สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของวัตถุกันเสียบางชนิดต่อการเจริญและการผลิตสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในอาหารเหลว

นาย ธวัชชัย เปรมศรี

นางสาว นิรมล ปัญญ์บุศยกุล

ว/ท.
ส395ผ
2536
0125216 20

เลขหมู่....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2536

Effect of food preservatives on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in liquid medium

Mr. Thawatchai Premsri

Miss Niramol Punbusayakul

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1993

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลของวัตถุกันเสียบางชนิดต่อการเจริญและการผลิตสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในอาหารเหลว
โดย	นาย ธวัชชัย เปรมศรี
	นางสาว นิรมล ปัญญ์บุศยกุล
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. ดุษฎี ธนะบริพัฒน์
	อาจารย์ อรไท สุขเจริญ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษ
ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
(ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

..... ประธานกรรมการ
(อ. อุ่นเรือน ศิริวาณิชกุล)

..... กรรมการ
(อ. สุรีย์ นานาสมบัติ)

..... กรรมการ
(อ. ดุษฎี ธนะบริพัฒน์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ผลของวัตถุกันเสียบางชนิดต่อการเจริญและการผลิตสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในอาหารเหลว
นักศึกษา	นาย ธวัชชัย เปรมศรี นางสาว นิรมล ปัญญ์บุศยกุล
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. ดุษฎี ธนะบริพัฒน์ อาจารย์ อรไท สุขเจริญ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2535

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา และการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในอาหารเหลวโดยใช้วัตถุกันเสีย 3 ชนิดคือ โซเดียมเบนโซเอต กรดเบนโซอิก และ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 , 0.06 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยไม่ใส่วัตถุกันเสีย เชื้อจะสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้ปริมาณสูงสุดในวันที่ 4 , 5 และ 6 คือ 17.66 , 18.82 และ 18.77 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจากผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* โดยใช้วัตถุกันเสีย โซเดียมเบนโซเอต กรดเบนโซอิก และ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ พบว่า โซเดียมเบนโซเอตที่ระดับความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 36.55 เปอร์เซ็นต์ จาก 1.45 เป็น 0.92 กรัมของน้ำหนักแห้ง และสามารถลดการสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ 41.69 เปอร์เซ็นต์ จาก 18.42 เป็น 10.74 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนกรดเบนโซอิก ที่ระดับความเข้มข้น

0.02 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 74.48 เปอร์เซ็นต์ จาก 1.45 เป็น 0.37 กรัมน้ำหนักแห้ง และสามารถลดปริมาณแอฟฟลาทอกซิน ได้ 75.73 เปอร์เซ็นต์ จาก 18.42 เป็น 4.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และกรดเบนโซอิก ที่ระดับความเข้มข้น 0.06 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้สมบูรณ์ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ได้สมบูรณ์ 100 เปอร์เซ็นต์

Special Project Title: Effect of food perservative on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in liquid medium

Name: Mr. Thawatchai Premsri
Miss. Niramol Punbusayakul

Special Project Adviser
Associate Professor Dr. Dusanee Thanaboripat
Archarn Oratai Sukcharoen

Department: Applied Biology

Academic Year: 1991

Abstract

The use of various concentrations of a preservatives (benzoic acid , sodium benzoate and potassium metabisulphite) for controlling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in liquid media was investigated. When *A. flavus* was grown in liquid media without preservative, aflatoxin was produced with the maximum yield of 17.66 ,18.82 and 18.77 µg/ml an day 4 , 5 and 6 subsequently. Aflatoxin production was reduced 41.69 % (from 18.42 to 10.74 ppm).When culture was added with 0.10 % of sodium benzoate and the growth of *A. flavus* was reduced about 35 % (from 1.45 to 0.92 gramdryweight). Benzoic acid at concentration of 0.02 % could reduce the growth of *A.*

flavus about 74.48 % (from 1.45 to 0.30 gramdryweight) and reduced aflatoxin production about 75.73 % (from 18.42 to 4.47 ppm). At 0.06 and 0.10 % of benzoic acid, inhibited the growth and aflatoxin production completely. In addition, potassium metabisulphite at concentration lf 0.02 % and the higher concentration could also inhibit the growth and aflatoxin production completely.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. ดุษฎี ธนะบริพัฒน์ และอาจารย์ อรไท สุขเจริญ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา และอาจารย์ทุกท่านที่ได้สละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษาและชี้แนวทางที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งให้ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อโครงงานพิเศษนี้ ซึ่งผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ท้ายสุดนี้ผู้เขียนขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ และเพื่อนนักศึกษา รวมทั้งท่านผู้ที่มีอุปการะคุณที่มิอาจกล่าวนามได้ครบถ้วน ณ ที่นี้ที่ได้ช่วยเหลือเป็นกำลังใจ กำลังความคิด ตลอดจนการให้ความร่วมมือในเรื่องต่างๆเป็นอย่างดี

คณะผู้จัดทำ

กุมภาพันธ์ 2536

สารบัญ

เรื่อง			หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย			ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ			ค
กิตติกรรมประกาศ			จ
สารบัญตาราง			ช
สารบัญรูป			ฌ
บทที่ 1	บทนำ		1
บทที่ 2	ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง		3
	2.1	ประวัติของแอฟฟลาทอกซิน	3
	2.2	ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแอฟฟลาทอกซิน	7
	2.3	กระบวนการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซิน	16
	2.4	การเปลี่ยนแปลงแอฟฟลาทอกซินในร่างกาย	16
	2.5	ผลของแอฟฟลาทอกซิน	17
	2.6	การศึกษาแอฟฟลาทอกซินในประเทศไทย	20
	2.7	การวิเคราะห์แอฟฟลาทอกซิน	22
	2.8	การป้องกันกำจัดเชื้อราและสารพิษแอฟฟลาทอกซิน	26
	2.9	วัตถุกันเสียในอาหาร	32
	2.10	การศึกษาการยับยั้งการเจริญและการสร้างแอฟฟลาทอกซิน โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* โดยใช้กรดเบนโซอิก โซเดียมเบนโซเอต และโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์	39
บทที่ 3	ขั้นตอนการดำเนินงาน		41
	3.1	จุลินทรีย์	41
	3.2	อุปกรณ์และสารเคมี	41
	3.3	ขั้นตอนการเตรียมสปอร์ของเชื้อรา	43

เรื่อง หน้า

3.4 ขั้นตอนการศึกษาการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในอาหารเหลว 43

3.5 ขั้นตอนการทำ stock solution ของวัตถุกันเสีย 44

3.6 ขั้นตอนการใส่วัตถุกันเสียลงในอาหารเหลวเพื่อยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน 44

3.7 ขั้นตอนการสกัดแอฟฟลาทอกซินในอาหารเหลว 46

3.8 ขั้นตอนการสกัดแอฟฟลาทอกซินในใยรา 46

3.9 ขั้นตอนการหาน้ำหนักแห้ง 47

3.10 ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน 47

3.11 การคำนวณ 48

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 50

4.1 ผลการศึกษาการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในอาหารเหลว 50

4.2 ผลการศึกษาการใช้วัตถุกันเสียบางชนิด ที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในอาหารเหลว 53

บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ 70

ภาคผนวก 71

เอกสารอ้างอิง 77

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	น้ำหนักโมเลกุล และจุดหลอมตัวของแอฟฟลาทอกซิน B1,B2,G1 และ G2	5
2-2	ปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่พบจากอาหารในประเทศไทย	11
2-3	การเปรียบเทียบการแยกแอฟฟลาทอกซิน B1,B2,G1 และ G2 บนแผ่นซิลิกาเจล โดย solvent system	24
2-4	ลักษณะทั่วไปของเกลือซัลไฟต์	38
4-1	น้ำหนักแห้งของเชื้อรา *A. flavus*	51
4-2	ปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่ผลิตได้จากเชื้อรา *A. flavus*	54
4-3	ผลการยับยั้งการเจริญโดยใช้วัตถุกันเสีย	56
4-4	ผลการยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซินโดยใช้วัตถุกันเสียต่าง ๆ	60
4-5	ค่าเฉลี่ยของผลการยับยั้งการเจริญของใยราโดยใช้วัตถุกันเสียต่าง ๆ	60
4-6	ค่าเฉลี่ยของผลการยับยั้งการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน โดยใช้วัตถุกันเสียต่าง ๆ	61
4-7	analysis of varience ของการยับยั้งการเจริญของใยรา	63
4-8	ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอิทธิพลร่วมในการยับยั้งการเจริญของใยราโดยวิธี DMRT ที่ 5 %	64
4-9	analysis of varience ของการยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซิน	65
4-10	ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอิทธิพลร่วมในการยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซินโดย DMRT ที่ 5 %	66

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2-1	สูตรโครงสร้างของแอฟฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ	6
2-2	แหล่งคาร์บอนของกลุ่มเมทิลจากแอซีติกและเมทไทโอนีน	9
2-3	การสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซิน B1	18
4-1	กราฟแสดงน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *A. flavus*	52
4-2	ปริมาณแอฟฟลาทอกซินทั้งหมดที่ผลิตโดยเชื้อรา *A. flavus*	55
4-3	แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อรา ในวันต่าง ๆ	57
4-4	แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญโดยใช้โซเดียมเบนโซเอต ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	57
4-5	แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญโดยใช้กรดเบนโซอิก ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	58
4-6	แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญโดยใช้โพแทสเซียม เมตาไบซัลไฟต์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	58

บทที่ 1

บทนำ

แอฟฟลาทอกซิน (Aflatoxin) เป็นสารพิษที่ร้ายแรง และเป็นอันตรายต่อชีวิต ซึ่งเป็น secondary metabolite ที่ผลิตโดยเชื้อราบางสายเชื้อที่อยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *A. parasitus* แต่เชื้อราที่สร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินในปริมาณมากได้ และแพร่กระจายปนเปื้อนได้ดีในอากาศ คือ *A. flavus* แอฟฟลาทอกซินนั้น อาจเกิดขึ้นได้ในอาหารทุกชนิด ตั้งแต่ผลิตผลทางการเกษตร ได้แก่ ข้าวชนิดต่างๆ ถั่ว มันสำปะหลัง พริก หัวหอม หัวกระเทียม จนถึงอาหารกึ่งสำเร็จรูป เช่น เต้าหู้ แฮม และแม้แต่ในน้ำมันพืช

สารพิษแอฟฟลาทอกซินมีผลต่อมนุษย์และสัตว์มาก แม้จะมีในปริมาณเพียงเล็กน้อย ก็สามารถทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมของมนุษย์และสัตว์ผิดปกติไป ทำให้เกิดพิษทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรัง กรณีเฉียบพลัน จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ (necrosis) ในตับเป็นส่วนใหญ่ ทำให้เกิดมะเร็งที่ตับและยังทำให้เกิดมะเร็งที่ปอดอีกด้วย (ไมตรี,2528)

นอกจากจะมีผลต่อมนุษย์และสัตว์แล้ว ยังมีผลทางด้านเศรษฐกิจด้วย คือ เป็นปัญหาในด้านการรับซื้อผลผลิตทางด้านการเกษตร จึงมีการศึกษาถึงวิธีป้องกัน และกำจัดสารพิษแอฟฟลาทอกซินนี้ ซึ่งวิธีลดหรือทำลายความเป็นพิษนี้ทำได้ทั้งทางฟิสิกส์ ชีววิทยา และเคมี และวิธีที่เหมาะสมสำหรับประเทศไทย น่าจะเป็นวิธีทางเคมีคือ การใช้สารเคมีบางชนิด มายับยั้งการเจริญของเชื้อราและการผลิตสารพิษนี้ โดยสารเคมีที่มีการศึกษาและนำมาใช้ได้ผลมีหลายชนิดเช่น แอมโมเนีย แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ เกลือแกง และสารกันหืน เป็นต้น แต่มีสารเคมี อีกชนิดหนึ่งที่นิยมเติมลงไปในอาหาร เพื่อเป็นวัตถุกันเสีย ซึ่งนิยมใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร เพราะราคาถูก ใช้ได้ผลดี และไม่ทำให้คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลง จึงน่าจะมีการศึกษาถึงผลของวัตถุกันเสียบางชนิดต่อการเจริญของใยรา และการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน เพื่อเป็นแนวทางในการใช้วัตถุกันเสียที่เหมาะสม เพื่อยับยั้งการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน นี้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในอาหารเหลว
2. เพื่อศึกษาปริมาณของสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ที่ผลิตจาก *Aspergillus flavus* ที่อายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆกัน
3. เพื่อศึกษาผลของวัตถุกันเสียบางชนิด ที่มีต่อการเจริญ และการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ของ *Aspergillus flavus*

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบถึงลักษณะการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในอาหารเหลว
2. ได้ทราบว่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* จะผลิตสารพิษแอฟฟลาทอกซินปริมาณเท่าใดในอายุการเก็บเกี่ยวต่าง ๆกัน
3. ได้ทราบว่าวัตถุกันเสียชนิดใดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการผลิตสารพิษแอฟฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ได้มากที่สุด
4. เพื่อเป็นแนวทาง และประโยชน์ในการใช้วัตถุกันเสียในอุตสาหกรรมอาหารและการเกษตร

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติของแอฟฟลาทอกซิน

สารพิษแอฟฟลาทอกซินถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 เนื่องจากเกิดโรคระบาดของไก่งวงในประเทศอังกฤษ สาเหตุเพราะกินกากถั่วเหลือง ซึ่งสั่งเข้ามาจากนอกประเทศแล้วเกิดล้มตายนับแสนตัว แต่ก็ยังไม่ทราบสาเหตุของโรคโดยแท้จริงว่าเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใด จึงเรียกโรคนี้ว่า Turkey X disease (Blount, 1961 และ Goldblatt, 1969) ภายหลังได้มีรายงานเกี่ยวกับโรคระบาดชนิดเดียวกันเกิดขึ้นกับเป็ดและไก่ฟ้า ในประเทศเคนย่าและยูกานดา และโรคระบาดในปลาเทราท์ในประเทศสหรัฐอเมริกาจากการศึกษาค้นคว้าถึงสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคนี้ในประเทศอังกฤษ พบว่าโรค Turkey X disease นี้เกี่ยวข้องกับถั่วลิสง ซึ่งสั่งซื้อจากประเทศบราซิล เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ ภายหลังจากการนำเอาถั่วลิสงเหล่านั้น มาเลี้ยงกับเป็ดทดลองแล้วปรากฏว่าเกิดอาการเป็นพิษเช่นเดียวกับเป็ดและไก่งวงในระยะที่มีโรคระบาดคือ มีอาการซึม เบื่ออาหาร ปีกตก คอตก ขาอ่อน เพลีย และตายในที่สุด ผลจากการตรวจทางพยาธิวิทยาของอวัยวะต่าง ๆ พบว่า ตับเป็นอวัยวะที่ถูกทำลายมากที่สุด (ดุษฎี, 2530)

Sargeant (1961) ทำการสกัดแยก และทำให้สารพิษบริสุทธิ์จากถั่วลิสงจากประเทศบราซิล พบว่าสามารถแยกเชื้อ *Aspergillus flavus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีชีวิตอยู่และสามารถสร้างสารพิษได้เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น สารพิษที่ถูกสร้างขึ้นจากเชื้อราชนิดนี้ เป็นชนิดเดียวกับที่พบจากส่วนสกัดของถั่วลิสงที่เป็นพิษ ดังนั้นสารพิษที่ได้จากเชื้อราจึงเรียกว่า แอฟฟลาทอกซิน (Aflatoxin) ตามชื่อของเชื้อราที่สร้างนั่นเอง จากการศึกษาต่อ ๆมาพบว่าสารพิษแอฟฟลาทอกซินนี้เป็นสารก่อให้เกิดมะเร็งในสัตว์ การกินอาหารที่มีสารพิษชนิดนี้ เข้าไปในระยะสั้น ๆ ก็เพียงพอที่จะทำให้เกิดเนื้องอกได้ (ธีรยุทธ และชัยวัฒน์, 2524)

แอฟฟลาทอกซินเป็นกลุ่มของสารเคมีพวกบีส-ฟิวราโนคิวมาริน (bisfuranocoumarin) แอฟฟลาทอกซินเป็น secondary metabolite ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อราบางชนิด แอฟฟลาทอกซินแบ่งเป็น 4 ชนิด ตามการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และค่า R_f บนแผ่น thin layer chromatography คือ B1,B2,G1และ G2 โดย B1 และ B2 จะเรืองแสงสีน้ำเงินภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ส่วน G1 และ G2 จะเรืองแสงสีเขียวภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Hartley , 1963)

ศุภกิจและคณะ (2520) รายงานว่า แอฟฟลาทอกซินที่กำลังศึกษาอยู่ขณะนี้มีอยู่ 12 ชนิดคือ B1 , B2 , G1 , G2 , M1 , M2 , B2a , G2a , P1 , Q1 , RO และ GM1 แต่ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารทั่วไปเพียง B1 , B2 , G1 , G2 , M1 M2 , B2a และ G2a

จากสูตรโครงสร้างของแอฟฟลาทอกซินต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 2-1 จะเห็นได้ว่า ชนิด B1 แตกต่างจาก B2 ตรงที่มีพันธะคู่ (double bond) ที่วงแหวนวงที่หนึ่ง ส่วน B1 และ G1 แตกต่างกันตรงที่ B1 ไม่มีกลุ่มแล็กโทน (lactone group)ในวงแหวนที่ห้าการที่แอฟฟลาทอกซินมีสูตรโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน ทำให้ความรุนแรงของการเกิดพิษแตกต่างกันไปด้วย กล่าวคือ การที่แอฟฟลาทอกซินมีพันธะคู่ ในวงแหวนที่หนึ่งและไม่มีกลุ่มแล็กโทนที่วงแหวนที่ห้า จะทำให้เกิดการเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน และมีผลทำให้เกิดมะเร็งที่ตับเพิ่มขึ้น ความเป็นพิษของแอฟฟลาทอกซินจะเรียงตามความรุนแรงได้ดังนี้ คือ B1 , B2 , G1 และ G2 ตามลำดับ

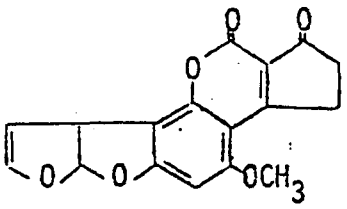
แอฟฟลาทอกซิน B2 และ G2 เป็น dihydroderivative ของแอฟฟลาทอกซิน B1 และ G1 ส่วน M1 และ M2 นั้นเป็น hydroxylated metabolite ของแอฟฟลาทอกซิน B1 และ B2 มักพบในน้ำนมและปัสสาวะของสัตว์ที่ได้รับแอฟฟลาทอกซิน B1 และ B2 เข้าไป แอฟฟลาทอกซิน B2a และ G2a เกิดจากการ hydration ของแอฟฟลาทอกซิน B2 และ G2 เช่นการทำปฏิกิริยาของแอฟฟลาทอกซิน B2 และ G2 กับ trifluoroacetic acid จะได้แอฟฟลาทอกซิน B2a และ G2a ซึ่งพบในปริมาณต่ำในอาหารทั่วไป แอฟฟลาทอกซิน P1 , Q1 และ RO เป็น metabolite ของแอฟฟลาทอกซิน B1 แอฟฟลาทอกซิน P1, Q1 อาจพบได้ในปัสสาวะของสัตว์ ส่วนแอฟฟลาทอกซิน RO นั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ B1 โดยเซลล์ตับของร่างกาย

Wogan (1966) รายงานว่า น้ำหนักโมเลกุลและจุดหลอมตัวของแอฟฟลาทอกซิน B1 ,B2, G1 และ G2 มีค่าดังแสดงในตารางที่ 2-1

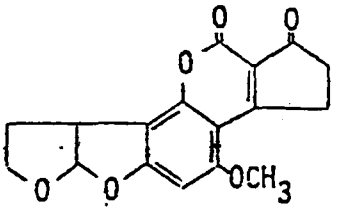
Davis และ Diener (1983) ได้รายงานว่า เชื้อรา *A.flavus* เจริญได้ดีและพบมากในข้าวโพดนั้นสร้างแอฟฟลาทอกซิน B1 ได้ส่วนมาก และ B2 เล็กน้อย ในขณะที่ *A.parasiticus* เป็นเชื้อที่ทำลายถั่วลิสงมาก และสามารถสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ครบทั้ง B1, B2 ,G1 และ G2 ที่เป็นเช่นนี้เพราะ เชื้อ *A. parasiticus* นี้ปรับตัวอยู่ในดินได้ดีในขณะที่ *A.flavus* แพร่กระจายได้ดีในอากาศ ดังนั้นสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่พบในข้าวโพด ส่วนใหญ่คือ B1

ตารางที่ 2-1 แสดงน้ำหนักโมเลกุลและจุดหลอมตัว ของแอฟฟลาทอกซิน B1,B2,G1และG2

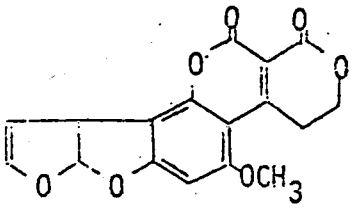
ชนิดของแอฟฟลาทอกซิน	น้ำหนักโมเลกุล	จุดหลอมตัว(° ซ)
B1	312	268–269
B2	314	286–289
G1	328	244–246
G2	330	237–240



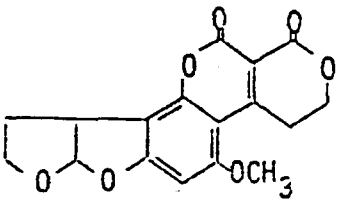
B_1 $C_{17}H_{12}O_6$



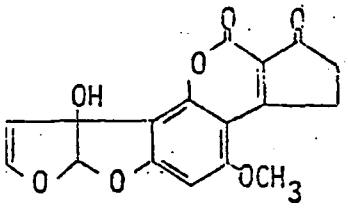
B_2 $C_{17}H_{14}O_6$



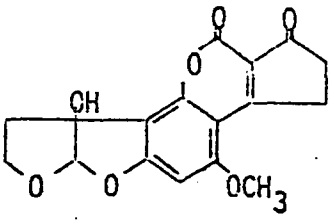
G_1 $C_{17}H_{12}O_7$



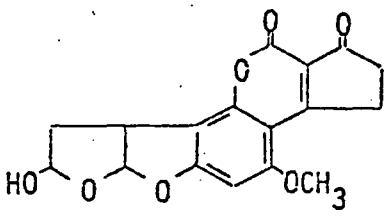
G_2 $C_{17}H_{14}O_7$



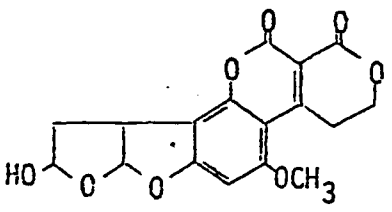
M_1 $C_{17}H_{12}O_7$



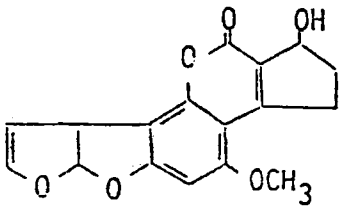
M_2 $C_{17}H_{14}O_7$



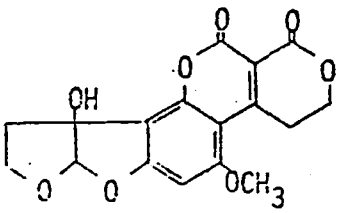
B_{2a} $C_{17}H_{14}O_7$



G_{2a} $C_{17}H_{14}O_8$



R_0 $C_{17}H_{16}O_6$



GM_1 $C_{17}H_{12}O_8$

รูปที่ 2-1 สูตรโครงสร้างของแอฟฟลาทอกซินชนิดต่าง ๆ

Glinsukol และคณะ (1976) ทำการตรวจเชื้อราที่ขึ้นอยู่บนอาหารในประเทศไทย พบว่าถั่วลิสงมีเชื้อราพวก *Aspergillus* ขึ้นอยู่มาก และพบว่า *A. flavus* และ *A. parasiticus* สามารถผลิตแอฟฟลาทอกซิน B1 , B2 G1 และ G2 ส่วน *A. flavus* var. columnaris สร้างได้เฉพาะแอฟฟลาทอกซิน B2 เท่านั้น แอฟฟลาทอกซินที่สร้างจากเชื้อราชนิดต่าง ๆ มีปริมาณและชนิดแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อรา

A. flavus บางสายเชื้อก็ไม่สามารถสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ จากรายงานในส่วนต่าง ๆ ของโลกพบว่าเชื้อ *A.flavus* สามารถสร้างแอฟฟลาทอกซินได้แตกต่างกันออกไป จำนวนโดยประมาณของ *A.flavus* ที่สร้างแอฟฟลาทอกซินได้เป็นดังนี้คือ อังกฤษ 75 เปอร์เซ็นต์ อัฟริกาใต้ 52 เปอร์เซ็นต์ อินเดีย 6 เปอร์เซ็นต์ อิสราเอล 71 เปอร์เซ็นต์ เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา 86 เปอร์เซ็นต์ (ธีรยุทธ และ ชัยวัฒน์ ,2524) สำหรับประเทศไทย Glinsukol และคณะ (1976) ได้รายงานว่า พบจำนวน *A. flavus* ที่สามารถสร้างแอฟฟลาทอกซินได้นั้นมีจำนวน 80 เปอร์เซ็นต์ แล้วพบว่าในบางครั้งตรวจพบเชื้อ *A.flavus* เจริญบนอาหาร แต่ไม่พบแอฟฟลาทอกซินปะปนอยู่ด้วย

Kutzman และคณะ (1987) รายงานว่า *A.nomius* เป็นเชื้อราอีกสายเชื้อหนึ่งที่สามารถสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ โดยคาดว่า *A. nomius* เป็นสายเชื้อที่กลายพันธุ์มาจาก *A. flavus* และ *A. tamarii*

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแอฟฟลาทอกซิน

2.2.1 ชนิดของเชื้อรา

Glinsukol และคณะ (1976) รายงานว่า *A. flavus* และ *A. parasiticus* สามารถสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ดี การสร้างแอฟฟลาทอกซินมีความแตกต่างกันทั้งด้านปริมาณ และชนิดของแอฟฟลาทอกซิน ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากเชื้อราต่างชนิดกัน

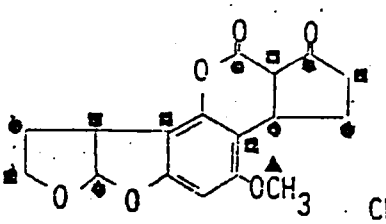
2.2.2 แหล่งอาหาร

Maggon และคณะ (1977) ได้อธิบายถึงการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และการสร้างแอฟฟลาทอกซินว่า โดยปกติแล้วเชื้อรานี้จะเจริญสร้างใยราและสปอร์เท่านั้น ตราบจนกระทั่งปริมาณของฟอสเฟต ไนโตรเจน หรือ ธาตุอาหารรองบางชนิด ถูกจำกัด การเจริญจะช้าลง เกิดการสะสมของ pyruvate , malonate , acetate และ กรดอะมิโน ทำให้เกิดการพัฒนา และกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดให้สร้าง secondary metabolite ขึ้น ใน *A. flavus* สายเชื้อที่สร้างสารพิษได้ พบว่ากระบวนการ polyketide biosynthesis pathway จะสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซินขึ้น แทนการสังเคราะห์กรดไขมันปกติ

เมื่อศึกษาถึงกระบวนการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซินจากเชื้อรา จากการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งสังเคราะห์ โดยใช้สารกัมมันตรังสี ที่เป็นแหล่งอาหารชนิดต่าง ๆ พบว่าธาตุอาหารที่มีโมเลกุลใหญ่จะถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดแอซีติก ซึ่งใช้เป็นสารเริ่มต้นที่ให้คาร์บอนและออกซิเจน ในโมเลกุลของแอฟฟลาทอกซินเป็นส่วนใหญ่ นอกจากกรดแอซีติกแล้ว กรดอะมิโนเมทไทโอนิน (methionine) จะเป็นแหล่งคาร์บอนของกลุ่มเมทิล (methyl group) ในโมเลกุลของแอฟฟลาทอกซินอีกด้วย ดังรูปที่ 2-2 ดังนั้น การนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหารชนิดต่าง ๆ กัน จะทำให้ปริมาณของแอฟฟลาทอกซินที่ถูกสร้างขึ้นแตกต่างกันออกไปด้วย

2.2.2.1 แหล่งไนโตรเจน

ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโน มีความสำคัญต่อการสร้างแอฟฟลาทอกซินมาก Reddy และคณะ (1971) ได้รายงานว่าการเพิ่ม aspartic acid และ asparagine ในสารอาหาร จะกระตุ้นให้เชื้อราสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น Davis และ Diener (1983) ได้อธิบายสาเหตุที่ aspartate และ asparagine มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซินมากที่สุด เพราะ aspartate ถูกใช้เป็นองค์ประกอบของ Tricarboxylic acid (TCA) intermediates และเป็นตัวให้ acetate เพื่อสร้าง secondary metabolite เมื่อศึกษาถึงกระบวนการสร้าง



CH_3COOH Acetic acid C^{14} = ■ C, ● C

$CH_3SCH_2CH_2(NH_2)COOH$ Methionine C^{14} = ▲ C

รูปที่ 2.2 แหล่งคาร์บอนของกลุ่มเมทิล จากแอซีติก และเมทไทโอนีน ในโมเลกุลของแอฟฟลาทอกซิน

แอฟฟลาทอกซินโดยใช้อาหารสังเคราะห์ พบว่าแหล่งอาหารไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อราสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ดีคือ เกลือแอมโมเนียมต่าง ๆ โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟต แต่อย่างไรก็ตาม การสร้างแอฟฟลาทอกซินของเชื้อราที่จะใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตนั้น ยังสร้างได้น้อยกว่าเมื่อใช้ส่วนสกัดของข้าวโพด คือ casamino acid ส่วนสกัดของยีสต์ (yeast extract) และ เพปโทน (ธีระยุทธ และชัยวัฒน์, 2524)

2.2.2.2 แหล่งคาร์บอน

การเพิ่มอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน สัมพันธ์กับการสร้างแอฟฟลาทอกซิน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตจนถึงระดับหนึ่ง ทำให้เชื้อราสร้างสารพิษได้เพิ่มขึ้น Shih และ Marth (1974) ได้เลี้ยง *A. parasiticus* ในสารอาหาร พบว่าแอฟฟลาทอกซินถูกสร้างสูงสุดที่ความเข้มข้นของกลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียม-ซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ แต่เชื้อรามีน้ำหนักแห้งของใยราสูงสุด ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ สำหรับธาตุอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนให้แก่เชื้อรานั้น ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น ซูโครส , ฟรักโตส ,ไซโลส ,ไรโบส แต่พบว่า ซูโครสช่วยทำให้เชื้อราสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ดีที่สุด (ธีรยุทธ และชัยวัฒน์, 2524)

2.2.2.3 เกลือแร่

เกลือแร่ที่สำคัญที่ช่วยทำให้เชื้อราสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ดี คือ สังกะสี (Zn^{2+}) ถ้าขาดสังกะสีแอฟฟลาทอกซินจะถูกสร้างน้อยลง ทั้งนี้เนื่องจากสังกะสีไปกระตุ้นเอนไซม์ในกระบวนการ glycolysis และกระตุ้นให้สะสม adenosine monophosphate (AMP) เพิ่มขึ้น ซึ่ง AMP อาจเป็นสาเหตุให้ระงับการสังเคราะห์ไขมัน แต่กลับสร้างแอฟฟลาทอกซินแทน (Gupta และคณะ , 1976; Davis และ Diener,1983) นอกจากนี้ Lillehoj และคณะ (1974) ได้ศึกษาอิทธิพลของแร่ธาตุอาหารรองที่มีต่อการเข้าทำลายของเชื้อ *A. flavus* และการสร้างแอฟฟลาทอกซินในข้าวโพด พบว่านอกจากสังกะสีแล้ว แมงกานีส และทองแดงก็กระตุ้นการสร้างแอฟฟลาทอกซินที่ส่วนของ germ ข้าวโพดมากขึ้น

ในการศึกษาส่วนของเมล็ดข้าวโพดที่มีเชื้อราเจริญได้ดีที่สุด พบว่าส่วน germ มีเชื้อราอยู่ 54-68 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปลายสุดเมล็ด 48 เปอร์เซ็นต์ และที่พบน้อยที่สุด คือ ส่วน เอนโดสเปิร์ม 12-38 เปอร์เซ็นต์ (Fennell และคณะ ,1973; Rambo และคณะ 1974; Jones และคณะ ,1980)

ปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่พบในอาหารชนิดต่าง ๆ Shank และคณะ (1972) ทำการตรวจแอฟฟลาทอกซินในอาหารชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทยได้ผลดังตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 ปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่พบจากอาหารในประเทศไทย

ชนิดอาหาร	จำนวนอาหารที่มีแอฟฟลาทอกซิน(%)	ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน	
		ค่าเฉลี่ย	ค่าสูงสุด
ถั่วลิสง	49	1,530	12,256
ข้าวโพด	35	400	2,730
พริกแห้ง	11	125	966
กุ้งแห้ง,ปลาแห้ง	5	166	772
ถั่วเขียว	5	16	112
งา	3	1	10
หัวหอม,หัวกระเทียม	3	60	67
ข้าวชนิดต่าง ๆ	2	20	98

2.2.3 ปฏิกิริยาระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกัน

บนอาหารทั่วไปมักมีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดขึ้นปะปนกัน และเชื้อเหล่านี้มีปฏิกิริยาต่อกัน ซึ่งเป็นผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษของ *A.flavus* โดยแบ่งออกได้ดังนี้ คือ

2.2.3.1 ปฏิกิริยาของเชื้อที่ทำให้เชื้ออีกชนิดหนึ่งเจริญเติบโตได้น้อย

ในถั่วลิสง พบว่าเชื้อ *Bacillus, Rhizoctonia* และ/หรือ *A. niger* สามารถทำให้ *A.flavus* เจริญได้น้อย จึงมีการสร้างแอฟฟลาทอกซินน้อยลงด้วย (อรพิน, 2526) Boller และ Schroeder(1974) ศึกษาความสัมพันธ์ของ *A. parasiticus* และเชื้อรา *A.chevalieri* Thom and Church ที่เลี้ยงบนข้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ในตัวอย่างที่ใส่เชื้อทั้งสองชนิดนี้ลงบนอาหารในเวลาเดียวกัน พบว่ามีการสร้างแอฟฟลาทอกซินบนอาหารต่ำกว่าตัวอย่างอื่น ๆ Hunter (1969) พบว่าเชื้อ *A. flavus* สร้างแอฟฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น 24-117 เท่า เมื่อเลี้ยงเชื้อบนเมล็ดข้าวโพดที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อบนเมล็ดข้าวโพดที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อพบว่ามีเชื้อราอื่น ๆ ขึ้นมาแข่งขันด้วย Lillehoj และคณะ (1980) ได้รายงานถึงความสามารถของเชื้อ *A. flavus* ที่มีเหนือ *A. parasiticus* ในการเข้าทำลายเมล็ดข้าวโพดและการสร้างแอฟฟลาทอกซิน

2.2.3.2 ปฏิกิริยาที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งสร้างสารบางตัวไม่ได้

ในถั่วลิสงพบว่าเชื้อรา หรือแบคทีเรียบางชนิดผลิตสารอาหารบางอย่างออกมาทำให้ยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซินของเชื้อ *A. flavus* บนอาหารได้ (อรพิน ,2526) Sauer และ Burroughs (1989) ได้รายงานถึงการแข่งขันการเจริญของเชื้อราที่มีผลต่อการสร้างแอฟฟลาทอกซิน B1 โดยพบว่าข้าวโพดที่เก็บไว้ในที่มีความชื้นสูงมีเชื้อรา *Fusarium* และ *A. flavus* เจริญเติบโตจำนวนมาก แต่ไม่พบแอฟฟลาทอกซินเลย Wicklow และคณะ (1980) พบว่าเมื่อใส่เชื้อ

A. flavus ร่วมกับ *A. niger* หรือเชื้อรา *Trichoderma viride* บนเมล็ดข้าวโพดที่เพิ่งเก็บเกี่ยว และนำมาฆ่าเชื้อแล้วจะไม่พบแอฟฟลาทอกซินเลย Lillehoj และคณะ (1982) พบว่า เมื่อปลูกเชื้อผสมระหว่าง *A. flavus* *Penicillium oxalicum* และ *Fusarium moniliforme* ลงบนฝักข้าวโพดทำให้ปริมาณแอฟฟลาทอกซินปะปนลดลง

2.2.3.3 ปฏิกิริยาที่ไปทำลายสารบางอย่างซึ่งเชื้ออีกตัวสร้างขึ้นมา

เชื้อ *Flavobacterium aurantiacum* สามารถทำลายพิษของแอฟฟลาทอกซินในอาหารได้โดยการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมี ทำให้พิษของแอฟฟลาทอกซินหมดไป (อรพิน, 2526)

2.2.4 สภาพแวดล้อม

2.2.4.1 ความชื้น

ความชื้นทั้งความชื้นสัมพัทธ์อากาศ และความชื้นในเมล็ดพืชเอง มีส่วนในการก่อให้เกิดการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษ ทั้งนี้เพราะถ้าความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศสูงจะเกิดการถ่ายเทความชื้นจากอากาศไปให้กับอาหารที่เชื้อราขึ้นอยู่ เป็นผลให้เชื้อราเจริญได้ดีและสร้างสารพิษได้มาก จากการศึกษาความต้องการความชื้นของ *A. flavus* และการสร้างแอฟฟลาทอกซินโดยทดสอบกับเมล็ดข้าวโพดที่สุกแก่แล้ว พบว่าเชื้อราเจริญได้น้อยที่ความชื้นสัมพัทธ์อากาศที่ต่ำกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อความชื้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อยประมาณ 86-87 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราสามารถเจริญอย่างรวดเร็วและสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ (Lopez และ Chirstensen, 1967;Sauer และ Burroughs 1980) จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นสัมพัทธ์อากาศและความชื้นของเมล็ด พบว่า ความชื้นสัมพัทธ์ 85 เปอร์เซ็นต์ สมดุลกับความชื้นภายในเมล็ดที่ 17.0 - 17.4 เปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไปในไร่ข้าวโพดนั้น เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคพืช จะเข้าทำลายเมล็ดที่มีความชื้นสูงกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มเชื้อราหลักเหล่านี้ได้แก่ *Alternaria* ,

Helminthosporium , *Fusarium* และ *Cladosporium* แต่กลุ่มเชื้อราในโรงเก็บ เข้าทำลายเมล็ดในช่วงความชื้น 13-18 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มเชื้อราในกลุ่มนี้พบมากโดยทั่วไป 2 กลุ่ม คือ *Aspergillus* และกลุ่ม *Penicillium* ในกลุ่ม *Aspergillus* นั้น *A. glaucus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ไม่สร้างแอฟฟลาทอกซินนั้นเจริญได้ดีและพบมากในเมล็ดที่มีความชื้น 12-15 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อความชื้นเมล็ดมากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* สามารถเข้าทำลายมากกว่า

2.2.4.2 อุณหภูมิและระยะเวลาในการเจริญเติบโตของเชื้อรา

อุณหภูมิเป็นตัวแปรที่สำคัญมอ ๆ กับความชื้นที่ควบคุมกระบวนการพัฒนาเชื้อราโดยทั่วไป เชื้อรา *A. flavus* สามารถเจริญได้ ตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิ 6-46°ซ โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 36-38°ซ แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแอฟฟลาทอกซินนั้นอยู่ระหว่าง 15°ซ (Lillehoj,1983) West และคณะ (1973) ได้ทดลองเพิ่มอุณหภูมิจาก 15°ซ ขึ้นเป็น 28°ซ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิทำให้ปริมาณแอฟฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น 4 เท่า เช่นเดียวกัน Shih และ Marth (1974) ศึกษาอุณหภูมิกับการสร้างไยราและการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซิน พบว่าน้ำหนักแห้งของไยราสูงสุดที่อุณหภูมิ 35°ซ และ ปริมาณแอฟฟลาทอกซินสูงสุดที่ 25°ซ (ธีระยุทธ และชัยวัฒน์ , 2524) รายงานระยะเวลาของแต่ละอุณหภูมิก็ผลต่อเชื้อราในการสร้างแอฟฟลาทอกซินด้วยเช่นกัน กล่าวคือที่อุณหภูมิ 20°ซ เชื้อราสร้างแอฟฟลาทอกซิน ได้สูงสุดระหว่างวันที่ 11-13 ของการเลี้ยงเชื้อรา และที่อุณหภูมิ 25 และ 30°ซ เชื้อราจะสร้างแอฟฟลาทอกซินได้สูงสุดระหว่างวันที่ 7-9 และ 5-7 ตามลำดับ และได้ให้ข้อสังเกตว่า อุณหภูมิและความชื้นในบรรยากาศของประเทศไทยเหมาะสมต่อเชื้อที่จะสร้างแอฟฟลาทอกซินได้เป็นอย่างดีในระยะเวลา 7-14 วัน

A. flavus จัดเป็นจุลินทรีย์ในพวก mesophilic ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่าช่วงอุณหภูมิ 25-35 °ซ แล้ว เชื้อราจะสามารถเจริญได้ แต่การเจริญเติบโตจะช้าในช่วงแรก และจะขยายปริมาณมากขึ้นอย่างรวดเร็วในภายหลัง (นรสีห์ ,2530) Ceigler และคณะ (1971) รายงานว่า *A. flavus* ผลิตแอฟฟลาทอกซิน B ที่อุณหภูมิ 11 และ 37°ซ และจะผลิตแอฟฟลาทอกซิน G ที่อุณหภูมิ 28°ซ

2.2.4.3 แสง

ในสภาพแปลงปลูกข้าวโพดนั้น แสงและอุณหภูมิมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด การศึกษาส่วนใหญ่ มุ่งถึงอิทธิพลของอุณหภูมิมากกว่า การศึกษาอิทธพลของแสงโดยตรงจึงมีน้อย แต่เป็นที่ทราบแล้วว่า แสงแดดมีผลทำลายการปะปนแอฟฟลาทอกซิน Trione และ Leach (1969) พบว่าแสงมีอิทธิพลต่อกระบวนการ sporogenesis และ sporulation ในเชื้อราหลายชนิด และในเชื้อราที่สามารถสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซินได้นั้น การให้แสงจะระงับการสร้าง sclerotium (Benett และคณะ, 1978) Joffeeและ Lisker (1969) ได้ทดลองหาการสร้างแอฟฟลาทอกซินของเชื้อ *A.flavus* ภายใต้สภาพแวดล้อมต่าง ๆ พบว่า ในสภาพที่มีแสงพบปริมาณสารพิษน้อยกว่าในที่มืดมาก

2.2.4.4 ปริมาณออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์

นอกจากความชื้น อุณหภูมิ และแสงแล้ว สัดส่วนของออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ยังมีผลต่อการเจริญ การสร้างสปอร์ และ การสร้างสารพิษของเชื้อราด้วย ถึงแม้เชื้อราในโรงเก็บส่วนใหญ่จะเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนสูงในการดำรงชีวิต (aerobic fungi) แต่ก็สามารถทนทานต่อสภาพที่มีออกซิเจนต่ำ และมีคาร์บอนไดออกไซด์สูงได้ดี เช่น เชื้อ *A. flavus* จากการทดลองของ Landers และคณะ (1967) พบว่าถ้าเพิ่มปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์จาก 0.03 ให้สูงถึง 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วเชื้อรายังเจริญได้ดี แต่ไม่สามารถสร้างแอฟฟลาทอกซินในสภาพเช่นนี้ได้ ในขณะเดียวกันถ้าลดออกซิเจนลงเหลือ 1 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรายังคงเจริญเติบโตต่อไปได้บ้าง แต่การเกิดสปอร์และการสร้างสารพิษน้อยลงเช่นเดียวกับ ธีระยุทธ และชัยวัฒน์ (2524) ได้เลี้ยงเชื้อราบนอาหารพืชพบว่า เชื้อราสร้างแอฟฟลาทอกซินเพิ่มขึ้นเป็น 3-150 เท่า ถ้าทำการเขย่าขวดแก้วที่ใช้เลี้ยงเชื้อราด้วย เนื่องจากทำให้ออกซิเจนเข้าไปแทนที่คาร์บอนไดออกไซด์ในขวดแก้วนั้น

Landers และคณะ (1967)รายงานว่าในบรรยากาศที่มีออกซิเจน แอฟฟลาทอกซินจะถูกสร้างได้ดี แต่ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 100เปอร์เซ็นต์ จะไม่มีการสร้างแอฟฟลาทอกซินเลย แต่ถ้าหากว่าในบรรยากาศที่มีทั้งคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดฟอร์มิก พบว่าแอฟฟลาทอกซินจะถูกสร้างขึ้นในปริมาณเล็กน้อย

2.3 กระบวนการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซิน

Ceigler และคณะ (1971)รายงายว่าแอฟฟลาทอกซินผลิตมาจาก acetate เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นวงได้เป็น Cyclic polyketo acid ซึ่งมีคาร์บอน 20 ตัว ซึ่งสารประกอบนี้จะเปลี่ยนเป็น Averufin ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น Versinocol และ Sterigmatocystin และแอฟฟลาทอกซิน B1 ในที่สุด ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2-2

จากการศึกษากระบวนการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซินจากเชื้อราในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้สารกัมมันตรังสี เป็นแหล่งอาหารชนิดต่าง ๆ พบว่า อาหารที่มีโมเลกุลใหญ่เปลี่ยนแปลงไป ได้กรดแอซีติก ซึ่งเป็นสารที่เป็นตัวที่ให้ คาร์บอน และออกซิเจนในโมเลกุลของแอฟฟลาทอกซิน เป็นส่วนใหญ่ โดยมีเมทไทโอนินเป็นแหล่ง methyl group ในโมเลกุลของแอฟฟลาทอกซิน

2.4 การเปลี่ยนแปลงแอฟฟลาทอกซินในร่างกาย

จากการศึกษาถึงการกระจายของแอฟฟลาทอกซินไปยังอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย และการขับออกนอกร่างกายโดยใช้ C^{14} Labelled aflatoxinฉีดเข้าไปในหนู พบว่า 80-90 เปอร์เซ็นต์ของแอฟฟลาทอกซิน B1 ถูกกำจัดออกนอกร่างกายภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยพบว่ากำจัดออกทางอุจจาระ 50-60 เปอร์เซ็นต์และทางปัสสาวะเป็นทางกำจัดแอฟฟลาทอกซินออกนอกร่างกายรองลงมา มีการสะสมแอฟฟลาทอกซินมากบริเวณตับ และไต ส่วนอวัยวะอื่น ๆ เช่น ม้าม ตับอ่อน หัวใจ และสมอง มีการสะสมแอฟฟลาทอกซินน้อยกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์

Wogan (1966) รายงานว่ามีแอฟฟลาทอกซินเพียงส่วนน้อย ที่ถูกขับออกมากับมูลโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนใหญ่ที่ขับออกมาในมูลและปัสสาวะมีการเปลี่ยนแปลงแล้ว ซึ่งทำให้คุณสมบัติด้าน Solubility และ Chromatographic เปลี่ยนแปลงไปด้วย

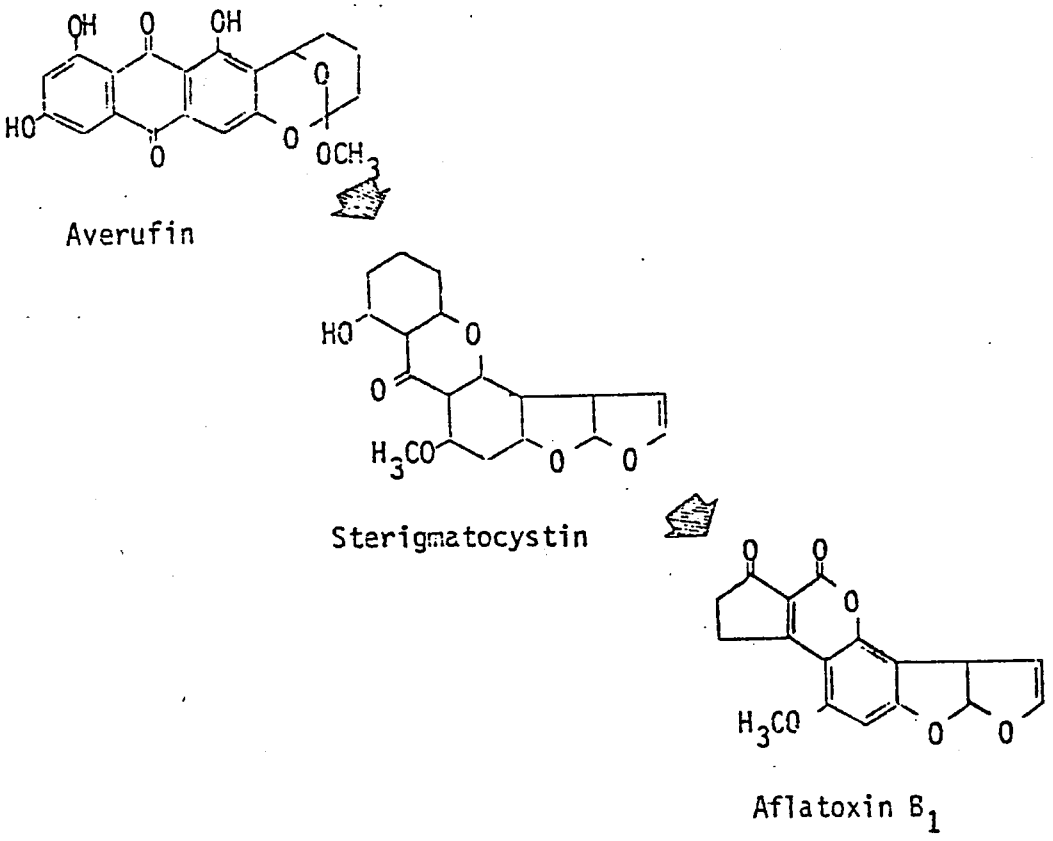
ธีรยุทธ และชัยวัฒน์ (2524) กล่าวว่า เมื่อร่างกายได้รับแอฟฟลาทอกซิน B1 ร่างกายจะขับแอฟฟลาทอกซินบางส่วนออกนอกร่างกาย โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนใหญ่ของแอฟฟลาทอกซิน B1จะถูกเปลี่ยนไปเป็น metabolite ของแอฟฟลาทอกซินเช่น M1,P1

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Q1, B2a, และ RO การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นในตับโดยมีเอนไซม์ Drug metabolizing ซึ่งมาจากส่วนของ Endoplasmic reticulum มาเกี่ยวข้อง metabolite ของแอฟฟลาทอกซินเหล่านี้จะถูกขับออกนอกร่างกาย Aflatoxin B1 -2-3-oxide ซึ่งเป็น metabolite ตัวหนึ่งของแอฟฟลาทอกซิน B1 เป็นตัวที่มีบทบาทสำคัญ ซึ่งจะรวมตัวกับสารโมเลกุลใหญ่ เช่น RNA,DNA หรือ โปรตีนในเซลล์ของตับ ซึ่งทำให้เกิดการเป็นพิษและก่อให้เกิดมะเร็ง

2.5 ผลของแอฟฟลาทอกซิน

แอฟฟลาทอกซินมีผลทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ และมนุษย์ ซึ่งมีผลทำให้เกิดอาการได้ทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง กรณีของการเกิดพิษอย่างเฉียบพลันนั้นพบว่า จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ (necrosis) ในตับเป็นส่วนใหญ่ นอกจากแอฟฟลาทอกซินจะทำให้เกิดมะเร็งของตับแล้ว ยังทำให้เกิดมะเร็งของปอดอีกด้วย (ไมตรี, 2528) จากการศึกษาถึงความเป็นพิษในสัตว์ต่าง ๆ พบว่า LD_{50} (lethal dose 50) ของสัตว์ต่าง ๆ จะแตกต่างกันออกไปตั้งแต่ 0.3-17.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว (WHO, 1979) โดยพบว่า ลูกเป็ดอายุหนึ่งวันจะอ่อนแอต่อสารพิษนี้มากที่สุด และถ้าคนได้รับอาหารที่มีปริมาณแอฟฟลาทอกซินน้อยกว่า 5 นาโนกรัมของน้ำหนักตัวต่อวัน จะไม่ทำให้เกิดมะเร็งในตับ แต่ถ้าได้รับปริมาณสูงกว่านั้น เป็นเวลานาน ๆ จะทำให้เป็นอันตรายจนทำให้เกิดมะเร็งในตับได้ (ธีรยุทธ และชัยวัฒน์, 2524) แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับส่วนประกอบอื่น ๆ ด้วย เช่น อายุ เพศ สภาวะที่ได้รับแอฟฟลาทอกซิน กรรมพันธุ์ และระยะเวลาที่ได้รับแอฟฟลาทอกซิน เป็นต้น



รูปที่ 2-3 การสังเคราะห์สารพิษแอฟฟลาทอกซิน B1

2.5.1 ผลของแอฟฟลาทอกซิน B1 ต่อการสังเคราะห์ DNA และ RNA

Friedman และ Wogan (1967) รายงานว่า แอฟฟลาทอกซินเมื่อถูกดูดซึมที่ตับมีการเปลี่ยนแปลงเป็น Epoxide ซึ่งจะรวมกับ RNA ,DNA และทำให้เอนไซม์ DNA และ RNA Polymerase ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ทำให้การสร้าง DNA และ RNA ลดน้อยลง Clifford และ Lees (1966,1967) รายงานว่าแอฟฟลาทอกซิน B1 ทำให้การสร้าง RNA และสัดส่วนของ DNA/RNA ลดลงอย่างรวดเร็ว และการลดต่ำลงนี้จะคงอยู่ตลอด 24 ชั่งโมง หลังจากนั้น จะค่อย ๆ กลับเข้าสู่สภาวะปกติในวันที่ 5หลังจากได้รับแอฟฟลาทอกซิน Friedman และ Wogan(1966)รายงานว่า แอฟฟลาทอกซิน B1 มีผลทำให้การสังเคราะห์ RNA ในแอฟฟลาทอกซินลดลงนี้จะกลับเข้าสู่สภาวะปกติภายในระยะเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากได้รับแอฟฟลาทอกซินครั้งเดียว

2.5.2 ผลของแอฟฟลาทอกซินต่อสัตว์ชนิดต่าง ๆ

Asplin และ Carnaghan (1961) พบว่าไก่งวงและลูกเป็ดมีความต้านทานต่อแอฟฟลาทอกซินต่ำมาก ในกรณีที่เกิดการเป็นพิษเนื่องมาจากแอฟฟลาทอกซินจะมีอาการชักและตาย จากการผ่าชากเพื่อดูอาการพบว่ามีจุดเลือดออกใต้ผิวหนังและอวัยวะภายใน เลือดมีลักษณะใสและแข็งตัวยากกว่าปกติมีอาการบวมน้ำรอบ ๆ หัวใจตับมีขนาดใหญ่กว่าปกติ สีซีด มีการตายของเซลล์ตับ มีการสะสมไขมันที่ตับเพิ่มขึ้น

ในสุกร พบว่าเมื่อได้รับแอฟฟลาทอกซินในปริมาณสูงจะมีอาการผอม ขนหยาบ ขาหลังไม่มีกำลัง เวลายืนตัวโก่ง มีอาการโลหิตจางและตายภายใน 1-5 วัน จากการผ่าชากพบว่ามีจุดเลือดออกบริเวณใต้ผิวหนัง ตับสีซีด และมีการสะสมไขมันมากในบริเวณตับ

ในโคและกระบือ พบว่าลูกโคกระบือจะแสดงอาการเป็นพิษเนื่องจากแอฟฟลาทอกซิน แต่สำหรับสัตว์ที่โตเต็มที่มักไม่แสดงอาการให้เห็นชัด อาการที่เห็นได้คือ น้ำหนักตัวลดลง ปริมาณน้ำนมลดลง แต่จำนวนเซลล์ต่อน้ำดีเพิ่มขึ้น ขนาดของตับขยายใหญ่ขึ้น มีอาการอักเสบของเส้นเลือดดำ hepatic vein และ Central globular สำหรับแกะนั้น เป็นสัตว์ที่ทนทานต่อพิษของแอฟฟลาทอกซินได้ดีมาก ระดับแอฟฟลาทอกซินในอาหารปหติไม่สามารถก่อให้เกิดอาการเป็นพิษในแกะได้

Wyatt และคณะ (1975) รายงานว่าไก่ที่ได้รับแอฟฟลาทอกซิน จะทำให้ความสามารถในการทนต่ออากาศเย็นลดลง เพราะแอฟฟลาทอกซินจะทำให้เกิดน้ำตาลกลูโคสในเลือดต่ำ (Hypoglycemia) อุณหภูมิร่างกายต่ำ (Hypothermia) และการสะสมไขมันในร่างกายลดต่ำลง จากการทดลองเลี้ยงไก่ด้วยอาหารที่มีแอฟฟลาทอกซิน 1.5 พีพีเอ็ม พบว่าตับมีขนาดใหญ่ขึ้น การเจริญเติบโตลดต่ำลงกว่าปกติ

2.6 การศึกษาแอฟฟลาทอกซินในประเทศไทย

มีรายงานเกี่ยวกับการสำรวจการเกิดแอฟฟลาทอกซินในข้าวโพด ก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว และศึกษาเปรียบเทียบจำนวนประชากรของเชื้อราที่สร้างแอฟฟลาทอกซินในปี พ.ศ. 2523-2525 พบตัวอย่างข้าวโพดก่อนการเก็บเกี่ยวจากจังหวัดเพชรบูรณ์ สระบุรี ลพบุรี อุทัยธานี อ่างทอง ชัยนาท นครสวรรค์ และนครราชสีมา มีแอฟฟลาทอกซินปะปน 4.6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแอฟฟลาทอกซินเฉลี่ย0.6 พีพีบี แต่ตัวอย่างข้าวโพดภายหลังการเก็บเกี่ยว ตรวจพบแอฟฟลาทอกซินถึง 77.2 เปอร์เซ็นต์ โดยแยกตัวอย่างจากยุ้งฉางกสิกร โรงเก็บของพ่อค้าท้องถิ่นและไซโล 37.5, 0 และ 97.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณแอฟฟลาทอกซิน 12, 145 และ 93 พีพีบี ตามลำดับ ข้าวโพดที่เก็บไว้ในยุ้งฉางกสิกรนาน 1 และ 2 เดือน ตรวจพบแอฟฟลาทอกซิน 25 และ 62.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอฟฟลาทอกซิน 7 และ 21 พีพีบี ส่วนข้าวโพดที่เก็บไว้ในโรงเก็บของพ่อค้าท้องถิ่นนาน 1 และ 3 เดือน ตรวจพบแอฟฟลาทอกซิน 86.4 และ78.6 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยปริมาณแอฟฟลาทอกซิน 196 และ 104 พีพีบี ข้าวโพดที่เก็บไว้ในไซโลนาน 1 ,2 ,3 ,4 และ 5 เดือนนั้น มีค่าเฉลี่ยปริมาณแอฟฟลาทอกซิน 52 ,85.8 102, 63 และ 163 พีพีบี ตามลำดับ ส่วนผลการตรวจเชื้อรา *A. flavus* และ *A.parasiticus* ในข้าวโพด 150 ตัวอย่างจากไร่กสิกร พ่อค้าท้องถิ่น และไซโลพบเชื้อนี้ 18.96, 24.41, และ 26.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เชื้อราที่สำคัญอื่นๆ ที่ตรวจพบคือ *A. glaucus* , *Penicillium fumiculosum*, *P. oxalicus* , *Fusarium moniliforme* , *F. oxysporum* , *F. semitectum* และ *Botryodiplodia* sp. การศึกษาความสามารถในการสร้างแอฟฟลาทอกซินจากเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* 246 isolates พบว่ามี 65 isolates (26.4 เปอร์เซ็นต์) ที่สามารถสร้างแอฟฟลาทอกซินได้

Japan International Co-operation Agency ได้สำรวจปริมาณแอฟฟลาทอกซินจากข้าวโพดในไร่ ยุ้งฉางกสิกร โรงเก็บของพ่อค้าท้องถิ่น และไซโลของประเทศไทย ในปี พ.ศ.2524 ผลการสำรวจในไร่กสิกร และในไร่ทดลอง พบแอฟฟลาทอกซิน 15.2 ถึงมากกว่า 25เปอร์เซ็นต์ จากข้าวโพดในยุ้งฉางกสิกรและโรงเก็บของพ่อค้าท้องถิ่นที่ความชื้นเฉลี่ย 15 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน แต่ปริมาณแอฟฟลาทอกซินต่างกันเฉลี่ย 16 พีพีบี และ 122 พีพีบี ตามลำดับ ส่วนข้าวโพดในไซโลมีความชื้นเฉลี่ย 14.1 เปอร์เซ็นต์ แอฟฟลาทอกซินปะปน 94.2 พีพีบี พบจำนวนประชากรของเชื้อรา *A. flavus* จากไร่กสิกร , ยุ้งฉางกสิกร , โรงเก็บพ่อค้าคนกลาง และไซโลเท่ากับ 8.8, 2.7, 20.0 และ 43.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผลิตผลเกษตร ได้มีการสุ่มเก็บตัวอย่างข้าวโพด จากยุ้งฉางกสิกร และจากพ่อค้าท้องถิ่นในจังหวัดลพบุรี ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงธันวาคม พ.ศ. 2527 พบว่าข้าวโพด ที่เก็บจากยุ้งฉางกสิกร ภายหลังเก็บเกี่ยว 2-14 วัน มีปริมาณแอฟฟลาทอกซินเปลี่ย 21 พีพีบี ความชื้นข้าวโพดเฉลี่ย 24.6 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเก็บข้าวโพด ไว้ในยุ้งเดิมนาน 6-8 สัปดาห์ พบปริมาณแอฟฟลาทอกซินเฉลี่ย 76 พีพีบี ความชื้นในเมล็ดข้าวโพดเฉลี่ย 16.4 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การสุ่มเก็บตัวอย่างจากพ่อค้าท้องถิ่นที่เข้าไปรับซื้อข้าวโพดจากชาวไร่ ตรวจพบแอฟฟลาทอกซินเฉลี่ย 45 พีพีบี เมล็ดข้าวโพดมีความชื้น 24.9 เปอร์เซ็นต์ จากการสุ่มตัวอย่าง ณ ลานตากพ่อค้าท้องถิ่นรายย่อย เมื่อเริ่มตากพบแอฟฟลาทอกซิน 239 พีพีบี ความชื้นในเมล็ด 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนตัวอย่างที่สุ่ม ณ ลานตาก ตรวจพบแอฟฟลาทอกซิน223 พีพีบี ความชื้นในเมล็ด 20.4 เปอร์เซ็นต์และหลังจากตากเสร็จแล้วนำเข้าเก็บตรวจพบแอฟฟลาทอกซิน 246 พีพีบี ความชื้นในเมล็ดข้าวโพด 14.3 เปอร์เซ็นต์

ปริศนา (2528) ได้รายงานการสุ่มเก็บตัวอย่างข้าวโพดจากรถบรรทุกของพ่อค้าที่กำลังจะนำเข้าไซโลต่าง ๆ ในระหว่างเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนธันวาคม โดยสุ่มเก็บตัวอย่างเดือนละ 150 ตัวอย่าง พบค่าเฉลี่ยปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่ตรวจพบในระยะต้นฤดูการเก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคมและสิงหาคม 61 และ 70 พีพีบี ตามลำดับ เมล็ดข้าวโพดมีความชื้น 21.98 และ 22.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาณแอฟฟลาทอกซินเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ นับแต่เดือนกันยายน ตุลาคม และพฤศจิกายน คือ 115, 193 และ 230 พีพีบี แต่ความชื้นข้าวโพดลดลงคือ 20.39, 17.31, 16.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ปริมาณ

แอฟฟลาทอกซิน ที่ตรวจพบในเดือนธันวาคม พบเพียง 71 พีพีบี ความชื้น ในเมล็ดข้าวโพด 15.2 เปอร์เซ็นต์

2.7 การวิเคราะห์แอฟฟลาทอกซิน

2.7.1 การวิเคราะห์โดยใช้ HPLC (High pressure liquid chromatoghraphy)

วิธีนี้ค่อนข้างสะดวก สามารถอ่านค่าความเข้มข้นของแอฟฟลาทอกซินได้ถึงหน่วยในพันล้านส่วน แต่เครื่องมือชนิดนี้มีข้อเสียคือ ไม่รวดเร็ว ในกรณีที่ต้องวิเคราะห์ปริมาณแอฟฟลาทอกซินในตัวอย่างเป็นจำนวนมาก ๆและวิธีที่ใช้สกัดสารจะต้องทำให้สารที่สกัดได้บริสุทธิ์ไม่มีสารอื่นเจือปน ก่อนที่จะนำมาฉีดเข้าเครื่องเพื่อวิเคราะห์ปริมาณต่อไป นอกจากนี้แล้วค่าใช้จ่ายสำหรับวิธีนี้ค่อนข้างสูงอีกด้วย

2.7.2 การวิเคราะห์โดยใช้ TLC (Thin layer chromatography) และ Fluorodensitometer

เป็นการตรวจหาปริมาณแอฟฟลาทอกซิน โดยเปรียบเทียบความเข้มของแสงที่เรืองออกมาด้วยเครื่องมือ fluorodensitometer ที่ 363 นาโนเมตร วิธีนี้สามารถหาปริมารได้โดยตรงจาก thin layer plate หลังจากสกัดสารออกจากตัวอย่างได้แล้ว นำมาละลายในคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร และนำมา spot บน thin layer plate (เคลือบด้วยซิลิกาเจล หนา 0.25 มิลลิเมตร) ทิ้งไว้ให้อิ่มตัวใน solvent tank โดยอาจใช้ solvent system ต่าง ๆ กัน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2-3 เพื่อแยกแอฟฟลาทอกซิน B1, B2, G1 และ G2 ออกจากกัน แล้วจึงนำมาอ่านค่าด้วย fluorodensitometer ค่านี้อ่านได้จะคลาดเคลื่อนไปเพียง 15 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

2.7.3 การวิเคราะห์โดย TLC และ UV Spectrophotometer

วิธีนี้ยุ่งยากกว่าวิธีที่สอง ทั้งนี้เพราะว่าวิธีนี้จำเป็นต้องขูดเอาแอฟฟลาทอกซินที่ปะปนอยู่กับซิลิกาเจลบนแผ่น Thin layer plate ออกมาก่อนแล้วจึงละลายด้วยเมทานอล เพื่อสกัดเอาแอฟฟลาทอกซินออกมาจากซิลิกาเจล แล้วจึงนำไปวัดค่าด้วยเครื่องมือ UV Spectrophotometer (Nabney และ Nesbitt, 1965) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการตรวจหาแอฟฟลาทอกซิน โดยวิธีนี้จำเป็นต้องมีแอฟฟลาทอกซินในปริมาณมาก นอกจากนี้แล้วการตรวจหาโดยวิธีนี้มีความคลาดเคลื่อนมากกว่า $\pm$ 5 เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ดีทั้งสามวิธีนี้ใช้ได้ผล ดังนั้นจึงขึ้นอยู่กับว่ามีเครื่องมือชนิดใดในการตรวจหาปริมาณแอฟฟลาทอกซินในอาหารสัตว์

ตารางที่ 2-3 การเปรียบเทียบการแยกแอฟฟลาทอกซิน B1 ,B2 ,G1 และ G2 บนแผ่นซิลิกาเจล โดย solvent system ต่าง ๆ กัน

Solvent system	Solvent ratio	Rf value			
		B1	B2	G1	G2
คลอโรฟอร์ม:อะซีโตน:น้ำ	88:12:15	0.51	0.45	0.40	0.35
คลอโรฟอร์ม:อะซีโตน	90:10	0.44	0.37	0.34	0.29[b]
เบนซิน:เมทานอล:กรดแอซีติก	90:5:5	0.26	0.23	0.20	0.19
คลอโรฟอร์ม:อะซีโตน:แอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์	90:10:0.5	0.33	0.29	0.23	0.20
คลอโรฟอร์ม:อะซีโตน:เฮกเซน	85:15:20	0.48	0.43	0.36	0.30
คลอโรฟอร์ม:เมทานอล	4:1	0.99	0.99	0.99	0.99
โทลูอีน:เอทิลอะซีเตต:กรดฟอร์มิก	6:3:1	0.35	0.28	0.25	0.15[a]
โทลูอีน:เอทิลอะซีเตต:คลอโรฟอร์ม :กรดฟอร์มิก	70:50:50:20	0.38	0.32	0.28	0.21[a]

หมายเหตุ a = compact spot

b = diffuse spot

นอกจากวิธีดังกล่าวแล้ว ก็มีการตรวจแบบรวดเร็ว (rapid test) เพื่อที่จะทราบปริมาณอย่างคร่าว ๆ ของแอฟฟลาทอกซิน คือ

1.BGY (bright greenish yellow fluorescence) ตัวอย่างเช่น การตรวจปริมาณการเรืองแสงของเมล็ดข้าวโพด ซึ่งทำปฏิกิริยากับแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ แล้วเกิดสารเรืองแสง เมื่อนำมาตรวจใต้แสงอัลตราไวโอเลตพบว่าปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ของสารเรืองแสงจะเป็นแอฟฟลาทอกซิน

2.มินิคอลัมน์ (minicolumn) วิธีนี้ใช้ตรวจหาปริมาณแอฟฟลาทอกซินโดยใช้คอลัมน์ขนาดเล็กที่บรรจุซิลิกาเจล Alumina และ Florisil หลังจากที่สกัดแยกสารพิษแอฟฟลาทอกซินออกจากตัวอย่างแล้ว นำสารละลายส่วนของสารพิษมาผ่านคอลัมน์ ทิ้งไว้ให้ develop แล้วนำมาตรวจภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ถ้าหากว่าตัวอย่างอาหารมีสารพิษแอฟฟลาทอกซินจะปรากฏแถบเรืองแสงขึ้น วิธีนี้สามารถตรวจหาปริมาณแอฟฟลาทอกซินได้ถึง 5-15 ส่วนในพันล้านส่วน

ตัวอย่างการตรวจสอบสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ซึ่งสามารถกระทำได้หลายวิธีการดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น แต่ละวิธีการมีขั้นตอนที่ใกล้เคียงกัน เพียงต่างกันที่สารเคมีที่ใช้และเครื่องมือต่างกันออกไป แต่ทั่วไปแล้วพอสรุปเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

1. การเตรียมตัวอย่าง (preparation) และ การสุ่มตัวอย่าง (sampling) เพื่อนำมาวิเคราะห์

2. ขั้นตอนการกำจัดไขมัน (defatting)ขั้นตอนนี้มีความสำคัญและจำเป็น ถ้าหากตัวอย่างที่เรานำมาวิเคราะห์ มีปริมาณไขมันมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ แต่เป็นไปได้ที่จะข้ามขั้นตอนนี้ไปโดยสกัดทิ้งไขมันหรือน้ำมันกับสารพิษ ในขั้นตอนที่ 3 และสกัดเอาไขมัน หรือน้ำมันออกในขั้นตอนที่ 4

3. การสกัดเอาสารพิษแอฟฟลาทอกซินออกกจากตัวอย่าง (extraction) โดยการใช้ตัวทำละลาย (solvent) ที่เหมาะสม

4. ขั้นตอนการทำให้สะอาด (clean up) ของสารที่สกัดได้ ขั้นตอนนี้จะมีการกำจัด interfering fluorescent msterial หรือมีการกำจัดไขมันและน้ำมัน

5. การประเมินผลของความเข้มข้นของสารพิษแอฟฟลาทอกซิน

6. ขั้นตอนของการยืนยันว่า เป็นสารพิษแอฟฟลาทอกซินหรือว่าเป็น fluorescent material โดยเทียบกับ standard

2.8 การป้องกันกำจัดเชื้อราและสารพิษแอฟฟลาทอกซิน

การป้องกันกำจัดเชื้อรา และสารพิษแอฟฟลาทอกซินมีหลายวิธี เช่น การควบคุมการกำจัดโดยทางชีววิทยา , การควบคุมการกำจัดโดยทางฟิสิกส์ และการควบคุมกำจัดโดยใช้สารเคมี เป็นต้น (รฌภพ, 2530)

2.8.1 การควบคุมทางชีววิทยา

การควบคุมการกำจัดเชื้อรา และสารพิษแอฟฟลาทอกซิน โดยวิธีทางชีววิทยาทำได้โดย การนำเอาจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ คือ แบคทีเรีย ยีสต์ รา แอคติโนมัยสีท และอื่น ๆ ประมาณ 1,000 ชนิด มาทำการทดสอบความสามารถในการควบคุมกำจัดเชื้อราและสารพิษแอฟฟลาทอกซิน หรือเปลี่ยนรูปโครงสร้างแอฟฟลาทอกซิน ทำให้ความเป็นพิษลดลง หรือไม่เกิดเป็นพิษต่อสัตว์อื่น จากการทดสอบพบว่า แบคทีเรีย *Flavobacterium auranticum* (NRRL B-184) สามารถเปลี่ยนรูป โครงสร้างของสารพิษแอฟฟลาทอกซินชนิด B1 เป็นชนิด B2a ซึ่งเป็นแอฟฟลาทอกซินที่ไม่เป็นพิษกับสัตว์ นอกจากนี้ยังได้มีการสกัดสารพิษแอฟฟลาทอกซินจากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *A. flavus* ที่สามารถสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้ร่วมกับเชื้อ *Flavobacterium auranticum* แล้วนำสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่ได้นี้ไปผสมกับอาหาร ใช้เลี้ยงลูกเป็ด ผลปรากฏว่าลูกเป็ดไม่มีอาการถูกพิษของสารพิษแอฟฟลาทอกซินเลย El-Gendy และ March (1981) รายงานว่า *Lactobacillus casei* เมื่อใช้เลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* ในอาหาร mineral salts glucose broth บ่มที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 10 วัน พบว่า *Lactobacillus casei* สามารถช่วยลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้ โดยเปรียบเทียบกับอาหารที่เลี้ยงเฉพาะ *A.parasiticus* เพียงอย่างเดียว Mabrouk และคณะ (1985) รายงานว่าสาหร่ายทะเลบางชนิด เช่น

Sargassum despiense , *Turbinaria decurense* , *Dilophus ligulatus* และ *Padina pavonia* ทำให้เชื้อราสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้น้อยลงเช่นกัน

Sauer และ Burroughs (1980) ได้รายงานถึงการแข่งขันการเจริญของเชื้อราต่อการสร้างแอฟฟลาทอกซิน B1 โดยข้าวโพดที่เก็บไว้ในขณะที่มีความชื้นสูง จะพบว่ามีเชื้อรา *Fusariun* และ *A. flavus* เจริญเติบโตเป็นจำนวนมากแต่ไม่พบแอฟฟลาทอกซินเลย Wicklow และคณะ (1980) พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *A.flavus* ร่วมกับเชื้อรา *A. niger* หรือเชื้อรา *Trichoderma viride* บนเมล็ดข้าวโพดที่เพิ่งทำการเก็บเกี่ยว และนำมาทำการฆ่าเชื้อแล้ว จะไม่พบแอฟฟลาทอกซินเลย Lillehoj และคณะ(1982) รายงานว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *A. flavus* *Penicillium oxalicum* และ *Fusarium moniliforms* ลงบนฝักข้าวโพด จะทำให้ปริมาณแอฟฟลาทอกซินปะปนลดลง

Djion และ Hesseltine (1979) ได้รายงานว่า การนำผลผลิตที่ปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* มาใช้ทำเทมเป้ (Tempeh)ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของชาวอินโดนีเซีย โดยใช้เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* ปรากฏว่า สามารถลดการเจริญ และการสร้างสปอร์ของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้รวมทั้งลดปริมาณแอฟฟลาทอกซินได้ด้วย นอกจากนี้ Wang และคณะ (1981) ได้พบว่า *R. oligosporus* ยังมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก รวมทั้ง *Closteidium botulinum* , *Bacillus subtilis* และ *Staphylococous aureus*

2.8.2 การควบคุมทางฟิสิกส์

มีรายงานว่า การทำให้เมล็ดข้าวโพดมีความชื้นภายในเมล็ด 14 เปอร์เซ็นต์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 7°ซ ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถเก็บข้าวโพดนี้ได้นานหลายเดือนถึงหนึ่งปี นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า แอฟฟลาทอกซินจะเปลี่ยนรูปได้เมื่อถูกแสง ทำให้มีความเป็นพิษน้อยลงและสารพิษแอฟฟลาทอกซินยังไวต่อแสงอัลตราไวโอเลตอีกด้วย

แอฟฟลาทอกซินมีความเสถียรต่อความร้อนค่อนข้างมาก Coomes และคณะ (1966) รายงานว่า ได้ทำการฆ่าเชื้อเมล็ดถั่วที่ยังไม่ได้กระเทาะเปลือกที่อุณหภูมิ 120°ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะสามารถลดปริมาณแอฟฟลาทอกซินจาก 7,000 เหลือเพียง 350 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

2.8.3 การควบคุมทางเคมี

สารเคมีหลายชนิดใช้ได้ผลดี และมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารพิษแอฟฟลาทอกซิน รวมทั้ง สามารถป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อราที่สร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้ด้วย Buchanan และ Ayres (1976 พบว่าที่พีเอช 4.5 และความเข้มข้นของโซเดียมอะซีเตต มากกว่า 1.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร สามารถหยุดการเจริญและการผลิตสารพิษแอฟฟลาทอกซินโดยเชื้อรา *A. parasiticus* ได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.6 และ 0.8 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร สามารถหยุดการเจริญและลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้เพียงบางส่วน Uraih และ Chipley (1976) รายงานว่า ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ของโซเดียมอะซีเตต (2 กรัม หรือน้อยกว่า ต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร) จะลดการเจริญเติบโตของ *A.flavus* NRRL 3145 แต่กลับเพิ่มการสร้างแอฟฟลาทอกซินได้อย่างมีนัยสำคัญ และที่ 4 กรัม หรือมากกว่า ต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร จะสามารถหยุดการเจริญของ *A. flavus* NRRL 3145 ได้อย่างสมบูรณ์ Rusul และคณะ (1986) รายงานว่า ที่พีเอช 5.5 และความเข้มข้นสูงสุดของกรดแอซีติกในการทดลอง จะเพิ่มการเจริญ และการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินขึ้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ และที่พีเอช 4.5 จะลดการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินลง 0.25 เปอร์เซ็นต์

กรดโพรพิโอนิก และอนุพันธ์ของกรดโพรพิโอนิก มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อรา แต่จะมีผลเล็กน้อย หรือไม่มีผลต่อเชื้อยีสต์ จึงสามารถนำมาใช้ในการยับยั้งเชื้อราในอุตสาหกรรมขนมปังได้ Vandegraft และคณะ (1975) รายงานว่า กรดโพรพิโอนิค 1 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อรา และการผลิตสารพิษโดย *A. flavus* , *A. ochraceus* และ *Penicillium viridicatum* ในข้าวโพดที่มีเชื้อราเหล่านี้อยู่ และนำมาเก็บไว้เป็นเวลา 29 สัปดาห์

ในขณะที่ *A. parasiticus* และ *A. flavus* จะเจริญเติบโตได้ดีมากในข้าวโพดที่ไม่ได้ใส่สารเคมีนี้ไว้ การเจริญเติบโตของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ เมื่อมีโซเดียมโพรพิโอเนต ความเข้มข้น 1,000 หรือ 8,000 พีพีเอ็ม ที่พีเอช 3 ในขณะที่พีเอช 5 และ 7 จะสามารถยับยั้งได้เพียงบางส่วน

Buchanan และ Ayres (1976) รายงานว่ากรดโพรพิโอนิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ ก็สามารถยับยั้งการเจริญ และการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน โดย *A. parasiticus* ได้เพียงบางส่วน ส่วนที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโต และการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้อย่างสมบูรณ์ Gosh และ Haggiblom (1985) สังเกตว่าระดับความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกที่ระดับต่ำ ๆ นั้น จะไม่มีผลกระตุ้นการสร้างแอฟฟลาทอกซิน โดยพบว่า 0.05 เปอร์เซ็นต์ ของกรดโพรพิโอนิก จะมีผลเพียงเล็กน้อยต่อการเจริญเติบโตของ *A. flavus* แต่ปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่สร้างได้ จะลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร chemical defined liquid medium และเมื่อใช้กรดโพรพิโอนิกร่วมกับกรดแอซีติก จะมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราได้สูงขึ้น เนื่องจากสารเคมีทั้ง 2 ชนิดมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราเหมือนกันแต่มีข้อแตกต่าง คือ กรดโพรพิโอนิกมีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อได้เร็วกว่ากรดแอซีติก แต่มีอัตราการระเหยเป็นไอเร็วกว่าถึง 2 เท่า ซึ่งควบคุมเชื้อได้ในช่วงเวลาอันสั้นกว่า ดังนั้นการรวมเอาสารเคมี 2 ชนิด ที่มีคุณสมบัติต่างกันเข้าด้วยกัน จะทำให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น จากการทดลอง พบว่า การใช้สารเคมีทั้งสองตัวผสมกันในอัตราส่วน 0.25 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเมล็ด จะใช้ได้ผลดีและทำให้ข้าวโพดมีกลิ่นน้อย (ประวัติ, 2528) สำหรับกรดโพรพิโอนิกนี้ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ เพราะว่า กรดโพรพิโอนิกสามารถแตกตัวให้ free carboxyl group ที่มีผลในการยับยั้งและฆ่าเชื้อรา

Buchanan และ Ayres (1977) ได้รายงานว่ากรดแลกติกในขณะที่มีกลูโคสอยู่ จะกระตุ้นการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซินขึ้นEl-Gazzar และคณะ พบว่า *A. parasiticus* จะเจริญและสร้างแอฟฟลาทอกซินในปริมาณมาก เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อราประกอบด้วยกรดแลกติก 2 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรายังสามารถผลิตแอฟฟลาทอกซินได้มากขึ้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชระหว่าง 3.5 ถึง 4.5 ด้วย

Uraih (1977) รายงานว่า กรดเบนโซอิก และโซเดียมเบนโซเอต จะ

สามารถลดปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B1 และ G1 ซึ่งผลิตโดย *A. flavus* และพบว่าการลดปริมาณแอฟฟลาทอกซิน จะเป็นสัดส่วนกับการเพิ่มปริมาณกรดเบนโซอิก หรือโซเดียมเบนโซเอตในอาหารด้วย ในการศึกษาครั้งแรกนั้น Uraih และ Chipley (1976) พบว่ากรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอต 0.2 กรัม ใน 100 มิลลิลิตร ของอาหาร จะสามารถลดทั้งการเจริญของใยรา และการผลิตสารพิษแอฟฟลาทอกซิน โดย *A. flavus* และกรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอต 0.4 กรัมใน 100 มิลลิลิตรของอาหาร จะสามารถยับยั้งการเจริญของ *A.flavus* ได้ นอกจากนี้การยับยั้งโดยกรดเบนโซอิกหรือโซเดียมเบนโซเอตจะดีขึ้นเมื่อค่าพีเอชลดต่ำลง

สารเคมีอีกชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการลดความเป็นพิษ ของสารพิษแอฟฟลาทอกซิน และใช้ได้ผลดี คือ แอมโมเนีย โดยจะทำปฏิกิริยากับแอฟฟลาทอกซิน B1 ทำให้การเปิดของ Lactone ring ในโมเลกุลแอฟฟลาทอกซิน B1 แล้วเกิด decarboxylation ได้โมเลกุลของแอฟฟลาทอกซิน D1 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของแอฟฟลาทอกซิน B1 และมีความเป็นพิษน้อยลงมาก ประสิทธิภาพของแอมโมเนียจะสูงขึ้นในเมล็ดที่มีความชื้นภายในเมล็ดและอุณหภูมิสูง โดยที่อุณหภูมิ 25°ซ ลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B1 จาก 450 พีพีบี เหลือ 15 พีพีบี ภายใน 20 วัน แต่ที่อุณหภูมิ 60°ซ ลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B1 เหลือ10 พีพีบี ภายใน 2 วัน การใช้แอมโมเนียนั้นใช้ได้ทั้งในรูปก๊าซและสารละลาย โดยอาจใช้ร่วมกับอุณหภูมิและความดันได้ Masri(1969) รายงานว่าถั่วลิสงที่ปนเปื้อนแอฟฟลาทอกซิน B1 709 พีพีบี ความชื้น 9.6 และ 14.6 เปอร์เซ็นต์ ใช้แอมโมเนียในรูป anhydrous ที่ 200°ฟ เวลา 60 นาที ความดัน 20 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว พบว่าลดปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B1 ได้ 96.4 และ 97.6 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้ข้าวโพดที่ผ่าน แอมโมเนียแล้วยังปลอดภัย เมื่อนำมาใช้เลี้ยงสัตว์ Norred(1979) พบว่า ข้าวโพดที่ผ่านแอมโมเนียหรือแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์สามารถลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้ และเมื่อนำมาเลี้ยงสัตว์ก็ไม่มีผลต่อสัตว์เลี้ยง ไม่ว่าจะเป็นการเกิดโรค อัตราการเจริญเติบโตหรือจำนวนไข่ สำหรับปัจจัยจำกัดในการใช้ประโยชน์จากแอมโมเนีย คือ ทำให้สีข้าวโพดเปลี่ยนไปโดยจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีเหลืองปนน้ำตาล และจะเข้มขึ้นเรื่อย ๆ โดยความเข้มข้นของสีจะขึ้นอยู่กับปริมาณของแอมโมเนีย และความชื้นของเมล็ด นอกจากนี้ข้าวโพดที่ผ่านแอมโมเนียแล้ว จะมีกลิ่นของแอมโมเนียอยู่ด้วย ถึงแม้จะทำการอบแห้งแล้วก็ตาม

แอมโมเนียสามารถนำไปใช้ได้ดีกับข้าวโพดที่บดแล้วเนื่องจากแอมโมเนียสามารถทำปฏิกริยากับสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้อย่างรวดเร็ว ในการใช้ข้าวโพดเป็นอาหารสัตว์นี้ หากนำแอมโมเนียมาใช้ทำปฏิกิริยากับข้าวโพดหลังจากบดแล้ว จะทำให้สารพิษแอฟฟลาทอกซินหมดไป ส่วนค่าใช้จ่ายจะตกประมาณ 12 สตางค์ต่อกิโลกรัม (เฉพาะค่าแอมโมเนีย) ปัจจุบันโรงงานอาหารสัตว์จะกว้านซื้อข้าวโพดคุณภาพดี เพื่อนำไปเป็นอาหารสัตว์ โดยให้ราคาสูงกว่าท้องตลาด ดังนั้นข้าวโพดที่ส่งเข้าไซโลจึงมีคุณภาพต่ำกว่าหากโรงงานอาหารสัตว์สามารถนำวิธีการใช้แอมโมเนียนี้ไปใช้ได้ ก็จะสามารถรับซื้อข้าวโพดคุณภาพต่ำลงได้ ส่วนข้าวโพดที่มีคุณภาพดีก็สามารถนำส่งไซโล จะช่วยให้คุณภาพของข้าวโพดส่งออกดีขึ้น เป็นการลดปัญหาแอฟฟลาทอกซินไปได้อีกขั้นหนึ่ง (ประวัติ, 2528)

โซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่ำ 1-3 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะกระตุ้นการสร้างแอฟฟลาทอกซิน โดย *A. flavus* และ *A. parasiticus* (El-Gazzar และคณะ,1986) เมื่อใช้โซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร จะไม่พบการสร้างแอฟฟลาทอกซินเลย และในขณะเดียวกันการเจริญเติบโตของเชื้อราก็จะลดน้อยลงด้วย นอกจากนี้เกลือสามารถเข้าทำลายแอฟฟลาทอกซินได้โดยตรง (ปริมณฑ์ และคณะ,2520) พวกเกลือต่าง ๆ จะช่วยส่งเสริมการสร้างแอฟฟลาทอกซินที่ความเข้มข้นสูงจึงจะมีผลยับยั้งได้แต่ต้องใช้ในปริมาณมาก ๆ

นอกจากนี้ยังมีสารเคมีอีกหลายชนิดที่มีการทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการลดความเป็นพิษของแอฟฟลาทอกซินได้ เช่น โซเดียมไบซัลไฟท์ 1 เปอร์เซ็นต์ ใช้คลุกกับเมล็ดข้าวโพด ที่มีความชื้นภายในเมล็ด 26 เปอร์เซ็นต์ สามารถควบคุมเชื้อราในโรงเก็บได้นาน 30 วัน แต่มีข้อเสีย คือ ทำให้สีของเมล็ดข้าวโพดเปลี่ยนไป แคลเซียมโพรพิโอเนต และโซเดียมโพรพิโอเนต ใช้ได้ผลดีกับเมล็ดข้าวโพดที่มีความชื้นสูง แต่มีข้อเสีย คือ ให้ผลในการทำลายเชื้อราในโรงเก็บช้า และมีประสิทธิภาพต่ำที่ความชื้นภายในเมล็ด 18 เปอร์เซ็นต์ (ประวัติ , 2528 ; Sauer และ Burroughs, 1974) เนื่องจาก แคลเซียม และ โซเดียมโพรพิโอเนต แตกตัวให้คาร์บอเนตไอออนซึ่งไม่สามารถฆ่าเชื้อราได้ แต่ถ้าอยู่ในสภาพที่มีความชื้นสูง และพีเอชต่ำจะสามารถเปลี่ยนจาก คาร์บอเนตไอออนกลับมาเป็น freecarboxyl group ทำให้มีความสามารถในการฆ่าเชื้อราได้ โซเดียมอะซีเตตสามารถใช้ควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด และในอุตสาหกรรมได้มีการนำมาใช้เป็นตัวควบคุมจุลินทรีย์ในแป้งมา

นานแล้วแต่จากการทดสอบพบว่า ประสิทธิภาพในการป้องกันการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน อยู่ในเกณฑ์ต่ำมากไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เท่าที่ควร (ประวิติ,2528)

สมุนไพรต่างๆในเมืองไทยก็มีประสิทธิภาพในการลดการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้ เช่น กระเทียม ที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารประจำวัน ก็มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโต และการสร้างแอฟฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* นอกจากนี้พบว่ากระเทียมสามารถทำลาย และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา ที่เป็นสาเหตุของโรคในมนุษย์ได้หลายชนิด ในห้องปฏิบัติการ ใช้น้ำสกัดกระเทียมผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* พบว่าหากเพิ่มความเข้มข้นของน้ำสกัดกระเทียมเชื้อราจะสร้างแอฟฟลาทอกซินได้น้อยลง ในขณะที่การเจริญเติบโตไม่เปลี่ยนแปลง แต่เมื่อความเข้มข้นของน้ำสกัดกระเทียมที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นถึง 0.83 - 1.3 มิลลิกรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลูกบาศก์เมตร จะไม่มีการเจริญเติบโตของ *A. flavus* เลย รวมทั้งไม่มีสารพิษแอฟฟลาทอกซินปะปนอยู่เลย

นอกจากนี้ ยังมีสารเคมีอื่น ๆ อีกหลายชนิดที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้ด้วย เช่น สารฟีนอลลิก ซึ่งเป็น antioxidants ใช้ในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในอาหาร ยาฆ่าแมลงบางชนิด เมทธิลแซนทีน และองค์ประกอบในสมุนไพร เครื่องเทศ และพืชบางชนิด เป็นต้น

2.9 วัตถุกันเสียในอาหาร

2.9.1 ความหมายของวัตถุกันเสีย

วัตถุกันเสีย หมายถึง สารเคมีหรือส่วนผสมของสารเคมีที่ใช้ในอาหาร เพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของอาหารเนื่องจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ยีสต์ และ รา หลังจากวัตถุดิบของอาหารนั้น ๆ ถูกเก็บเกี่ยว รวมทั้งสารปฏิชีวนะ ซึ่งเป็นสารประกอบที่สกัดได้จากจุลินทรีย์ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

2.9.2 กลไกของวัตถุกันเสียในการลดการเสื่อมเสียของอาหาร

การลดการเสื่อมเสียของอาหารเนื่องจากจุลินทรีย์ มีความหมายเดียวกับการลดหรือการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหาร ซึ่งวัตถุกันเสียมีผลต่อจุลินทรีย์โดยมีผลต่อ

1. เยื่อหุ้มเซลล์
2. กลไกทางพันธุกรรม
3. ระบบเอนไซม์ในเซลล์

เยื่อหุ้มเซลล์ พบว่าวัตถุกันเสียอาจทำปฏิกิริยาบนผนังเซลล์ ทำให้การถ่ายเทของสารอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์น้อยลงหรือไม่ได้เลย ปฏิกิริยานี้ค่อนข้างซับซ้อนและแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของวัตถุกันเสีย

กลไกทางพันธุกรรม ผลที่เกิดขึ้นจริง ๆ ยากแก่การบอกแน่นอน ส่วนใหญ่เป็นผลที่เกิดขึ้นเนื่องจากสารปฏิชีวนะ ขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีน หรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ ส่วนผลต่อเอนไซม์ภายในเซลล์ ยังอยู่ในระหว่างการศึกษาและผลยังสรุปได้ไม่แน่นอนนัก

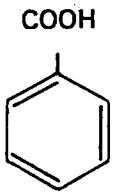
2.9.3 ประเภทของวัตถุกันเสียที่ใช้ในอาหารประเภทต่าง ๆ

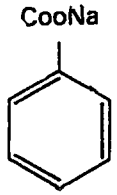
ในที่นี้ จะกล่าวถึงเฉพาะวัตถุกันเสียบางชนิดที่อนุญาตให้ใช้ในอาหารในประเทศไทยสำหรับ ซึ่งการเลือกใช้วัตถุกันเสีย จะต้องพิจารณาองค์ประกอบต่าง ๆ ได้แก่ ประเภทของจุลินทรีย์ที่ต้องการยับยั้งหรือทำลาย กลไกของสารเคมีที่ต้องการ การละลายของวัตถุกันเสียในอาหาร ความสะดวกในการใช้ ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร ตลอดจนราคาของสารเคมีนั้น ๆ ให้เหมาะสม ตัวอย่างของวัตถุกันเสีย เช่น

2.9.3.1 กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอต (benzoic acid and benzoate salt)

กรดเบนโซอิก โดยทั่วไปมักมีขายในรูปเกลือโซเดียมซึ่งนิยมใช้เป็นวัตถุกันเสียมานาน เกลือโซเดียมเบนโซเอต มีขายในรูปผงสีขาวหรือแผ่นผลึกสีขาวหรือสารละลาย

ซึ่งเกลือนี้ละลายได้ดีในน้ำที่มีค่าการละลายเท่ากับ 50 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร ที่ 25°ซ เมื่อละลายน้ำจะให้กรดอิสระ (Free acid)มาก กรดเบนโซอิก และเกลือโซเดียมเบนโซเอต มีสูตรโมเลกุลดังนี้





กรดเบนโซอิก เกลือโซเดียมเบนโซเอต

กรดเบนโซอิก และเกลือเบนโซเอต สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์และแบคทีเรียได้ดี แต่จะให้ผลไม่ดีนักในการยับยั้งเชื้อรา ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับ พีเอชของอาหาร พบว่ากรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอตจะให้ผลในการยับยั้งดีที่สุดที่พีเอชระหว่าง 2.5 - 4.0 ดังนั้นจึงใช้ได้ดีกับอาหารที่มีฤทธิ์เป็นกรด เช่น เครื่องดื่มอัดลม เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ น้ำผลไม้ สลัดผลไม้ แยม เยลลี ผลไม้แช่อิ่ม น้ำเชื่อม อาหารหมักดอง เป็นต้น โดยปริมาณที่ใช้จะต้องไม่มากกว่า 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก คิดคำนวณเป็นโซเดียมเบนโซเอต

กรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอต มีข้อดีคือ ราคาถูก แต่ก็มีข้อเสีย คือ อาจทำให้รสชาติของอาหารผิดปกติจนรู้สึกได้ ดังนั้นจึงต้องใช้ในปริมาณที่ต่ำมาก หรืออาจใช้ร่วมกับวัตถุกันเสียอื่น ๆ

2.9.3.2 กรดซอร์บิกและเกลือซอร์เบต (sorbic acid and sorbate salt)

กรดซอร์บิก (CH_3-CH=CH-CH=CH-COOH) เป็นผลึกสีขาวที่ละลายน้ำได้เล็กน้อย มีค่าการละลายเท่ากับ 0.16 กรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร ที่ 20°ซ แต่จะละลายได้ดีขึ้นในแอลกอฮอล์ โพรพิลีนไกลคอล น้ำมันพืช และในน้ำที่เติมแอลกอฮอล์ หรือกรดน้ำส้ม สำหรับเกลือซอร์เบต ที่อาจใช้เป็นวัตถุกันเสีย ได้แก่ โพแทสเซียมซอร์เบต (CH_2- CH= CH-CH=CH-COOK และ CH_3-CH=CH-CH=CH-COONa) ซึ่งเป็นผงสีขาว ละลายน้ำได้ดีมาก โพแทสเซียมซอร์เบตมีค่าการละลายสูงถึง 139.2 กรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร ที่ 20°ซ ส่วนโซเดียมซอร์เบตจะละลายได้น้อยกว่าคือ ละลายได้ 28 กรัมใน น้ำ 100 มิลลิลิตร กรดซอร์บิก และเกลือซอร์เบต นี้จะใช้ได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำโดยจะไม่ทำให้กลิ่นและรสของอาหารผิดปกติ

กรดซอร์บิกและเกลือซอร์เบต ใช้ได้ดีในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์และเชื้อรา แต่ไม่ดีนักสำหรับแบคทีเรีย โดยพีเอชเหมาะสมและให้ประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 6.5 ดังนั้น จึงใช้เป็นวัตถุกันเสียในมาร์การีน เนยแข็ง ขนมปังที่ใช้ผงฟู เค้ก เครื่องดื่ม และน้ำเชื่อม และอาจใช้ร่วมกับเกลือเบนโซเอตในเครื่องดื่ม น้ำผลไม้ และผลิตภัณฑ์ผลไม้ ในประเทศไทยอนุญาตให้ใช้ในปริมาณไม่มากกว่าร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก คิดคำนวณเป็นกรดซอร์บิก โดยอาจใช้ในอาหารทุกประเภทยกเว้นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

2.9.3.3 กรดโพรพิโอนิกและเกลือโพพิโอเนต (propicnic acid and propionate salt)

กรดโพรพิโอนิก (CH_3CH_2COOH) เป็นกรดอินทรีย์ที่มีกลุ่มคาร์บอกซิลิก (-COOH groups) เพียงกลุ่มเดียวมีกลิ่นแรงและกัดกร่อนจึงนิยมใช้เกลือโซเดียมหรือแคลเซียมโพรพิโอเนตเป็นวัตถุกันเสียมากกว่า เกลือเหล่านี้สามารถแตกตัวให้กรดอิสระที่พีเอช 2-8 เกลือทั้งสองมีขายในรูปผงสีขาวละลายน้ำได้ดี โดยค่าการละลายของเกลือโซเดียมและแคลเซียมโพรดิโอเนตเท่ากับ 150 และ 55.8 กรัมในน้ำ 100 มิลลิลิตร ที่ 100°ซ ตามลำดับ และเกลือโซเดียมจะละลายได้บ้างในแอลกอฮอล์ ในขณะที่เกลือแคลเซียมจะไม่ละลายเลย

เกลือโพรพิโอเนตจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา ได้ดีกว่าเกลือเบนโซเอต แต่ไม่มีผลต่อยีสต์และมีผลน้อยมากต่อแบคทีเรีย โดยจะมีประสิทธิภาพ สูงสุดที่พีเอช 5-6 และโดยที่เกลือทั้งสองนี้มีกลิ่นรสคล้ายเนยแข็ง จึงนิยมใช้ในผลิตภัณฑ์ เนยแข็ง ในประเทศไทยอนุญาตให้ใช้ในปริมาณสูงสุดไม่เกินร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนัก สำหรับอาหารอื่น ๆ เช่น อาหารอบ น้ำเชื่อม แยม และเยลลี่ที่ใช้น้ำตาลสังเคราะห์ ผลไม้แช่อิ่ม และไม่อนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

2.9.3.4 ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และเกลือซัลไฟต์

ซัลเฟอร์ไดออกไซด์(SO_2)เป็นก๊าซอิสระ เมื่อละลายน้ำให้กรดซัลฟิวรัสและไอออนของกรด การใช้อาจใช้ในรูปของก๊าซอิสระหรือเกลือซัลไฟต์ ซึ่งที่พีเอชต่ำ ๆ จะแตกตัวได้กรดซัลฟิวรัสอิสระ ในประเทศไทยอนุญาตให้ใช้เกลือต่อไปนี้คือ โซเดียมไบซัลไฟต์ โพแทสเซียมไบซัลไฟต์ โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ และโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ซึ่งมีลักษณะทั่วไปและการละลายดังแสดงในตารางที่ 2-4

เกลือเหล่านี้เมื่อละลายน้ำ จะแตกตัวให้กรดซัลฟิวรัส (H_2SO_3) ไบซัลไฟต์ไอออน (HSO_3) และซัลไฟต์ไอออน (SO_3) โดยอัตราส่วนที่เกิด ขึ้นอยู่กับพีเอช และชนิดของเกลือที่ใช้ ซึ่งกรดซัลฟิวรัสจะเป็นตัวที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรีย โดยมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีกว่ายีสต์ เกลือซัลไฟต์และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ จะให้ประสิทธิภาพสูงสุดที่พีเอช 2.5 ในประเทศไทย อนุญาตให้ใช้ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และเกลือซัลไฟต์ในผักผลไม้แห้ง และอาหารอื่น ยกเว้นเนื้อสัตว์ และน้ำตาลทรายดิบ โดยปริมาณที่อนุญาตให้ใช้แตกต่างกันไป ดังต่อไปนี้

อาหาร	ปริมาณสูงสุดที่อนุญาตให้ใช้ (ร้อยละโดยน้ำหนักคิดคำนวณเป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์)
ผักและผลไม้แห้ง	0.250
อาหารอื่นๆ ยกเว้นเนื้อสัตว์และน้ำตาลทรายดิบ	0.050
น้ำตาลทรายชนิดผง หรือป่น	0.002
น้ำตาลแล็กโทส	0.002
น้ำเชื่อมกลูโคส	0.004
น้ำตาลทรายขาว	0.007
น้ำตาลทรายบริสุทธิ์	0.002

การใช้ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ จะต้องระมัดระวังเพราะก๊าซนี้ระเหยง่ายและอาจเกิดการกัดกร่อนภาชนะ ดังนั้นจึงควรใช้ในภาชนะ หรือเครื่องมือที่ปิดสนิทและไม่ควรใช้ภาชนะหรือเครื่องมือที่เป็นโลหะ นอกจากนี้ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์อาจทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบของอาหาร เช่น วิตามินบี 1 และอาจให้รสชาติที่ผิดปกติถ้าใช้ในปริมาณสูง สำหรับที่ใช้นอกจากที่แสดงไว้ข้างต้น ยังอาจใช้ในน้ำผลไม้ น้ำเชื่อมเข้มข้น ผลไม้ปั่น และไวน์

ตารางที่ 2-4 ลักษณะทั่วไปและการละลายของเกลือซัลไฟต์

เกลือซัลไฟต์	ลักษณะทั่วไป	ค่าการละลาย (มก./100 มล.)	
		ในน้ำ	แอลกอฮอล์
โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ($NaHSO_3$)	ผลึกเล็ก สีขาว มีกลิ่นซัลเฟอร์ไดออกไซด์	28.6 ในน้ำเย็น 50.0 ในน้ำเย็น	1.43
โพแทสเซียมไบซัลไฟต์ ($KHSO_3$)	ผลึกเล็ก สีขาว มีกลิ่นซัลเฟอร์ไดออกไซด์	28.6 ในน้ำเย็น 50.0 ในน้ำร้อน	ไม่ละลาย
โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ ($Na_2S_2O_5$)	ผลึกหรือผงสีขาว มีกลิ่นซัลเฟอร์ไดออกไซด์	ละลายได้อย่างอิสระ	ละลายได้เล็กน้อย
โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ($K_2S_2O_5$)	ผลึกหรือผงสีขาว มีกลิ่นซัลเฟอร์ไดออกไซด์	ละลายได้อย่างอิสระ	ไม่ละลาย

2.10 การศึกษาการยับยั้งการเจริญและการสร้างแอฟฟลาทอกซินโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในอาหารเหลว โดยใช้กรดเบนโซอิก โซเดียมเบนโซเอต และโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์

เนื่องจากปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า ปัญหาที่เกิดจากสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ไม่ได้เป็นอันตรายต่อมนุษย์เพียงอย่างเดียวเท่านั้น แต่ยังเป็นอันตรายต่อสัตว์เลี้ยง และสัตว์เศรษฐกิจอีกด้วย ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงหนทางที่จะป้องกัน เพื่อลดความเสียหายอันเนื่องมาจากสารแอฟฟลาทอกซิน

โดยปกติแล้ว ร่างกายจะสามารถรับแอฟฟลาทอกซินได้ทางบาดแผล ที่ถูกสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้ และยังมีอีกหนทางหนึ่งที่เป็นหนทางสำคัญที่สารพิษแอฟฟลาทอกซิน จะเข้าสู่ร่างกายได้ ก็คือ การรับประทานอาหารที่มีแอฟฟลาทอกซินปนเปื้อนเข้าไป ซึ่งสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่มักจะปนเปื้อนมาจากอาหารที่เราบริโภค เนื่องจาก *A. flavus* สามารถแพร่กระจายอยู่ในอากาศได้ดีกว่า *A. parasiticus* จึงพบ *A. flavus* เข้าทำลายอาหารพวกข้าวโพด ข้าว ต่าง ๆ และอาหารชนิดอื่น ๆ เช่น ถั่ว หัวหอม กระเทียม ซึ่งอาจจะมี *A. flavus* ปนเปื้อนภายหลัง และควรหาทางป้องกันที่ต้นเหตุ คือการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งมีด้วยกันหลายวิธีการคือ ทางกายภาพหรือทางฟิสิกส์ เช่นการลดความชื้น ทางชีวภาพ เช่น การใช้เชื้อ *Rhizopus oligosporus* ยับยั้งการเจริญ และการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวโพด และทางเคมี เช่นการใช้เกลือแกงยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินเป็นต้น

อีกวิธีหนึ่ง ซึ่งน่าจะเหมาะสมกับอาหารมากกว่า 2 วิธีแรก คือ ใช้สารเคมี ซึ่งสารเคมีประเภทหนึ่งซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ เรียกว่าวัตถุกันเสีย เนื่องจากแอฟฟลาทอกซินจะปนเปื้อนกับอาหารและวัตถุกันเสียสามารถใช้ได้ในอาหาร ดยที่ไม่ทำให้คุณสมบัติของอาหารเปลี่ยนแปลงถ้าใช้ในปริมาณเหมาะสมและยังใช้ในปริมาณเล็กน้อย ทำให้ประหยัด การทดลองต่อไปนี้ เป็นการศึกษาการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในอาหารเหลว โดยใช้วัตถุกันเสีย 3 ชนิด คือ กรดเบนโซอิก โซเดียมเบนโซเอต และโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ซึ่งมีขั้นตอนในการดำเนินการดังต่อไปนี้

ขั้นที่ 1 การเตรียมกล้าเชื้อ

ขั้นที่ 2 การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergilus flavus* ในอาหารเหลว

ขั้นที่ 3 การศึกษาการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus*

ขั้นที่ 4 การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน

บทที่ 3

ขั้นตอนการดำเนินการ

3.1 จุลินทรีย์

Aspergillus flavus 102556 จาก CMI ประเทศอังกฤษ

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์
2. Haemacytometer
3. กรวยแยก (separatory funnel)
4. เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศ (Rotary evaporator)
5. ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)
6. กระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 1
7. เครื่องชั่ง
8. เครื่องเขย่า (shaker)
9. ฟลาสก์รูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
10 ฟลาสก์กันกลม ขนาด 500 มิลลิลิตร
11. Pasteur pipette
12. แผ่น TLC (thin layer chromatography plate) 20*20cm, 250 μm layer, silica gel 60A K6F
13. UV chamber

14. UV spectrophotometre LKB - Biochrom ULTRASPEC II
15. sinter glass filter เบอร์ 4
16. solvent tank
17. volumetric flask
18. Hot air oven
19. Micropipette
20. เครื่องกรอง millipore
21. เยื่อกรอง cellulose nitrate
22. ปิเปตต์

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 สารเคมีที่ใช้ยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซิน

1. โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS)
2. กรดเบนโซอิก (Benzoic acid)
3. โซเดียมเบนโซเอต (Sodium benzoate)

3.2.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. เมทานอล (methanol)
2. คลอโรฟอร์ม (chloroform)
3. โทลูอีน (Toluene)
4. กรดฟอร์มิก (formic acid)
5. เอทิลอะซีเตต (ethylacetate)
6. สารละลายแอฟฟลาทอกซินมาตราฐาน

3.3 การเตรียมสปอร์ของเชื้อรา

การเตรียมกล้าเชื้อรา อายุ 7 วัน สามารถทำได้ดังนี้คือ

3.3.1 ถ่ายเชื้อจาก stock culture ลงบนอาหาร potato dextrose agar

3.3.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน

3.3.3 ทำ spore suspension โดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว เทลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วหยด Tween80 0.1 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 1-2 หยด ใช้ loop เขี่ยสปอร์ให้หลุดจากอาหารให้หมด

3.3.4 กรองสารละลายที่ได้ในข้อ 3.3.3 โดยใช้ชุดกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว (ซึ่งประกอบด้วย กรวยกรองที่มีสำลีอยู่ต่อเข้ากับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร) จะได้ spore suspension อยู่ในฟลาสก์ดังกล่าว

3.3.5 นับจำนวนสปอร์โดยใช้ Haemacytometerให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.3.6 นำ spore suspension ที่ได้ไปเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4°ซ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.4 การศึกษาการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ในอาหารเหลว

3.4.1 เตรียมอาหารเหลวใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรฟลาสก์ละ 100 มิลลิลิตร

3.4.2 ใส่ spore suspension ของเชื้อราลงไปในอาหาร 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความปริมาณเชื้อเริ่มต้นในแต่ละฟลาสก์เป็น 10^{4} เซลล์

3.4.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า ที่ปรับความเร็วรอบเป็น 200 รอบต่อนาที

3.4.4 หลังจากนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 2 ถึงวันที่ 7 เพื่อหาน้ำหนักแห้งของเชื้อรา และหาปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินในใยรา และในอาหารเหลว

3.4.5 นำข้อมูลจากข้อ 3.4.4 มาเขียนกราฟระหว่าง น้ำหนักแห้ง ,ปริมาณ

แอฟฟลาทอกซิน กับวันที่เก็บเกี่ยว เพื่อศึกษาว่าในวันใดมีการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินในปริมาณสูงสุด

3.5 การทำ stock solution ของวัตถุกันเสีย

3.5.1 ชั่งวัตถุกันเสีย แต่ละตัวมาอย่างละ 10 กรัม

3.5.2 นำสารแต่ละตัว มาละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม (โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ และโซเดียมเบนโซเอตละลายในน้ำ ส่วนกรดเบนโซอิกละลายในเมทานอล) โดยทำการละลายสารทั้งหมดในตัวทำละลายนั้น ๆ แต่น้อยก่อนในบิกเกอร์ เมื่อละลายหมดแล้วจึงเทสารละลายทั้งหมดใน Volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร จึงเติมตัวทำละลายนั้น ๆลงใน Volumetric flask จนได้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ได้เป็น Stock solution ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.5.3 นำ stock solution ของโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ และ โซเดียมเบนโซเอตไปทำให้ปราศจากเชื้อ โดยการกรองด้วยเยื่อกรอง Cellulose nitrate ขนาด 0.45 ไมโครเมตร โดยใช้ชุดกรอง millipore

3.5.4 นำ Stock solution ทั้งสามไปเก็บไว้เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.6 การใส่วัตถุกันเสียลงในอาหารเหลว เพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินโดยเชื้อรา *A. flavus*

3.6.1 การใส่กรดเบนโซอิกลงในอาหารเหลว

- ปิเปตต์ Stock solution ของกรดเบนโซอิกที่ได้ ลงในฟลาสก์เปล่าขนาด 250 มิลลิลิตร
- นำไประเหยเมทานอลออกให้หมดใน Hot air oven
- เตรียมอาหาร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์แต่ละฟลาสก์
- นำไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°ซ เป็นเวลา 15 นาที
- ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.6.2 การทำ blank ของกรดเบนโซอิก

- ปิเปตต์เมทานอล 1 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์เปล่าขนาด 250 มิลลิลิตร
- นำไประเหยเมทานอลออกให้หมดใน Hot air oven แล้วจึงเตรียมอาหารเหลวใส่ นำไปฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับการใส่กรดเบนโซอิกลงในอาหารเหลว ในข้อ 3.6.1

3.6.3 การใส่โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์และ โซเดียมเบนโซเอต ลงในอาหารเหลว

- เตรียมอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์เปล่าขนาด 250 มิลลิลิตร
- นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°ซ เป็นเวลา 15 นาที
- ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- ปิเปตต์ Stock solution ของโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ หรือโซเดียมเบนโซเอต ลงในฟลาสก์เหล่านั้น

3.6.4 การปิเปตต์ Stock solution ลงในอาหารเหลว

ความเข้มข้นของสารกันเสียในอาหารเหลวของการทดลองนี้มี 3 ระดับ สามารถปิเปตต์มาจาก Stock solution ได้ดังนี้คือ

- ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ ปิเปตต์สารละลายจาก Stock solution มา 1 มิลลิลิตร
- ความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ ปิเปตต์สารละลายจาก Stock solution มา 0.6 มิลลิลิตร
- ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ปิเปตต์สารละลายจาก Stock solution มา 0.2 มิลลิลิตร

3.6.5 ทำการใส่เชื้อราลงในอาหารเหลว โดยการปิเปตต์สารละลายสปอร์ลงในแต่ละฟลาสก์ ฟลาสก์ละ 1 มิลลิลิตร

3.6.6 นำแต่ละฟลาสก์ไปบ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่า ที่ปรับความเร็วรอบเป็น 200 รอบต่อนาที

3.6.7 หลังจากนั้นทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 4 ถึง 7 โดยทำซ้ำ 3 ซ้ำ เพื่อหาน้ำหนักแห้งของเชื้อรา วิเคราะห์ปริมาณแอฟฟลาทอกซินในอาหารเหลว และในใยรา ต่อไป

3.7 การสกัดแอฟฟลาทอกซินในอาหารเหลว (Shih และ Marth ,1974)

3.7.1 กรองใยราด้วย buchner funnel โดยใช้ ปั๊มสุญญากาศ

3.7.2 นำส่วนของน้ำใสมา 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในกรวยแยก

3.7.3 เติม คลอโรฟอร์ม 40 มิลลิลิตร ลงไปเขย่าอย่างแรง

3.7.4 ไขเอาชั้นของคลอโรฟอร์มที่อยู่ด้านล่างออกมา

3.7.5 สกัดซ้ำด้วย 100 มิลลิลิตร ของคลอโรฟอร์ม โดยแบ่งทำเป็น 2 ครั้ง

3.7.6 นำส่วนของคลอโรฟอร์มที่ได้มาเทรวมกัน แล้วนำไประเหยใน rotary evaporator จนเหลือสารละลายประมาณ 2-3 มิลลิลิตร

3.7.7 ถ่ายลงในขวดสีชาขนาดเล็ก โดยใช้ pasteur pipette แล้วจึงนำไประเหยใน desiccator ที่อุณหภูมิห้อง ได้เป็นผลึกของแอฟฟลาทอกซินตกอยู่ก้นขวด

3.7.8 นำไปเก็บไว้ในที่มืด เพื่อรอการวิเคราะห์ปริมาณต่อไป

3.8 การสกัดแอฟฟลาทอกซินในใยรา (Urath และ Chipley ,1976)

3.8.1 นำใยราที่กรองได้มาใส่ในโกร่งบดยา

3.8.2 เททราย 5 กรัมลงไปพร้อมกับคลอโรฟอร์ม 20 มิลลิลิตร

3.8.3 บดให้ทรายกระจายจนทั่วใยรานั้น ๆ

3.8.4 ตวงคลอโรฟอร์มเทลงไปอีก 20 มิลลิลิตร

3.8.5 นำไปกรองอีกทีหนึ่งโดยใช้ buchner funnel

3.8.6 ล้างอุปกรณ์ด้วย คลอโรฟอร์ม เทลงไปในฟลาสก์รวมกันกับสารละลายที่กรองได้ครั้งแรก

3.8.7 นำสารละลายที่ได้ไประเหยใน rotary evaporator จนเหลือสารละลายประมาณ 2-3 มิลลิลิตร

3.8.8 ถ่ายสารละลายนี้ลงในขวดสีชาเล็กโดยใช้ pasteur pipette

3.8.9 นำไประเหยใน desiccator ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง

3.8.10 นำผลึกแอฟฟลาทอกซินที่ได้ไปเก็บไว้ในที่มืด เพื่อรอการวิเคราะห์ทางปริมาณต่อไป

3.9 การหาน้ำหนักแห้งของใยรา

3.9.1 นำกระดาษวัทแมนเบอร์ 4 ไปอบที่อุณหภูมิ 45°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.9.2 นำไปทำให้เย็นใน desiccator แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนของกระดาษกรอง บันทึก

3.9.3 นำกระดาษกรองนี้ไปใช้ในการกรองใยรา ในข้อ 3.7.1

3.9.4 นำกระดาษกรองนี้ไปใช้ในการกรองใยราในข้อ 3.8.5

3.9.5 นำไปอบที่อุณหภูมิ 45°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.9.6 นำไปทำให้เย็นใน desiccator แล้วจึงนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งต่อไป

3.10 การวิเคราะห์ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน

3.10.1 activate แผ่น TLC (Thin layer chromatography) โดยการนำไปอบที่อุณหภูมิ 105°ซ เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3.10.2 เตรียม solvent system ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย โทลูอีน :เอทิลอะซีเตต:คลอโรฟอร์ม:กรดฟอร์มิก ในอัตราส่วน 70:50:50:20 โดยตวงสารละลายเหล่านี้ตามอัตราส่วนนี้ เทลงใน solvent tank ที่แห้งตามลำดับ ตัดกระดาษกรองให้ เป็นแผ่นสี่เหลี่ยมขนาดเท่ากับด้านยาวของ solvent tank แล้วใส่ไว้ด้านใน ทิ้งให้ solvent tank อิ่มตัวไปด้วย solvent system ประมาณ ครึ่งชั่วโมงก่อนที่จะใส่แผ่น TLC ลงไป

3.10.3 ละลายผลึกแอฟฟลาทอกซิน ในคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร

3.10.4 ใช้ไมโครปิเปตต์ 0.1 มิลลิลิตร spot สารละลายนี้ ลงบนแผ่น TLC พร้อมกับ spot สารละลายแอฟฟลาทอกซินมาตราฐาน (standard aflatoxin) เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ

3.10.5 นำแผ่น TLC ที่ได้ใส่ลงใน solvent tank ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.10.2 โดยให้ระดับที่ spot เอาไว้อยู่เหนือสารละลาย

3.10.6 ทิ้งให้มีการ develope ใน solvent tank จนสารละลายเคลื่อนมาถึงระดับที่ต้องการ เอาแผ่น TLC ออกทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวางไว้

ใต้ UV chamber ตรวจหาสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B1 และ G1 เปรียบเทียบกับแอฟฟลาทอกซินมาตราฐาน ทำเครื่องหมายรอบ ๆ แอฟฟลาทอกซินทั้งสองไว้

3.10.7 ขูดซิลิกาเจล บริเวณที่พบแอฟฟลาทอกซิน B1 และ G1 ใส่บิกเกอร์ปากกว้าง เก็บเอาไว้เพื่อรอการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

3.10.8 ปิเปตต์เมทานอล 5 มิลลิลิตร ใส่ในบิกเกอร์ซิลิกาเจลที่ได้ในข้อ 3.10.7 เพื่อชะเอาแอฟฟลาทอกซินออกจากซิลิกาเจล

3.10.9 กรองสารละลายที่ได้ด้วย sinter glass filter เบอร์ 4 โดยใช้ปั๊มสุญญากาศ

3.10.10 นำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสง (A) โดย UV spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 363 นาโนเมตร โดยใช้เมทานอลเป็น blank บันทึกค่าที่วัดได้ เพื่อใช้ในการคำนวณในขั้นต่อไป

3.11 การคำนวณ

ค่า A ที่ได้จากการทดลอง สามารถนำมาคำนวณเพื่อหาค่าความเข้มข้นของแอฟฟลาทอกซิน ได้ดังสมการต่อไปนี้

$$C = \frac{A * MW * 10^{4}}{2E * D}$$

โดยที่ C = ค่าความเข้มข้นของแอฟฟลาทอกซิน

A = ค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ ที่ 363 นาโนเมตร

MW = น้ำหนักโมเลกุลของแอฟฟลาทอกซิน

E = the molar extinction coefficient

D = dilution factor

ค่า E และ MW สำหรับแอฟฟลาทอกซินทั้ง 4 ชนิด มีค่าดังต่อไปนี้

แอฟฟลาทอกซิน	E	MW
B1	21,800	312
B2	24,000	314
G1	17,700	328
G2	17,100	330

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในอาหารเหลว

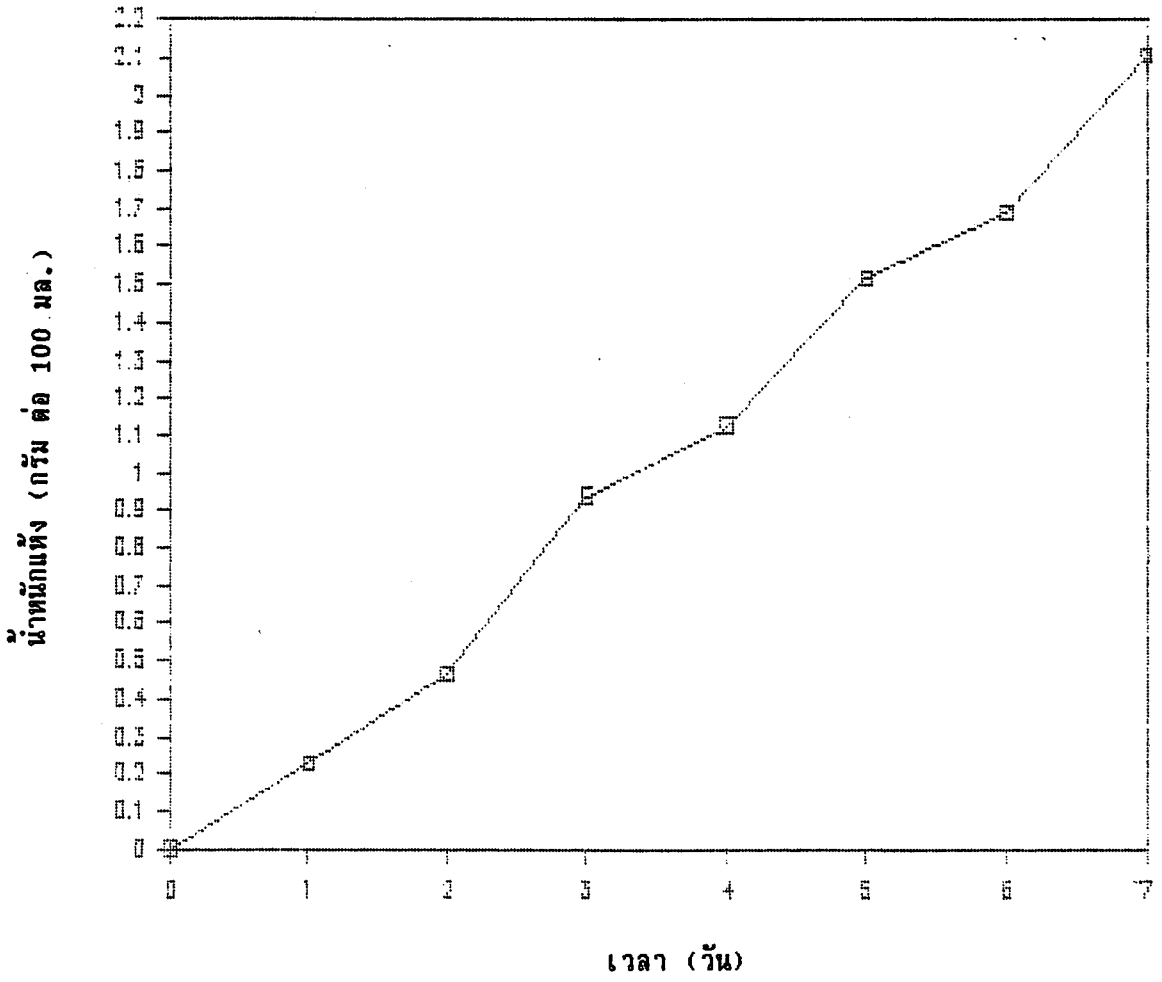
จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *A. flavus* ในอาหารเหลว โดยใช้ความเข้มข้นของสปอร์ เป็น 10^6 ต่อฟลาสก์ นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ปรับความเร็วรอบเป็น 200 รอบต่อนาที แล้วทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ วันเริ่มในวันที่ 2 จนถึงวันที่ 7 ที่เริ่มเก็บในวันที่ 2 โดยไม่เก็บในวันที่ 1 เพราะ ในวันแรกนั้น เชื้ออยู่ในขั้น lag phase ต่อกับ log phase โดยจะสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินน้อย เนื่องจากแอฟฟลาทอกซินเป็น Secondary metabolite ซึ่งจะถูกสร้างขึ้น เมื่อจุลินทรีย์เจริญเต็มที่แล้ว และในวันที่ 1 อาหารมีความหนืดมาก ยากต่อการแยกใยรา ออกจากอาหารและที่เก็บตัวอย่างถึงเพียงวันที่ 7 เท่านั้น เนื่องมาจาก หลังจากวันที่ 7 อาหารจะค่อย ๆ หมดลง และปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่ถูกสร้างขึ้นมีน้อย อาจทำให้การวิเคราะห์ผลเกิดความคลาดเคลื่อนได้

เมื่อเก็บตัวอย่างได้แล้วนำมาแยกใยราออกจากอาหารเหลว นำส่วนที่เป็นของเหลวไปสกัดแอฟฟลาทอกซินออกเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณต่อไป ส่วนใยราที่ได้ นำไปสกัดแอฟฟลาทอกซินออกก่อน แล้วจึงนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 85°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักแห้ง

จากผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4-1 และรูปที่ 4-1 พบว่าน้ำหนักแห้งของใยรา จะสูงสุดในวันที่ 7 คือ 2.11 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

ตารางที่ 4-1 แสดงน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *A. flavus*

วัน	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)
2	0.47
3	0.97
4	1.13
5	1.52
6	1.69
7	2.11



รูปที่ 4-1 กราฟแสดงน้ำหนักแห้งของเชื้อรา *A. flavus*

จากตารางที่ 4-2 และรูปที่ 4-2 ซึ่งแสดงถึงปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อรา *A. flavus* พบว่าการสร้างแอฟฟลาทอกซินจะมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 4 ถึงวันที่ 6 จึงเป็นช่วงวันที่นำไปทำการทดลองในขั้นตอนการใช้วัตถุกันเสียยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน เพราะเป็นช่วงที่มีการสร้างแอฟฟลาทอกซินในปริมาณมาก ทำให้การวิเคราะห์ผลทำได้ง่ายและถูกต้องแม่นยำกว่า ช่วงที่มีการสร้างแอฟฟลาทอกซินในปริมาณน้อย

4.2 การศึกษาการใช้วัตถุกันเสียบางชนิดที่มีผล ต่อการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในอาหารเหลว

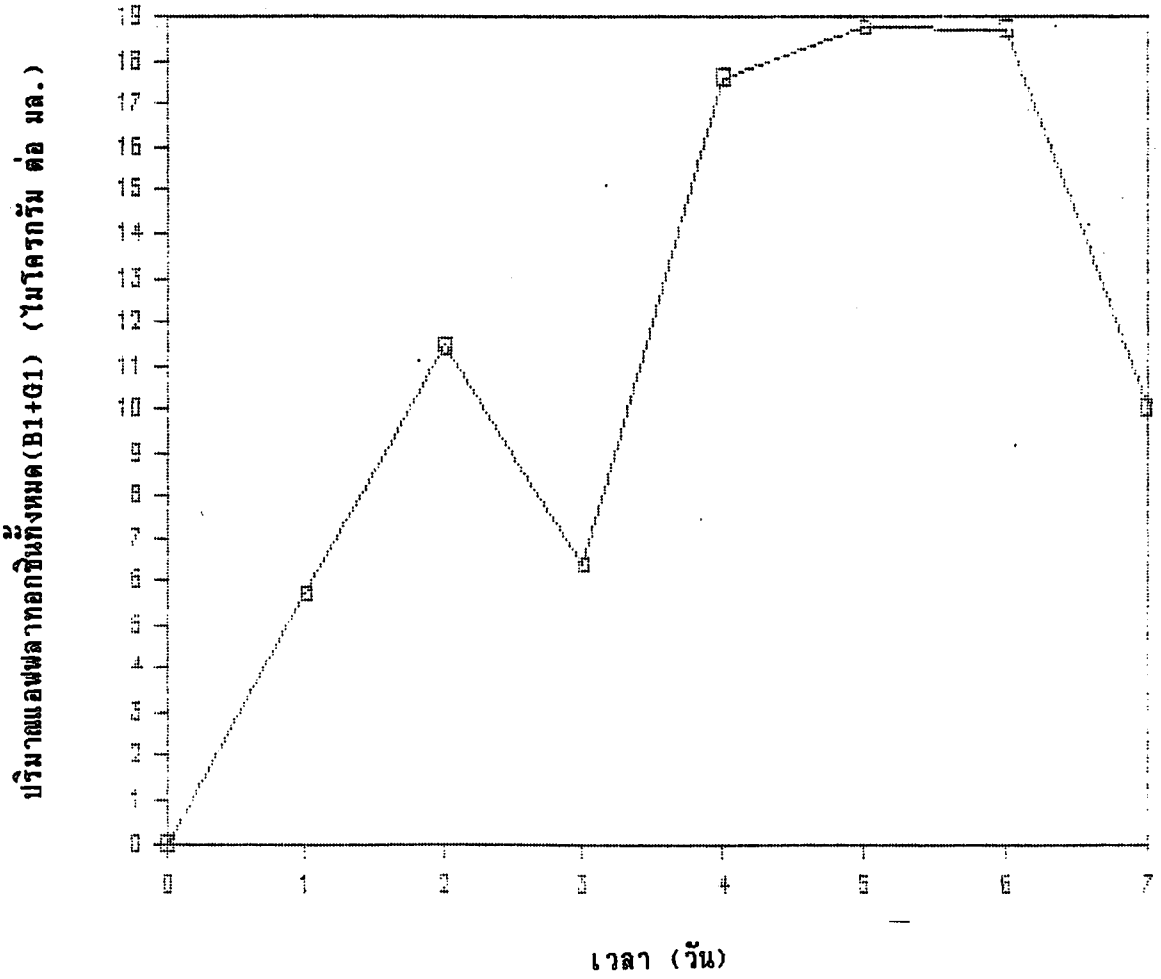
4.2.1 ผลของวัตถุกันเสียต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*

ผลของวัตถุกันเสียต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้แสดงในตารางที่ 4.3 จากผลการทดลองพบว่า โซเดียมเบนโซเอต ที่ความเข้มข้น 0.02 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ จะไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา แต่ที่ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญได้เพียงเล็กน้อย คือ จาก 1.69 เป็น 1.46 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในวันที่ 6 ในขณะที่ กรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดการเจริญของเชื้อราจาก 1.69 เป็น 0.48 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในวันที่ 6 ส่วนกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 0.06 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ที่ความเข้มข้น 0.02 , 0.06 และ 0.10 เปอร์เซนต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์

รูปที่ 4-3 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราในวันต่าง ๆกัน และรูปที่ 4-4 , 4-5 และ 4-6 แสดงการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวัตถุกันเสียต่าง ๆ

ตารางที่ 4-2 ปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่ผลิตได้จากเชื้อรา *A. flavus*

วัน	ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	B1	G1	ทั้งหมด (B1+G1)
2	8.37	3.09	11.46
3	3.97	2.44	6.41
4	12.35	5.31	17.66
5	13.02	5.80	18.82
6	12.76	6.01	18.77
7	8.07	1.98	10.05



รูปที่ 4-2 ปริมาณแอฟฟลาทอกซินทั้งหมดที่สร้างขึ้นโดยเชื้อรา *A. flavus*

ตารางที่ 4-3 ผลการยับยั้งการเจริญของใยราโดยใช้วัตถุกันเสีย

ชนิดและความเข้มข้นของวัตถุกันเสีย ที่เติมลงในอาหารเหลว (100 มล.)	น้ำหนักแห้ง (กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)		
	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6
โซเดียมเบนโซเอต 0.00 %	1.13	1.52	1.69
โซเดียมเบนโซเอต 0.02 %	1.37	1.85	2.01
โซเดียมเบนโซเอต 0.06 %	1.12	1.67	2.11
โซเดียมเบนโซเอต 0.10 %	0.40	0.89	1.46
กรดเบนโซอิก 0.00 %	1.13	1.52	1.69
กรดเบนโซอิก 0.02 %	0.21	0.41	0.48
กรดเบนโซอิก 0.06 %	0.00	0.00	0.00
กรดเบนโซอิก 0.10 %	0.00	0.00	0.00
โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.00 %	1.13	1.52	1.69
โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.02 %	0.00	0.00	0.00
โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.06 %	0.00	0.00	0.00
โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.10 %	0.00	0.00	0.00

รูปที่ 4-3 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราในวันต่าง ๆ

รูปที่ 4-4 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อราโดยใช้โซเดียมเบนโซเอตที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

รูปที่ 4-5 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญโดยใช้กรดเบนโซอิกที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

รูปที่ 4-6 แสดงการเปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญโดยใช้โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

4.2.2 ผลของวัตถุกันเสียชนิดต่อการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน โดย *A. flavus*

ผลของวัตถุกันเสียต่างๆต่อการสร้าง แอฟฟลาทอกซิน โดยเชื้อรา *A. flavus* ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4-4 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า โซเดียมเบนโซเอตที่ความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดปริมาณแอฟฟลาทอกซินได้จาก 17.66 เป็น 6.48 และจาก 18.82 เป็น 12.64 และจาก 16.77 เป็น 12.11 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 , 5 และ 6 ตามลำดับ ในขณะที่ โซเดียมเบนโซเอต 0.02 และ 0.06 เปอร์เซ็นต์ จะกระตุ้นให้มีการสร้างแอฟฟลาทอกซินมากขึ้น จาก 16.77 เป็น 21.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 6 ส่วนกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดปริมาณแอฟฟลาทอกซิน จาก 18.77 เป็น 2.49 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 สำหรับกรดเบนโซอิก 0.10 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.02 , 0.06 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ จะไม่พบการสร้างแอฟฟลาทอกซินเลย

ตารางที่ 4-5 และ 4-6 เป็นตารางสรุปแสดงค่าเฉลี่ยของการยับยั้งการเจริญของใยรา และการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินโดยวัตถุกันเสียต่างๆ ในระหว่างวันที่ 4-6

ตารางที่ 4-4 ผลการยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซินโดยใช้วัตถุกันเสียต่าง ๆ

ชนิดและความเข้มข้นของวัตถุกันเสีย ที่เติมลงในอาหารเหลว (100 มล.)	ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)								
	วันที่ 4			วันที่ 5			วันที่ 6		
	B1	G1	B1+G1	B1	G1	B1+G1	B1	G1	B1+G1
โซเดียมเบนโซเอต 0.00 %	12.35	5.31	17.66	13.02	5.80	18.82	12.76	6.01	18.77
โซเดียมเบนโซเอต 0.02 %	14.36	4.26	18.62	18.53	7.99	26.52	16.11	5.23	21.34
โซเดียมเบนโซเอต 0.06 %	5.77	1.47	7.24	14.15	5.28	19.43	18.9	6.47	25.37
โซเดียมเบนโซเอต 0.10 %	4.40	2.08	6.48	9.31	4.33	13.64	8.21	3.90	12.11
กรดเบนโซอิก 0.00 %	12.35	5.31	17.66	13.02	5.80	18.82	12.76	6.01	18.77
กรดเบนโซอิก 0.02 %	0.29	0.13	0.42	5.41	5.08	10.49	1.35	1.14	2.49
กรดเบนโซอิก 0.06 %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
กรดเบนโซอิก 0.10 %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.00 %	12.35	5.31	17.66	13.02	5.80	18.82	12.76	6.01	18.77
โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.02 %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.06 %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.10 %	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

ตารางที่ 4-5 ค่าเฉลี่ยของผลการยับยั้งการเจริญของใยราโดยใช้วัตถุกันเสีย

ชนิดวัตถุกันเสีย ความเข้มข้น(%)	โซเดียมเบนโซเอต	กรดเบนโซอิก	โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์
0.00	1.45	1.45	1.45
0.02	1.74	0.37	0.00
0.06	1.63	0.00	0.00
0.10	0.92	0.00	0.00

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของน้ำหนักแห้งของใยรา (กรัม/100 มล.)

ตารางที่ 4-6 ค่าเฉลี่ยของผลการยับยั้งการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน โดยวัตถุกันเสียต่าง ๆ

ชนิดวัตถุกันเสีย ความเข้มข้น(%)	โซเดียมเบนโซเอต	กรดเบนโซอิก	โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์
0.00	18.42	18.42	18.42
0.02	22.16	4.47	0.00
0.06	17.35	0.00	0.00
0.10	10.74	0.00	0.00

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยของแอฟฟลาทอกซิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

4.2.1 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

จากผลการทดลองสามารนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้ analysis of variance เมื่อได้ผลแตกต่างทางสถิติแล้วจึงนำค่าเฉลี่ยของผลการทดลองมาเปรียบเทียบกันโดยใช้ DMRT 5%

4.2.1.1 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของการใช้วัตถุกันเสียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

จากผลของการใช้วัตถุกันเสียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* สามารถนำมาวิเคราะห์โดยใช้ ANOVA แลเปรียเทียบค่าเฉลี่ยโดย DMRT 5 % ได้ดังตารางที่ 4-7 และ 4-8 ตามลำดับ และผลของการยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซินก็สามารถนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ ANOVA และ DMRT 5 % ดังตารางที่ 4-9 และ 4-10 ตามลำดับ

ตารางที่ 4-7 analysis of varianceของการยับยั้งการเจริญของใยรา

SV	DF	SS	MS	F
block(r)	2	0.92	0.46	11.50 **
treatment	11	18.63	1.69	42.25 **
a (a)	2	8.50	4.25	106.25 **
b (b)	3	6.54	2.18	54.50 **
axb	6	3.59	0.60	15.00 **
error	22	0.89	0.04	
total	35	20.44		

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

r = วันที่ใช้เพาะเลี้ยง

a = ชนิดของวัตถุกันเสีย

b = ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 4-8 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอิทธิพลร่วมในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยรา โดย DMRT

ชนิดวัตถุกันเสีย (A) ระดับความเข้มข้น (B) (%)	โซเดียมเบนโซเอต	กรดเบนโซอิก	โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์
0.00	1.45 b	1.45 c	1.45 b
0.02	1.74 b	0.37 b	0.00 a
0.06	1.63 b	0.00 a	0.00 a
0.10	0.92 a	0.00 a	0.00 a

ในแต่ละ column ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติใช้ DMRT ที่ 5 %

จากผลที่วิเคราะห์ได้พบว่าปัจจัยทั้ง 2 ปัจจัยคือ ชนิดของวัตถุกันเสีย และระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มีอิทธิพลร่วมกันคือผลของปัจจัยหนึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามอีกปัจจัย หนึ่งที่เปลี่ยนแปลงไป

โดยพบว่าโซเดียมเบนโซเอต ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 0.10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 36.55 เปอร์เซ็นต์คือลดลงจาก 1.45 เป็น 0.92 กรัมน้ำหนักแห้ง

ส่วนกรดเบนโซอิกที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์สามารถลดการเจริญของเชื้อราได้บางส่วน คือสามารถลดได้ 74.48 เปอร์เซ็นต์ จาก 1.45 เป็น 0.37 กรัมน้ำหนักแห้ง และที่ระดับความเข้มข้น 0.06 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์สามรถยับยั้งการเจริญได้ 100 เปอร์เซ็นต์

และโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 0.06 และ0.10 เปอร์เซ็นต์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์

4.2.1.2 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของ การใช้วัตถุกันเสีย ในการยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซิน

จากผลการวิเคราห์ทางสถิติของผลการยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซิน แสดงให้เห็นว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้ง 2 คือ ผลของปัจจัยแรกคือชนิดของวัตถุกันเสียจะเปลี่ยนแปลงไปตามปัจจัยที่สองคือความเข้มข้นที่เปลี่ยนปลงไป ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4-9 และได้แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ได้โดยใช้ DMRT ที่ 5 % ดังตาตรางที่ 4-10

ตารางที่ 4-9 analysis of variance ของการยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซิน

SV	DF	SS	MS	F
block(r)	2	76.68	38.34	3.94 *
treatment	11	2811.42	255.58	26.28 **
a (a)	2	1160.28	580.14	59.65 **
b (b)	3	1154.70	384.90	39.57 **
axb	6	496.44	82.74	8.51 **
error	22	213.96	9.72	
total	35	3102.07		

** = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

* = แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

r = วันที่ใช้เพาะเลี้ยง

a = ชนิดของวัตถุกันเสีย

b = ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางที่ 4-10 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอิทธิพลร่วมในการยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซิน โดย DMRT ที่ 5 %

ชนิดวัตถุกันเสีย (A) ระดับความเข้มข้น (B) (%)	โซเดียมเบนโซเอต	กรดเบนโซอิก	โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์
0.00	18.42 b	18.42 b	18.42 b
0.02	22.16 b	4.47 a	0.00 a
0.06	17.35 b	0.00 a	0.00 a
0.10	10.74 a	0.00 a	0.00 a

ในแต่ละ column ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติใช้ DMRT ที่ 5 %

จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ สามารถบอกได้ว่า สารโซเดียมเบนโซเอตที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์สามารถลดการสร้างแอฟฟลาทอกซินจากเดิม 18.42 เป็น 10.74 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ลดลงเท่ากับ 41.69 เปอร์เซ็นต์ได้จริงที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ความเข้มข้น 0.06,0.02 และ0.00 เปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยที่คำนวณได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ หมายความว่า โซเดียมเบนโซเอตที่ความเข้มข้น 0.06 และ 0.02 ไม่สามารถยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซิน ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ในส่วนของกรดเบนโซอิก ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปสามารถใช้ยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซินได้โดยที่ความเข้มข้น 0.02 สามารถยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ 75.73 เปอร์เซ็นต์คือลดลงจาก 18.42 เป็น 4.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 0.06 และ 0.10 สามารถยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ผลค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นทั้งสามที่ได้ไม่แตกต่างทางสถิติหมายความว่าสามารถใช้ความเข้มข้นของกรดเบนโซอิกที่ความเข้มข้น 0.02 ก็สามารถให้ผลเหมือน

ที่ความเข้มข้น 0.06 และ0.10 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เพราะฉะนั้น ควรใช้ความเข้มข้นที่ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ในการยับยั้งในอาหารเพราะเป็นใช้วัตถุกันเสียที่ประหยัดและปลอดภัย

ส่วนสารโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์นั้น ที่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป สามารถยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ 100 เปอร์เซ็นต์ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลที่ได้จะเห็นว่า กรดเบนโซอิก สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ดีกว่า โซเดียมเบนโซเอต ทั้ง ๆ ที่เป็นวัตถุกันเสียในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งสามารถอธิบายในแง่ของ ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารต่างกันโดยกรดเบนโซอิกจะทำให้ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารลดต่ำลงมากกว่าโซเดียมเบนโซเอต กรดเบนโซอิกจึงสามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้ดีกว่าโซเดียมเบนโซเอต

Bosund (1962) รายงานว่า กรดเบนโซอิกสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยจะไปหยุดการออกซิเดชันของกลูโคส และไพรูเวตที่ acetate leval ใน *Proteus vulgaris*

มีการทดลองนำกรดเบนโซอิก และโซเดียมเบนโซเอตไปใช้ยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินโดยเชื้อ *A. flavus* ในอาหารแข็ง โดยใช้ถั่วเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลปรากฏว่ากรดเบนโซอิกสามารถยับยั้งทั้งการเจริญและการสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ที่ระดับความเข้มข้น 10 มก./ก.อาหาร หรือ 1 เปอร์เซ็นต์และใช้โซเดียมเบนโซเอตที่ดับความเข้มข้น 24 มก./ก.อาหาร หรือ 2.4 เปอร์เซ็นต์ ก็สามารถยับยั้งได้เช่นกัน จะเห็นว่าผลที่ได้แตกต่างจากผลการทดลองที่ได้ อธิบายว่าเนื่องมาจากชนิดของอาหารที่แตกต่างกันนั้นเอง คือในสภาพที่กรดเบนโซอิกและโซเดียมเบนโซเอตอยู่ในรูปสารละลาย จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีกว่าสภาพของแข็ง

จากขั้นตอนการทดลองจะเห็นว่าการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นสูงที่สุดคือ 0.10 เปอร์เซ็นต์ ของอาหาร เนื่องจากต้องการทดลองประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *A. flavus* ในระดับความเข้มข้นที่กฎหมายกำหนดไว้ โดยกฎหมายได้กำหนดให้ใช้กรดเบนโซอิก หรือเกลือของกรดนี้ หรือทั้งสองชนิดรวมกัน ใส่ลงในอาหารได้ไม่เกิน 0.10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร ซึ่งมีการศึกษาอันตรายที่จะเกิดจากการที่ร่างกายรับกรดและเกลือของกรดนี้เกินขนาด Furia (1975) โดยโซเดียมเบนโซเอตในปริมาณต่ำกว่า 0.5 กรัมต่อวัน ไม่ก่อให้เกิดอันตราย โดยที่กรดเบนโซอิกและเกลือ

เบนโซเอตจะไม่เป็นอันตรายต่อเมแทบอริซึม ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่ เนื่องจากร่างกายจะเปลี่ยนกรดเบนโซอิกและเกลือเบนโซเอตไปเป็น hippuric acid ซึ่งไม่เป็นอันตรายเมื่อมีการสะสมกรดตัวนี้ (Gatley และ Sherratt, 1977)

ส่วนโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ยังไม่พบว่ารายงาน เกี่ยวกับการนำมาใช้ในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน แต่ที่โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์สามารถยับยั้งได้สันนิษฐานว่าเนื่องจาก โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์เป็นวัตถุกันเสียที่อยู่ในกลุ่ม ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ มีคุณสมบัติเป็น reducing agent เมื่อละลายในน้ำจะแตกตัวให้ซัลไฟต์อิสระ คือ กรดซัลฟิวรัส (H_2SO_3) ไบซัลไฟต์ (HSO_3^-) และซัลไฟต์ไอออน (SO_3^{2-}) ซึ่งซัลไฟต์อิสระเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน คีโตน อัลดีไฮด์ วิตามิน B_1 (thiamine) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์ ซัลไฟต์อิสระ จึงสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้โดยกลไกที่ว่า ซัลไฟต์อิสระไปทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของผนังเซลล์ทำให้อาหารผ่านเข้าเซลล์ได้น้อยหรือไม่ได้เลย ทำให้จุลินทรีย์ถูกยับยั้งได้ หรืออาจเกิดจากการที่ซัลไฟต์อิสระไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ภายในเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งเป็นโปรตีน ทำให้เอนไซม์เสียสภาพไม่สามารถดำเนินกิจกรรมต่อไปได้จุลินทรีย์มีชีวิตอยู่ไม่ได้ โดยกรดซัลฟิวรัสจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าซัลไฟต์อิสระอื่น และที่ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารยิ่งต่ำประสิทธิภาพของซัลไฟต์อิสระยิ่งสูง

โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ มีข้อดีหลายประการ คือ นอกจากเป็นวัตถุกันเสียแล้วยังเป็นสารป้องกันการเปลี่ยนสีในอาหาร เช่นการป้องกันการเกิดสีน้ำตาลในอาหารทั้งแบบมีเอนไซม์เกี่ยวข้องและไม่มีเอนไซม์เกี่ยวข้อง นอกจากนี้ ยังสามารถกลายเป็นไอซึ่งทำให้อาหารที่ใช้ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์นี้ ค่อย ๆ มีปริมาณสารนี้ลดน้อยลงเมื่อถึงมือผู้บริโภค ทำให้มีสารนี้ในปริมาณน้อยซึ่งเป็นผลดีต่อผู้บริโภคเองที่จะได้รับอาหารที่มีวัตถุกันเสียในปริมาณน้อย

มีกฎหมายกำหนดปริมาณการใช้ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ โดยคิดเป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์ คือในผักและผลไม้แห้งให้ใช้ได้ถึง 0.25 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมากกว่าที่ใช้ในการทดลองนี้หลายเท่า FAO และ WHOได้ร่วมกันกำหนดค่า ADI (acceplable daily intake) ของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไว้ที่ระดับ 0.7 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ซัลไฟต์อิสระนั้น ในคนปกติจะมีเอนไซม์ sulphite oxidase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการออกซิไดซ์สารซัลไฟต์ ที่เกิดขึ้นภายในและที่รับเข้ามาจากภายนอกร่างกาย โดยจะ

เปลี่ยนซัลไฟต์ไปเป็นซัลเฟต ซึ่งไม่มีพิษต่อร่างกายและถูกขับถ่ายออกจากร่างกายทางปัสสาวะแต่ถึงอย่างไรก็ควรระมัดระวังการใช้ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ บ้างเนื่องจากบางคนขาดเอนไซม์ sulphite oxidase อาจเป็นอันตราย และถ้าได้รับในปริมาณมากเกินไปจะเป็นอันตรายได้ ซึ่ง FDA (Food and Drug Adminisration) ได้กำหนดให้อาหารที่ปริมาณซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ตั้งแต่ 10 มก.ต่อกก. ขึ้นไปต้องแสดงปริมาณไว้บนฉลากอาหาร

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่าวัตถุกันเสียทั้ง 3 ชนิดคือ โซเดียมเบนโซเอต กรดเบนโซอิก และ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างแอฟฟลาทอกซินของเชื้อ *A. flavus* ในอาหารเหลวได้ โดยระดับความเข้มข้นของโซเดียมเบนโซเอตที่สามารถยับยั้งการเจริญ และการสร้างแอฟฟลาทอกซินคือ ระดับความเข้มข้น 0.10 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว สามารถลดการเจริญของเชื้อได้ 36.55 เปอร์เซ็นต์ และลดการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินลงได้ 41.69 เปอร์เซ็นต์ส่วนกรดเบนโซอิกที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร สามารถลดการเจริญของเชื้อได้ 74.48 เปอร์เซ็นต์ และยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ 75.73 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการยับยั้งนี้เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติแล้ว ไม่แตกต่างกับการยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซินที่ระดับความเข้มข้น 0.06 และ 0.10 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร ซึ่งสามารถยับยั้งได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับความเข้มข้น 0.06 และ 0.10 นี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนวัตถุกันเสีย อีกชนิดหนึ่ง คือ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินของเชื้อ *A. flavus* ในอาหารเหลวได้ 100 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองที่ได้นี้ควรจะทำการทดลองเพิ่มเติม โดยใช้วัตถุกันเสียทั้ง 3 ชนิด โดยหาระดับความเข้มข้นในช่วงที่สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ในช่วงที่สามารถยับยั้งได้ กับช่วงที่สามารถยับยั้งได้บางส่วนในกรดเบนโซอิก และ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ และทดลองเพิ่มความเข้มข้นในส่วนของ โซเดียมเบนโซเอต เพื่อที่จะหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม และเพื่อเป็นการลดความสิ้นเปลืองของค่าใช้จ่ายในการใช้วัตถุกันเสียเพื่อการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ในขั้นที่นำไปใช้ได้จริง และควรทดลองกับอาหารแข็งซึ่งเป็นสภาพที่แท้จริงของการปนเปื้อนและการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ต่อไป

ภาคผนวก

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ liquid medium 1 ลิตร ประกอบด้วย

- Sucrose	85	กรัม
- L-Asparagine	10	กรัม
- Ammonium sulphate	3.5	กรัม
- KH_2PO_4	10	กรัม
- $MgSO_4.7H_2O$	2	กรัม
- $CaCL_2.2H_2O$	75	มิลลิกรัม
- $ZnSO_4.7H_2O$	10	มิลลิกรัม
- $MnCl_2.4H_2O$	5	มิลลิกรัม
- $FeSO_4.7H_2O$	10	มิลลิกรัม
- Ammonium molybdate.$4H_2O$	2	มิลลิกรัม
- $Na_2B_4O_7$	2	มิลลิกรัม

ปรับสภาพความเป็นกรดเป็นด่าง เท่ากับ 4.5

ฆ่าเชื้อที่ 110°ซ 15 นาที

2. การเตรียม diluent เพื่อใช้ทำ spore suspension

เตรียมโดยผสม Tween 80 0.1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ 15-20 นาที

3. คุณสมบัติของวัตถุกันเสียที่ใช้ในการทดลอง

3.1 โซเดียมเบนโซเอต

สูตรโมเลกุล $C_7H_5O_2Na$

มวลโมเลกุล 144.11

จุดหลอมเหลว 121.5-123.5°ซ

ลักษณะ เป็นผลึกสีขาว

การละลาย ละลายได้ดีในน้ำและแอลกอฮอล์ ไม่ละลายในไขมัน

3.2 กรดเบนโซอิก

สูตรโมเลกุล $C_7H_6O_2$

มวลโมเลกุล 122.13

จุดหลอมเหลว 121.7° ซ

ลักษณะ เป็นผลึกสีขาว

การละลาย ละลายได้เล็กน้อยในน้ำ ละลายได้ในแอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม อีเทอร์ อะซีโตน กลีเซอรีน ไขมัน

3.3 โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์

สูตรโมเลกุล $K_2S_2O_5$

มวลโมเลกุล 222.33

จุดหลอมเหลว สลายตัวเมื่อโดนความร้อน

ลักษณะ เป็นผลึกสีขาว มีกลิ่นของซัลเฟอร์ไดออกไซด์ และไม่จับตัวเป็นก้อน

การละลาย ละลายได้ดีในน้ำ

4. ตาราง F

หน่วยเปอร์เซ็นต์ของการแจกแจงแบบ F

$\alpha = .01$

Degrees of Freedom

ν_2 \ ν_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	4052	4999.5	5403	5625	5764	5859	5928	5982	6022
2	98.50	99.00	99.17	99.25	99.30	99.33	99.36	99.37	99.39
3	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.35
4	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66
5	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16
6	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98
7	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72
8	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91
9	10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35
10	10.04	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94
11	9.65	7.21	6.22	5.67	5.32	5.07	4.89	4.74	4.63
12	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39
13	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19
14	8.86	6.51	5.56	5.04	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03
15	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89
16	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78
17	8.40	6.11	5.18	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68
18	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.71	3.60
19	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52
20	8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46
21	8.02	5.78	4.87	4.37	4.04	3.81	3.64	3.51	3.40
22	7.95	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35
23	7.88	5.66	4.76	4.26	3.94	3.71	3.54	3.41	3.30
24	7.82	5.61	4.72	4.22	3.90	3.67	3.50	3.36	3.26
25	7.77	5.57	4.68	4.18	3.85	3.63	3.46	3.32	3.22
26	7.72	5.53	4.64	4.14	3.82	3.59	3.42	3.29	3.18
27	7.68	5.49	4.60	4.11	3.78	3.56	3.39	3.26	3.15
28	7.64	5.45	4.57	4.07	3.75	3.53	3.36	3.23	3.12
29	7.60	5.42	4.54	4.04	3.73	3.50	3.33	3.20	3.09
30	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07
40	7.31	5.18	4.31	3.83	3.51	3.29	3.12	2.99	2.89
60	7.08	4.98	4.13	3.65	3.34	3.12	2.95	2.82	2.72
120	6.85	4.79	3.95	3.48	3.17	2.96	2.79	2.66	2.56
∞	6.63	4.61	3.78	3.32	3.02	2.80	2.64	2.51	2.41

10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞	ν_1 / ν_2
6056	6106	6157	6209	6235	6261	6287	6313	6339	6366	1
99.40	99.42	99.43	99.45	99.46	99.47	99.47	99.48	99.49	99.50	2
27.23	27.05	26.87	26.69	26.60	26.50	26.41	26.32	26.22	26.13	3
14.55	14.37	14.20	14.02	13.93	13.84	13.75	13.65	13.56	13.46	4
10.05	9.89	9.72	9.55	9.47	9.38	9.29	9.20	9.11	9.02	5
7.87	7.72	7.56	7.40	7.31	7.23	7.14	7.06	6.97	6.88	6
6.62	6.47	6.31	6.16	6.07	5.99	5.91	5.82	5.74	5.65	7
5.81	5.67	5.52	5.36	5.28	5.20	5.12	5.03	4.95	4.86	8
5.26	5.11	4.96	4.81	4.73	4.65	4.57	4.48	4.40	4.31	9
4.85	4.71	4.56	4.41	4.33	4.25	4.17	4.08	4.00	3.91	10
4.54	4.40	4.25	4.10	4.02	3.94	3.86	3.78	3.69	3.60	11
4.30	4.16	4.01	3.86	3.78	3.70	3.62	3.54	3.45	3.36	12
4.10	3.96	3.82	3.66	3.59	3.51	3.43	3.34	3.25	3.17	13
3.94	3.80	3.66	3.51	3.43	3.35	3.27	3.18	3.09	3.00	14
3.80	3.67	3.52	3.37	3.29	3.21	3.13	3.05	2.96	2.87	15
3.69	3.55	3.41	3.26	3.18	3.10	3.02	2.93	2.84	2.75	16
3.59	3.46	3.31	3.16	3.08	3.00	2.92	2.83	2.75	2.65	17
3.51	3.37	3.23	3.08	3.00	2.92	2.84	2.75	2.66	2.57	18
3.43	3.30	3.15	3.00	2.92	2.84	2.76	2.67	2.58	2.49	19
3.37	3.23	3.09	2.94	2.86	2.78	2.69	2.61	2.52	2.42	20
3.31	3.17	3.03	2.88	2.80	2.72	2.64	2.55	2.46	2.36	21
3.26	3.12	2.98	2.83	2.75	2.67	2.58	2.50	2.40	2.31	22
3.21	3.07	2.93	2.78	2.70	2.62	2.54	2.45	2.35	2.26	23
3.17	3.03	2.89	2.74	2.66	2.58	2.49	2.40	2.31	2.21	24
3.13	2.99	2.85	2.70	2.62	2.54	2.45	2.36	2.27	2.17	25
3.09	2.96	2.81	2.66	2.58	2.50	2.42	2.33	2.23	2.13	26
3.06	2.93	2.78	2.63	2.55	2.47	2.38	2.29	2.20	2.10	27
3.03	2.90	2.75	2.60	2.52	2.44	2.35	2.26	2.17	2.06	28
3.00	2.87	2.73	2.57	2.49	2.41	2.33	2.23	2.14	2.03	29
2.98	2.84	2.70	2.55	2.47	2.39	2.30	2.21	2.11	2.01	30
2.80	2.66	2.52	2.37	2.29	2.20	2.11	2.02	1.92	1.80	40
2.63	2.50	2.35	2.20	2.12	2.03	1.94	1.84	1.73	1.60	60
2.47	2.34	2.19	2.03	1.95	1.86	1.76	1.66	1.53	1.38	120
2.32	2.18	2.04	1.88	1.79	1.70	1.59	1.47	1.32	1.00	∞

หน่วยเปอร์เซ็นต์ไทล์ของการแจกแจงแบบ F

$\alpha = .05$

Degrees of Freedom

ν_2 \ ν_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88

10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞	ν_1 / ν_2
241.9	243.9	245.9	248.0	249.1	250.1	251.1	252.2	253.3	254.3	1
19.40	19.41	19.43	19.45	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50	2
8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53	3
5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63	4
4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46	4.43	4.40	4.36	5
4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67	6
3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23	7
3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93	8
3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71	9
2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54	10
2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40	11
2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30	12
2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21	13
2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13	14
2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07	15
2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01	16
2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96	17
2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92	18
2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88	19
2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84	20
2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96	1.92	1.87	1.81	21
2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.78	22
2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91	1.86	1.81	1.76	23
2.25	2.18	2.11	2.03	1.98	1.94	1.89	1.84	1.79	1.73	24
2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71	25
2.22	2.15	2.07	1.99	1.95	1.90	1.85	1.80	1.75	1.69	26
2.20	2.13	2.06	1.97	1.93	1.88	1.84	1.79	1.73	1.67	27
2.19	2.12	2.04	1.96	1.91	1.87	1.82	1.77	1.71	1.65	28
2.18	2.10	2.03	1.94	1.90	1.85	1.81	1.75	1.70	1.64	29
2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62	30
2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51	40
1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39	60
1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	1.43	1.35	1.25	120
1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00	∞

หนังสืออ้างอิง

ดุษฎี เดโชวิบูลย์ "การวิเคราะห์ปริมาณแอฟฟลาทอกซินในอาหารสัตว์" จุลสาร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เนื่องในงานพระจอมเกล้าลาดกระบังนิทรรศน์'30 2530.

ธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว "แอฟฟลาทอกซิน (สารพิษจากเชื้อราที่ทำให้เกิดมะเร็งในตับ)" สำนักพิมพ์ ดร. สกบ พงศกร, กรุงเทพฯ. 2524.

นรสิงห์ ตระกูล "เชื้อราบ่อนทำลายเศรษฐกิจ" แก่นเกษตร , 5(6), (2520) 269.

ประวัติ ตันบุญเอก,) ดารา พวงสุวรรณ และ กัญจนา พุทธสมัย "การศึกษาสารเคมี ที่มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดสารพิษแอฟฟลาทอกซิน" กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผลิตผลทางการเกษตร กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร,กรุงเทพฯ.2528.

ปริมณฑ์ กาจนัษฐิติ และสุภร พัฒธุ์สิทธิกุล "การยับยั้งสารพิษประเภทแอฟฟลาทอกซิน" วารสารวิทยาศาสตร์, 31 (2520) 64-67.

ปริศนา สิริอาชา (2528) "การสำรวจปริมาณแอฟฟลาทอกซินในข้าวโพดก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว" เอกสารสัมมนาเรื่องความก้าวหน้าทางวิชาการ หลังการเก็บเกี่ยวต่าง ๆ ณ ห้องประชุมศูนย์วิจัยอารักขาข้าว ระหว่างวันที่ 10-17 กรกฎาคม.

ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก , "กรรมวิธีแปรรูปอาหาร" มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หาดใหญ่, (2532) 1-11.

ไมตรี สุทธิจิตต์ "สารพิษและสารอันตรายจากธรรมชาติ" วารสารวิทยาศาสตร์, 39 (2528) 207-222.

รณภพ บรรเจิดเชิดชู "เชื้อราในโรงเก็บ สารพิษแอฟฟลาทอกซินและการควบคุมด้วยสารเคมีบนเมล็ดข้าวโพด" วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 2530.

อรพิน ถีรวัฒน์ "สารพิษจากเชื้อรา" ก้าวหน้า. 2,(2526) 35-40.

เอกสารการสอนชุดวิชาอาหารและโภชนาการ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช., (742-747) 2527.

Asplin,F.A. and R.B.A. Carnaghan. "The toxicity of certain groundnut meal for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens". Vet. Rec. 13 (1961) 73, 1215-1218.

Benett, J.W., F.A. Fernholz and L.S. Lee."Effect of light on aflatoxin , and sclerotia in *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*". Mycologia., 76, (1978) 104-116.

Blout, W.P. "Turley X disease". Turkey, 9, (1961) 52.

Boller, R.A. and H.W. Schroeder (1973)"Influence of *A. chevalieri* on production of aflatoxin in rice by *A. parasiticus*".

Bosund I. 1962 "The action of benzoic acid and salicylic acids on the metabolism of microorganisms". Adv. Fd. Res.11: 331-353.

Buchanan R.L. and Ayres J.C. "Effect lf sodium acetate on growth and aflatoxin production by *A. parasiticus* NRRL 2999". J Food Sci., 41, (1976) 128-132.

Buchanan R.L. and Ayres J.C. (1977) "Effect of various glycolysis and TCA intermediates on aflatoxin".J Food Saf., 1, 19-28.

Ceigler, A., S. Kadis and S.J. Ajl. "Microbial toxins Vol.6 fungal toxins". Academic Press, New York. 165 p. 1971.

Ceigler, A., E.B. Lillehoj, R.E. Peterson and H.H. Hall "Microbial detoxification of aflatoxin". Appl. Microbiol., 14, (1966) 934-939.

Clifford, J.T. and K.R. Lees "Aflatoxin : A site of aflatoxin B1 on rat liver". Biochem. J., 209, (1966) 312-313.

Clifford, J.T. and K.R. Lees (1967) "The action of aflatoxin B1 on rat liver". Biochem. J., 102, (1967) 65-75.

Coomes, T.J.. P.C. Crowther. A.J. Fevell, and B.J. Francis. 1966 "Experimental detoxification of groundnut meals containing aflatoxin". Nature. 209: 406-408.

Davis, N.D. and U.L. Diener "Some characteristics of toxigenic and nontoxigenic isolates of *A. flavus* and *A. parasiticus*". p. 1-5. 1983.

Djion, K.S. and C.W. hessettine (1979) "Use of Microbial Cultivar: Legume and Cereal products". Economic Microbial., 4, 115.

El-Gazzar, F.E., Rusul, G. and Marth, E.H. "Growth and aflatoxin production by *A. parasiticus* in the presence of sodium chloride". J Food Prot., 49, (1986):461-466.

El-Khady. I.A. and M.s. Farghaly. 1981."Inactivation aflatoxin in contaminated peanuts". Crypt.Mycol. 2: 131-136.

Fennell, D.I., R.J. Bothast, E.B. Lillehoj and R.E. Peterson "Bright greenish-yellow fluorescence and associated fungi in white corn naturally contaminated with aflatoxin". Cereal Chem,50, (1973) 404-414.

Friedman, M.A. and G.N. Wogan "Effect of aflatoxin B1 on RNA polymerase activity and incorporation of cytidine into RNA of rate nucli.". Fed Proc., 26, (1967)358.

Furia, T.E. (1976) "Handbook of Food Additives".(121) CRC Press, Claveland, Ohio, U.S.A..

Gatley, S.J. and Sherratt H.S.A. (1977) "The systhesis of hippurate from benzate and glycine by rat mitochondria, Submitochondrail locatization of kinetics".Biochem. J., 166, 39-48.

Glinsukol, T.,W. Thamavit and M, Ruchirawut. "Studies on the population of toxigenic fungi in market food and foodstuff. 1. Mycoflora contamination".

Goldblatt, " Aflatoxin: Scientific background, Control and Implication". New York : Academic press Inc. 1969.

Gosh J., Haggiblum P. (1985) "Effect of sublethal concentration of propionic acid or butyricacid on growth and aflatoxin production by *A. flavus* " Interm of J Food Microbiol., 2, 323-330.

Gupta, S.K., K.K. Maggon and T.A. Venkitasubramanian "Effect of Zinc on adenine nucleotide pools in relation to aflatoxin biosynthesis in *A. parasiticus* ". Appl. Environ. Microbiol., 32, (1976) 753-756.

Hartley, R.D., B.F. Nesbitt and J.O. Kelly "Toxic metabolite of *A. flavus*". Nature., 198.(1963) 1056.

Joffee, A.Z. and N. Lisker "Effect of light, temperature and pH value on aflatoxin production in vitro". Appl. Micrabiol., 18, (1969) 517-518.

Jone, R.K., H.E. Duncan, G.A. Payne and K.J. Leonard "Factors influencing infection by *A. flavus* in silk inoculated corn". Plant Dis., 64, (1980) 859-863.

Kurtzman, C.P., B.W. Horn and C.W. Hesseltine " *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *A. flavus* and *A. tamarii*". Antonie Van Leeuwenhoek, 53(3) (1987) 147-158.

Landers, K.E., N.D. Davis and U.L. Diener. " Influence of atmospheric gases on growth sporulation and production of free fatty acids and aflatoxin by *A. flavus* in peanuts". Phytopathology, 57(1967) 1086-1090.

Lillehoj, E.B. "Effect of environmental and cultural factors on aflatoxin contamination of developing corn kernels". 27-34, 1983.

Lillehoj, E.B., W.J. Garcia and M. Lambrow. "*A. flavus* infection and aflatoxin production in corn : influence of trace elements". Appl. Microbiol., 28 (1974) 739-767.

Lillehoj, E.B., W.F. Kwolek, W.D. Guthrie, D. Barry, W.W. McMillian and N.W. Widstrom "Aflatoxin accumulation in preharvest maize kernels : Interaction of three fungi species, European corn borer and two hybrids". Plant Soil., 65 (1982) 95-102.

Lillehoj, E.B. (1980) "Aflatoxin contamination of preharvest corn : Role of *A. flavus* inoculum and insect damage". Cereal Chem., 57, 255-257.

Lopez, L.C. and C.M. Christensen. "Effect of moisture content and temperature in invasion of stored corn by *A. flavus*". Phytopath., 57 (1967) 588-590.

Mabrouk, S.S., El-Shayeb,N.M.A., El-Refai,A.H.,Sallam,L.A.R.and Hamdy,A.A. (1985)"Inhibitory activities of some marine algae on aflatoxin accumulation". Appled and Environmental Microbiology. 22, 152-155.

Maggon. K.K., S.K. Gupta and T.A. Venkitasubramanian (1977) "Biosynthesis of aflatoxins". Bacteriol. Rev., 41 (1977) 822-855.

Masri, M.S., H.L.E. Vix. and L.A. Golbatt (1969) "Process for detoxifying substances contaminated with aflatoxin". U.S. patent 3, 427,709 (Feb. 25).

Norrred. W.P. 1979 "Effect of ammonia on the toxicity of corn artifycially contaminated with aflatoxin B1".Toxicol. Appl. Pharmacol. 51: 411-416.

Rambo, G.M., J.Tuite and R.W. Calwel "*A. flavus* and aflatoxin in preharvest corn from indiana in 1971 and 1972 ". Cereal chem., 51 (1974):600-604.

Read, T.V., L.Viswanathan and T.A. venkitasubramanian (1971) "High aflatoxin production on a chemically defined medium". Appl. Microbial., 22, 393-396.

Rusul G., El-Gazzar F.E.,Marth E.H. "Groath and aflatoxin production by *A. parasiticus* in a medium containing potassium chloride and sodium". J Food Prot., 49 (1986) 880-885.

Sargeant, K. "Toxicity associated with certain samples of groundnuts". Nature, 192 (1961) 1096-1097.

Sauer, D.B. and R. Burroughs "Efficacy of various chemicals as grain mold inhibitors". 17 (1974) 557-567.

Sauer, D.B. and R. Burroughs (1980) "Fungal growth, aflatoxin production and moisture eguilibration in mixture of wet and dry corn". Phytopathology, 70, 516-521.

Shank, R.C., G.N. Wogan, J.B. Gibson and a, Nondasuta (1972) "Dietory aflatoxin and human liver cancer. II. Aflatoxin in market foods and foodstuffs of Thailand and Hong Kong". Fed. Cosmet. Toxicol.,10, 61.

Shih, C.N. and E.H. Marth "Some cultural conditions that control biosynthesis of aflatoxin by *A. parasiticus*". Appl. Microbiol., 27 (1974) 452-456.

Trione, E.J. and C.M. Leach (1969) "Light - induced sporulation and sporogenic substance in fungi". Phytopathology, 59,1077-1088.

Uraih, N.(1977) "Characterization of the mode of action of benzoic acid on aflatoxin biosynthesis by *A. flavus*". PhD thesis. Ohio State University, Columbus, Ohio, U.S.A..

Uraih N. and Chipley J.R. 1976 "Effects of various acids and salts on growth and aflatoxin production by *A. flavus*". Microbiosm, 17, 51-59.

Vandegraft E.E., Hesseltine C.W., Shotwell O.L. "Grain preservatives : Effect on aflatoxin and ochratoxin production". Cereal Chem., 52 (1975) 79-84.

Wang, H.L. and Hesseltine "Use of microbial cultures : legume and cereal products". Food Technol., 35(1) (1981) 79.

West, S., R.D. Wyatt and P.B. Hamilton "Improved yield of aflatoxin by incremental increases of tenperature". Appl. Microbiol., 25. (1973) : 1018-1019.

Wicdlow, D.T., C.W. Hessettine, O.L. Sgotwell and G.L. Adams (1980) "Interference competition and aflatoxin levels in corn". Phytopath., 70, 761-764.

Wogan, G.N. (1966)"Chemical nature and biological effect of aflatoxins". Bacteriol. Rev., 30, 460.

Wyatt, R.D., P. Thaxton and P.B. Halminton (1975) "Interaction of aflatoxicosis with heat strees". Poultry Sci., 54, (1975)

WHO,1979 "Environment health criteria in Mycotoxins". World Health Organization, Geneva.