อยละ 75 (ในเดซิเดเตอร์ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์อิ่มตัว) เมื่อบ่มจนครบ 7 วัน ตรวจสอบปริมาณการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่ผิวเมล็ดถั่วลิสงและนำเมล็ดถั่วมาตรวจสอบปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินบี1

### ง) การตรวจสอบสารอะฟลาทอกซินบี1 โดยวิธี ELISA

ทำการตรวจสอบสารอะฟลาทอกซินบี1 ในตัวอย่างถั่วทั้งเมล็ดจากขั้นตอนที่ 3.2.4 (ค) ด้วยชุดทดสอบ DOA-Aflatoxin ELISA โดยการนำตัวอย่าง 20 กรัม มาบดให้ละเอียดในถุงโพลีเอทิลีน จากนั้นนำตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วใส่ในพลาสติกดีมเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาทีเพื่อแยกส่วนที่

ใส่ กรองเฉพาะส่วนที่ใสผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ส่วนที่กรองได้ (มีความเข้มข้นเป็นสัดส่วนเท่ากับ 1:5) จากนั้นบีบส่วนใสที่กรองได้ 1 มิลลิลิตรผสมกับ PBS-T ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จะได้สารสกัดเจือจาง 1:20 เท่า จากนั้นหยดสารพิษมาตรฐานปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบจำนวน 5 ความเข้มข้น นำสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตรที่สกัดได้มาหยดลงในหลุมทดสอบที่เหลือ จากนั้นหยดเอนไซม์คอนจูเกต (AFB<sub>1</sub> HRP conjugate) ตามลงไปทุกหลุมทดสอบ เขย่าเล็กน้อยแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 20-30 นาที เติสารในหลุมทดสอบทิ้งแล้วล้างด้วย PBS-T ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ 3 ครั้ง หยดสารสับสเตรท ปริมาตร 100 ไมโครลิตรทุกหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 5-10 นาที ปฏิกริยาจะเกิดเป็นสีฟ้าสามารถอ่านผลเชิงคุณภาพได้ด้วยสายตาโดยเปรียบเทียบกับสีฟ้าของสารพิษมาตรฐาน หยด ปฏิกริยาโดยเติม stopping solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปฏิกริยาจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง นำไปอ่านค่าด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร แล้วนำไปคำนวณหา ปริมาณสารอะฟลาทอกซิน โดยการนำค่าเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสงของแต่ละตัวอย่างมาพล็อตลงบนกราฟมาตรฐานของสารพิษมาตรฐาน ค่าที่อ่านได้บนแกน X ต้องคูณด้วย 20 (dilution factor) จะได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่างเป็นปริมาณ ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  หรือ  $\text{ng}/\text{ml}$ )



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

# ผลการวิจัยและอภิปรายผล

### 4.1 ผลการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและการจำแนกชนิดของเชื้อราในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง

จากการวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อราในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสงจำนวนทั้งหมด 4 ชนิด ชนิดละ 10 ตัวอย่าง ได้แก่ ถั่วลิสงดิบ ถั่วลิสงทอด ถั่วลิสงคั่วบดและถั่วตัด ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.2 พบว่าเมื่อวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อราบนถั่วลิสงดิบด้วยวิธี direct plating พบว่ามีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อราค่อนข้างสูง โดยพบเชื้อราเจริญบนอาหาร DG18 มากกว่าบนอาหาร acidified PDA ปริมาณเชื้อราที่ปนเปื้อนเฉลี่ยที่พบบนอาหาร Acidified PDA และอาหาร DG18 คิดเป็นร้อยละ 48.6 และร้อยละ 86.2 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) สำหรับถั่วลิสงทอดพบการปนเปื้อนของเชื้อราเฉลี่ยในอาหาร Acidified PDA และ DG18 ใกล้เคียงกันซึ่งคิดเป็นร้อยละ 70.8 และร้อยละ 76.2 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกันจะเห็นได้ว่า เชื้อราบนเมล็ดถั่วลิสงเจริญบนอาหาร DG18 ได้ดีกว่าบนอาหาร acidified PDA เมื่อทำการแยกเชื้อราที่เจริญบนถั่วลิสงดิบและถั่วลิสงทอดแล้วนำมาจำแนกชนิดของเชื้อรา ปรากฏว่าพบเชื้อราทั้งหมด 3 สกุล ได้แก่ *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp. และ *Penicillium* spp. ซึ่งในตัวอย่างถั่วลิสงดิบจะพบเชื้อรา *Aspergillus* spp. เป็นจำนวนร้อยละ 65.38 และร้อยละ 51.16 ของเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดในอาหาร Acidified PDA และ DG18 ตามลำดับ ซึ่งพบเชื้อรา *Aspergillus flavus* บนตัวอย่างถั่วลิสงดิบ PN-09 ที่แยกได้จากอาหาร DG18 ส่วนในตัวอย่างถั่วลิสงทอดจะพบเชื้อรา *Aspergillus* spp. เป็นจำนวนร้อยละ 56.52 และร้อยละ 39.29 ของเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดในอาหาร Acidified PDA และ DG18 ตามลำดับ เชื้อรารหัส PN-09 ที่แยกได้จากถั่วลิสงดิบตัวอย่างที่ 9 บนอาหาร Acidified PDA พบว่าเป็น *Aspergillus flavus* ซึ่งมีลักษณะดังนี้ โคลนีสีสีเขียวอมเหลือง เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นว่ามีส่วน conidial head แผล่ออกจากศูนย์กลาง (radiate) สปอร์มีลักษณะกลมต่อกันเป็นสายโซ่ มี phalides ที่เจริญอยู่บน metulae และเจริญได้ดีบนอาหาร MEA (รูปที่ 4.1)

ส่วนปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อราในถั่วลิสงคั่วบดและถั่วลิสงตัดเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี dilution plating (ตารางที่ 4.2) พบว่าถั่วลิสงคั่วบดส่วนใหญ่มีจำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดค่อนข้างน้อยโดยพบการเจริญของเชื้อราบนอาหาร acidified PDA และบนอาหาร DG18 จำนวน

$<10 - 7.0 \times 10^3$  CFU/g และ  $<10 - 2.5 \times 10^2$  CFU/g ตามลำดับ ส่วนถั่วลิสงตัดมีปริมาณการปนเปื้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าของเชื้อราบนอาหาร acidified PDA และบนอาหาร DG18 จำนวน  $5 \times 10^1 - 3.5 \times 10^3$  CFU/g และ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$<10 - 2.5 \times 10^3$  CFU/g ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อราและยีสต์ที่เจริญบนอาหาร acidified PDA มีจำนวนมากว่าเชื้อราและยีสต์ที่เจริญบนอาหาร DG18 เมื่อทำการแยกเชื้อราที่เจริญบนถั่วลันเตากั่วบดและถั่วลันเตากั่วบดแล้วนำมาจำแนกชนิดจะพบยีสต์และรา ได้แก่ *Aspergillus* spp. 1 ไอโซเลต ส่วนไอโซเลตอื่นๆที่แยกได้พบว่าเป็นยีสต์ นอกจากนี้ยังทำการวัดปริมาณน้ำอิสระ (water activity ;  $a_w$ ) พบว่าถั่วลันเตากั่วบดและถั่วลันเตากั่วบดมีค่า  $a_w$  ก่อนข้างต่ำ (0.35 – 0.37) ส่วนถั่วลันเตากั่วดิบและถั่วลันเตากั่วบดมีค่า  $a_w$  สูงกว่า (0.56 – 0.61)

ในการทดลองนี้การที่พบเชื้อราปนเปื้อนมากในถั่วลันเตาโดยเฉพาะในถั่วลันเตากั่วดิบและถั่วลันเตากั่วบดนั้น ผลการวิเคราะห์นี้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ของนักวิจัยท่านอื่น เช่นงานวิจัยของ Nakai และคณะ (2008) ซึ่งได้เก็บตัวอย่างถั่วลันเตาจากเมือง Tupã รัฐ São Paulo ประเทศบราซิล จำนวน 120 ตัวอย่างนำมาวิเคราะห์หาเชื้อรา ปรากฏว่าพบเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp., *Drechoderma* spp., *Trichoderma* spp. และเชื้อราที่ไม่มีการสร้างสปอร์ โดยเชื้อราที่พบปริมาณมากที่สุด 2 อันดับแรกคือ *Fusarium* spp. (ร้อยละ 67.7 บนเปลือกและร้อยละ 25.8 ข้างในเมล็ดถั่วลันเตา) รองลงมาคือ *Aspergillus flavus* (ร้อยละ 10.3 บนเปลือกและร้อยละ 21.8 ข้างในเมล็ดถั่วลันเตา) เช่นเดียวกับผลงานวิจัยของ Zorzete และคณะ (2011) ได้นำถั่วจากแปลงเพาะปลูก 2 ชนิดคือ ถั่วสายพันธุ์ IAC 886 และ Caiapõ นำมาวิเคราะห์หาเชื้อรา พบว่าในถั่วสายพันธุ์ IAC 866 พบเชื้อรา *Fusarium* spp. และ *Penicillium* spp. ร้อยละ 3 ส่วนในถั่วสายพันธุ์ Caiapõ พบเพียงแต่เชื้อรา *Aspergillus flavus* (ร้อยละ 12) เท่านั้น

เชื้อราที่พบปนเปื้อนมากในถั่วลันเตากั่วดิบชี้ให้เห็นถึงสภาวะการผลิดที่ไม่ดีคิดว่าเชื้อราที่ปนเปื้อนในถั่วลันเตาน่าจะมาจากเชื้อราในสภาพแวดล้อมหลังการเก็บเกี่ยว เช่น ในดิน อากาศ น้ำ และอื่นๆ Passone และคณะ (2008) กล่าวว่า ถั่วลันเตาประกอบด้วยสารอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะสารอาหารที่ให้พลังงานที่มีส่วนประกอบ ได้แก่ ไขมัน โปรตีนและยังมีปริมาณเส้นใยอาหารค่อนข้างสูง ซึ่งลักษณะนี้ทำให้ถั่วลันเตาปนเปื้อนต่อเชื้อราได้ง่ายทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว นอกจากนี้อาจเป็นผลมาจากกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม จึงทำให้ถั่วลันเตาและผลิตภัณฑ์จากถั่วลันเตาปนเปื้อนโดยเชื้อราได้ง่าย

ส่วนการที่ถั่วลันเตากั่วบดและถั่วลันเตากั่วบดมีเชื้อราปนเปื้อนน้อย ในกรณีของถั่วลันเตากั่วบดอาจเป็นเพราะในกระบวนการผลิตมีการให้ความร้อนสูงถึง 70 องศาเซลเซียสในขั้นตอนการคั่วทำให้มีปริมาณน้ำในถั่วลันเตาลดลง โดยจะเห็นได้จากค่า  $a_w$  ที่ต่ำของถั่วลันเตากั่วบด (0.221 - 0.499) Jay และคณะ (2005) ได้กล่าวว่า  $a_w$  ต่ำสุดที่เชื้อราที่ชอบความแห้ง (xerophilic mold) ชนิด *Aspergillus echinulatus* สามารถเจริญได้คือที่  $a_w$  0.64 ดังนั้นจึงพบเชื้อราเจริญได้น้อยในถั่วลันเตากั่วบด ส่วนการที่ถั่วลันเตากั่วดิบพบยีสต์มากกว่าเชื้อรา อาจเป็นเพราะส่วนประกอบของถั่วลันเตากั่วดิบมีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบสูงทำให้มีค่า  $a_w$  ต่ำ (0.308 – 0.56) ทำให้ตรวจพบยีสต์ในถั่วลันเตากั่วดิบ ซึ่งการผลิตถั่วลันเตากั่วดิบ (มีส่วนผสมดังนี้ ถั่วลันเตากั่ว น้ำตาลทราย เเปาะแซ่ งาขาวคั่ว และน้ำมันพืช) ทำได้โดยนำถั่ว

ลีสงที่ล้างสะอาดแล้วมาคว่ำด้วยไฟอ่อน นำน้ำคาลมาเคี่ยวแล้วผสมเบะแซลงไปเคี่ยวให้เข้ากัน นำถั่วลีสงที่คั่วแล้วลงไปคลุกให้ทั่ว จากนั้นเทลงบนแม่พิมพ์แล้วโรยงา พักไว้ให้เย็นจึงค่อยตัดเป็นชิ้นๆ (นัทรพงศ์, 2552) ดังนั้นยีสต์และเชื้อราที่ปนเปื้อนในถั่วลีสงตัดอาจเป็นผลมาจากสาเหตุลักษณะการผลิตที่ไม่ดีทำให้เชื้อราและยีสต์ที่มีในสิ่งแวดล้อม เช่น *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp. และยีสต์ปนเปื้อนลงในถั่วลีสงตัดได้



ก. ลักษณะ โครงสร้าง *A. flavus* PN-09  
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ข. ลักษณะ โคลินีของ *A. flavus* PN-09  
บนอาหาร Acidified PDA

รูปที่ 4.1 ลักษณะของ *Aspergillus flavus* PN-09

ก. ลักษณะ โครงสร้าง *A. flavus* PN-09 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ข. ลักษณะ โคลินีของ *A. flavus* PN-09 บนอาหาร Acidified PDA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 การปนเปื้อนของเชื้อราในถั่วลิสงดิบและถั่วลิสงทอดทั้งเมล็ด

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวน (ตัวอย่าง)	a <sub>w</sub> (25°C)		การปนเปื้อน (ร้อยละ)				ไอโซเลตของเชื้อราที่แยกได้	
		ช่วง	ค่าเฉลี่ย	acidified PDA		DG18		acidified PDA	DG18
				ช่วง	ค่าเฉลี่ย	ช่วง	ค่าเฉลี่ย		
ถั่วลิสงดิบ	10	0.423-0.674	0.614	12-86	48.6	6-100	86.2	<i>Aspergillus</i> (16) <i>A. flavus</i> PN-09 (1) <i>Rhizopus</i> (6) <i>Penicillium</i> (3)	<i>Aspergillus</i> (22) <i>Rhizopus</i> (16) <i>Penicillium</i> (5)
ถั่วลิสงทอด	10	0.426-0.682	0.555	24-100	70.8	36-100	76.2	<i>Aspergillus</i> (13) <i>Rhizopus</i> (7) <i>Penicillium</i> (3)	<i>Aspergillus</i> (11) <i>Rhizopus</i> (13) <i>Penicillium</i> (4)

ตารางที่ 4.2 จำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดในถั่วลิสงคั่วบดและถั่วลิสงคั่วตัด

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวน (ตัวอย่าง)	a <sub>w</sub> (25°C)		จำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมด (CFU/g)		จำนวนไอโซเลตของเชื้อราที่แยก	
		ช่วง	เฉลี่ย	acidified PDA	DG18	acidified PDA	DG18
ถั่วลิสงคั่วบด	10	0.221-0.499	0.351	< 10 <sup>1</sup> - 2.2x10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>1</sup> - 2.5x10 <sup>2</sup>	-	<i>Aspergillus</i> (1) Yeast (1)
ถั่วลิสงคั่วตัด	10	0.308-0.561	0.369	5x10 <sup>1</sup> - 3.5x10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>1</sup> - 2.5x10 <sup>3</sup>	Yeast (1)	<i>Aspergillus</i> (1) Yeast (3)

## 4.2 ผลของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากสมุนไพรในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

### 4.2.1 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยในสมุนไพร

เมื่อนำสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดมากลั่นน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีการกลั่นไอน้ำพบว่าสมุนไพร กระวาน กานพลูและเทียนตาตั๊กแตนมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยร้อยละ 4.13, 3.47 และ 1.83 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่ได้ในสมุนไพรแต่ละชนิด

ชนิดของสมุนไพร	ปริมาณน้ำมันหอมระเหย <sup>a</sup> ± SD (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักพืชแห้ง 100 กรัม)
กระวาน	4.13 ± 0.35
กานพลู	3.47 ± 0.23
เทียนตาตั๊กแตน	1.83 ± 0.06

<sup>a</sup>ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ

### 4.2.2 สมบัติการต้านการเจริญของเชื้อราโดยน้ำมันหอมระเหยจากกระวาน กานพลูและเทียนตาตั๊กแตน

จากการวิเคราะห์ค่า MIC ของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรทั้งสามชนิด ได้แก่ กระวาน กานพลู และเทียนตาตั๊กแตน โดยวิธี agar dilution พบว่า น้ำมันกานพลู สามารถออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราทุกสายพันธุ์ได้ดีที่สุด โดยเชื้อราที่มีความไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันกานพลูมากที่สุด ได้แก่ *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. terreus*, *A. ochraceus*, *P. citrinum*, *Al. alternata* ซึ่งมีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม ส่วนเชื้อราที่มีความต้านทานต่อน้ำมันกานพลู คือ *A. versicolor* ซึ่งมีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม น้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพรองลงมาได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากเทียนตาตั๊กแตน โดยเชื้อราที่มีความไวต่อน้ำมันเทียนตาตั๊กแตน ได้แก่ *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. terreus*, *P. citrinum*, *Al. alternata* ซึ่งมีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม ส่วนเชื้อราที่มีความต้านทานต่อน้ำมันเทียนตาตั๊กแตน ได้แก่ *A. ochraceus* และ *A. versicolor* ซึ่งมีค่า MIC ที่ความเข้มข้น 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม เชื้อราทุกสายพันธุ์มีความต้านทานต่อน้ำมันกระวานค่อนข้างสูง โดยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ยับยั้งเชื้อราทุกชนิดจะอยู่ในระดับที่เท่ากันคือ 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม (ตารางที่ 4.4)

ในการทดสอบด้วยวิธี agar dilution พบว่าน้ำมันกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทุกชนิดได้ดีกว่าน้ำมันเทียนตาตั๊กแตนและน้ำมันกระวาน ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ

เอกสารวิจัยที่มีผู้ศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ Matan และคณะ (2011) ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับฤทธิ์การไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรหลายชนิดพบว่ามีความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งเชื้อราของน้ำมันกานพลูอยู่ที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Mucor dimorphosporus*, *Penicillium* sp., *A. niger* และ *Rhizopus* sp. ได้ดีกว่าสมุนไพรชนิดอื่น ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด Omidbeygi และคณะ (2007) ได้รายงานถึงปริมาณของสารสำคัญที่พบในน้ำมันกานพลู 9 ชนิด ได้แก่ chavicol ร้อยละ 0.1, cubenere ร้อยละ 0.34, eugenol ร้อยละ 63.37,  $\beta$ -caryophyllene ร้อยละ 15.94,  $\alpha$ -humelene ร้อยละ 2.62, e,c-farnesol ร้อยละ 0.44, eugeyl acetate ร้อยละ 13.14, +Spathulenol ร้อยละ 0.18 และ Caryophyllene oxide ร้อยละ 1.06 ซึ่งสารสำคัญที่มีในน้ำมันกานพลูอาจมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา สารนั้นก็คือ สารยูจีนอล (eugenol) Komala และคณะ (2012) ได้ศึกษาการยับยั้งสารพิษอะฟลาทอกซินบี1 ที่ผลิตโดย *A. flavus* ในข้าวฟ่างด้วยยูจีนอลบริสุทธิ์ พบว่ายูจีนอลความเข้มข้น 8.025 ไมโครกรัมต่อกรัมสามารถยับยั้งสารพิษได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ Karapinar (1990) พบว่ายูจีนอลสามารถยับยั้งการเจริญของ *A. parasiticus* ได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรอีกด้วย

จากการทดลองยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดคือน้ำมันกานพลู รองลงมาคือน้ำมันเทียนตาตักแตน มีรายงานของ Singh และคณะ (2005) พบว่า น้ำมันเทียนตาตักแตน มีสารประกอบ 35 ชนิดที่สามารถแยกชนิดได้เป็นร้อยละ 98.9 ของสารประกอบทั้งหมด โดยมีสารประกอบหลัก ได้แก่ carvone ร้อยละ 55.2, limonene ร้อยละ 16.6, dill apiole ร้อยละ 14.4, linalool ร้อยละ 3.7,  $\alpha$ -terpinene ร้อยละ 2.8 และ cis-dihydro carvone ร้อยละ 2.6 นอกจากนี้ Tian และคณะ (2011) ยังพบว่า น้ำมันเทียนตาตักแตนมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อรา *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. niger* และ *Alternaria alternate* โดยสารสำคัญที่มีบทบาทในการยับยั้งเชื้อรา คือ carvone ตามรายงานการวิจัยของ Kazemi และคณะ (2012) ที่พบว่า สาร carvone มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิดการที่น้ำมันกระวานมีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อรา คาดว่าน่าจะเป็นเพราะในกระวานมีสารสำคัญหลายชนิด Sirat และคณะ (2001) ได้วิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมันจากผลการศึกษาของกระวาน (*Amomum testaceum* Ridl.) โดย GC/MS ว่าประกอบไปด้วย  $\beta$ -pinene ร้อยละ 15.9, 1,8-cineole ร้อยละ 12.7, fenchone ร้อยละ 14.9, trans-piano carvone ร้อยละ 10.9, myrtenol ร้อยละ 16.1 และ myrtenal ร้อยละ 12.7 สารสำคัญในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา คือ 1,8-cineole ตามรายงานวิจัยของ Vilela และคณะ (2008) พบว่า สาร 1,8-cineole ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* เช่นเดียวกับรายงานการวิจัยของ Shukla และคณะ (2012) ที่พบว่าสาร 1,8-cineole มีฤทธิ์ในการต้านการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยน้ำมันกระวาน กานพลูและเทียนตาตุ๊กแทน

ชนิดของเชื้อรา	ค่า MIC (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)		
	น้ำมันกระวาน	น้ำมันกานพลู	น้ำมันเทียนตาตุ๊กแทน
<i>Aspergillus flavus</i> TISTR 3041	16	1	4
<i>Aspergillus flavus</i> PN-09	16	1	4
<i>Aspergillus parasiticus</i> TISTR 3276	16	1	4
<i>Aspergillus terreus</i> TISTR 3109	16	1	4
<i>Aspergillus ochraceus</i> TISTR 3557	16	1	6
<i>Aspergillus versicolor</i> TISTR 3460	16	4	6
<i>Penicillium citrinum</i> TISTR 3473	16	1	4
<i>Alternaria alternata</i> TISTR 3282	16	1	4

### 4.3 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยกระวาน กานพลู และเทียนตาตุ๊กแทน

#### 4.3.1 วิธี Free radical scavenging activity (DPPH)

ในการศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยด้วย 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่า น้ำมันหอมระเหยที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดคือ น้ำมันกานพลูเนื่องจากน้ำมันกานพลูมีค่า  $IC_{50}$  ต่ำกว่า 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ -15.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รองลงมาคือน้ำมันกระวาน (ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 2.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และน้ำมันเทียนตาตุ๊กแทน (ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 4.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับ บีเอชที (BHT) และแอลฟา-โทโคฟีรอล ( $\alpha$ -tocopherol) พบว่าค่า  $IC_{50}$  ของน้ำมันกานพลูมีค่า  $IC_{50}$  ต่ำกว่า 0.062 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเช่นเดียวกับสารทั้งสองชนิด (ตารางที่ 4.5)

#### 4.3.2 วิธี Ferric deducing antioxidant power (FRAP)

ในการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธี FRAP พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มีความสามารถรีดิวซ์ได้ดีที่สุดคือน้ำมันกานพลู โดยมีความสามารถในการรีดิวซ์เท่ากับ 5.11 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัม แสดงว่าน้ำมันหอมระเหย 1 มิลลิกรัมสามารถเปลี่ยนสารประกอบเชิงซ้อนของ  $Fe^{3+}$ -TPT2 ไปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ  $Fe^{2+}$ -TPT2 ได้ 5.11 มิลลิโมลาร์ต่อสาร 1 มิลลิกรัม เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันเทียนตาตุ๊กแทนและน้ำมันกระวานรวมทั้งแอลฟา-โทโคฟีรอลและบีเอชทีซึ่งใช้เป็น positive control พบว่าน้ำมันกานพลูมีความสามารถในการรีดิวซ์มากกว่าแอลฟา-โทโคฟีรอลและบีเอชที ส่วนน้ำมันเทียนตาตุ๊กแทนพบว่ามีประสิทธิภาพ

ในการรีดิวซ์ 4.07 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิกรัม ซึ่งใกล้เคียงกับความสามารถในการรีดิวซ์ของสารมาตรฐานแอลฟา-โทโคฟีรอลและน้ำมันกระวานพบว่ามีค่าความสามารถในการรีดิวซ์ต่ำที่สุด 4.33 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำมันพบว่าน้ำมันกานพลูมีปริมาณสารฟีนอลิกมากที่สุดคือเท่ากับ 0.71 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมของน้ำมันหอมระเหย ซึ่งสอดคล้องกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันกานพลูซึ่งสูงที่สุด สำหรับน้ำมันเทียนตาตึกแดนพบว่ามีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกน้อยกว่าน้ำมันกานพลูคือปริมาณเท่ากับ 0.55 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย และน้ำมันกระวานที่มีปริมาณสารฟีนอลิกน้อยที่สุดคือมีปริมาณเท่ากับ 0.44 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย

ตารางที่ 4.5 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลิกของสมุนไพร

ชนิดของน้ำมันหอมระเหย	กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ		ปริมาณสารฟีนอลิก (มิลลิกรัม GAE/mg น้ำมันหอมระเหย) <sup>a</sup> ± SD
	วิธี DPPH <sup>b</sup> ± SD (mg/ml)	วิธี FRAP <sup>b</sup> ± SD (mM/mg)	
น้ำมันกานพลู	-15.77 ± 1.93	5.11 ± 0.09	0.71 ± 0.14
น้ำมันเทียนตาตึกแดน	4.96 ± 0.50	4.07 ± 0.03	0.55 ± 0.04
น้ำมันกระวาน	2.26 ± 0.39	1.28 ± 0.38	0.44 ± 0.14
α-tocopherol	-31.84 ± 1.37	4.10 ± 0.05	0.61 ± 0.01
BHT	-29.31 ± 1.05	2.78 ± 0.29	0.90 ± 0.01

<sup>a</sup> = ข้อมูลเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

<sup>b</sup> = ข้อมูลเฉลี่ยของผลการทดลอง 2 ซ้ำ

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Lee และคณะ (2001) ซึ่งได้พบว่าสารสกัดอะโรมา (aroma extract) จากดอกกานพลู (clove bud) ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อลิตรสามารถยับยั้งออกซิเดชันของ เฮกซานอล (hexanal) หลังจากที่ถูกบ่มครบ 30 วัน สารสกัดจากกานพลูที่ระดับความเข้มข้น 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ยับยั้งการเกิด Malonaldehyde ในน้ำมันตับปลาคอด (cod liver oil) ได้ร้อยละ 93 นอกจากนี้ Gülcin และคณะ (2004) ยังได้รายงานไว้ว่า สารสกัดน้ำมันจากกานพลูที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม จะมีฤทธิ์ยับยั้ง lipid peroxidation ได้ร้อยละ 97.9 แต่สารสกัดน้ำมันกานพลูที่สกัดด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้นเท่ากันสามารถยับยั้ง lipid peroxidation ได้ร้อยละ 98.2 ซึ่งสารสกัดทั้งสองมีร้อยละของการยับยั้ง lipid peroxidation มากกว่าแอลฟา-โทโคฟีรอลความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (ร้อยละ 61.1) และ

ไม่มีการยับยั้งน้อยกว่า BHA และ BHT ที่ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม (ร้อยละ 96.6 และใช้

99.1 ตามลำดับ) นอกจากนี้ได้ศึกษาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดกานพลูที่สกัดด้วยเอทานอลมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดกานพลูที่สกัดด้วยน้ำ ส่วนการหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดกานพลูพบว่า ในสารสกัดกานพลูที่สกัดด้วยเอทานอลมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (264.9 ไมโครกรัม) มากกว่าในสารสกัดกานพลูที่สกัดด้วยน้ำ (179.8 ไมโครกรัม) จากการที่น้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี อาจเป็นเพราะในน้ำมันกานพลูมีสารสำคัญอยู่มาก จากงานวิจัยของ Gülcin และคณะ (2004) รายงานว่าจากการวิเคราะห์สารสกัดกานพลูด้วยวิธี GC-MS พบว่ามีสารประกอบที่สำคัญทั้งหมด 32 ชนิด โดยมีสารประกอบหลักที่พบปริมาณมาก ได้แก่ ยูจีนอล (eugenol) (24.371 มิลลิกรัมต่อกรัม) ยูจีนิล แอซิเตท (eugenyl acetate) (2.354 มิลลิกรัมต่อกรัม), 1-Acetyloxy-2-propanone (0.162 มิลลิกรัมต่อกรัม), 2-methyl-5-(1-methylethynyl)-cyclohexyl acetate (0.136 มิลลิกรัมต่อกรัม), isophthalaldehyde (0.126 มิลลิกรัมต่อกรัม), 2,5-dimethylanisole (0.043 มิลลิกรัมต่อกรัม), salicylic acid (0.033 มิลลิกรัมต่อกรัม) และสารประกอบอื่นเล็กน้อย นอกจากนี้ Martini และคณะ (1996) พบว่ายูจีนอลมีประสิทธิภาพมากในการยับยั้งกิจกรรมการเจริญของเชื้อรา

#### 4.4 ผลการประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและเทียนตาตักเตนต่อการชะลอการเจริญและการลดการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในถั่วลิสง

จากการประยุกต์ใช้น้ำมันกานพลูและน้ำมันเทียนตาตักเตนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในการชะลอการเจริญและลดการสร้างสปอร์ของเชื้อราในถั่วลิสง ซึ่งตัวอย่างถั่วลิสงดิบที่ผ่านการชะล้างผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.5 จะมี  $a_w$  เหลือ 0.88 และได้ผลการทดลองซึ่งแสดงในตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus flavus* TISTR 3041 และ *Aspergillus flavus* PN-09 ลดลงตามปริมาณของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ชนิดที่เพิ่มขึ้น ซึ่งได้เติมลงบนฝาภาชนะที่บรรจุถั่วลิสง ในกรณีของน้ำมันกานพลูพบว่าการเติมน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ฝาภาชนะบรรจุ สารประกอบที่ระเหยได้จากน้ำมันกานพลูมีผลช่วยชะลอการเจริญและการสร้างเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ทั้ง 2 ชนิดบนผิวของเมล็ดถั่วลิสงดิบได้ดีที่สุด เนื่องจากพบการเจริญน้อยมากที่ผิวของเมล็ดถั่วลิสง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันซึ่งมีเชื้อราเจริญมากที่สุด ซึ่งถั่วลิสงชุดควบคุมมีการเจริญของเส้นใยเชื้อราปริมาณมากปกคลุมผิวของเมล็ดถั่วลิสงทุกเมล็ด สำหรับน้ำมันเทียนตาตักเตนก็ให้ผลในการชะลอการเจริญและการสร้างเส้นใยราเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเช่นเดียวกัน แต่จะลดการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันทั้ง 2 ชนิดพบว่า น้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพดีกว่าน้ำมันเทียนตาตักเตนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเฉพาะการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*Aspergillus flavus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 2 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Bluma และคณะ (2008) ซึ่งได้พบว่าการยับยั้งการเจริญด้วยน้ำมันกานพลู น้ำมันสาระแห่นววนและน้ำมันไทม์ (mountain thyme) เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำมันที่เพิ่มขึ้น การใช้ความเข้มข้นของน้ำมันทั้ง 3 ชนิดที่ระดับ 500 ไมโครกรัมต่อกรัม พบว่าทำให้เชื้อ *Aspergillus section flavi* ถูกยับยั้งมากถึงร้อยละ 90

เมื่อพิจารณาผลของสารประกอบที่ระเหยได้จากน้ำมันกานพลูและน้ำมันเทียนตาตุ๊กแดงต่อการลดการสร้างอะฟลาทอกซินโดย *Aspergillus flavus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ในถั่วลิสง ผลปรากฏว่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* TISTR 3041 และ *Aspergillus flavus* PN-09 มีแนวโน้มการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้นเมื่อเติมน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นไปอีกที่ฝักราชพระบรรจุถั่วลิสง ในกรณีของน้ำมันกานพลูเมื่อเติมที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นไปอีก 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ฝักราชพระบรรจุ พบการสร้างสารอะฟลาทอกซินในปริมาณที่สูงขึ้นไปอีกในถั่วลิสงที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา *Aspergillus flavus* TISTR 3041 และ *Aspergillus flavus* PN-09 (0.65 และ 1.30 ppb) ตามลำดับ สำหรับผลการประยุกต์ใช้น้ำมันเทียนตาตุ๊กแดงเพื่อลดปริมาณสารอะฟลาทอกซินพบว่าให้ผลเช่นเดียวกับน้ำมันกานพลูคือ การใช้น้ำมันเทียนตาตุ๊กแดงที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปอีก 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ฝักราชพระบรรจุพบการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินเพิ่มมากขึ้น เมื่อเติมน้ำมันเทียนตาตุ๊กแดงลงไปอีกที่ฝักราชพระบรรจุที่ระดับความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบการสร้างสารพิษในถั่วลิสงที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา *Aspergillus flavus* TISTR 3041 และ *Aspergillus flavus* PN-09 เพิ่มขึ้นเป็น 1.28 และ 1.00 ppb ตามลำดับ เปรียบเทียบกับถั่วลิสงชุดควบคุม (1.43 ppb)

การที่สารประกอบที่ระเหยได้ในน้ำมันกานพลูสามารถช่วยชะลอการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในถั่วลิสงได้นั้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Passone และคณะ (2012) ซึ่งได้ศึกษาผลของน้ำมันกานพลูต่อการยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* บนอาหารจำลองจากถั่ว (PMEA) พบว่าการใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อกรัมมีผลช่วยชะลอการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้มากกว่าร้อยละ 54 และช่วยเพิ่มระยะเวลาในช่วง lag phase ขึ้นร้อยละ 15 ในขณะที่การใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อกรัมสามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus section flavi* หลายสายพันธุ์ได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ Matan และคณะ (2006) รายงานว่าสารประกอบที่ระเหยได้ในส่วนผสมของน้ำมันกานพลูกับน้ำมันอบเชยปริมาตร 2,000 ไมโครกรัมที่จุ่มบนกระดาษกรอง whatman เบอร์ 6 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*, *P. roqueforti*, *M. plumbeus*, *Eurotium sp.*, *D. hansenii* และ *Z. rouxii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ขณะที่การยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* ต้องใช้ส่วนผสมของน้ำมันทั้งสองชนิดถึง 4,000 ไมโครกรัม การที่พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันกานพลูทำให้การเจริญของเส้นใยเชื้อราที่ผิวของเมล็ดถั่วลิสงลดลงอาจไม่เป็นผลจากฤทธิ์ยับยั้งของสารระเหยในน้ำมันกานพลู Goñi และคณะ (2009) ได้รายงานพบว่า

สารประกอบหลายชนิดในไอระเหยของน้ำมันกานพลู สารที่พบได้แก่ estragol ร้อยละ 0.2, thymol ร้อยละ 0.1, eugenol ร้อยละ 82,  $\beta$ -caryophyllene ร้อยละ 10,  $\alpha$ -humelene ร้อยละ 2.9, eugenol acetate ร้อยละ 0.5,  $\delta$ -cadinene ร้อยละ 0.4 และ calamenene ร้อยละ 0.3 ของไอออนทั้งหมด (total ion counts) ที่ได้จำแนกชนิด ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Neilsen และคณะ (2000) ซึ่งได้ทดลองประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศหลายชนิดในการเก็บรักษาขนมปังในสภาพปรับบรรยากาศพบว่าน้ำมันกานพลู 1 ไมโครลิตรที่เติมลงบนกระดาษกรองซึ่งวางอยู่บนฝาจานเพาะเชื้อสามารถลดการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ที่เจริญบนอาหาร CYA ได้ถึงร้อยละ 40 สำหรับกลไกในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารประกอบจากพืชได้มีรายงานว่า สารจากพืชส่งผลของเซลล์จุลินทรีย์โดยกลไกการต้านจุลินทรีย์ที่หลากหลาย เช่น การเข้าโจมตีฟอสโฟลิปิดสองชั้น (phospholipid bilayer) ของเยื่อหุ้มเซลล์ ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ และอื่นๆ (Tajkarimi และคณะ, 2010) สาเหตุของการเพิ่มขึ้นของสารอะฟลาทอกซินที่สร้างขึ้น โดย *A. flavus* อาจเกิดขึ้นจากปัจจัยต่างๆ ได้หลายปัจจัย รายงานการวิจัยของ Ayerst (1969) รายงานว่าค่า  $a_w$  ต่ำสุดที่เชื้อรา *A. flavus* จะเจริญได้เท่ากับ 0.78 ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.6 ผลของน้ำมันหอมระเหยจากกานพลูและเทียนตักแตนต่อการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus*

ชนิดของน้ำมัน	<i>Aspergillus flavus</i> TISTR 3041		<i>Aspergillus flavus</i> PN-09	
	ปริมาณการเจริญ	ปริมาณสารอะฟลาทอกซิน <sup>a</sup> $\pm$ SD (ppb)	ปริมาณการเจริญ	ปริมาณสารอะฟลาทอกซิน <sup>a</sup> $\pm$ SD (ppb)
น้ำมันกานพลู (mg/ml)				
0	+++	0.42 $\pm$ 0.08	+++	1.43 $\pm$ 1.51
1	++	4.03 $\pm$ 2.73	++	0.80 $\pm$ 0.42
4	+	0.65 $\pm$ 0.38	+	1.30 $\pm$ 1.33
น้ำมันเทียนตักแตน (mg/ml)				
0	+++	0.42 $\pm$ 0.08	+++	1.43 $\pm$ 1.51
2	+++	0.52 $\pm$ 0.28	+++	1.44 $\pm$ 0.57
8	+	1.28 $\pm$ 0.79	++	1.00 $\pm$ 0.65

หมายเหตุ +++ หมายถึง มีการเจริญของเชื้อรา มาก ++ หมายถึง มีการเจริญของเชื้อราปานกลาง

++ หมายถึง มีการเจริญของเชื้อรา น้อย + หมายถึง มีการเจริญของเชื้อรา น้อยมาก

<sup>a</sup> ข้อมูลเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

ในการทดลองนี้ถั่วลิสงที่ผ่านการชะล้างด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 0.5 ก่อนเติม

เชื้อรา *A. flavus* TISTR 3041 และ *A. flavus* PN-09 มีค่า  $a_w$  เฉลี่ย 0.88 ที่ระดับ  $a_w$  นี้ อาจเป็นระดับไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$a_w$  ที่ *A. flavus* สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ ดังเช่น Passone และคณะ (2010) ได้รายงานว่ามีปริมาณอะฟลาทอกซินทั้งหมดที่ตรวจพบในถั่วลิสงที่มีค่า  $a_w$  ระหว่าง 0.84-0.94 มีปริมาณ 1.1-200.4 นาโนกรัมต่อกรัม อย่างไรก็ตาม Ellis และคณะ (1994) ได้รายงานว่าการเจริญของ *A. flavus* สูงสุดบนถั่วลิสงจะเกิดที่  $a_w$  0.97 ที่อุณหภูมิของการเก็บรักษาเป็น 25 องศาเซลเซียส และมีออกซิเจนภายในบรรจุภัณฑ์ที่เก็บรักษาถั่วลิสงเป็นร้อยละ 10 หลังจากการเก็บรักษา 21 วัน ขณะที่การสร้างอะฟลาทอกซินสูงสุดเกิดขึ้นที่  $a_w$  ต่ำกว่า ก็คือที่ระดับ  $a_w$  0.94 ภายใต้สภาวะการเก็บรักษาเดียวกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเชื้อราในถั่วลิสงดิบ ถั่วลิสงทอด ถั่วลิสงคั่วบดและถั่วลิสงคั่วคั่ว พบว่ามีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อราสูงที่สุดในถั่วลิสงดิบ (ร้อยละ 86.2) โดยพบเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในตัวอย่างถั่วลิสงดิบที่ได้จากแหล่งที่มาจากร้านขายของชำในกรุงเทพฯ นอกจากนี้ยังพบเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizopus* spp. และยีสต์ โดยเชื้อราเหล่านี้เจริญได้ดีบนอาหาร DG18 เมื่อวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรทั้งสามชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. terreus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *P. citrinum*, *Al. alternata* พบว่าน้ำมันที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราทุกสายพันธุ์ได้ดีที่สุดคือน้ำมันกานพลู น้ำมันที่มีประสิทธิภาพรองลงมาคือน้ำมันเทียนตาตักแต่น ส่วนน้ำมันกระวานมีประสิทธิภาพต่ำในการยับยั้งเชื้อราทุกชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันกานพลูมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดและมีประสิทธิภาพสูงกว่าน้ำมันเทียนตาตักแต่นและน้ำมันกระวาน แต่มีประสิทธิผลต่ำกว่าสารมาตรฐานแอลฟา-โทโคฟีรอลและบีเอชที การประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยกานพลูและเทียนตาตักแต่นเพื่อยับยั้งการเจริญและสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินบี1 ของเชื้อรา *A. flavus* TISTR 3041 และ *A. flavus* PN-09 โดยนำไปเคลือบบนฝาบรรจุภัณฑ์พบว่าน้ำมันกานพลูมีประสิทธิผลในการยับยั้งการเจริญได้ดีกว่าน้ำมันเทียนตาตักแต่น โดยสามารถชะลอการสร้างเส้นใยของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่สร้างโดยเชื้อรา *A. flavus* TISTR 3041 และ *A. flavus* PN-09 พบว่าเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของน้ำมันจะส่งผลให้เชื้อรามีการสร้างสารพิษที่เพิ่มมากขึ้นสาเหตุอาจมาจากความพยายามในการปรับตัวให้อยู่รอดของเชื้อรา *A. flavus* ทำให้เชื้อรามีการผลิตสารอะฟลาทอกซินมากยิ่งขึ้น แต่ถ้าเราเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันจนถึงระดับที่เชื้อราไม่สามารถเจริญอยู่ได้ ปริมาณสารพิษที่ตรวจพบก็มีแนวโน้มว่าจะมีปริมาณที่ลดลง

จากผลการทดลองทำให้ทราบว่าน้ำมันหอมระเหยจากสมุนไพรไทยมีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและต้านอนุมูลอิสระ เราอาจนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงโดยการนำน้ำมันมาเคลือบบรรจุภัณฑ์แทนการเจือปนลงไปในอาหารโดยตรง หรืออาจจะผสมลงในเนื้อของบรรจุภัณฑ์ได้ เช่นผสมลงในเนื้อไม้ในกระบวนการผลิตตุ๊กกระดาศที่นำมาเป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหารแห้งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## อ้างอิง

- ชยันต์ พิเชียรสุนทร, แม้นมาส ชวลิต และวิเชียร จีรวงศ์. 2542. คำอธิบายตำราพระโอสถพระนารายณ์. กรุงเทพฯ: บริษัทอัมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน).
- ธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2540. โรคถั่วลิสง. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะเกษตร ภาควิชาโรคพืช
- ธีรยุทธ์ กลิ่นสุคนธ์ และชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว. 2524. แอฟลาทอกซิน (สารพิษเชื้อราที่ทำให้เกิดมะเร็งของตับ). กรุงเทพฯ: ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล. (หน้า 159)
- ทิพย์วรรณ จตุมานัสศิริ และธรรมศักดิ์ สมมาตย์. 2532. สถานการณ์ของสารพิษแอฟลาทอกซินในถั่วลิสงและการคัดพันธุ์ต้านทาน. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- นัทธพงศ์ ตามวงศ์. 2552. หลักสูตรการทำถั่วตัด. ลำปาง: ศูนย์การศึกษานอกระบบและการศึกษาตามอัธยาศัยอำเภอวังเหนือ.
- วุฒิสักดิ์ บุตรธนู, สุทธิ สุริยะ, ธนิต โสภโณตร และประวีติ ต้นบุญเอก. 2540. ปัจจัยที่มีผลต่อการปลูกเชื้อรา *Aspergillus flavus* และการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินบนถั่วลิสง. หน้า 131-139. ใน รายงานผลการวิจัย ปี 2538 ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น (เล่มที่ 1) ถั่วลิสง ถั่วเหลือง และพืชอื่นๆ. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตรและสหกรณ์.
- กวนาท นนทธีย์. 2531. ถั่วลิสง. โครงการหนังสือเกษตรชุมชน. กรุงเทพฯ: เอ็ดดิสัน เพรส โปรดักส์. (หน้า 157-180)
- สถาพร วิทยา. 2534. เครื่องเทศพืชพันธุ์ปຽงรสแห่งชีวิต. กรุงเทพฯ: เจริญวิทย์การพิมพ์.
- หมอมเส็งยม พงษ์บุญรอด. 2522. ไม้เทศเมืองไทย. กรุงเทพฯ: การพิมพ์ไชยวัฒน์. (หน้า 62-63).
- อภิพรพรณ พุกภักดี. 2533. วิทยาศาสตร์การผลิตพืชตระกูลถั่ว. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Anderson, R. A. (1983). Detoxification of aflatoxin contaminated corn. In U.L. Diener, R.L. Asquith, & J. W. Dickens (Eds.), *Aflatoxin and Aspergillus flavus in Corn Vol. 279* (pp. 87-90). Alabama, USA: Agricultural Experiment Station, Department of Research Information.
- Ashworth, T.G., Pilbeam, S.H., & Davidson, J.C. (1965). Toxic changes in eosinophil maturation. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 59, 608-610.
- Ayerst, G. (1969). The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Product Research*, 5, 127-141.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Backer, C.A., & Bakhuizen van den Brink, R.C. (1968). Verbemaceae. In C.A. Backer (Ed.), *Flora of Java Vol. 1* (pp. 337-342). Groningen: Noordhoff NVP.
- Baillie, J.K., Thompson, A.A., Irving, J.B., Bates, M.G., Sutherland, A.I., Macnee, W., Maxwell, S.R., & Webb, D.J. (2009). Oral antioxidant supplementation does not prevent acute mountain sickness: double blind, randomized placebo-controlled trial. *Monthly Journal of the Association of Physicians*, 102(5), 341-348.
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Gluud, L.L., Simonetti, R.G., & Gluud, C. (2007). Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention. *Systematic Review and Meta-analysis. JAMA*, 297(8), 842-857.
- Bluma, R., Amaiden, M.R., & Etcheverry, M. (2008). Screening of Argentine plant extracts: Impact on growth parameters and aflatoxin B<sub>1</sub> accumulation by *Aspergillus* section *Flavi*. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 114-125
- Cairn-Fuller, V., Aldred, P., & Maegan, N. (2005). Water temperature and gas composition interactions affect growth and ochratoxin A production by isolate of *P. verrucosum* on wheat grain. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1215-1221.
- Champ, B.R., Highley, C., Hocking, A.D., & Pitt, J.I. (1991). Significance of fungi in stored, In B. R. Champ (Ed.), *Fungi and Mycotoxins in Stored Products* (pp.16). Canberra: Australian Centre for International Agricultural Research.
- Chang, H.T., Cheng, Y.H., Wu, C.L., Cang, S.T., Chang, T.T., & Su, Y.C. (2008). Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresource Technology*, 99, 6266–6270.
- Chansa-ngavej, K., & Singhaboonpong, T. (1996). Nitrogen fixation, In W. Srijankul (Ed.), *Effect of temperature on growth and nitrogen fixing potential of Bradyrhizobium japonicum strains A3, A5 and A6* (pp.219-224). Prachuap Khiri Khan: Issues and choices.
- Collins, C.H., & Lyne, P.M. (2007). Counting micro-organism, In P.M. Lyne (Ed.), *Microbiological methods* (pp. 414-427). Michigan: Butterworth and Co.Ltd.
- Dastmalchi, K., Dorman, H.J.D., Laakso, I., & Hiltunen, R. (2007). Chemical composition and antioxidative activity of moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 1655–1663
- Diener, U.L., & Davis, N.D. (1986). Biology of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. In E.L. Batan (Ed.), *Aflatoxin in Maize* (pp.33-44). Mexico: Proceeding of Workshop.

- Ding, X., Li, P., Bai, Y., & Zhou, H. (2012). Aflatoxin B<sub>1</sub> in post-harvest peanut and dietary risk in China. *Food Control*, 23, 143-148.
- Doyle, M.P., & Marth, E.H. (1978). Bisulfite degrades aflatoxin: effect of temperature and concentration of bisulfite. *Journal of Food Products Marketing*, 41, 774.
- Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77, 67-82.
- Eaton, D.L., & Groopman, J. (1994). Toxicology and carcinogenesis in humans. In D.L. Eaton, & J.D. Groopman (Eds.), *The Toxicology of Aflatoxins* (pp.116). New York: Academic Press.
- Ellis, D. (1994). *Clinical mycology: the human opportunistic mycoses* (pp.166). Gillingham: Printers pty. Ltd.
- Eiils, W.O., Smith, J.P., Simpsons, B.K., Ramaswamy, H., & Doyon, G. (1994). Growth of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts stored under modified atmosphere packing (MAP) condition. *International Journal of Food Microbiology*, 22, 173-187.
- Glinsukon, T., Taycharpipranai, S., & Toskulkao, C. (1976). Aflatoxin B<sub>1</sub> hepatotoxicity in rats pretreated with ethanol. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 34 (7), 869-870.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116, 982-989.
- Gqaleni, N., Smith, J.E., Lacey, J., & Gettinby. (1997). Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of aflatoxins and cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1048-1053.
- Gülçin, İ., Sat, I.G., Beydemir, S., Elmastas, M., & Küfrevioğlu, Ö.I. (2004). Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry*, 87, 393-400.
- Hageman, R.H. and Flesher, D. (1960). The effect of an anaerobic environment on activity of alcohol dehydrogenase and other enzymes of corn seedlings. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 87, 203-209.
- Jackson, C.R. (1965). Reduction of *Sclerotium bataticola* infection of peanut kernels by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 55, 934.
- Jay, J.M., Loessner, M.J. & Golden, D.A. 2005. Moisture Content. In J.M. Jay, M.J. Loessner, & D.A. Golden (Eds.), *Modern food microbiology* Vol. 7 (pp. 45-46). New York: Springer Science+Business Media Inc.

- & Lisker, N. (1969). Effects of light, temperature, and pH value on aflatoxin production in vitro. *Applied Microbiology*, 18(3), 517–518.
- Prasad, K.K., & Duncan, H.E. (1981). Effect of nitrogen fertilizer, planting date, and harvest date on aflatoxin production in corn inoculated with *Aspergillus flavus*. *Plant Disease*, 65, 741–744.
- Karapinar, M. (1990). Inhibitory effects of anethole and eugenol on the growth and toxin production of *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 10, 193–199.
- Kazemi, M., Rostami, H., & Ameri, A. (2012). The study of compositions and antimicrobial properties of essential oil of *origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* on human pathogen. *Current Research in Bacteriology*, 1-12.
- Komala, V.V., Ratnavathi, C.V., Kumar, B.S.V., & Das, I.K. (2012). Inhibition of aflatoxin B<sub>1</sub> production by an antifungal component, eugenol in stored sorghum grains. *Food Control*, 26, 139-146.
- Lado, C., Then, M., Varga, I., Szoke, E., & Szentmihalyi, K. (2004). Antioxidant property of volatile oils determined by ferric reducing agent. *Z. naturforsch*, 59, 354-358.
- Lee, K.G., & Shibamoto, T. (2001). Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chemistry*, 74, 443-448.
- Lillehoj, E., Garcia, W., & Lambrow, M. (1974). *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin production in corn: influence of trace elements. *Applied and Environmental Microbiology*, 28, 763-767.
- Lin, M.T., & Dianese, J.C. (1976). A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology*, 66, 1466-1499.
- Lindsey, D.L. (1970). Effect of *Aspergillus flavus* on peanuts grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, 60(2), 208-211.
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A.J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., & Parker, M. (2006). Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 180-185.
- Matan, N., Saengkrajang, W., & Matan, N. (2011). Antifungal activities of essential oils applied by dip-treatment on areca palm (*Areca catechu*) leaf sheath and persistence of their potency upon storage. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 212-216.

- Martini, H., Weidenbörner, M., Adams, S., & Kumz, B. (1996). Eugenol and carvacrol: the main fungicidal compounds in clove. *Italian Journal of Food Science*, 1, 63-67.
- Mecteau, M.R., Arul, J., & Tweddell, R.J. (2002). Effect of organic and inorganic salts on the growth and development of *Fusarium sambucinum*, a causal agent of potato dry rot. *Mycological Research*, 106 (6), 688-698.
- Mixon, A.C., & Rogers, K.M. (1973). Peanuts resistant to seed invasion by *Aspergillus flavus*. *Oleagineux*, 28, 85-86.
- Mixon, A.C. (1977). Influence of plant genetics on colonisation by *Aspergillus flavus* and toxin production (peanuts). In J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine, & M.A. Mehlman (Eds.), *Mycotoxins in Human and Animal Health* (pp.745). Illinois: Pathotox Publishers Inc.
- Montes-Belmont, R., & Carvajal, M. (1998). Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *Journal of Food Products Marketing*, 61(5), 616-619.
- Nakai, V.K., Rocha, L.O., Goncalvez, E., Fonseca, H., Ortega, E.M.M., & Corrêa, B. (2008). Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. *Food Chemistry*, 106, 285-290.
- Nanasombat, S., & Wimuttigol, P. (2011). Antimicrobial and antioxidant activity of spice essential oils. *Food Science and Biotechnology*, 20(1), 45-53.
- Nessbitt, B., O'Kelly, J., Sargeant, K., & Sheridan, A. (1962). *Aspergillus flavus* and turkey x disease toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Journal of Microbiology*, 33, 1674-1678.
- Nielsen, P.V., & Rios, R. (2000). Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 219-229.
- Okushio, K., Suzuki, M., Matsumoto, N., Nanjo, F., & Hara, Y. (1998). Identification of (-)-epicatechin metabolites and their metabolic fate in the rat. *Metabolism and Disposition*, 27(2), 309.
- Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z., & Naghdibadi, H. (2007). Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18, 1518-1523.
- Özcan, M.M., & Arslan, D. (2011). Antioxidant effect of essential oils of rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. *Food Chemistry*, 129, 171-174.

เอกสารนี้เป็นเอกสารหลวงเวสท์หรือการเขียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ดูแลเนื้อหาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Pandey, M.K., Monyo, E., Ozias-Akins, P., Liang, X., Guimarães, P., Nigam, S.N., Upadhyaya, H.D., Janila, P., Zhang, X., Guo, B., Cook, D.R., Bertioli, D.J., Michelmore, R., & Varshney, R.K. (2012). Advances in Archis genomics for peanut improvement. *Biotechnology Advance*, 30, 639-651.
- Paranagama, P.A., Abeyssekera, K.H.T., Abeywickrama, K., & Nugaliyadde, L. (2003). Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citrates* (DC.) Stapf. (lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. Isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 86-90.
- Park, M., Gwak, K., Yang, I., Choi, W., Jo, H., Chang, J., Jeung, E., & Choi, I. (2007). Antifungal Activity of the essential oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* bailey and their constituents against various dermatophytes. *Journal of Microbiology*, 45, 460-465.
- Passone, M.A., Resnik, S., & Etcheverry, M. (2008). The potential of food grade antioxidants in the control of *Aspergillus* section *Flavi*, interrelated mycoflora and aflatoxin B<sub>1</sub> accumulation on peanut grains. *Food Control*, 19, 364-371.
- Passone, M.A., Rosso, L.C., Ciancio, A., & Etcheverry, M. (2010). Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* spp. In stored peanuts by real-time PCR of *nor-1* gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 276-281.
- Passone, M.A., Grardi, N.S., Ferrand, C.A., & Etcheverry, M. (2012). Invitro evaluation of five essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored peanuts from *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* contamination. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 70, 82-88.
- Paster, N., & Bullerman, L.B. (1988). Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. *International Journal of Food and Microbiology*, 7, 257-265.
- Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., & Juven, B. (1995). Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Products Marketing*, 58, 81-85.
- Pettit, R.E., Taber, R.A., & Foster, B.G. (1968). Occurrence of *Bacillus subtilis* in peanut kernels. *Phytopathology*, 58(2), 254-255.

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Prakash, B., Singh, P., Mishira, P.K., & Dubey, N.K. (2012). Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 183-191.
- Purchase, I. F. H., Steyn, M., Rinsma, R., & Tustin, R. C. (1972). Reduction of the aflatoxin M1 in milk by processing. *Food and Cosmetics Toxicology*, 10, 383-387.
- Reddy, T.V., Viswanathan, L., & Venkatasubramanian, T. A. (1971). High aflatoxin production on a chemically defined medium. *Applied Microbiology*, 22, 393-396.
- Rasooli, I., & Abyaneh, M.R. (2004). Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 15, 479-483.
- Samson, R., Shafik, H., Benjamo, A., & Gardan, L. (2004). Description of the bacterium causing blight of leek as *Pseudomonas syringae* pv. *porri* (pv. nov.). *Phytopathology*, 88, 844-850.
- Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J., & Carnagan, R. (1961). Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Letter to Nature*, 192, 1096-1097.
- Sauer, D.B. 1980. Effects of fungal deterioration on grain: nutritional value, toxicity, germination. *International Journal of Food Microbiology*, 7, 267-275.
- Sauer, D.B., Sternberg, N., Hoess, R., & Abramski, K. (1986). Bacteriophage P1 *cre* gene and its regulatory region: evidence for multiple promoters and for regulation by DNA methylation. *Journal of Molecular Biology*, 187, 197-212.
- Selvi, T.A., Joseph, G.S., & Jayaprakasha, G.K. (2003). Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. *Food Microbiology*, 20, 455-460.
- Sirat, H. M., Hong, L. F., & Khaw, S. H. (2001). Chemical compositions of the essential oil of the fruits of *Amomum testaceum* Ridl. *Journal of Essential Oil Research*, 13, 86-87.
- Shank, R.C., Wogan, G.N., Gibson, J.B., & Nondasuta, A. (1972). Dietary aflatoxins and human liver cancer. II. Aflatoxins in market foods and foodstuffs of Thailand and Hong Kong. *Food and Cosmetics Toxicology*, 10 (1), 61-69.
- Shankla, R., Singh, P., Prakash, B., & Dubey, N.K. (2012). Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) Sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control*, 25, 27-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 33. ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Shantha, T., & Sreenivas, M. (1981). Influence of tricarboxylic acid cycle intermediates and related metabolites on the biosynthesis of aflatoxin by resting cells of *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 758-761.
- Shotwell, O.L., Goulden, M.L., & Hesseltine, C.W. (1972). Aflatoxin contamination: association with foreign material and characteristic fluorescence in damaged corn kernels. *Cereal Chemistry*, 49, 458-465.
- Shukla, R., Kumar, A., Singh, P., & Dubey, N.K. (2009). Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B<sub>1</sub> production. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 165-170.
- Shukla, R., Singh, P., Prakash, B., & Dubey, N.K. (2012). Antifungal, aflatoxin inhibition and antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Control*, 25, 27-33.
- Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M.P., & Catalan, C. (2005). Chemical constituents, antimicrobial investigations, and antioxidative potentials of *Anethum graveolens* L. essential oil and acetone extract: part 52. *Journal of Food Science*, 70, 208-215.
- Sirat, H. M., Hong, L. F., & Khaw, S. H. (2001). Chemical compositions of the essential oil of the fruits of *Amomum testaceum* Ridl. *Journal of Essential Oil Research*, 13, 86-87.
- Soliman, K.M., & Badeaa, R.I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1669-1675.
- Sommartya, T. (1997). Peanut disease. Bangkok: Kasetsart University Publishing.
- Tajkarimi, M.M., Lbrahim, S.A., & Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds on food. *Food Control*, 21, 1199-1218.
- Teissedre, P.L., & Waterhouse, A.L. (2000). Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3801-3805.
- Teitell, L. (1958). Effects of relative humidity on viability of conidia of *Aspergillus*. *American Journal of Botany*, 45, 784-753.
- Thanaboripat, D., Mongkontanawur, N., Suvathi, Y., & Ruangrattanamatee, V., (2004). Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by citronella oil. *KMITL Science and Technology Journal*, 4 (1), 1-8.

- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., Huang, B., He, J., & Wang, Y. (2011). In vitro and in vivo activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. *Food Control*, 22, 1992-1999.
- Tournas, V., Stack, M. E., Mislivec, P. B., Koch, H. A., & Bandler, R. (2001). Yeasts, mold, and mycotoxins. In *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. Available from : [www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071435.htm](http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071435.htm)
- Tripathi, P., Dubey, N.K., Banarji, R., & Chansouria, J.P.N. (2004). Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants in management of post harvest rotting of citrus fruits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 317-321.
- Tzortzakis, N.G., & Economakis, C.D. (2008). Deployment of shredded maize stems as an alternative substrate medium in tomato soilless culture. *Agrothesis*, 6, 20-28.
- Vilela, G.R., Steffen de Almeida, G., Regitano D Arce, M.A.B., Moraes, M.H.D., Brito, J.O., Fatima das G.F. da Silva, M., Silva, S.C., Maria de Stefano Piedade, S., Calori-Domingues, M.A., & Micotti da Gloria, E. (2009). Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globules* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* speare. *Journal of Stored Products Research*, 45, 108-111.
- Widstrom, N.W., & Zuber, M.S. (1983). Prevention and control of aflatoxin in corn: source and mechanisms of genetic control in the plant. In U.L. Diener, R.L. Asquith, & J. W. Dickens (Eds.), *Aflatoxin and Aspergillus flavus in Corn* (pp. 72-76). Alabama: Department of Research Information.
- Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., & Aggarwal, D. (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1106-1122.
- Wilson, H.J., Michael, W., & Katherine, H.K. (1983). Use of *Aspergillus* overproducing mutants, cured for intergrated plasmid, to overproduce heterologous proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39, 738-743.
- Yabe, K., Nakamura, M., & Hamasaki, T. (1999). Enzymatic formation of G-group aflatoxins and biosynthetic relationship between G- and B- group aflatoxins. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 3867-3872.

Zorzete, P., Reis, T.A., Felicio, J.D., Baquião, A.C., Makimoto, P., & Corrêa, B. (2011). Fungi, mycotoxins and phytoalexin in peanut varieties, during plant growth in the field. *Food Chemistry*, 129, 957-964.

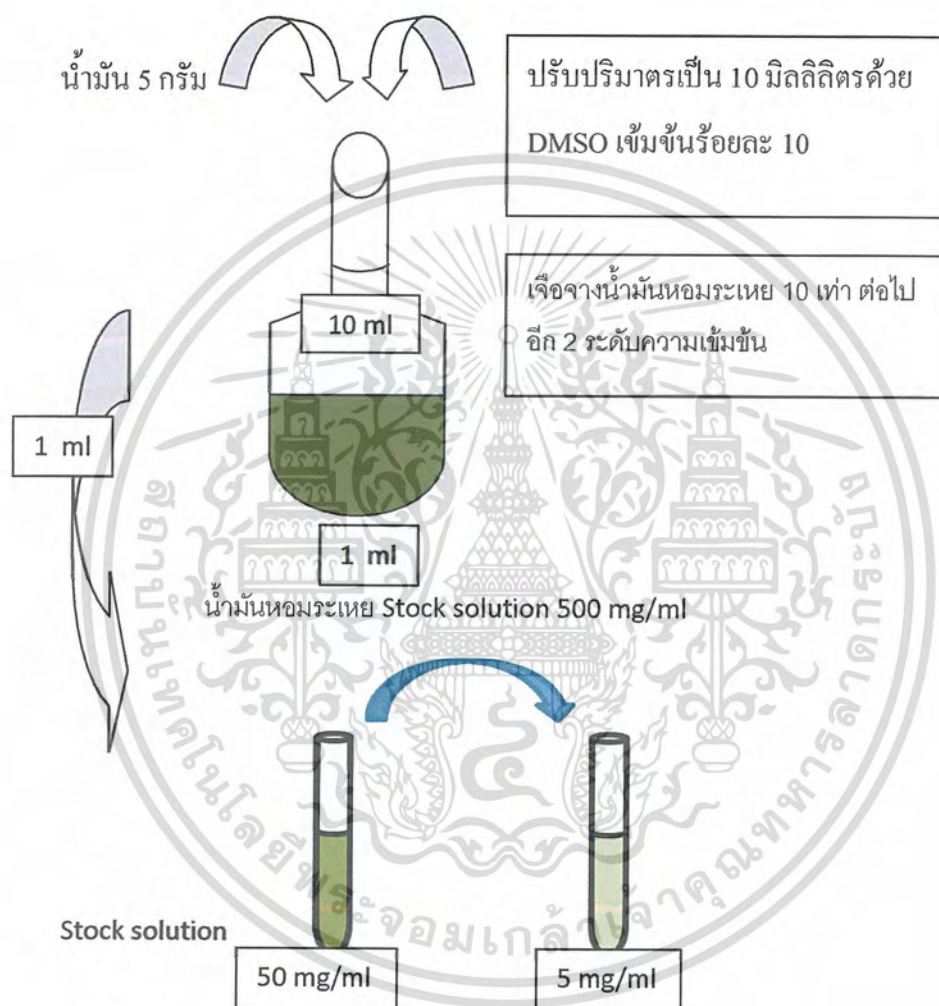


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### การเตรียม Stock solution ของน้ำมันหอมระเหย

#### 1. การเตรียม Stock solution ของน้ำมันหอมระเหย 500, 50 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ ก.1 ขั้นตอนการเตรียม Stock solution ของน้ำมันหอมระเหย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.1 ปริมาตรของน้ำมันหอมระเหย และน้ำกลั่นที่ใช้ ในการปรับความเข้มข้นให้ได้ระดับต่างๆ

conc. น้ำมันหอมระเหย (mg/ml)	ปริมาตรน้ำมันหอมระเหย (ml)	ปริมาตรน้ำกลั่น (ml)	conc. น้ำมัน (หลังเติมน้ำกลั่น) (mg/ml)	ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหาร [ 1 : 20 ] (mg/ml)
500	0.88	0.12	440	22
	0.8	0.2	400	20
	0.72	0.28	360	18
	0.64	0.36	320	16
	0.56	0.44	280	14
	0.48	0.52	240	12
	0.4	0.6	200	10
	0.32	0.68	160	8
	0.24	0.76	120	6
	0.16	0.84	80	4
50	0.8	0.2	40	2
	0.4	0.6	20	1
	0.2	0.8	10	0.5
5	1	0	5	0.25
	0.5	0.5	2.5	0.125
Control	0	1	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### การเตรียมสารละลายต่างๆ

#### 1. การเตรียมสารละลาย DPPH ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร สำหรับวิเคราะห์หาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

น้ำหนักโมเลกุลของ DPPH เท่ากับ 394.34 กรัมต่อโมล

ถ้า 0.1 มิลลิโมลาร์จะมี DPPH =  $(394.34 \times 0.1) / 1000 = 0.0394$  กรัม

เพราะฉะนั้น ชั่งสาร DPPH 0.0394 กรัม ละลายในเมทานอล (Methanol) เล็กน้อยก่อน แล้วปรับปริมาตรด้วยเมทานอลให้ได้ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

#### 2. การเตรียมสารละลาย สำหรับวิเคราะห์หาค่าสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

สารละลาย FRAP reagent ที่ต้องการ สามารถเตรียมได้จากการผสมสาร 3 ชนิดคือ อะซิเตตบัฟเฟอร์ (acetate buffer) ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร TPTZ reagent ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร ในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร สารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนั้นจึงทำการเตรียมสารละลายทั้ง 3 ชนิดคือ

##### 2.1.1 การเตรียมอะซิเตตบัฟเฟอร์

ทำการชั่งโซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate) 0.31 กรัม ใส่ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นเปิดกรดอะซิติกปริมาตร 1.6 มิลลิลิตรลงไป เพื่อทำการละลายโซเดียมอะซิเตต แล้วทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

##### 2.1.2 การเตรียมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร

ต้องเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น โดยดูที่ข้างขวดดังนี้

ปริมาณเนื้อกรด 37 % น้ำหนักต่อปริมาตร

ความหนาแน่น 1.186 กรัมต่อลิตร

น้ำหนักโมเลกุล 36.46 กรัมต่อโมล

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดไปหาความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกในขวดตามสูตร

$$C = (10 \times dx) / M_w$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นในหน่วย N (Normal)

d = ความหนาแน่น

x = ปริมาณเนื้อกรด (%)

$$\text{แทนค่า } C = (10 \times 1.186 \times 37) / 36.46 = 12.0356 \text{ N}$$

เนื่องจาก 1 Normality ของกรดไฮโดรคลอริกเท่ากับ 1 Molarity ของกรดไฮโดรคลอริกทำการ  
ไม่เตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกโดยการเจือจางความเข้มข้นที่ได้จากข้างขวดตามสูตรการนำไปใช้

$$N_1V_1 = N_2V_2 ; N = \text{ความเข้มข้นในหน่วยโมลาร์ (Molar)}$$

ต้องการเตรียมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร หรือ 0.04 โมลาร์ต่อลิตร จากกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 12.06 โมลาร์

$$\text{แทนค่า } V_1 = (0.04 \times 1000) / 12.06 = 3.398 \text{ มิลลิลิตร}$$

เพราะฉะนั้นทำการเปิดกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 3.398 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

2.1.3 การเตรียมสารละลาย TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ต่อลิตรในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร

น้ำหนักโมเลกุลของ TPTZ เท่ากับ 312.33 กรัมต่อโมล

ใน 1000 มิลลิโมลมี TPTZ เท่ากับ 312.33 กรัม

ถ้า 10 มิลลิโมลจะมี TPTZ เท่ากับ  $(312.33 \times 10) / 1000 = 3.1233$  กรัม

ฉะนั้นต้องชั่ง TPTZ 3.1233 กรัมละลายด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นที่เตรียมไว้แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

2.1.4 การเตรียมสารละลายเฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (Ferricchloride hexahydrate;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร

น้ำหนักของ เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต เท่ากับ 270.30 กรัมต่อโมล

ใน 1000 มิลลิโมลมี  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  เท่ากับ 270.30 กรัม

ถ้า 20 มิลลิโมลมี  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  เท่ากับ  $(270.30 \times 20) / 1000 = 5.4060$  กรัม

ฉะนั้นจะต้องชั่ง  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  5.4060 กรัม ละลายน้ำเล็กน้อยแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร

2.1.5 การเตรียมสารละลายเฟอร์รัสซัลเฟต (Ferroussulfate heptahydrate;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-3 มิลลิโมลาร์)

โดยที่น้ำหนัก โมเลกุลของ  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  เท่ากับ 278.02 กรัมต่อโมล

ใน 1000 มิลลิโมลมี  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  เท่ากับ 278.02 กรัม

ถ้า 3 มิลลิโมลจะมี  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  เท่ากับ  $(278.02 \times 3) / 1000 = 0.834$  กรัม

ฉะนั้นต้องชั่ง  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.834 กรัมใส่ลงในขวดปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปเพื่อทำการละลาย  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  แล้วทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร จะได้ความเข้มข้นของ  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  เริ่มต้นเท่ากับ 3 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร จากนั้นทำการเจือจางแบบ 2 เท่าไปเรื่อยๆ ด้วยน้ำกลั่นจนได้ความเข้มข้นของสารละลาย  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  เท่ากับ 3, 1.5, 0.75, 0.275 และ 0.1875 มิลลิโมลาร์ต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

### ผลการทดลองหาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

ตารางที่ ค.1 ผลได้ของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จาก กระจวาน กานพลูและเทียนตาคักแต่น

ชนิดของสมุนไพร	ผลได้ของน้ำมันหอมระเหยต่อสมุนไพร 100 กรัม (มิลลิลิตร)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย ± SD
กระจวาน	4.5	4.1	3.8	4.13 ± 0.35
กานพลู	3.2	3.6	3.6	3.47 ± 0.23
เทียนตาคักแต่น	1.8	1.9	1.8	1.83 ± 0.06

#### การหาค่า IC<sub>50</sub> ด้วยวิธีการ DPPH assay

ในการคำนวณหาค่า IC<sub>50</sub> ของน้ำมันหอมระเหยกระจวาน กานพลู เทียนตาคักแต่น บีเอชที และแอลฟา-โทโคฟีรอล จะต้องหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งในที่นี้ความเข้มข้นที่เหมาะสมมี 5 ระดับคือ 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำค่าทั้งหมดมาวิเคราะห์หาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และทำให้เป็นค่าร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical จากสูตร

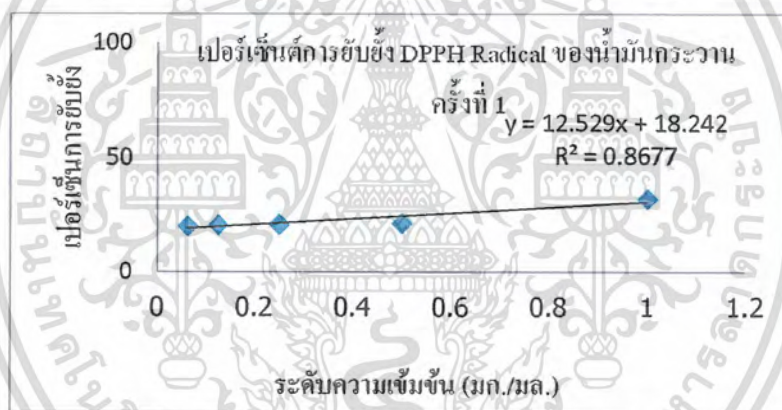
$$\%I = \frac{(A_0 - A_s)}{A_0} \times 100$$

เมื่อ A<sub>0</sub> คือค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (เมทานอลแทนน้ำมันหอมระเหย) และ A<sub>s</sub> คือค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันหอมระเหยและสารมาตรฐานในแต่ละความเข้มข้น ซึ่งทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยจากผลการทดลองทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงและค่าร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical ดังตาราง

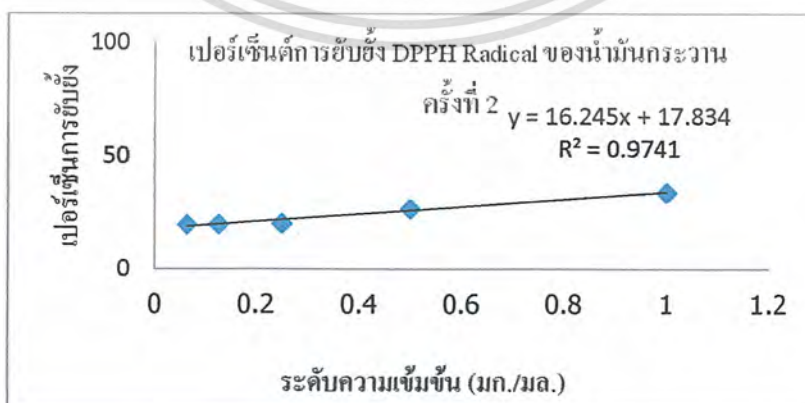
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันกระวานที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรและร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical

ความเข้มข้นของน้ำมันกระวาน (มก./มล.)	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2	
	ค่าการดูดกลืนแสง	%I	ค่าการดูดกลืนแสง	%I
Control	1.666	-	1.545	-
1	1.129	32.23	1.019	34.05
0.5	1.309	21.43	1.132	26.73
0.25	1.317	20.95	1.232	20.26
0.125	1.321	20.71	1.238	19.87
0.0625	1.330	20.17	1.240	19.74



รูปที่ ค.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical กับความเข้มข้นของน้ำมันกระวานครั้งที่ 1



รูปที่ ค.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical กับความเข้มข้นของเอกสารนี้เป็นเอกสารทงสวนไวสูวหรับการใชงานเพอการศกษาเทานน เมออนุญาตเทนาเปเชประยชนดานการคาน้ำมันกระวานครั้งที่ 2  
ไม่วากรณีใด ๆ ทั้งสน อักทงห้ามมิใหัดแปลงเนื้อหาและตองอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช

เมื่อสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical กับสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆแล้วจะได้สมการเส้นตรง ซึ่งจากสมการเส้นตรงนี้จะสามารถหาค่า  $IC_{50}$  ได้ดังนี้

การหาค่า  $IC_{50}$  ของน้ำมันกระวาน ครั้งที่ 1

$$\text{สมการเส้นตรง คือ } y = 12.52x + 18.24$$

เมื่อ  $y = 50$  (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ

$$50 = 12.52x + 18.24$$

$$\text{จะได้ } x = 2.538$$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 2.538 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การหาค่า  $IC_{50}$  ของน้ำมันกระวาน ครั้งที่ 2

$$\text{สมการเส้นตรง คือ } y = 16.24x + 17.83$$

เมื่อ  $y = 50$  (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ

$$50 = 16.24x + 17.83$$

$$\text{จะได้ } x = 1.981$$

ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1.981 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้นนำค่า  $IC_{50}$  ที่ได้จากการคำนวณทั้ง 2 ค่ามาหาค่าเฉลี่ยจะได้

$$\begin{aligned} IC_{50} \text{ เฉลี่ย} &= (2.538 + 1.981) / 2 \\ &= 2.26 \pm 0.39 \end{aligned}$$

ดังนั้นการหาค่า  $IC_{50}$  ของน้ำมันกระวานจึงมีค่าเท่ากับ 2.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

**ตารางที่ ค.3** ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันกานพลูที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรและร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical

ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู (มก./มล.)	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2	
	ค่าการดูดกลืนแสง	%I	ค่าการดูดกลืนแสง	%I
Control	1.666	-	1.545	-
1	0.152	90.88	0.144	90.68
0.5	0.156	90.64	0.148	90.42
0.25	0.151	90.94	0.149	90.36
0.125	0.173	89.62	0.155	89.97
0.0625	0.217	86.97	0.197	87.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาค่า  $IC_{50}$  ของน้ำมันกานพลู ครั้งที่ 1

สมการเส้นตรง คือ  $y = 2.690x + 88.76$

เมื่อ  $y = 50$  (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ

$$50 = 2.690x + 88.76$$

จะได้  $x = -14.409$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ -14.409 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การหาค่า  $IC_{50}$  ของน้ำมันกานพลู ครั้งที่ 2

สมการเส้นตรง คือ  $y = 2.266x + 88.85$

เมื่อ  $y = 50$  (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ

$$50 = 2.266x + 88.85$$

จะได้  $x = -17.145$

ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ -17.145 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้นนำค่า  $IC_{50}$  ที่ได้จากการคำนวณทั้ง 3 ค่ามาหาค่าเฉลี่ยจะได้

$$\begin{aligned} IC_{50} \text{ เฉลี่ย} &= \frac{((-14.409) + (-17.145))}{2} \\ &= -15.77 \pm 1.93 \end{aligned}$$

ดังนั้นเนื่องจากค่า  $IC_{50}$  ของน้ำมันกานพลูคิดลบ แสดงว่าจะต้องใช้ปริมาณน้ำมันกานพลูต่ำกว่า 0.0625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้ง DPPH ลงร้อยละ 50

ตารางที่ ค.4 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันเทียนตาตักแดนที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรและร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical

ความเข้มข้นของ น้ำมันเทียนตาตักแดน (มก./มล.)	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2	
	ค่าการดูดกลืนแสง	%I	ค่าการดูดกลืนแสง	%I
Control	1.666	-	1.545	-
1	1.231	26.11	1.216	21.29
0.5	1.240	25.57	1.222	20.91
0.25	1.310	21.37	1.283	16.96
0.125	1.315	21.07	1.294	16.25
0.0625	1.324	20.53	1.305	15.53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาค่า  $IC_{50}$  ของน้ำมันเทียนตาตุ๊กเตน ครั้งที่ 1

$$\text{สมการเส้นตรง คือ } y = 6.415x + 20.44$$

เมื่อ  $y = 50$  (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ

$$50 = 6.415x + 20.44$$

$$\text{จะได้ } x = 4.608$$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 4.608 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การหาค่า  $IC_{50}$  ของน้ำมันเทียนตาตุ๊กเตน ครั้งที่ 2

$$\text{สมการเส้นตรง คือ } y = 6.451x + 15.68$$

เมื่อ  $y = 50$  (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ

$$50 = 6.451x + 15.68$$

$$\text{จะได้ } x = 5.320$$

ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 5.320 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากนั้นนำค่า  $IC_{50}$  ที่ได้จากการคำนวณทั้ง 2 ค่ามาหาค่าเฉลี่ยจะได้

$$\begin{aligned} IC_{50} \text{ เฉลี่ย} &= (4.608 + 5.320)/2 \\ &= 4.96 \pm 0.50 \end{aligned}$$

ดังนั้นการหาค่า  $IC_{50}$  ของน้ำมันเทียนตาตุ๊กเตน จึงมีค่าเท่ากับ 4.96 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ค.5 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานบีเฮททีที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรและร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical

ความเข้มข้นของบีเฮทที (BHT) (มก./มล.)	ครั้งที่ 2		ครั้งที่ 3	
	ค่าการดูดกลืนแสง	%I	ค่าการดูดกลืนแสง	%I
Control	1.666	-	1.545	-
1	0.145	91.30	0.134	91.26
0.5	0.148	91.12	0.135	91.46
0.25	0.154	90.76	0.131	91.52
0.125	0.155	90.70	0.147	90.49
0.0625	0.176	89.44	0.160	89.64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น สมการเส้นตรง คือ  $y = 1.404x + 90.11$  เอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อ  $y = 50$  (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ

$$50 = 1.404x + 90.11$$

จะได้  $x = -28.568$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $-28.568$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร  
การหาค่า  $IC_{50}$  ของบีเอชที ครั้งที่ 2

สมการเส้นตรง คือ  $y = 1.341x + 90.30$

เมื่อ  $y = 50$  (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ

$$50 = 1.341x + 90.30$$

จะได้  $x = -30.052$

ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $-30.052$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร  
จากนั้นนำค่า  $IC_{50}$  ที่ได้จากการคำนวณทั้ง 2 ค่ามาหาค่าเฉลี่ยจะได้

$$\begin{aligned} IC_{50} \text{ เฉลี่ย} &= ((-28.568) + (-30.052))/2 \\ &= -29.31 \pm 1.05 \end{aligned}$$

ดังนั้นเนื่องจากค่า  $IC_{50}$  ของบีเอชทีติดลบ แสดงว่าจำเป็นต้องใช้ปริมาณบีเอชทีต่ำกว่า  
 $0.0625$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้ง DPPH ลงร้อยละ 50

ตารางที่ ค.6 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานแอลฟา-โทโคฟีรอลที่ความยาวคลื่น 517 นาโน  
เมตรและร้อยละของการยับยั้ง DPPH radical

ความเข้มข้นของแอลฟา-โทโคฟีรอล (มก./มล.)	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2	
	ค่าการดูดกลืนแสง	%I	ค่าการดูดกลืนแสง	%I
Control	1.666	-	1.545	-
1	0.146	91.24	0.135	91.26
0.5	0.147	91.18	0.132	91.46
0.25	0.148	91.12	0.131	91.52
0.125	0.160	90.40	0.147	90.49
0.0625	0.173	89.62	0.160	89.64

การหาค่า  $IC_{50}$  ของแอลฟา-โทโคฟีรอล ครั้งที่ 1

สมการเส้นตรง คือ  $y = 1.302x + 90.20$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
เมื่อ  $y = 50$  (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$50 = 1.302x + 90.20$$

จะได้  $x = -30.876$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $-30.876$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร  
การหาค่า  $IC_{50}$  ของแอลฟา-โทโคฟีรอล ครั้งที่ 2

สมการเส้นตรง คือ  $y = 1.231x + 90.39$

เมื่อ  $y = 50$  (ร้อยละ 50) แทนค่าในสมการ

$$50 = 1.231x + 90.39$$

จะได้  $x = -32.811$

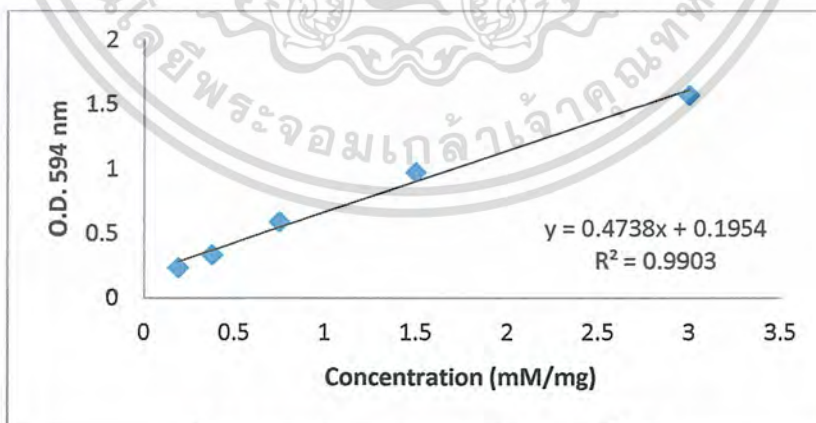
ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ  $-32.811$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร  
จากนั้นนำค่า  $IC_{50}$  ที่ได้จากการคำนวณทั้ง 2 ค่ามาหาค่าเฉลี่ยจะได้

$$\begin{aligned} IC_{50} \text{ เฉลี่ย} &= ((-30.876) + (-32.811))/2 \\ &= -31.84 \pm 1.37 \end{aligned}$$

ดังนั้นเนื่องจากค่า  $IC_{50}$  ของแอลฟา-โทโคฟีรอลคิดลบ แสดงว่าจะต้องใช้ปริมาณ  
แอลฟา-โทโคฟีรอลต่ำกว่า  $0.0625$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการยับยั้ง DPPH ลงร้อยละ 50

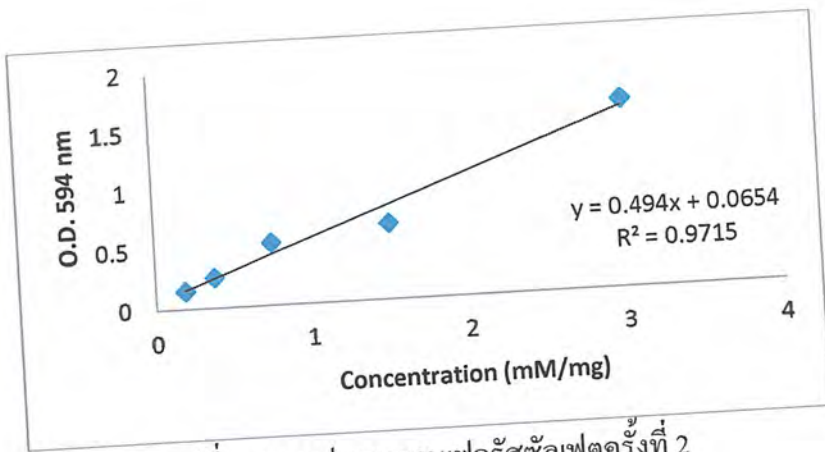
### ผลการทดลองหาสมบัติการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

การวิเคราะห์หาสมบัติการเป็นตัวรีดิวซ์ของน้ำมันหอมระเหยโดยวิธี FRAP  
ทำการสร้างกราฟมาตรฐานของ  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  ที่ความเข้มข้นตั้งแต่  $0-3$  มิลลิโมลต่อลิตร และทำ  
การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น  $594$  นาโนเมตร เพื่อใช้ในการหาปริมาณความเข้มข้นของ  
 $Fe^{2+}$ -TPTZ



รูปที่ ๓.3 กราฟมาตรฐานเฟอร์รัสซัลเฟตครั้งที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๔.4 กราฟมาตรฐานเฟอร์ริซัลเฟตครั้งที่ 2

ตารางที่ ๔.7 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันกานพลูที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร และปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ในน้ำมันกานพลู

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	$[\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}]$ (mM/mg)
1	2.579	5.0401
2	2.620	5.1720

ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ในน้ำมันกานพลู

ครั้งที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 2.579

สมการเส้นตรงคือ  $y = 0.473x + 0.195$

เมื่อ  $y = 2.579$  แทนค่าในสมการ

$$2.579 = 0.473x + 0.195$$

$$x = 5.0401 \text{ mM/mg}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ เท่ากับ 5.0401 mM/mg

ครั้งที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 2.620

สมการเส้นตรงคือ  $y = 0.494x + 0.065$

เมื่อ  $y = 2.620$  แทนค่าในสมการ

$$2.620 = 0.494x + 0.065$$

$$x = 5.1720 \text{ mM/mg}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ เท่ากับ 5.1720 mM/mg

ดังนั้นได้ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ของน้ำมันกานพลูเฉลี่ยได้เท่ากับ 5.1060 mM/mg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันเทียนตาดักแตนที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร และ  
ความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ในน้ำมันเทียนตาดักแตน

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	$[\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}]$ (mM/mg)
1	2.108	4.0444
2	2.083	4.0850

ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ในน้ำมันเทียนตาดักแตน

ครั้งที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 2.108

สมการเส้นตรงคือ  $y = 0.473x + 0.195$

เมื่อ  $y = 2.108$  แทนค่าในสมการ

$$2.108 = 0.473x + 0.195$$

$$x = 4.0444 \text{ mM/mg}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ เท่ากับ 4.0444 mM/mg

ครั้งที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 2.083

สมการเส้นตรงคือ  $y = 0.494x + 0.065$

เมื่อ  $y = 2.083$  แทนค่าในสมการ

$$2.083 = 0.494x + 0.065$$

$$x = 4.0850 \text{ mM/mg}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ เท่ากับ 4.0850 mM/mg

ดังนั้นได้ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ของน้ำมันเทียนตาดักแตนเฉลี่ยได้เท่ากับ 4.0647 mM/mg

ตารางที่ ค.9 ค่าการดูดกลืนแสงของน้ำมันกระวานที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร และปริมาณ  
ความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ในน้ำมันกระวาน

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	$[\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}]$ (mM/mg)
1	0.929	1.5518
2	0.562	1.0061

ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ในน้ำมันกระวาน

ครั้งที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.929

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
สมการเส้นตรงคือ  $y = 0.473x + 0.195$   
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อ  $y = 0.929$  แทนค่าในสมการ

$$0.929 = 0.473x + 0.195$$

$$x = 1.5518 \text{ mM/mg}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ เท่ากับ 1.5518 mM/mg

ครั้งที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.562

สมการเส้นตรงคือ  $y = 0.494x + 0.065$

เมื่อ  $y = 0.562$  แทนค่าในสมการ

$$0.562 = 0.494x + 0.065$$

$$x = 1.0061 \text{ mM/mg}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ เท่ากับ 1.0061 mM/mg

ดังนั้นได้ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ของน้ำมันกระวานเฉลี่ยได้เท่ากับ 1.2789 mM/mg

ตารางที่ ค.10 ค่าการดูดกลืนแสงของวิตามินอีที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร และปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ในวิตามินอี

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	$[\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}]$ (mM/mg)
1	2.117	4.0634
2	2.107	4.1336

ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ในวิตามินอี

ครั้งที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 2.117

สมการเส้นตรงคือ  $y = 0.473x + 0.195$

เมื่อ  $y = 2.117$  แทนค่าในสมการ

$$2.117 = 0.473x + 0.195$$

$$x = 4.0634 \text{ mM/mg}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ เท่ากับ 4.0634 mM/mg

ครั้งที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 2.107

สมการเส้นตรงคือ  $y = 0.494x + 0.065$

เมื่อ  $y = 2.107$  แทนค่าในสมการ

$$2.107 = 0.494x + 0.065$$

$$x = 4.1336 \text{ mM/mg}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการอ้างอิงเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นได้ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ของวิตามินอีเฉลี่ยได้เท่ากับ 4.0985 mM/mg

ตารางที่ ค.11 ค่าการดูดกลืนแสงของบีเฮกทีที่ความยาวคลื่น 594 นาโนเมตร และปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ในบีเฮกที

ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง	$[\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}]$ (mM/mg)
1	1.601	2.9725
2	1.333	2.5668

ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ในบีเฮกที

ครั้งที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 1.601

สมการเส้นตรงคือ  $y = 0.473x + 0.195$

เมื่อ  $y = 1.601$  แทนค่าในสมการ

$$1.601 = 0.473x + 0.195$$

$$x = 2.9725 \text{ mM/mg}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ เท่ากับ 2.9725 mM/mg

ครั้งที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 1.333

สมการเส้นตรงคือ  $y = 0.494x + 0.065$

เมื่อ  $y = 1.333$  แทนค่าในสมการ

$$1.333 = 0.494x + 0.065$$

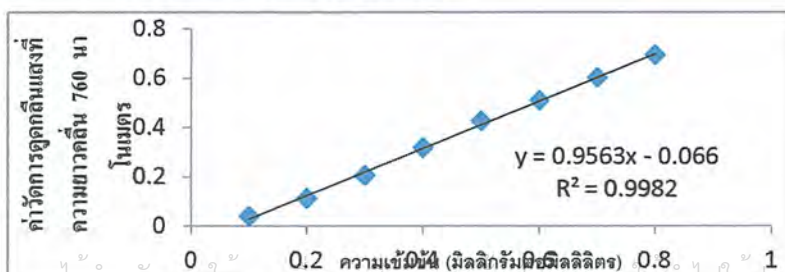
$$x = 2.5668 \text{ mM/mg}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ เท่ากับ 2.5668 mM/mg

ดังนั้นได้ปริมาณความเข้มข้นของ  $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ ของบีเฮกทีเฉลี่ยได้เท่ากับ 2.7696 mM/mg

ผลการทดลองหาสมบัติการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

สร้างกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้เผยแพร่เนื้อหาและข้อมูลใดๆ ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ค.5 กราฟมาตรฐานกรดแกลลิก

**ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำมันเทียนตาตักแตน**

ครั้งที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.460

$$\text{สมการเส้นตรงคือ } y = 0.9563x - 0.066$$

เมื่อ  $y = 0.460$  แทนค่าในสมการ

$$0.460 = 0.9563x - 0.066$$

$$x = 0.550 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.550 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย

ครั้งที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.476

$$\text{สมการเส้นตรงคือ } y = 0.9563x - 0.066$$

เมื่อ  $y = 0.476$  แทนค่าในสมการ

$$0.476 = 0.9563x - 0.066$$

$$x = 0.567 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.567 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย

ครั้งที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.453

$$\text{สมการเส้นตรงคือ } y = 0.9563x - 0.066$$

เมื่อ  $y = 0.453$  แทนค่าในสมการ

$$0.453 = 0.9563x - 0.066$$

$$x = 0.543 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 3 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.543 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการคำนวณทั้ง 3 ค่ามาหาค่าเฉลี่ยจะได้

$$\text{ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด} = (0.550 + 0.567 + 0.543)/3$$

$$= 0.553 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย}$$

ดังนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำมันเทียนตาตักแตนจึงมีค่าเท่ากับ 0.553

มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย

**ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำมันกานพลู**

ครั้งที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.542

$$\text{สมการเส้นตรงคือ } y = 0.9563x - 0.066$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ส่งเมื่อวันสำหรับ  $y = 0.542$  แทนค่าในสมการเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้าม  $0.542 = 0.9563x - 0.066$  อย่งอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$x = 0.636 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.636 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย

ครั้งที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.630

$$\text{สมการเส้นตรงคือ } y = 0.9563x - 0.066$$

เมื่อ  $y = 0.630$  แทนค่าในสมการ

$$0.630 = 0.9563x - 0.066$$

$$x = 0.728 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด 0.728 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย

ครั้งที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.670

$$\text{สมการเส้นตรงคือ } y = 0.9563x - 0.066$$

เมื่อ  $y = 0.670$  แทนค่าในสมการ

$$0.670 = 0.9563x - 0.066$$

$$x = 0.764 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 3 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.764 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการคำนวณทั้ง 3 ค่านำมาหาค่าเฉลี่ยจะได้

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด} &= (0.636 + 0.728 + 0.764)/3 \\ &= 0.709 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย} \end{aligned}$$

ดังนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำมันกานพลูจึงมีค่าเท่ากับ 0.709 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย

**ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในน้ำมันกระวาน**

ครั้งที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.380

$$\text{สมการเส้นตรงคือ } y = 0.9563x - 0.066$$

เมื่อ  $y = 0.380$  แทนค่าในสมการ

$$0.380 = 0.9563x - 0.066$$

$$x = 0.466 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.466 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย

ครั้งที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.321

$$\text{สมการเส้นตรงคือ } y = 0.9563x - 0.066$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารหนึ่งวันเร็ว หรือบริการเชิงงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่าในรูปแบบใด ๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นหากมีเหตุที่เปลี่ยนแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อ  $y = 0.321$  แทนค่าในสมการ

$$0.321 = 0.9563x - 0.066$$

$x = 0.405$  มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย

ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.405 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย

ครั้งที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.370

สมการเส้นตรงคือ  $y = 0.9563x - 0.066$

เมื่อ  $y = 0.370$  แทนค่าในสมการ

$$0.370 = 0.9563x - 0.066$$

$x = 0.456$  มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย

ในการทดสอบครั้งที่ 3 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.456 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการคำนวณทั้ง 3 ค่ามาหาค่าเฉลี่ยจะได้

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด} &= (0.466 + 0.405 + 0.456)/3 \\ &= 0.442 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย} \end{aligned}$$

ดังนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำมันกระวานจึงมีค่าเท่ากับ 0.442

มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมน้ำมันหอมระเหย

**ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในปีเอชที**

ครั้งที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.770

สมการเส้นตรงคือ  $y = 0.9563x - 0.066$

เมื่อ  $y = 0.770$  แทนค่าในสมการ

$$0.770 = 0.9563x - 0.066$$

$x = 0.874$  มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมปีเอชที

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.874 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมปีเอชที

ครั้งที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.850

สมการเส้นตรงคือ  $y = 0.9563x - 0.066$

เมื่อ  $y = 0.850$  แทนค่าในสมการ

$$0.850 = 0.9563x - 0.066$$

$x = 0.958$  มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมปีเอชที

ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.958 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมปีเอชที

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครั้งที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.760

$$\text{สมการเส้นตรงคือ } y = 0.9563x - 0.066$$

เมื่อ  $y = 0.760$  แทนค่าในสมการ

$$0.760 = 0.9563x - 0.066$$

$$x = 0.867 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมบีเอชที}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 3 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.867 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมบีเอชที

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการคำนวณทั้ง 3 ค่ามาหาค่าเฉลี่ยจะได้

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด} &= (0.874 + 0.958 + 0.867) / 3 \\ &= 0.900 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมบีเอชที} \end{aligned}$$

ดังนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของบีเอชทีจึงมีค่าเท่ากับ 0.900 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมบีเอชที

**ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในแอลฟา-โทโคฟีรอล**

ครั้งที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.515

$$\text{สมการเส้นตรงคือ } y = 0.9563x - 0.066$$

เมื่อ  $y = 0.515$  แทนค่าในสมการ

$$0.515 = 0.9563x - 0.066$$

$$x = 0.608 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมแอลฟา-โทโคฟีรอล}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 1 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.608 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมแอลฟา-โทโคฟีรอล

ครั้งที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.515

$$\text{สมการเส้นตรงคือ } y = 0.9563x - 0.066$$

เมื่อ  $y = 0.515$  แทนค่าในสมการ

$$0.515 = 0.9563x - 0.066$$

$$x = 0.608 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมแอลฟา-โทโคฟีรอล}$$

ในการทดสอบครั้งที่ 2 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.608 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมแอลฟา-โทโคฟีรอล

ครั้งที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้เท่ากับ 0.523

$$\text{สมการเส้นตรงคือ } y = 0.9563x - 0.066$$

เมื่อ  $y = 0.523$  แทนค่าในสมการ

$$0.523 = 0.9563x - 0.066$$

$$x = 0.616 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมแอลฟา-โทโคฟีรอล}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดสอบครั้งที่ 3 ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดเท่ากับ 0.616 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมแอลฟา-โทโคฟีรอล

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการคำนวณทั้ง 3 ค่ามาหาค่าเฉลี่ยจะได้

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด} &= (0.608 + 0.608 + 0.616)/3 \\ &= 0.610 \text{ มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมแอลฟา-โทโคฟีรอล} \end{aligned}$$

ดังนั้นปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของแอลฟา-โทโคฟีรอลจึงมีค่าเท่ากับ 0.610 มิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อมิลลิกรัมแอลฟาโทโคฟีรอล



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ง

## การคำนวณหาปริมาณสารอะฟลาทอกซินบี1 ในถั่วลิสง

ตารางที่ ง.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี1

ความเข้มข้นของ สารมาตรฐาน (ppb)	ครั้งที่ทำการทดลอง			
	1		2	
	ค่าการดูดกลืนแสง	% maximal biding	ค่าการดูดกลืนแสง	% maximal biding
0	2.699	100	2.386	100
4	1.535	56.87292	1.008	42.24644
10	0.785	29.08485	0.635	26.61358
20	0.433	16.04298	0.381	15.96815
40	0.303	11.22638	0.27	11.31601

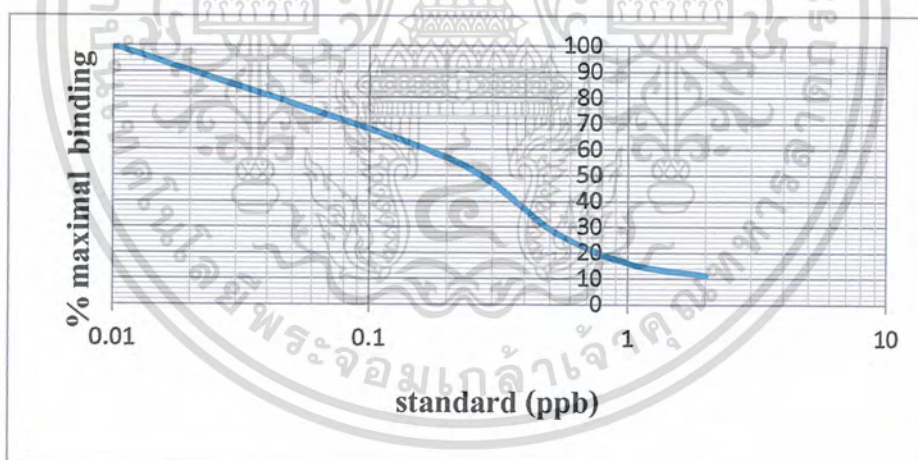
ตารางที่ ง.2 ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างถั่วลิสงที่ปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินที่สร้างโดย *Aspergillus flavus* PN-09

ชนิดน้ำมันที่ ทาบนฝาขวด (mg/g)	ความเข้มข้น ของน้ำมัน	ครั้งที่ทำการทดลอง			
		1		2	
		ค่าการดูดกลืนแสง	% maximal biding	ค่าการดูดกลืนแสง	% maximal biding
น้ำมันกานพลู	0	1.751	64.88	2.126	89.10
	1	2.353	87.18	1.595	66.85
	4	1.793	66.43	1.991	83.45
น้ำมันเทียน ตาดักแตน	0	1.751	64.88	2.126	89.10
	2	1.873	69.40	1.622	67.98
	4	2.057	76.21	1.686	70.66
	8	1.951	72.29	1.927	80.76

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

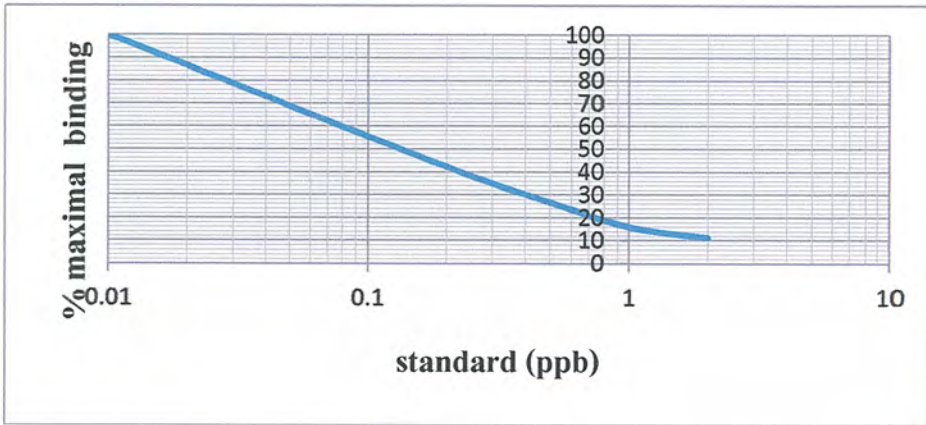
ตารางที่ ง.3 ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างถั่วลิสงที่ปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินที่สร้างโดย *Aspergillus flavus* TISTR 3041

ชนิดน้ำมันที่ ทาบหน้าเพลต	ความเข้มข้น ของน้ำมัน (mg/g)	ครั้งที่ทำการทดลอง			
		1		2	
		ค่าการดูดกลืนแสง	% maximal biding	ค่าการดูดกลืนแสง	% maximal biding
น้ำมันกานพลู	0	2.496	92.4787	1.992	83.48701
	1	1.825	67.61764	1.879	78.75105
	4	2.127	78.80697	2.078	87.09137
น้ำมันเทียน ตาคักแตน	0	2.496	92.4787	1.992	83.48701
	2	2.22	82.25269	2.177	91.24057
	4	2.07	76.69507	2.164	90.69573
	8	1.872	69.35902	1.805	75.64962

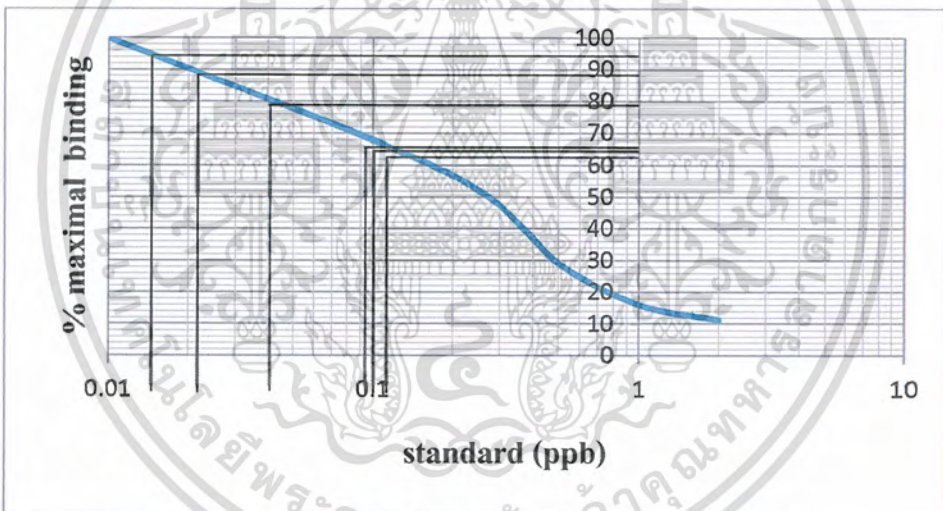


รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง (%maximal binding) กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐาน (พีพีบี) ครั้งที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ๓.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การดูดกลืนแสง (%maximal binding) กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐาน (พีพีบี) ครั้งที่ 2



รูปที่ ๓.3 การหาปริมาณอะฟลาทอกซินซึ่งอ่านได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ maximal binding กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐานอะฟลาทอกซิน (กานพลูซ้ำที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

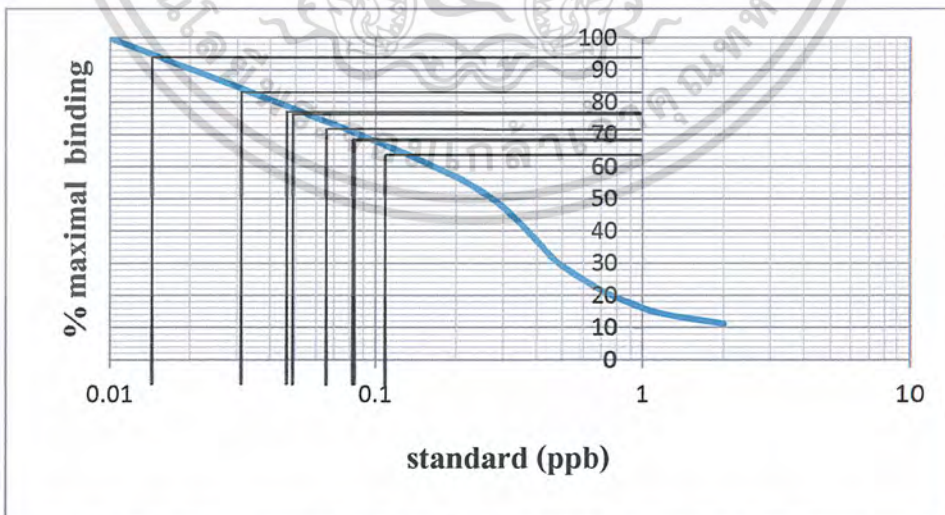
ตารางที่ ง.4 เปรอร์เซ็นต์ของ maximal biding และค่าปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่อ่านค่าได้จากกราฟมาตรฐาน (กานพลูซ้ำที่ 1)

ความเข้มข้นน้ำมันกานพลู (mg/g)	% maximal biding		ปริมาณอะฟลาทอกซินที่อ่านได้ จากกราฟมาตรฐาน (ppb)	
	<i>A. flavus</i> PN-09	<i>A. flavus</i> TISTR 3041	<i>A. flavus</i> PN-09	<i>A. flavus</i> TISTR 3041
0	64.880	92.480	0.125	0.018
1	87.180	67.620	0.025	0.105
4	66.430	78.810	0.112	0.046

ตารางที่ ง.5 ปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างถั่วลิสง (กานพลูซ้ำที่ 1)

ความเข้มข้นน้ำมันกานพลู (mg/g)	ปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างถั่วลิสง (ppb) <sup>a</sup>	
	<i>A. flavus</i> PN-09	<i>A. flavus</i> TISTR 3041
0	2.50	0.36
1	0.50	2.10
4	2.24	0.92

<sup>a</sup> เป็นค่าปริมาณอะฟลาทอกซินที่อ่านได้จากกราฟคูณด้วย 20 (dilution factor) จะได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่าง



รูปที่ ง.4 การหาปริมาณอะฟลาทอกซินซึ่งอ่านได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์

maximal biding กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐานอะฟลาทอกซิน (เทียบตาคู่แค่น้ำที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

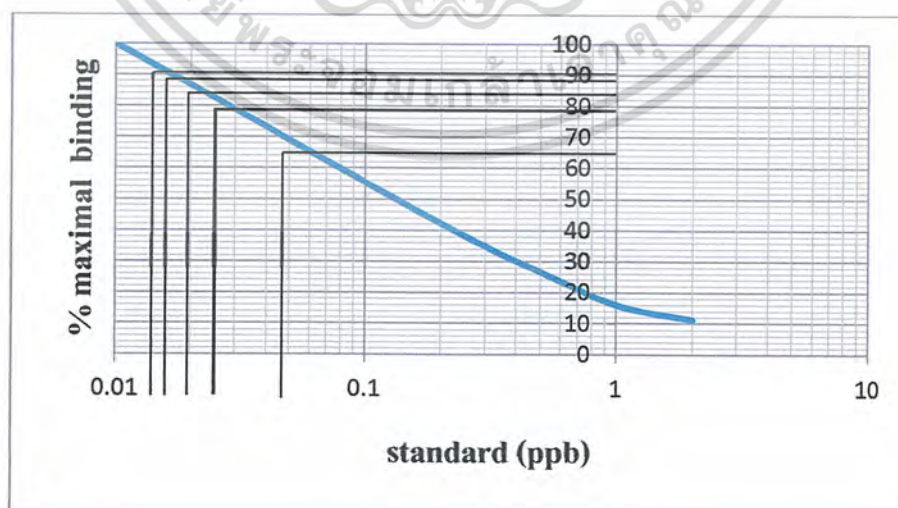
ตารางที่ ง.6 เปอร์เซ็นต์ของ maximal binding และค่าปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่อ่านค่าได้จากกราฟมาตรฐาน (เทียบค่าตั้งต้นซ้ำที่ 1)

ความเข้มข้นน้ำมันเทียน คาตักแตน (mg/g)	% maximal binding		ปริมาณอะฟลาทอกซินที่อ่านได้ จากกราฟมาตรฐาน (ppb)	
	<i>A. flavus</i> PN-09	<i>A. flavus</i> TISTR 3041	<i>A. flavus</i> PN-09	<i>A. flavus</i> TISTR 3041
	0	64.880	92.480	0.125
2	69.400	82.250	0.092	0.036
4	76.210	76.700	0.056	0.052
8	72.290	69.360	0.073	0.092

ตารางที่ ง.7 ปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างถั่วลิสง (เทียบค่าตั้งต้นซ้ำที่ 1)

ความเข้มข้นน้ำมันเทียนคาตักแตน (mg/g)	ปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างถั่วลิสง (ppb) <sup>a</sup>	
	<i>A. flavus</i> PN-09	<i>A. flavus</i> TISTR 3041
0	2.50	0.36
2	1.84	0.72
4	1.12	1.04
8	1.46	1.84

<sup>a</sup> เป็นค่าปริมาณอะฟลาทอกซินที่อ่านได้จากกราฟคูณด้วย 20 (dilution factor) จะได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่าง



รูปที่ ง.5 การหาปริมาณอะฟลาทอกซินซึ่งอ่านได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์เอกสารที่เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า maximal binding กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐานอะฟลาทอกซิน (กานพลูซ้ำที่ 2) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น ออกทงท มิมีเหตุดเบลงเนื้อหาและตองอายังถึงเจ้าของเอกสารทุกครงทมีการนไปใช้

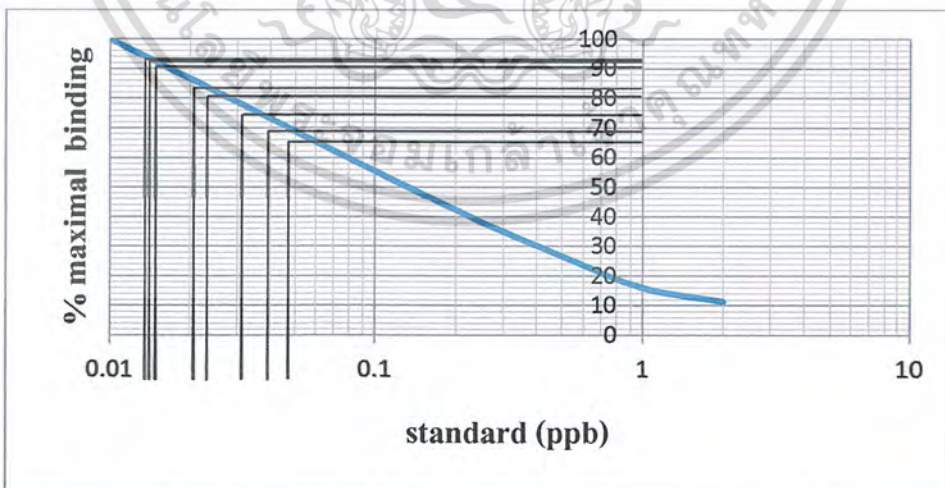
ตารางที่ ๖.๘ เปอร์เซ็นต์ของ maximal binding และค่าปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่อ่านค่าได้จากกราฟมาตรฐาน (กานพลูซ้ำที่ 2)

ความเข้มข้นน้ำมันกานพลู (mg/g)	% maximal binding		ปริมาณอะฟลาทอกซินที่อ่านได้ จากกราฟมาตรฐาน (ppb)	
	<i>A. flavus</i> PN-09	<i>A. flavus</i> TISTR 3041	<i>A. flavus</i> PN-09	<i>A. flavus</i> TISTR 3041
	0	89.100	83.490	0.018
1	66.850	78.750	0.055	0.298
4	83.450	87.090	0.018	0.019

ตารางที่ ๖.๙ ปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างถั่วลิสง (กานพลูซ้ำที่ 2)

ความเข้มข้นน้ำมันกานพลู (mg/g)	ปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างถั่วลิสง (ppb) <sup>a</sup>	
	<i>A. flavus</i> PN-09	<i>A. flavus</i> PN-09
Control	0.36	0.48
1	1.10	5.96
4	0.36	0.38

<sup>a</sup> เป็นค่าปริมาณอะฟลาทอกซินที่อ่านได้จากกราฟคูณด้วย 20 (dilution factor) จะได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่าง



รูปที่ ๖.๖ การหาปริมาณอะฟลาทอกซินซึ่งอ่านได้จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ maximal binding กับความเข้มข้นของสารพิษมาตรฐานอะฟลาทอกซิน (เทียบตาคักแตนซ้ำที่ 2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง.10 เปอร์เซ็นต์ของ maximal binding และค่าปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่อ่านค่าได้จากกราฟมาตรฐาน(เทียบตาคัดกแตนซ้ำที่ 2)

ความเข้มข้นน้ำมันเทียบตาคัดกแตน (mg/g)	% maximal binding		ปริมาณอะฟลาทอกซินที่อ่านได้จากกราฟมาตรฐาน (ppb)	
	<i>A. flavus</i> PN-09	<i>A. flavus</i> TISTR	<i>A. flavus</i> PN-09	<i>A. flavus</i> TISTR
		3041		3041
Control	89.100	83.490	0.018	0.024
2	67.980	91.240	0.052	0.016
4	70.660	90.690	0.045	0.017
8	80.760	75.650	0.027	0.036

ตารางที่ ง.11 ปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างถั่วลิสง (เทียบตาคัดกแตนซ้ำที่ 2)

ความเข้มข้นน้ำมันเทียบตาคัดกแตน (mg/g)	ปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างถั่วลิสง (ppb) <sup>a</sup>	
	<i>A. flavus</i> PN-09	<i>A. flavus</i> PN-09
	Control	0.36
2	1.04	0.32
4	0.90	0.34
8	0.54	0.72

<sup>a</sup> เป็นค่าปริมาณอะฟลาทอกซินที่อ่านได้จากกราฟคูณด้วย 20 (dilution factor) จะได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑.12 ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินบี1 ในตัวอย่างถั่วลิสงที่เก็บภายในบรรจุภัณฑ์ร่วมกับน้ำมันหอมระเหย

ชนิดของเชื้อรา	ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินบี1 ในตัวอย่างถั่วลิสง (ppb) ภายใต้ ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยในถั่ว (มิลลิกรัมต่อกรัม)					
	Control	กานพลู			เทียนตาตุ๊กแตน	
	0	1	4	2	4	8
<i>A. flavus</i> TISTR 3041	0.42 ± 0.08	4.03 ± 2.73	0.65 ± 0.38	0.52 ± 0.28	0.69 ± 0.50	1.28 ± 0.79
<i>A. flavus</i> PN-09	1.43 ± 1.51	0.80 ± 0.42	1.30 ± 1.33	1.44 ± 0.57	1.01 ± 0.16	1.00 ± 0.65

## ภาคผนวก จ

### แนวทางการจำแนกชนิดเชื้อรา

#### DEUTEROMYCETES

ลักษณะโดยทั่วไป

ดิวเทอโรไมซีทีส (Deuteromycetes) หรือเชื้อราที่ไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (fungi imperfecti) รวมถึงเชื้อราที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารและอากาศ และเชื้อราหลายชนิด (species) สามารถสร้างสารพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึม เชื้อราในชั้นนี้จะประกอบด้วย “form-genera” และ “form-species” ซึ่งพบเฉพาะในรูป anamorph (ระยะที่พบเพียงการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ หรือ conidial state) อย่างไรก็ตามในรูปที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งก็คือ ascomycetous teleomorphs หรือ basidiomycetous teleomorphs (ระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ หรือ perfect state) สัมพันธ์กับเชื้อราหลายชนิด ดิวเทอโรไมซีทีสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยพื้นฐานของการสร้างสปอร์ (conidium formation)

1. COELOMYCETES : คอนิไดโอฟอร์เกิดขึ้นอยู่ภายในพรีตบอดี (conidiomata)

- Melanconiales : คอนิไดโอฟอร์อยู่ในอวัยวะรูปร่างคล้ายถ้วยปากกว้าง

- Sphaeropsidales : คอนิไดโอฟอร์อยู่ในอวัยวะที่เกิดจากการอัดตัวกันแน่นของเส้นใย

ลักษณะเป็นรูปคนโท (pycnidia)

2. HYPHOMYCETES หรือ MONILIALES

- คอนิไดโอฟอร์เกิดขึ้นบนเส้นใยปกติ หรือเส้นใยที่รวมตัวกัน (aggregated hyphae)

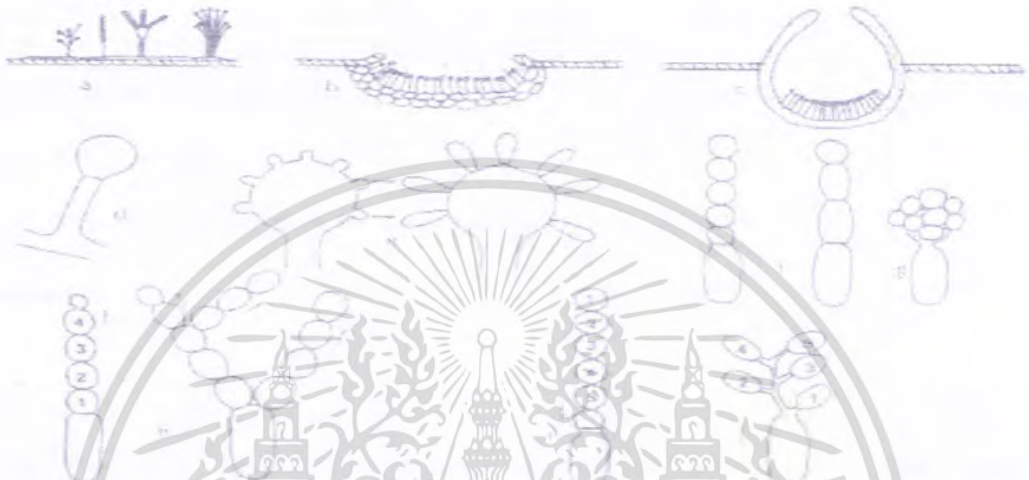
เชื้อรากลุ่มนี้ทุกชนิดที่พิจารณาในที่นี้ได้จัดอยู่ในกลุ่ม Moniliales ยกเว้น *Phoma* (Sphaeropsidales) และ *Epicoccum* (Melanconiales)

หลักเกณฑ์ในการจำแนกดิวเทอโรไมซีทีสอาศัยการพิจารณารูปแบบของการสร้างคอนิเดียม (conidiogenesis) โดยในที่นี้จะพิจารณาเฉพาะชนิดหลักๆ เท่านั้น หากต้องการข้อมูลเพิ่มเติมสามารถศึกษาเพิ่มได้จาก Cole และ Samson (1979) ในการขยายพันธุ์ของเชื้อราชั้นดิวเทอโรไมซีทีส จะเกิดขึ้นโดยคอนิเดียม (conidia) ซึ่งเป็น โครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและเคลื่อนที่ไม่ได้ โดยไม่ได้เกิดขึ้นแบบเดียวกับการเกิด sporangiospores คอนิเดียมมีรูปร่างและสีหลายแบบ และอาจเกิดอย่างอิสระเป็นสายโซ่หรือเป็นหัวที่มีลักษณะเหนียว (slimy head) โดยจะเกิดขึ้นบนเซลล์พิเศษที่เรียกว่า คอนิไดโอจีนัสเซลล์ (conidiogenous cells) ซึ่งเซลล์ชนิดนี้สามารถเกิดขึ้นโดยตรงภายในหรือเกิดจากเส้นใย (vegetative hypha) หรือเกิดบนโครงสร้างที่ช่วยค้ำจุน (stipe และ branches) ระบบของเส้นใยนี้เรียกว่า conidiophore

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคนิเดียมสามารถเกิดได้หลายรูปแบบ ดังนี้

1. acropetal chain หมายถึง conidiogenous loci ซึ่งเป็นที่ที่โคนิเดียมโผล่ขึ้นจำนวนหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่ง เกิดขึ้นที่ปลายของโคนิเดียมแต่ละอัน โคนิเดียมที่มีอายุน้อยจะอยู่ด้านบนสุด
2. basipetal succession หมายถึง โคนิเดียมใหม่จะถูกสร้างที่ฐานล่าง
3. sympodial succession หมายถึง โคนิเดียมที่เกิดใหม่แต่ละโคนิเดียมจะย้ายไปที่ด้านปลาย เพื่อให้ geniculate, elongate หรือ condensed rachis เกิดการพัฒนาขึ้น



รูปที่ ๑.1 a-j ลักษณะของโคนิเดียมโอฟอร์, โคนิเดียมอินัสเซสท์ และ การสร้างโคนิเดียม

- a. ตัวอย่างโคนิเดียมโอฟอร์ หรือบน aggregated hyphae
- b. acervulus
- c. pycnidium
- d. solitary conidiogenous cells
- e. synchronous development
- f. สายโซ่ (chain)
- g. หัว slimy head
- h. การเกิดโคนิเดียมแบบ acropetal succession
- i. การเกิดโคนิเดียมแบบ basipetal succession
- j. การเกิดโคนิเดียมแบบ sympodial succession

### รูปแบบสำคัญที่พบได้มากของ conidiogenesis

#### การพัฒนาธัลลิก (thallic development)

โคนิเดียมจะถูกสร้างขึ้นในรูปแบบ โคเดเดียมหรือเป็นสายโซ่ (arthroconidia) จากส่วนของเส้นใย เซลล์จะถูกแยกออกจากกันโดยการสร้างผนังกัน (septation) เปลี่ยนไปเป็นโคนิเดียม เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างเช่น *Geotrichum* เป็นต้น ในเชื้อราบางจำพวกเช่น *Moniliella* จะเกิดทั้ง รัชลิกโคนิเดีย (thallic conidia) และ บลาสติกโคนิเดีย (blastic conidia)

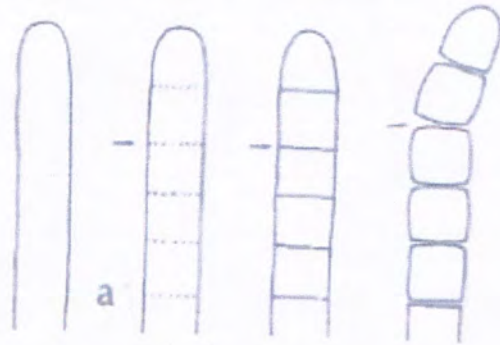


Fig. 21. a-b Thallic development. a. in chains; b. solitary

รูปที่ ๒.๒ a-b การพัฒนาของรัชลิก a. ในสายโซ่ b. แบบโดดเดี่ยว

#### การพัฒนาบลาสติก (Blastic development)

ผนังของ conidiogenous cell จะเริ่มมีความยืดหยุ่น และ หนูนออกไปเพื่อให้เกิดการสร้างผนังของโคนิเดีย โคนิเดียจะสามารถผลิตขึ้นเดี่ยวๆ หรือผลิตพร้อมๆ กัน (เช่น *Botrytis*, *Aureobasidium*) หรือต่อกันเป็นสายโซ่ (acropetal chains เช่น *Cladosporium*) บางจำพวกอาจจะมีฐานแคบ (*Botrytis*) หรือ ฐานกว้าง (*Epicoccum*) เชื้อในบางสกุลสามารถจำแนกได้โดยอาศัยลักษณะของ poroconidia หรือการพัฒนาของตรีทิก (tretic development) รูปแบบของการเกิดโคนิเดีย (conidiogenesis) จะคล้ายกับบลาสติก แต่จะแตกต่างกันตรงที่ conidiogenous cell จะเข็มมากกว่า และมีผนังของเมือกที่แข็งและเข็มกว่าเมื่อเจาะผ่านโคนิเดีย เมื่อโคนิเดียแตกออก เราจะสามารถพบรูพรุนได้ (เช่น *Alternaria*, *Ulocladium*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

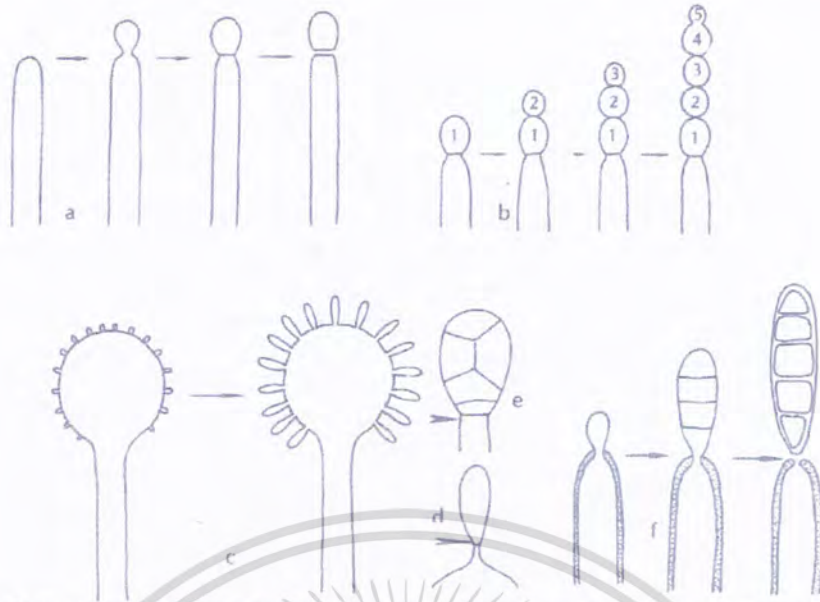


Fig. 22. a-f. Blastic development. a. solitary blastic; b. chains; c. synchronous; d. narrow base; e. broad base; f. poroconidia.

รูปที่ ๒.3 a-f การพัฒนาปลาสติก a. ปลาสติกแบบโดดเดี่ยว b. แบบโซ่ c. แบบ synchronous  
d. แบบฐานแคบ e. แบบฐานกว้าง f. Poroconidia

#### PHIALIDIC CONIDIOGENESIS (รูปที่ ๒.4)

โคนิเดียมจะถูกผลิตขึ้นภายใน basipetal succession จากการเปิดของเซลล์พิเศษที่เรียกว่า Phialide ซึ่งอาจจะมีรูปร่างคล้ายสว่าน คล้ายพลาสติก หรือรูปร่างอื่น บางครั้งแสดง collarete (โครงสร้างรูปถ้วยบริเวณ apex) โคนิเดียมจะถูกผลิตขึ้นในสายโซ่ (ตัวอย่างเช่น *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces*) หรือ รวมกันอยู่ในส่วนหัวที่มีความเหนียวหรือมีความชื้น (ตัวอย่างเช่น *Trichoderma*, *Phialophora*, *Stachybotrys*, *Acremonium*, *Verticillium*)

#### ANNELLIDIC CONIDIOGENESIS (รูปที่ ๒.5)

โคนิเดียม (conidia) ถูกสร้างขึ้นจากชุดของ percurrent proliferations หรือ annellation บนเซลล์ที่ให้กำเนิดโคนิเดียมที่เรียกว่า annellide การสังเกต annellide ค่อนข้างยากถ้าใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแต่จะเห็นความแตกต่างได้เด่นชัดเมื่อมีความยาวของ conidiogenous apex เพิ่มขึ้น คือบริเวณระหว่าง annellated ภายหลังจากการสร้างสปอร์ ลักษณะทาง microscopic ที่จะต้องมีพื้นฐานส่วนยอดของโคนิเดียมที่กว้างด้วยเช่นกัน เช่น *Scopulariopsis*

#### การเพาะเลี้ยงเพื่อจำแนกชนิด

Deuteromycetes ส่วนมากจะสร้างสปอร์ได้ดีบน MEA ความเข้มข้นร้อยละ 2 และ OA agar สำหรับเชื้อราบางสกุล เช่น *Fusarium* การใช้อาหาร SNA บนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

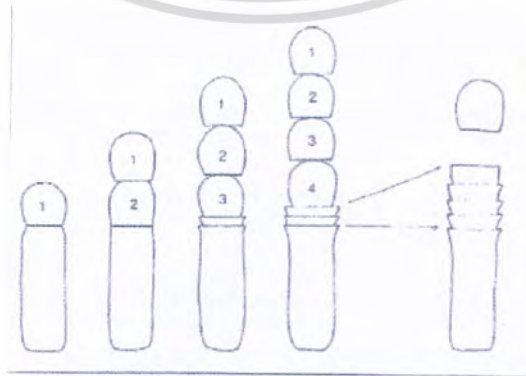
แล้วซึ่งจะเหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ ส่วน *Penicillium* และ *Aspergillus* ต้อง Czapek หรือ  
แม้ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Czapek yeast agar เพื่อจะจำแนกชนิดได้อย่างถูกต้อง โดยดูร่วมกับคำอธิบายวิธีการเพาะเลี้ยงของแต่ละชนิด

การเตรียมสไลด์ (Microscopic mounts) ที่คตินั้นจำเป็นสำหรับการตรวจสอบการสร้างโคนิเดีย (conidiogenesis) ซึ่งส่วนใหญ่จะเตรียมสไลด์โดยหยดกรดแลคติกผสมกับสีย้อม aniline blue หรือ cotton blue อาจใช้น้ำก็ได้ สำหรับ โครงสร้างที่เปราะบางของ *Botrytis* และ *Cladosporium* การเตรียมสไลด์โดยใช้เทปกาวชิ้นเล็กๆช่วย จะเป็นประโยชน์ในการเตรียมสไลด์หรืออาจตัดชิ้นส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่โปร่งใสวางบนสไลด์ก็ได้ การสร้างโคนิเดีย หรือ slimy head สังเกตได้ดีบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยายต่ำ อย่างไรก็ตามควรหลีกเลี่ยงการสูดดมสารระเหยที่สร้างโดยเชื้อราและโคนิเดีย



รูปที่ ๑.4 a-e. การพัฒนาของ Phialidic a.สายโซ่โคนิเดีย b. ส่วนหัวของโคนิเดีย c. รูปร่างแบบขวาน d. รูปร่างแบบพลาสติก e. Phialide ที่มี Phialide typical



รูปที่ ๑.5 การพัฒนาของ Annelidic, แสดงโครงสร้างส่วนยอดของโคนิเดีย (truncate conidia) และเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นดำนการค้า ส่วนที่ยื่นออกของเซลล์โคนิเดีย โอจินีเยส ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## Key สำหรับการจำแนกชนิดเชื้อรา Deuteromycetes ที่พบได้บ่อยในอาหารและอากาศ

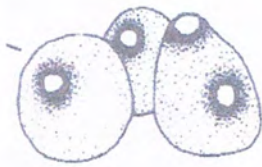
- 1a. คอนิเดียเกิดใน pycnidia.....*Phoma* (รูปที่ จ.6)
- 1b. คอนิเดียไม่เกิดใน pycnidia แต่เกิดบนเส้นใย, conidiophores, sporodochia หรือ synnemata....2
- 2a. คอนิเดียที่สร้างมาจากเซลล์พิเศษที่ให้กำเนิดคอนิเดีย (conidiogenous cell) เช่น phialides, annellides เป็นต้น คอนิเดียที่เกิดขึ้นมีลักษณะต่อกันเป็นสาย (chain) หรือเกิดในหัว (head) หรือใน basipetal.....3
- 2b. คอนิเดียไม่ได้สร้างจากเซลล์คอนิดิโอเจนีซิส แต่สร้างจาก acropetally หรือจากการแตกหักของเส้นใยที่สมบูรณ์ที่เชื่อมกันหรือเซลล์เดี่ยวๆ.....14
- 3a. คอนิเดียที่เกิดขึ้นมีลักษณะต่อกันเป็นสาย (dry chain).....4
- 3b. คอนิเดียเกิดขึ้นใน moist head หรือ slimy head.....10
- 4a. คอนิเดียมักเกิดขึ้นในลักษณะ 2 เซลล์โดยเกิดบนเซลล์คอนิดิโอเจนีซิสซึ่งอยู่ในเส้นใย คอนิเดียมีลักษณะเฉียงแทรกมากหรือน้อยจัดเรียงตัวเหมือนหนาม โคโลนีมีสีชมพูเข้ม....*Trichothedium* (รูปที่ จ.7)
- 4b. คอนิเดียที่เกิดขึ้นเป็นเซลล์เดี่ยวโดยเกิดขึ้นบนเซลล์คอนิดิโอเจนีซิสที่มีลักษณะคล้ายพลาสติกหรือรูป ทรงกระบอก คอนิเดียเกิดต่อกันเป็นสายตรง โคโลนีมีหลายสี.....5
- 5a. โคโลนีมีสีน้ำตาลแดง ค่อนข้างจะจำกัดมาก คอนิเดียเกิดขึ้นในลักษณะเป็นกลุ่มๆ ละ 4 เซลล์ โดย เกิดขึ้นจากการแบ่งของเส้นใยที่สมบูรณ์ซึ่งมีลักษณะรูปทรงกระบอก ได้เป็นโคโลนีรูปร่างรี (sub-globose) และชอบความแห้ง (Xerophilic).....*Wallemia* (รูปที่ จ.8)
- 5b. โคโลนีไม่จำกัด (ยกเว้น *Aspergillus* สปีชีส์ที่ทนความแห้งแล้งได้) คอนิเดียไม่ได้เกิดขึ้นหลังจากการแบ่งของเส้นใย.....6
- 6a. ก้านชูอับสปอร์ (conidiospores) มีลักษณะปลายบวม (a typical apical swelling)... *Aspergillus* (รูปที่ จ.9)
- 6b. ก้านชูอับสปอร์ไม่มีส่วนขอดเป็นลักษณะพองๆ.....7
- 7a. conidiogenous cells annellidic คอนิเดียมีส่วนฐานกว้าง.....*Scopulariopsis* (รูปที่ จ.10)
- 7b. conidiogenous cells phialidic คอนิเดียไม่มีส่วนฐานกว้าง.....8
- 8a. โคโลนีมีสีเทาเข้มไปจนถึงดำ มี phialides ที่มีลักษณะกว้าง ด้านบนสุดและคอนิเดียสีดำ....*Memmoniella* (รูปที่ จ.11)
- 8b. โคโลนีไม่มีสีเทาเข้มไปจนถึงดำ มี phialides ที่มีลักษณะคล้ายพลาสติกหรือ lanceolate มีฐานที่กว้างที่สุด .....9
- 9a. โคโลนีสีเหลืองไปจนถึงน้ำตาล มี phialides ที่มีส่วนคอยาว.....*Paecilomyces* (รูปที่ จ.12)
- 9b. โคโลนีมักจะมีสีเขียว บางสปีชีส์มีสีขาว มี phialides ที่มีส่วนคอสั้น.....*Penicillium* (รูปที่ จ.13)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ หรือมีการสงวนลิขสิทธิ์ไว้แล้ว โดยผู้จัดทำ หรือเจ้าของลิขสิทธิ์ ซึ่งการนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ผ่านการอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์ อาจก่อให้เกิดความเสียหายทางกฎหมายได้

- 10a. มี phialides ยาวมีรูปร่างคล้ายขวานและไม่มี polyphialides.....*Acremonium* (รูปที่ จ.14)
- 10b. มี phialides เป็นจำนวนมากหรือน้อย มีลักษณะแบบคล้ายพลาสติกและ/หรือมี polyphialides หรือ มี phialide ลดลง.....11
- 11a. โคลโคนีค่อนข้างเป็นสีเขียว เมื่อเจริญในที่ๆมีแสงสว่าง.....*Trichoderma* (รูปที่ จ.15)
- 11b. โคลโคนีมีสีขาว เหลือง ม่วง ชมพู น้ำตาล หรือสีน้ำตาลดำ.....12
- 12a. โคลโคนีมีสีขาว ค่อนข้างเหลือง ค่อนข้างชมพู ค่อนข้างแดง ม่วง บางที่มีสีเขียว มักจะมีโคนิเดีย ที่มี septate รูปกล้วย มีผนังกัน.....*Fusarium* (รูปที่ จ.16)
- 12b. โคลโคนีมีสีต่างๆบ้างครั้งค่อนข้างชมพู โคนิเดียไม่มีผนังกัน.....13
- 13a. phialide อยู่แบบเดี่ยวๆหรืออยู่รวมกันหลายๆอันแบบก้นหอยรูปร่างคล้ายพลาสติก .....*Phialophora/Lecythophora* (รูปที่ จ.17)
- 13b. phialide อยู่เป็นกลุ่มหนาแน่น.....*Stachybotrys* (รูปที่ จ.18)
- 14a. โคลโคนีเจริญเร็วมาก โดยสามารถเจริญปกคลุมจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรภายในเพียงไม่กี่วัน โคลโคนีมีสีส้ม.....*Chrysonilia* (รูปที่ จ.19)
- 14b. โคลโคนีไม่มีสีส้มและเจริญโดยจะไปปกคลุมจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ภายในไม่กี่วัน.....15
- 15a. โคนิเดียมีเฉพาะ arthric.....16
- 15b. โคนิเดียมีทั้งประเภท arthric และ blastic หรือเฉพาะ blastic .....18
- 16a. โคนิดิโอพอร์สไตป์ (conidiophores stipe) มีเม็ดสี.....*Oidiodendron* (รูปที่ จ.20)
- 16b. โคนิดิโอพอร์ไฮไลน (conidiophore hyaline) ไสไม่มีสีหรือไม่มีเลย.....17
- 17a. โคนิเดียใส ผนังเรียบ ค่อนข้างเป็นรูปทรงกระบอก ไม่มี Intercalary conidia .....*Geotichum* (รูปที่ จ.21)
- 17b. conidia (sub) hyaline ค่อนข้างใสถึงมีสีเขียว เมื่อมีอายุมากขึ้นผนังจะเริ่มหยาบ มี intercalary conidia .....*Geomyces* (รูปที่ จ.22)
- 18a. โคนิเดียถูกสร้างขึ้นในลักษณะเกาะกัน 4 เซลล์ ซึ่งเกิดขึ้นจากการแบ่งเส้นใยรูปร่าง ทรงกระบอก.....*Wallemia* (รูปที่ จ.23)
- 18b. โคนิเดียไม่อยู่ในลักษณะเกาะกัน 4 เซลล์.....19
- 19a. โครงสร้างที่ให้กำเนิดโคนิเดียประกอบด้วย arthroconidia และ blastoconidia (เปรียบเทียบกับ *Trichosporon* ในยีสต์และในเซลล์เส้นใยที่คล้ายกับ arthroconidia สีน้ำตาลที่มีผนังหนาของ *Aureobasidium*) .....*Monillella* (รูปที่ จ.24)
- 19b. โครงสร้างที่ให้กำเนิดโคนิเดียประกอบด้วย blastoconidia.....20
- 20a. blastoconidia จะเกิดพร้อมกันบนเส้นใยหรือเซลล์ที่บวมขึ้นหรือตรงกิ่งแตกแขนง.....21
- 20b. blastoconidia ไม่เกิดพร้อมกันบนเส้นใยหรือเซลล์ที่บวมขึ้นหรือที่กิ่งแตกแขนง.....22

- 21a. คอนิเดียเกิดจาก denticles บน conidiogenous cells ด้านปลายซึ่งบวมก้านชูอับสปอร์ตั้งตรง แฉกแขนง (ลักษณะคล้ายต้นไม้) โคลโคนีบาง มีสีน้ำตาลอมเทา.....*Botrytis* (รูปที่ จ.25)
- 21b. คอนิเดียเกิดขึ้นบนเส้นใยหรือเกิดบนเส้นใยส่วนที่แตกแขนง โคลโคนีมีลักษณะคล้ายโคลโคนีของยีสต์ สีค่อนข้างเหลืองครีมถึงน้ำตาลอ่อน สีส้มอมชมพูหรือเขียวอมดำ.....*Aureobasidium* (รูปที่ จ.26)
- 22a. คอนิเดียเกิดขึ้นเดี่ยวๆบนก้านชูอับสปอร์ที่มีไม่ค่อยชัดเจน อยู่รวมตัวกันเป็นกลุ่มมองเห็นเป็นตุ่มสีดำ.....*Epicoccum* (รูปที่ จ.27)
- 22b. คอนิเดียอยู่เดี่ยว หรืออยู่ในลักษณะต่อเป็นสายมีก้านชูคอนิเดียชัดเจน ไม่รวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน .....23
- 23a. คอนิเดียมีลักษณะต่อกันเป็นสาย ผนังเรียบ โคลโคนีมีสีครีมในระยะแรก สีจะเข้มขึ้นเมื่อมีอายุมากขึ้น.....*Moniliella* (รูปที่ จ.28)
- 23b. คอนิเดียมีลักษณะต่อกันเป็นสายหรืออยู่เดี่ยวๆ ผนังเรียบหรือหยาบ โคลโคนีมีสีดำออกเขียวหรือน้ำตาลออกเขียว .....24
- 24a. คอนิเดียมีผนังค่อนข้างบาง ส่วนมากมีเซลล์เดี่ยว ฐานของ โคลโคนีพบว่ามี 2 เซลล์ ซึ่งกันด้วยผนังตามขวาง.....*Cladosporium* (รูปที่ จ.29)
- 24b. คอนิเดียถูกกั้นด้วยผนังตามขวางและตามยาวหรือมีเพียงผนังตามขวาง.....25
- 25a. คอนิเดียมีผนังเรียบ มีผนังกั้นตามขวาง ค่อนข้างโค้งเซลล์อยู่ด้านปลายมากกว่าอยู่ตรงกลาง .....*Curbularia* (รูปที่ จ.30)
- 25b. คอนิเดียมีผนังหยาบ มีทั้งผนังกั้นตามขวางและตามยาว (muriform).....25
- 26a. คอนิเดียที่มีอายุน้อยมีลักษณะโค้งมนที่ฐาน ส่วนคอนิเดียที่โตเต็มที่ caternuate และ/หรือ rostrate .....*Alternaria* (รูปที่ จ.31)
- 26b. คอนิเดียที่มีอายุน้อยมีลักษณะซึ่งไม่พบได้บ่อยคือ ยาวและบางอยู่ที่ฐาน คอนิเดียที่โตเต็มที่อยู่เดี่ยวหรืออยู่ในลักษณะต่อกันเป็นสายสั้น .....*Ulocladium* (รูปที่ จ.32)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ จ.6 *Phoma*



รูปที่ จ.7 *Trichothedrium*



รูปที่ จ.8 *Wallemia*



รูปที่ จ.9 *Aspergillus*



รูปที่ จ.10 *Scopulariopsis*



รูปที่ จ.11 *Memnoniella*



รูปที่ จ.12 *Paecilomyces*



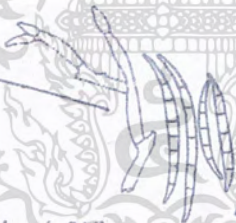
รูปที่ จ.13 *Penicillium*



รูปที่ จ.14 *Acromonium*



รูปที่ จ.15 *Trichoderma*



รูปที่ จ.16 *Fusarium*



รูปที่ จ.17 *Phialophora/Lecythophora*



รูปที่ จ.18 *Stachybotrys*

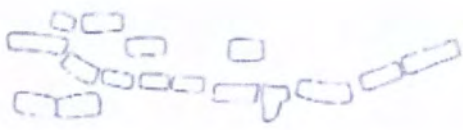


รูปที่ จ.19 *Chrysonilia*



รูปที่ จ.20 *Oidiodendron*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



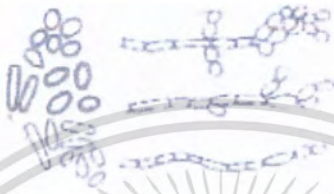
รูปที่ จ.21 *Geotichum*



รูปที่ จ.22 *Geomyces*



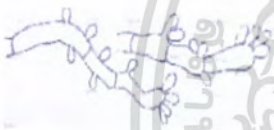
รูปที่ จ.23 *Wallemia*



รูปที่ จ.24 *Monillella*



รูปที่ จ.25 *Botrytis*



รูปที่ จ.26 *Aureobasidium*



รูปที่ จ.27 *Epicoccum*



รูปที่ จ.28 *Moniliella*



รูปที่ จ.29 *Cladosporium*



รูปที่ จ.30 *Curvularia*



รูปที่ จ.31 *Alternaria*



รูปที่ จ.32 *Ulocladium*

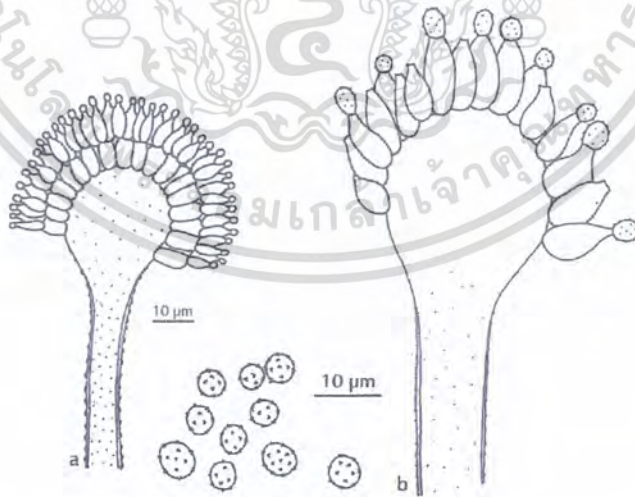
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### *Aspergillus flavus*

โคโลนีของ *A. flavus* มีขนาดโคโลนี 3-5 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร Czapek agar ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ก้านชูสปอร์ (conidiophores) เป็นสีเขียวอมเหลืองค่อนข้างหนา ลักษณะของ conidial head จะแผ่ออกจากจุดศูนย์กลาง (radiate) หลังจากนั้นจะแตกออกเป็นหลายคอลัมน์หลวมๆ มีสีเขียวอมเหลืองไปจนถึงเขียวอมเหลืองแก่ มีลักษณะหยาบขรุขระ มีขนาดความยาวถึง 1 มิลลิเมตร (บางไอโซเลตอาจพบได้จนถึงขนาด 2.5 มิลลิเมตร) vesicle มีลักษณะกลมถึงรี มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 25-45 ไมโครเมตร Phialides จะเกิดขึ้นโดยตรงบนถุงหรือบน metulae ซึ่งมีขนาด 6-10 x 4.0-5.5 ไมโครเมตร ส่วน metulae มีขนาด 6.5-10 x 3-5 ไมโครเมตร คอนิเดียมีลักษณะกลม ขนาดจากเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3.6 ไมโครเมตร มีสีเขียวอ่อน ซึ่งคอนิเดียที่เกิดขึ้นใหม่มักจะสร้าง Sclerotia (โครงสร้างระยะพักตัว ด้านทานต่อสภาวะไม่เหมาะสมได้ดี) มีรูปร่างและขนาดไม่แน่นอน มักจะมีสีน้ำตาลจนถึงดำ

โคโลนีจะเจริญได้รวดเร็วบนอาหาร MEA แต่จะเจริญได้ไม่ดีบนอาหาร CREA และโคโลนีจะเป็นสีส้มบนอาหาร AFPA สารเมตาบอไลต์ที่เป็นพิษชนิดที่สำคัญที่เชื้อราสร้างขึ้น ได้แก่ กรดโคจิก 3-nitropropionic acid cyclopiazonic acid aflatoxin BI และ aspergillitic acid มักพบในอาหาร ได้แก่ ถั่วชนิดต่างๆ เครื่องเทศ น้ำมันธัญพืช ธัญพืช บางครั้งอาจพบได้ในผลไม้แห้ง (รูปที่ จ.34)

หมายเหตุ : ค่อนข้างแยกที่จะแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อรา *A. flavus* กับเชื้อรา *A. parasiticus*, *A. oryzae* และเชื้อราชนิดอื่นที่คล้ายๆกัน



รูปที่ จ.33 a. โคโลนี *Aspergillus flavus* บนอาหาร Czapek agar b. โคโลนี *Aspergillus flavus* บนอาหาร MEA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.1 ผลการวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อราในตัวอย่างถั่วลิสงดิบด้วยวิธี Direct Plating

ชนิดของถั่ว	ที่มา	ค่า $a_w$ (25°C)	จำนวนเมล็ดที่ตรวจสอบ (เมล็ด)		การปนเปื้อน (ร้อยละ)		จำนวนไอโซเลตของเชื้อรา	
			Acidified PDA	DG18	Acidified PDA	DG18	Acidified PDA	DG18
ถั่วลิสงดิบ								
PN-01	ตลาดมีนบุรี	0.581	50	50	24	100	2	4
PN-02	ตลาดมีนบุรี	0.634	50	50	34	100	2	5
PN-03	ตลาดหัวตะเข้	0.641	50	50	26	100	3	5
PN-04	Tesco Lotus	0.651	50	50	86	100	4	5
PN-05	Lotus express	0.423	50	50	12	6	2	2
PN-06	Tops	0.674	50	50	86	100	4	6
PN-07	ตลาดบางกะปิ	0.628	50	50	82	88	3	3
PN-08	ตลาดบางกะปิ	0.644	50	50	26	72	1	3
PN-09	ร้านขายของชำ	0.672	50	50	40	96	2	4
PN-10	ร้านขายของชำ	0.593	50	50	70	100	3	6

ตารางที่ จ.2 ผลการวิเคราะห์หาการปนเปื้อนของเชื้อราในตัวอย่างถั่วลิสงทอดด้วยวิธี Direct Plating

ชนิดของถั่ว	ที่มา	ค่า $a_w$ (25°C)	จำนวนเมล็ดที่ตรวจสอบ (เมล็ด)		การปนเปื้อน (ร้อยละ)		จำนวนไอโซเลตของเชื้อรา	
			Acidified PDA	DG18	Acidified PDA	DG18	Acidified PDA	DG18
ถั่วลิสงทอด								
PF-01	ตลาดมีนบุรี	0.664	50	50	30	60	2	1
PF-02	ตลาดมีนบุรี	0.554	50	50	28	36	2	2
PF-03	ตลาดหัวตะเข้	0.674	50	50	24	80	2	2
PF-04	ตลาดหัวตะเข้	0.574	50	50	40	74	2	4
PF-05	ร้านขายของชำ	0.426	50	50	30	60	1	1
PF-06	ร้านขายของชำ	0.511	50	50	28	74	3	3
PF-07	ร้านขายของชำ	0.435	50	50	50	96	3	5
PF-08	ตลาดบางกะปิ	0.487	50	50	48	88	2	3
PF-09	ตลาดบางกะปิ	0.563	50	50	86	94	2	4
PF-10	ตลาดบางกะปิ	0.682	50	50	100	100	4	3

ตารางที่ จ.3 ผลการวิเคราะห์หาการปนเปื้อนในตัวอย่างถั่วลิสงคั่วบดด้วยวิธี Dilution Plating

ชนิดของถั่ว	ที่มา	ค่า a <sub>w</sub> (25°C)	จำนวนยีสต์และราทั้งหมด (CFU/g)	
			Acidified PDA	DG18
ถั่วลิสงคั่วบด				
PP-01	ตลาดสายเนตร	0.499	1.1 x 10 <sup>3</sup>	1 x 10 <sup>2</sup>
PP-02	ตลาดสายเนตร	0.354	5.0 x 10 <sup>2</sup>	5.0 x 10 <sup>1</sup>
PP-03	ตลาดบางกะปิ	0.374	1.8 x 10 <sup>3</sup>	5 x 10 <sup>1</sup>
PP-04	ตลาดบางกะปิ	0.434	< 10	1.5 x 10 <sup>2</sup>
PP-05	ตลาดหัวตะเข้	0.418	5 x 10 <sup>2</sup>	1.5 x 10 <sup>2</sup>
PP-06	ตลาดหัวตะเข้	0.276	5 x 10 <sup>1</sup>	5.0 x 10 <sup>1</sup>
PP-07	TOPS	0.270	3 x 10 <sup>2</sup>	< 10
PP-08	Lotus express	0.314	2.2 x 10 <sup>3</sup>	2.5 x 10 <sup>2</sup>
PP-09	ตลาดมีนบุรี	0.221	2.0 x 10 <sup>3</sup>	1.0 x 10 <sup>2</sup>
PP-10	ตลาดมีนบุรี	0.352	7.4 x 10 <sup>3</sup>	3.0 x 10 <sup>1</sup>

ตารางที่ จ.4 ผลการวิเคราะห์หาการปนเปื้อนในตัวอย่างถั่วลิสงตัดด้วยวิธี Dilution Plating

ชนิดของถั่ว	ที่มา	ค่า $a_w$ (25°C)	จำนวนยีสต์และราทั้งหมด (CFU/g)	
			Acidified PDA	DG18
ถั่วลิสงตัด				
PF-01	ตลาดหัวตะเข้	0.561	$1.4 \times 10^3$	$1.0 \times 10^2$
PF-02	ตลาดหัวตะเข้	0.455	$8.5 \times 10^2$	$1.3 \times 10^3$
PF-03	ตลาดหัวตะเข้	0.348	$7.0 \times 10^2$	$9.0 \times 10^2$
PF-04	ตลาดไอเฟลต	0.361	$2.0 \times 10^2$	$2.5 \times 10^3$
PF-05	ที่ขายของฝาก	0.332	$3.5 \times 10^3$	$2.5 \times 10^3$
PF-06	ที่ขายของฝาก	0.351	$1.0 \times 10^2$	$5.0 \times 10^{-1}$
PF-07	ร้านขายของชำ	0.324	$1.0 \times 10^2$	$1.5 \times 10^2$
PF-08	ร้านขายของชำ	0.333	$1.0 \times 10^2$	$5.0 \times 10^1$
PF-09	ร้านขายของชำ	0.312	$1.0 \times 10^2$	< 10
PF-10	ร้านขายของชำ	0.308	$5.0 \times 10^1$	$5.0 \times 10^1$

ตารางที่ ๑.5 เชื้อที่แยกได้จากถั่วลิสงดิบ

แหล่งที่มาของเชื้อราที่ แยกได้	ชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา (จำนวนไอโซเลต)	
	âPDA	DG18
PN-01	<i>Aspergillus</i> (2) <i>Penicillium</i> (1) <i>Rhizopus</i> (1)	<i>Aspergillus</i> (2)
PN-02	<i>Aspergillus</i> (3) <i>Rhizopus</i> (2)	<i>Aspergillus</i> (2)
PN-03	<i>Aspergillus</i> (2) <i>Rhizopus</i> (3)	<i>Aspergillus</i> (2) <i>Rhizopus</i> (1)
PN-04	<i>Aspergillus</i> (4) <i>Penicillium</i> (1) <i>Penicillium</i> (1)	<i>Aspergillus</i> (2) <i>Rhizopus</i> (1)
PN-05	<i>Penicillium</i> (1) <i>Aspergillus</i> (1)	<i>Penicillium</i> (2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๑.๖ เชื้อที่แยกได้จากถั่วลิสงดิบ

แหล่งที่มาของเชื้อราที่ แยกได้	ชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา (จำนวนไอโซเลต)	
	âPDA	DG18
PN-06	<i>Aspergillus</i> (2)	<i>Aspergillus</i> (2)  <i>Rhizopus</i> (2)
PN-07	<i>Rhizopus</i> (3)  <i>Penicillium</i> (1) <i>Aspergillus</i> (2) <i>Rhizopus</i> (1)	<i>Aspergillus</i> (2)  <i>Rhizopus</i> (1)
PN-08	<i>Rhizopus</i> (2) <i>Aspergillus</i> (1)	<i>Rhizopus</i> (1)
PN-09	<i>A. flavus</i> (1)  <i>Penicillium</i> (1)  <i>Rhizopus</i> (2)	<i>Aspergillus</i> (2)
PN10	<i>Aspergillus</i> (4)	<i>Aspergillus</i> (3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้