

ผลของการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือ (Ganoderma lucidum) ต่อการเจริญและ
การสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินจากเชื้อรา Aspergillus parasiticus

EFFECT OF MYCELIAL GROWTH OF LING ZHI
MUSHROOM (Ganoderma lucidum) ON GROWTH AND AFLATOXIN
PRODUCTION OF Aspergillus parasiticus

อัสฎา อิมเอิบ
ASADA IM-ERB

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2545
ISBN 974-648-886-4

ผลของการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) ต่อการเจริญและ
การสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินจากเชื้อรา *Aspergillus parasiticus*

EFFECT OF MYCELIAL GROWTH OF LING ZHI
MUSHROOM (*Ganoderma lucidum*) ON GROWTH AND AFLATOXIN
PRODUCTION OF *Aspergillus parasiticus*

อัษฎา อิมเอิบ

ASADA IM-ERB

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 44041
วัน, เดือน, ปี 2.5 ค.ค. 2545

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2545

ISBN 974-648-886-4

**EFFECT OF MYCELIAL GROWTH OF LING ZHI
MUSHROOM (*Ganoderma lucidum*) ON GROWTH AND AFLATOXIN
PRODUCTION OF *Aspergillus parasiticus***

ASADA IM-ERB

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2002

ISBN 974-648-886-4

CORYRIGHT 2002

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือ(<i>Ganoderma lucidum</i>) ต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i>
นักศึกษา	นายอัษฎา อิ่มเอิบ
รหัสประจำตัว	40065201
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2545
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. คุณณี ธนะบริพัฒน์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ. วรารัตน์ เรืองรัตนเมธี

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) ต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) และเมล็ดข้าวฟ่าง โดยเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* เป็นระยะเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* พบว่า การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 7 วัน บนอาหาร PDA ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* สามารถยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* บนอาหาร PDA ได้ดีที่สุด ส่วนในเมล็ดข้าวฟ่างพบว่า การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ตั้งแต่ 3 วัน ขึ้นไปก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อราในเมล็ดข้าวฟ่างได้ดี จากการทดลองครั้งนี้พบว่าการยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อเห็ด *G. lucidum* เป็นการยับยั้งแบบแข่งขันการใช้สารอาหาร เนื่องจากการทดสอบผลของสารที่เชื้อเห็ด *G. lucidum* สร้างขึ้นต่อการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* บนอาหาร PDA พบว่าสารเหล่านั้นจะไปกระตุ้นการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* บนอาหาร PDA ที่เคยใช้เลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* มาก่อนเป็นระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วันจะให้ผลในการกระตุ้นการสร้างโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

Thesis title	Effect of Mycelial Growth Ling Zhi Mushroom (<i>Ganoderma lucidum</i>) on Growth and Aflatoxin Production of <i>Aspergillus parasiticus</i>
Student	Mr. Asada Im-erb
Student ID.	40065201
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2002
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Dusanee Thanaboripat
Thesis Co-advisor	Asst. Prof. Vararat Ruangrattanametee

ABSTRACT

Effect of mycelial growth of Ling Zhi mushroom (*Ganoderma lucidum*) on the growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* were studied. *G. lucidum* was grown as mycelium on PDA and sorghum seeds for 0, 1, 3, 5 and 7 days before co-inoculation with *A. parasiticus*. When *G. lucidum* was grown on PDA for 7 days before growing *A. parasiticus*, it was found that no colonial growth of *A. parasiticus* was observed. When growing *G. lucidum* as mycelium on sorghum seeds for 3 days or more before inoculating spores of *A. parasiticus*, the results showed that aflatoxin production was inhibited. The inhibition of fungal growth and aflatoxin production was due to microbial growth competition. The substances produced by *G. lucidum* did not inhibit fungal growth, it rather stimulated the growth of *A. parasiticus*. When *A. parasiticus* was grown on PDA which was grown with *G. lucidum* for 1, 3, 5 and 7 days, the results showed that the growth of *A. parasiticus* was significantly stimulated.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ดี ด้วยคำแนะนำและคำปรึกษาจาก
รศ.ดร. ดุษณี ฐานะบริพัทธ์ และ ผศ. วรารัตน์ เรืองรัตนเมธี ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุม
วิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่าน และขอกราบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ. ณัฐดา วิโรจน์แสงอรุณ รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต และ
รศ.ดร. นवलพรรณ ณ ระนอง ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา ชี้แนวทาง รวมทั้งให้
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง นักศึกษาทุกคนที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำ คุณณิชนน ปานทอง ที่คอยให้
กำลังใจ และที่ละเลยมิได้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ที่ได้สนับสนุนการศึกษา
และให้กำลังใจตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบแต่ผู้มีพระคุณ
ทุกท่าน

อัญญา อัมเอิบ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญรูป.....	X
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
1.3 ขอบเขตการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 ประวัติของสารพิษอะฟลาทอกซิน.....	3
2.2 เชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน.....	3
2.3 ชนิดและคุณสมบัติของสารพิษอะฟลาทอกซิน.....	5
2.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซิน.....	7
2.4.1 ชนิดของเชื้อรา.....	7
2.4.2 ความชื้น.....	7
2.4.3 อุณหภูมิ.....	7
2.4.4 ปริมาณออกซิเจนและคาร์บอน ไดออกไซด์.....	8
2.4.5 ธาตุอาหารชนิดต่าง ๆ.....	8
2.4.6 แหล่งคาร์บอน.....	8
2.4.7 แหล่งไนโตรเจน.....	9
2.4.8 แกลีอแร์.....	9
2.4.9 ปฏิกริยาระหว่างจุลินทรีย์.....	9
2.4.9.1 เชื้อรา.....	10
2.4.9.2 แบคทีเรีย.....	11

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.9.3 ยีสต์.....	13
2.4.10 ปัจจัยอื่น ๆ.....	14
2.5 เห็ดหลินจือ (<i>Ganoderma lucidum</i>).....	14
2.5.1 คุณลักษณะของเห็ดหลินจือ.....	14
2.5.2 ส่วนประกอบของเห็ดหลินจือ.....	16
2.5.2.1 หมวกของดอกเห็ด.....	16
2.5.2.2 รูปร่างสร้างสปอร์.....	16
2.5.2.3 สปอร์ของเห็ดหลินจือ.....	18
2.5.2.4 ก้านของดอกเห็ด.....	18
2.5.2.5 ฐานก้านดอก.....	18
2.5.3 ระบบเส้นใย.....	18
2.5.3.1 เส้นใยเกิดใหม่.....	18
2.5.3.2 เส้นใยที่แก่.....	19
2.5.3.3 เส้นใยที่รวมตัวกัน.....	19
2.5.4 องค์ประกอบทางเคมีของเห็ดหลินจือ.....	19
2.5.5 สารออกฤทธิ์ในเห็ดหลินจือ.....	20
2.5.5.1 สารไตรเทอร์พีนอยด์ชนิดขม (Titter Triterpenoid).....	20
2.5.5.2 พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide).....	21
2.5.5.3 สเตอรอยด์ (Steroids).....	21
2.5.5.4 กลุ่มสารนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide).....	22
2.5.5.5 สารประกอบเจอร์มาเนียม (Germanium).....	22
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย.....	23
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	23
3.2 อุปกรณ์และสารเคมี.....	23
3.3 การเตรียมเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i>	24
3.4 การเตรียมเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i>	24

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5 การทดสอบการยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> โดยเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> ในงานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA.....	25
3.6 การทดสอบการสร้างสารของเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> ในงานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA.....	25
3.7 การเตรียมสปอร์ของเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i>	26
3.8 การเตรียมข้าวฟ่าง.....	26
3.9 การหาความชื้นในเมล็ดข้าวฟ่าง.....	27
3.10 การทดสอบการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> โดยเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> ในข้าวฟ่าง.....	27
3.11 การสกัดอะฟลาทอกซิน.....	28
3.12 การวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน โดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography).....	29
3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	29
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	30
4.1 ผลการทดสอบการยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> โดยเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> ในงานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA...30	
4.2 ผลการทดสอบการสร้างของเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> ในงานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA.....	36
4.3 ผลการทดสอบการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> โดยเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> ในข้าวฟ่าง.....	38
4.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> ต่อการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา <i>A. parasiticus</i>	43
4.4.1 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของการยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อ <i>A. parasiticus</i> โดยเชื้อเห็ด <i>G. lucidum</i> ในงานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA..	43

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4.2 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของการสร้างสารของเชื้อเห็ด <i>G. lucidum</i> ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> ในงานเพาะเชื้อบน อาหาร PDA.....	46
4.4.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของ เชื้อรา <i>A. parasiticus</i> โดยเชื้อเห็ด <i>G. lucidum</i> ในข้าวฟ่าง.....	49
บทที่ 5 วิจัยรณัผลการทดลอง.....	52
บทที่ 6 สรุปลผลการทดลอง.....	56
บรรณานุกรม.....	58
ภาคผนวก ก.....	64
ภาคผนวก ข.....	70
ประวัติผู้เขียน.....	71

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> (เซนติเมตร) จำแนกตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> ร่วมกับเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> และระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อเห็ด <i>G. lucidum</i> ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา <i>A. parasiticus</i>32
4.2	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) ของเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> และเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA จนครบ 7 วัน.....34
4.3	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> (เซนติเมตร) จำแนกตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> ภายหลังจากลอกกระดาษ cellophane membrane ออกและระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อบนกระดาษ cellophane membrane ก่อนการเลี้ยงเชื้อรา <i>A. parasiticus</i>37
4.4	ปริมาณอะฟลาทอกซิน (ไมโครกรัมต่อกรัม) ที่เชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> สร้างขึ้นจำแนกตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> ร่วมกับเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>G. lucidum</i> ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา <i>A. parasiticus</i>40
4.5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) ของเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> บนอาหาร PDA โดยเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>G. lucidum</i> ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> ณ วันต่าง ๆ.....44
4.6	ค่าเฉลี่ยของเส้นศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> (เซนติเมตร) เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> ณ วันต่าง ๆ.....45
4.7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> เมื่อเลี้ยงเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> บนอาหาร PDA ที่เคยใช้เลี้ยงเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> มาก่อนเป็นระยะเวลาต่าง ๆ.....47
4.8	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่เคยใช้เลี้ยงเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> ณ วันต่าง ๆ.....48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณอะฟลาทอกซิน (ไมโครกรัมต่อกรัม) ที่สร้างจากเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> ในเมล็ดข้าวฟ่าง โดยเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>G. lucidum</i> ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> ณ วันต่าง ๆ.....50
4.10	ค่าเฉลี่ยของปริมาณอะฟลาทอกซิน (ไมโครกรัมต่อกรัม) ของเชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> ณ วันต่าง ๆ.....51

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะของเชื้อ <i>Aspergillus parasiticus</i>	4
2.2 สูตรโครงสร้างของอะฟลาทอกซินชนิด B ₁ , B ₂ , G ₁ และ G ₂	6
2.3 ลักษณะของดอกเห็ดหลินจือ (<i>Ganoderma lucidum</i>).....	17
2.4 ลักษณะของรูสำหรับสร้างสปอร์ของเห็ดหลินจือ.....	17
2.5 ลักษณะภายในสปอร์ของเห็ดหลินจือเมื่อผ่าตามยาว (ก) และตามขวาง (ข) ตามลำดับ....	18
4.1 ลักษณะการเจริญของเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับ เชื้อรา <i>Aspergillus parasiticus</i> ในจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน.....	33
4.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อเมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน.....	35
4.3 ปริมาณอะฟลาทอกซินทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อกรัม) ที่เชื้อรา <i>Aspergillus</i> <i>parasiticus</i> สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> ณ วันต่างๆ ในเมล็ดข้าวฟ่าง.....	41
4.4 ลักษณะการเจริญของเชื้อเห็ด <i>Ganoderma lucidum</i> เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา <i>Aspergillus</i> <i>parasiticus</i> ในเมล็ดข้าวฟ่าง เป็นเวลา 28 วัน.....	42
ก-1 เครื่อง LiChrolut® เมื่อต่อเข้ากับปั๊มสุญญากาศ.....	64
ก-2 ลักษณะของ Sep-Pak silica gel cartridge column chromatography.....	65
ก-3 ลักษณะของ LiChrolut® silica gel cartridge column chromatography.....	66
ก-4 เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศ (rotary evaporator).....	67
ก-5 คอลัมน์ HPLC ชนิด C ₁₈ reverse phase.....	68
ก-6 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	69

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่สร้างขึ้นโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, (Dvorackova. 1990) *Aspergillus tamaris* (Goto *et al.* 1990) และ *Aspergillus nomius* (Kurtzman *et al.* 1987) ซึ่งสปอร์ของเชื้อราเหล่านี้ขึ้นอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะในดิน สารพิษอะฟลาทอกซินที่สร้างขึ้นเหล่านี้ ได้แก่ อะฟลาทอกซิน B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂, B_{2a} และ G_{2a} (WHO. 1979) อะฟลาทอกซินอาจเกิดขึ้นได้ในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร ได้แก่ ข้าว ชนิดต่าง ๆ ถั่ว มันสำปะหลัง พริก หัวหอม หัวกระเทียม จนถึงอาหารสำเร็จรูป เช่น แยม เต้าหู้ และแม่เต๋ในน้ำมันพืช ซึ่งอะฟลาทอกซินอาจเกิดขึ้นได้ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะสังเกตเห็นว่าอาหารนั้นๆ ขึ้นรา (ศรีสิทธิ์. 2515) โดยทำให้เกิดพิษกับคนและสัตว์ทั้งการเกิดพิษอย่างเฉียบพลันและทำให้เกิดมะเร็ง (ธีรยุทธ และ ชัยวัฒน์. 2524) ดังนั้นอะฟลาทอกซินจึงได้รับความสนใจและศึกษากันมาก

เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) เป็นเห็ดราชนิดหนึ่งมีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศไทยทั่วทุกภาค ขึ้นเบียนต้นไม้รวมทั้งทำลายขอนไม้ และตอไม้ของพืชหลายชนิด (ราชบัณฑิตยสถาน. 2539) เป็นเห็ดที่ใช้เป็นสมุนไพรในการรักษาโรคในประเทศจีนมานาน เนื่องจากเป็นเห็ดที่มีสรรพคุณทางยาสูงสุด (สุรพล และ ชวลิต. 2539) และมีการศึกษาวิจัย รวมทั้งมีการเพาะเห็ดหลินจือขึ้นในประเทศไทย (สาริต. 2538 ก) ดังนั้นจึงมีการนำเห็ดหลินจือมาใช้ประโยชน์กันมาก โดยการนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มากมาย อาทิเช่น เห็ดหลินจือสกัดชนิดเม็ด เครื่องดื่มเห็ดหลินจือ ชาเห็ดหลินจือ เห็ดหลินจือสกัดชนิดชง และเห็ดหลินจือชนิดขึ้น เป็นต้น ซึ่งเห็ดที่นำมาใช้ในการผลิตนั้นจะต้องมาจากฟาร์มปลูกที่เชื่อถือได้ เพราะอาจมีการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินขึ้น (สาริต. 2538 ข) ซึ่งการนำเห็ดหลินจือมารับประทาน ไม่ว่าจะเป็นการต้มเอาน้ำ หรือชงด้วยน้ำร้อน ก็ไม่สามารถทำลายสารพิษชนิดนี้ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเห็ดหลินจือมีคาร์โบไฮเดรตพวกพอลิแซ็กคาไรด์ซับซ้อน ซึ่งถ้าเก็บไม่แห้งดีอาจเกิดการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ที่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ สารพิษนี้จะตกค้างอยู่ในเนื้อเห็ดนั่นเอง และนอกจากนี้ในระหว่างการเพาะปลูกเห็ดหลินจือก็มีข้อสงสัยว่าถ้าปลูกเห็ดแล้วไม่เก็บเห็ดมาจากโรงเพาะอาจมีสารพิษนี้ตกค้างอยู่ในเห็ดตั้งแต่ยังไม่เก็บเห็ดมาก็เป็นได้ (ตีพร้อม. 2539) ดังนั้นวิทยานิพนธ์เรื่องนี้จึงเป็นการศึกษาการสร้างสาร

พิษอะฟลาทอกซินในระหว่างการเพาะเลี้ยง เส้นใยของเห็ดหลินจือในอาหารแข็ง ร่วมกับเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ที่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อศึกษาผลของการเพาะเลี้ยงเส้นใยของเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) ต่อการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ในอาหารแข็ง

1.3 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับผลของการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือต่อการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา ในระดับห้องปฏิบัติการ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้ทราบผลของการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือ ที่มีต่อการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อราในอาหารแข็ง

1.4.2 สามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการศึกษาป้องกันการเจริญ และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ในกรณีที่มีการปนเปื้อน

บทที่ 2

หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติของสารพิษอะฟลาทอกซิน

สารพิษจากเชื้อราได้คุกคามต่อสุขภาพของคนและสัตว์มาเป็นเวลาช้านานแล้ว โดยเฉพาะสารพิษอะฟลาทอกซิน (aflatoxin) ซึ่งเป็นสารพิษที่ทำให้เกิดพิษอย่างเฉียบพลัน (acute toxicity) และทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogenicity) ที่ตับอีกด้วย

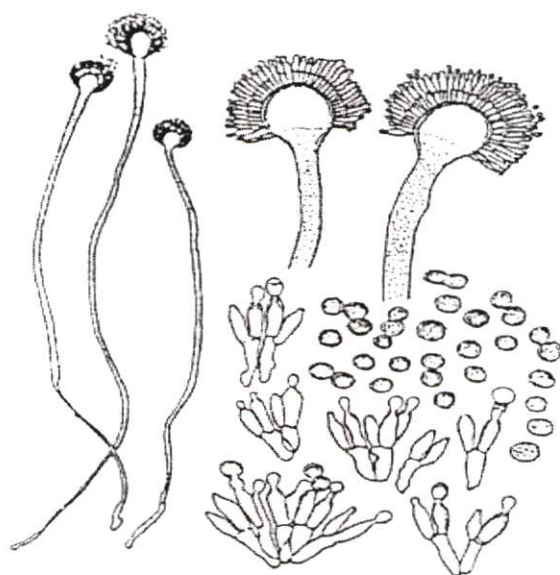
ในปี ค.ศ. 1960 ได้เกิดโรคระบาดอย่างรุนแรงแก่ฟาร์มสัตว์เลี้ยงในประเทศอังกฤษ ซึ่งเรียกว่า Turkey X disease เนื่องจากมีไก่ลงตายเป็นจำนวนมาก (Blount, 1961) และต่อมายังพบว่าทำให้เกิดพิษแก่ลูกเป็ดและลูกวัวอีกด้วย สาเหตุเนื่องจากการนำกากถั่วลิสงมาใช้เป็นส่วนผสมอาหารสัตว์ ในปีเดียวกัน Sargeant *et al.* 1961a ได้สกัด แยกและทำให้สารพิษบริสุทธิ์ จากถั่วลิสงที่ส่งมาจากประเทศบราซิลได้ Sargeant *et al.* 1961b ได้พบว่าเชื้อราชนิดหนึ่งชื่อ *Aspergillus flavus* สามารถสร้างสารพิษได้ ซึ่งเป็นสารพิษชนิดเดียวกันกับสารพิษจากถั่วลิสงที่เป็นพิษ ดังนั้นสารพิษที่ได้จากเชื้อราตัวนี้จึงเรียกว่า อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) เกิดจากการรวมค่า 3 คำเข้าด้วยกันคือ *Aspergillus* (A-) *flavus* (-fla) และ toxin

2.2 เชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

เชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้แก่เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ได้แก่ *A. flavus* ซึ่งตัวที่สำคัญ ได้แก่ *A. flavus* Link, *A. parasiticus* Spear, *A. nomius* Kurtzman, Horn และ Hesseltine (ซึ่งคาดว่าเป็นสายพันธุ์ที่กลายมาจาก *A. flavus* และ *A. tamarii* (Kurtzman *et al.* 1987)) และ *A. tamarii* (Goto *et al.* 1996) สปอร์ของเชื้อราเหล่านี้พบอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะในดิน (WHO, 1979) แม้ว่า *A. flavus* และ *A. parasiticus* จะเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ แต่ก็มีบางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้เช่น *A. flavus columnaris* ATCC 44310 ที่ใช้ในการหมักซีอิ้ว (Keanjak, 1984), *A. oryzae* และ *A. sojae* ที่ใช้ในการผลิตโคจิ (Wang และ Hesseltine, 1982) เป็นต้น

เชื้อราแต่ละสายพันธุ์จะมีการสร้างอะฟลาทอกซินแตกต่างกันทั้งในด้านชนิดและปริมาณ และพบว่าความสามารถในการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อราจะลดลงเมื่อมีการถ่ายเชื้อ (subculture) บ่อย ๆ (Torres *et al.* 1980)

เชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* จัดอยู่ใน sub-division Deuteromycotina, class Hyphomycetes (Alexopoulos *et al.* 1996) โดยโคโลนีของเชื้อราเจริญได้ดีบนอาหาร Czapeck's solution agar ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส และมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.8–5.6 เซนติเมตร เมื่ออายุ 2 สัปดาห์ ผิวหน้าของโคโลนีมี conidial head ที่มีสีเขียวปนเหลืองเกิดขึ้นอย่างหนาแน่น ได้โคโลนีของเชื้อราที่มีสีเหลืองอ่อน เมื่อนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 2.1) จะพบว่ามีการสร้าง sclerotium ที่มีสีน้ำตาลเข้มจนเกือบดำรูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดประมาณ 1.0 มิลลิเมตร ส่วนของ conidial head มีรูปร่างกลม หรืออาจแตกออกเป็นแฉกที่มีลักษณะหลวม ๆ ตั้งแต่ 2 แฉกขึ้นไป (Alexopoulos *et al.* 1996) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 300–400 ไมโครเมตร ส่วนของ conidiophore ยาวประมาณ 700–800 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10–25 ไมโครเมตร ผนังขรุขระไม่มีสี หนา 1.0 ไมโครเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางของ vesicle มีขนาด 20–60 ไมโครเมตร รูปร่างค่อนข้างกลม มี sterigma แบบ 2 ชั้น conidia มีรูปร่างกลม ผนังขรุขระสีเขียวอ่อน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5–4.5 ไมโครเมตร (อุทัยวรรณ, 2522) ส่วนการศึกษาลักษณะของเชื้อราบนอาหารสูตรธรรมชาติ เช่น corn meal agar และ malt extract agar พบว่าเชื้อรามีลักษณะอื่น ๆ ใกล้เคียงกับที่เลี้ยงบนอาหาร Czapeck's solution agar แต่ conidiophore มีความผันแปรในด้านความยาวน้อยกว่า (ชนิกา และคณะ, 2529) ซึ่งเชื้อรา *A. flavus* กับ *A. parasiticus* เมื่อตรวจดูลักษณะต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ฉะนั้นการจัดจำแนกเชื้อราทั้ง 2 ชนิดจึงต้องตรวจดูในระดับ DNA (Kurtzman *et al.* 1986)



รูปที่ 2.1 ลักษณะของเชื้อ *Aspergillus parasiticus*

ที่มา : Alexopoulos *et al.* 1996.

2.3 ชนิดและคุณสมบัติของสารพิษอะฟลาทอกซิน

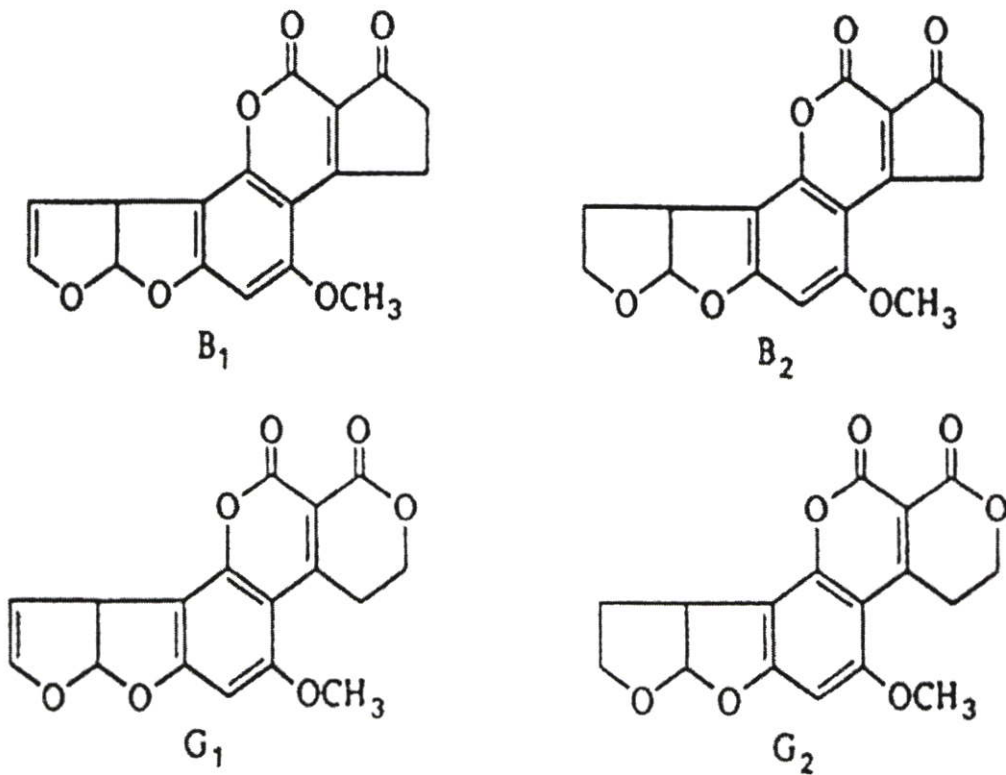
อะฟลาทอกซินเป็นสารอินทรีย์ประเภท heterocyclic compound อยู่ในกลุ่มพุกบิสฟูราโนควิมาริน (bisfuranocoumarin) ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน อะฟลาทอกซินที่พบโดยทั่วไปตามธรรมชาติจะเป็นอะฟลาทอกซิน B₁, B₂, G₁ และ G₂ แต่ก็มีอะฟลาทอกซินอีกหลายชนิดในปริมาณน้อยได้แก่ อะฟลาทอกซิน M₁, M₂, B_{2a} และ G_{2a} ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิท์ของอะฟลาทอกซิน B₁, B₂, G₁ และ G₂ ตามลำดับ อะฟลาทอกซิน M₁ และ M₂ พบมากในน้ำมันและปัสสาวะของสัตว์ที่ได้รับอะฟลาทอกซิน ส่วนอะฟลาทอกซิน B_{2a} และ G_{2a} พบได้ในอาหารทั่วไป ความรุนแรงของการเกิดพิษจะเป็นไปตามลำดับ จากมากไปหาน้อยดังนี้คือ B₁, G₁, B₂ และ G₂ (Bressac *et al.* 1991; Hsu *et al.* 1991)

การเรียกชื่อชนิดของอะฟลาทอกซินจะดูจากการเรืองแสงบนแผ่นโครมาโทกราฟีผิวบาง (Thin-layer chromatographic (TLC) plate) ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร ซึ่งคุณสมบัติข้อนี้ จะใช้ในการจัดจำแนกชนิดของอะฟลาทอกซิน โดยอะฟลาทอกซิน B₁ และ B₂ เป็นพวกที่เรืองแสงสีน้ำเงิน (blue fluorescence) ส่วนอะฟลาทอกซิน G₁ และ G₂ จะเรืองแสงสีเขียว (green fluorescence)

สูตรโครงสร้างของอะฟลาทอกซินทุกชนิด(รูปที่ 2.2)จะมีหมู่ methoxy ทั้งนั้นและแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างทางโครงสร้างเพียงเล็กน้อย คือ อะฟลาทอกซิน B₁ จะแตกต่างจาก B₂ ตรงที่มีพันธะคู่ (double bond) ที่วง (ring) ที่หนึ่ง เพราะชนิด B₁ แสดงพันธะทางเคมีที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated bond) แต่ชนิด B₂ มีพันธะทางเคมีที่อิ่มตัว (saturated bond) ชนิด B₁ จะเหมือนกับ G₁ คือจะมีพันธะคู่ในวงที่ 1 แต่จะแตกต่างกันตรงวงที่ 5 เพราะชนิด B₁ เป็น five-membered ring แต่ชนิด G₁ เป็น six-membered ring ความเหมือนและแตกต่างกันของโครงสร้างเพียงเล็กน้อยจะมีความสำคัญในการแสดงความเป็นพิษ กล่าวคือ การที่อะฟลาทอกซินมีพันธะคู่ในวงที่หนึ่งและไม่มียูนิทแลคโตน (lactone group) ในวงที่ห้า นั้นทำให้เกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันและการเกิดมะเร็งในตับเพิ่มขึ้นด้วย (ธีรบุท และ ชัยวัฒน์. 2524)

อะฟลาทอกซินมีพิษอย่างรุนแรงต่อตับของสัตว์ทุกชนิด และเป็นสารก่อมะเร็งต่อสัตว์บางชนิด อะฟลาทอกซิน B₁ มีความเป็นพิษรุนแรงที่สุด พิษของอะฟลาทอกซินต่อสัตว์ทดลองจะแปรผันไปตามชนิดของสัตว์ พันธุ์ ปริมาณ และระยะเวลาที่ได้รับ รวมทั้งอาหารหรือภาวะโภชนาการของสัตว์ด้วย การได้รับสารพิษเป็นปริมาณมากอาจมีผลทำให้สัตว์ตายได้ (lethal dose) หากลดปริมาณให้น้อยลง (sub-lethal dose) จะทำให้เกิดพิษเรื้อรัง และถ้าได้รับปริมาณต่ำ ๆ ต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลานานอาจทำให้เกิดมะเร็งได้ โดยเฉพาะมะเร็งที่ตับซึ่งเกิดขึ้นในสัตว์ทดลองหลายชนิด สัตว์ทดลองที่มีอายุน้อยเมื่อได้รับอะฟลาทอกซินจะเกิดพิษเฉียบพลันได้รวดเร็วกว่าสัตว์ที่โตเต็มวัย

อะฟลาทอกซินไม่ได้เป็นสารก่อมะเร็งปฐมภูมิแต่จัดเป็นโปรมิวตาเจน (promutagen) และโปรทอกซิน (protoxin) ก็จะต้องเกิดการเปลี่ยนแปลงในเมแทบอลิซึมเสียก่อนจึงจะเปลี่ยนเป็นสารที่มีพิษและออกฤทธิ์เป็นสารก่อกลายพันธุ์ กลไกการออกฤทธิ์ของอะฟลาทอกซินที่ทำให้เกิดมะเร็งตับ เริ่มจากอะฟลาทอกซิน B₁ สามารถเข้าไปที่นิวเคลียสของเซลล์ตับ ไปรวมกับดีเอ็นเอด้วยพันธะโควาเลนต์ และชอบจับกับดีเอ็นเอที่ไมโทคอนเดรียมากกว่าที่นิวเคลียสของเซลล์ตับ และหยุดการสร้างดีเอ็นเอ จึงทำให้การสังเคราะห์โปรตีนลดลง และทำให้เซลล์ของเนื้อเยื่อตับตาย ต่อมามีการขยายตัวของนิวเคลียสและเกิดเป็นก้อนมะเร็งที่ตับ (นิธิยา และวิบูลย์. 2543) ผลการศึกษาในสัตว์ทดลองยังพบว่าอะฟลาทอกซินสามารถทำให้เกิดมะเร็งที่ปอด ไต และลำไส้ใหญ่ แต่ตับเป็นอวัยวะเป้าหมายที่ได้รับอะฟลาทอกซินไวที่สุด และทำให้เกิดมะเร็งที่เซลล์ตับ



รูปที่ 2.2 สูตร โครงสร้างของอะฟลาทอกซินชนิด B₁, B₂, G₁ และ G₂

ที่มา: Eaton และ Groopman. 1993

2.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซิน

2.4.1 ชนิดของเชื้อรา

Aspergillus flavus เป็นเชื้อราที่สร้างเฉพาะ B₁, B₂ แต่ก็มีเชื้อ *A. flavus* บางสายพันธุ์ที่สร้างอะฟลาทอกซินไม่ได้ เช่น *A. flavus columnaris* (Keanjak. 1984) ส่วน *A. parasiticus* สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ทั้ง B₁, B₂, G₁ และ G₂ (Diener *et al.* 1987 ; Pitt. 1989) ในประเทศไทย พบว่าเชื้อ *A. flavus* จำนวน 84.6 เปอร์เซ็นต์ ที่แยกได้จากแหล่งอาหารต่าง ๆ กัน สามารถผลิตอะฟลาทอกซิน B₁ และ B₂ ได้ (ธีรยุทธ. 2529) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Glinsukon *et al.* 1976 ได้ศึกษาเชื้อราที่ขึ้นบนอาหารในประเทศไทยพบว่า จำนวนเชื้อ *A. flavus* ที่สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้มีจำนวนเฉลี่ยประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับประเทศสหรัฐอเมริกา อังกฤษ และบราซิล

2.4.2 ความชื้น

Aspergillus flavus สามารถเจริญและสร้างอะฟลาทอกซินได้บนแหล่งอาหารที่มีความชื้นสมดุลกับความชื้นสัมพัทธ์ในอาหารที่ระดับไม่ต่ำกว่า 83-85 เปอร์เซ็นต์ (Christensen และ Mirocha. 1976 ; Sauer และ Burroughs. 1980) ซึ่งสอดคล้องกับ นรสีห์. 2520 ได้รายงาน ว่า ความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา คือความชื้นสัมพัทธ์ 80-100 เปอร์เซ็นต์ รณภพ (2530) รายงานว่า เมล็ดข้าวโพดที่มีความชื้นเริ่มต้นภายในเมล็ดเท่ากับ 18.8, 21.4 และ 22.5 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราสามารถเจริญและสร้างอะฟลาทอกซินได้มากกว่า 20 พีพีบี ภายในเวลา 2 วัน และจะสร้างอะฟลาทอกซินได้สูงสุดภายในเวลา 8 วัน คือ 740, 550 และ 500 พีพีบี ตามลำดับ ในการเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* บนอาหารสังเคราะห์ที่มีการถ่ายเทอาหารที่ดีจะไม่มีจุดสูงสุดของความชื้นสัมพัทธ์ที่จะจำกัดการเจริญ แต่ในธรรมชาติการที่มีความชื้นของแหล่งอาหารที่สูงมากจะทำให้เชื้อราอื่น ๆ ยีสต์ หรือแบคทีเรีย ปรับตัวเจริญได้ดีกว่า และ/หรือสภาพไร้อากาศ (anaerobe) ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ทำให้เชื้อรา *A. flavus* เจริญได้น้อยลง (Sauer และ Tuite. 1986)

2.4.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *A. flavus* อยู่ในช่วง 29-35 องศาเซลเซียส (Marth และ Calanog. 1976) ส่วนการสร้างอะฟลาทอกซินจะอยู่ในช่วง 11-42 องศาเซลเซียส (Sorenson *et al.* 1967 ; Jarvis. 1971) โดยจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างอะฟลาทอกซิน คือ 20-35 องศาเซลเซียส (Sorenson *et al.* 1967 ; Hunter. 1969 ; Diener และ Davis. 1970) นอกจากนั้นอุณหภูมิจะมีส่วนในการกำหนดระยะเวลาในการผลิตอะฟลาทอกซินได้สูงสุด

โดยที่อุณหภูมิ 20, 24, 25 และ 30 องศาเซลเซียส จะพบปริมาณการผลิตสูงสุดในวันที่ 15, 4-7, 3-4 และ 11 วัน ตามลำดับ นอกจากนี้ อุณหภูมิยังมีผลต่ออัตราส่วนของชนิดของอะฟลาทอกซินที่สร้างขึ้นอีกด้วย (Sorenson *et al.* 1967 ; Diener และ Davis. 1970 ; Javis. 1971 ; Marth และ Calanog. 1976) นิธิยา และ วิบูลย์. 2543 รายงานว่าเชื้อรา *A. parasiticus* เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 35 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างอะฟลาทอกซินอยู่ในช่วง 24-28 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเชื้อรา *A. parasiticus* สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ดีที่สุด

2.4.4 ปริมาณออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์

การสร้างอะฟลาทอกซินในอาหารเหลวที่ได้รับการเขย่าหรือในถังหมักที่มีอัตราการกวนและถ่ายเทอากาศที่ดีจะมีปริมาณอะฟลาทอกซินที่สูง (Davis *et al.* 1966) นอกจากนี้ Landers *et al.* 1967 รายงานว่าในการเก็บรักษาเมล็ดข้าวโพดเมล็ดที่เก็บในสภาพปิด ซึ่งทำให้ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นเป็น 30-35 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจนลดลงเหลือ 0-1 เปอร์เซ็นต์ จะมีปริมาณเชื้อราเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยภายใน 12 วัน ซึ่งปริมาณของออกซิเจนที่ลดลงทำให้ปริมาณอะฟลาทอกซินลดลงด้วย แต่จะมีข้อแตกต่างคือเมื่อออกซิเจนลดลงจาก 5 เปอร์เซ็นต์เป็น 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0, 20, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ การเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินจะไม่เกิดขึ้นเลย เสาวรส. 2526 พบว่าถ้าคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นร้อยละ 20 เชื้อราจะเจริญเติบโตได้ดี แต่ความสามารถในการสร้างอะฟลาทอกซินจะลดลง 75 เปอร์เซ็นต์ และถ้าลดปริมาณออกซิเจนให้เหลือเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อราเจริญได้ดีแต่การสร้างอะฟลาทอกซินจะลดลง

2.4.5 ธาตุอาหารชนิดต่าง ๆ

การนำเชื้อรามาล้างบนอาหารชนิดต่าง ๆ กันจะทำให้ปริมาณของอะฟลาทอกซินที่ถูกสร้างขึ้นแตกต่างกันด้วย ความแตกต่างในการสังเคราะห์อะฟลาทอกซินจากเชื้อราชนิดเดียวกันบนอาหารพวกเมล็ดพืช (solid medium) หรืออาหารสังเคราะห์ (semisynthetic medium) อาจเป็นผลเนื่องมาจากธาตุอาหารที่มีอยู่ในอาหารเหล่านั้นแตกต่างกันออกไปก็ได้

2.4.6 แหล่งคาร์บอน

ธาตุอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนได้แก่น้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่นซูโครส กลูโคส ฟรักโทส ไซโลสและไรโบส (ribose) เป็นต้น (Griffin. 1993) แต่พบว่าซูโครสจะช่วยให้เชื้อราสร้างอะฟลาทอกซินได้ดีที่สุด (Lin และ Dianese. 1976)

2.4.7 แหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาถึงกระบวนการสร้างอะฟลาทอกซินโดยใช้อาหารสังเคราะห์พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่อาจนำมาใช้ได้แก่ กลีโอะแอมโมเนียมชนิดต่าง ๆ โดยกลีโอะแอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้เชื้อราสร้างอะฟลาทอกซินได้ดีกว่ากลีโอะแอมโมเนียมชนิดอื่น แต่อย่างไรก็ตามการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อราที่ใช้กลีโอะแอมโมเนียมซัลเฟตก็ยังสามารถสร้างได้น้อยกว่าเมื่อใช้ส่วนสกัดของข้าวโพด กรดเคสะมิโน(casamino acid) ส่วนสกัดของยีสต์ (yeast extract) และเพปโทน เป็นต้น (ธีรยุทธ และ ชัยวัฒน์. 2524) และยังพบว่า การเพิ่ม aspartic acid และ asparagine จะกระตุ้นให้เชื้อราสร้างอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น เนื่องจาก aspartate จะถูกใช้เป็นส่วนประกอบของ Tricarboxylic acid intermediate และเป็นตัวให้ acetate เพื่อสร้าง secondary metabolite (Reddy *et al.* 1971)

2.4.8 กลีโอะแร่

กลีโอะแร่ที่สำคัญที่ช่วยทำให้เชื้อราสร้างอะฟลาทอกซินได้ดี คือ สังกะสีไอออน (Zn^{2+}) เนื่องจากสังกะสีจะเป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์ในกระบวนการ glycolysis และกระตุ้นให้มีการสะสมของ adenine monophosphate (AMP) ซึ่ง AMP นี้ อาจเป็นสาเหตุให้มีการระงับการสังเคราะห์ไขมันแต่จะสร้างอะฟลาทอกซินขึ้นมาแทน (Gupta *et al.* 1976) ดังนั้นเมื่อปริมาณสังกะสีไอออนลดน้อยลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อราอันเนื่องมาจากสาเหตุที่มีปริมาณน้อยอยู่แล้วหรือมีอยู่มากแต่จับตัวกับสารอื่นก็จะทำให้ปริมาณของอะฟลาทอกซินลดน้อยลงไปด้วย เช่น ถั่วเหลือง ซึ่งมีปริมาณกรดไฟติก (phytic acid) อยู่สูงจึงจับตัวกับสังกะสีไอออนได้มาก จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การสร้างอะฟลาทอกซินจากเชื้อราบนถั่วเหลืองน้อยกว่าถั่วชนิดอื่น ๆ (ธีรยุทธ และ ชัยวัฒน์. 2524)

2.4.9 ปฏิกริยาระหว่างจุลินทรีย์

ในธรรมชาติ เชื้อ *A. flavus* จะเจริญร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ แบคทีเรียชนิดต่าง ๆ actinomyces และเชื้อรา เช่น *Fusarium sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger*, *Nigrospora sp.*, *Trichoderma sp.* และ *Rhizopus sp.* เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มีผลต่อการยับยั้ง หรือกระตุ้นการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* ได้ (Bothast *et al.* 1974)

2.4.9.1 เชื้อรา

การเจริญของ *A. flavus* ลดน้อยลง เมื่อมีการเจริญร่วมกับ *A. niger* และ *Rhizoctonia solani* บนเมล็ดข้าวลิสง นอกจากนี้ *A. niger*, *R. solani*, *Fusarium oxysporum* และ *Macrophomina phaseoli* สามารถทำลายอะฟลาทอกซินทั้งในลิสง และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Ashworth et al. 1965)

Rhizopus stolonifera, *R. arrhizus* และ *R. oryzae* สามารถยับยั้งการสร้างและสลายอะฟลาทอกซินที่ถูกสร้างขึ้น โดยเชื้อราทั้งสามชนิดดังกล่าวจะเปลี่ยนอะฟลาทอกซิน G_1 ไปเป็น อะฟลาทอกซิน B_2 หรือ parasiticol (Cole และ Kirksey. 1971 ; Javis. 1971) และ *R. nigricans* สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อ *A. parasiticus* ได้ (Weckbach Marth. 1977)

จากการเจริญร่วมกันระหว่างเชื้อรา *A. flavus* กับเชื้อราอื่น ๆ อีก 12 ชนิด คือ *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia lunata*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Nigrospora oryzae*, *Acremonium strictum*, *Penicillium oxalicum*, *Penicillium funiculosum*, *Trichoderma viridae* และ *Penicillium variable* ซึ่งเป็นเชื้อราที่แยกได้จากข้าวโพดในระหว่างการเก็บเกี่ยว เมื่อเลี้ยงเชื้อราเหล่านี้ลงบนเมล็ดข้าวโพดที่นึ่งมาเชื้อแล้ว พร้อมกับเชื้อ *A. flavus* พบว่าในกรณีของ *A. niger* และ *T. viridae* ไม่สามารถตรวจพบอะฟลาทอกซิน ส่วนเชื้อราอื่น ๆ ยังคงตรวจพบอะฟลาทอกซิน และเมื่อเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* หลังเชื้อราอื่น ๆ 5 วัน พบว่าเชื้อ *A. flavus* ยังคงเจริญแต่ไม่สามารถตรวจพบอะฟลาทอกซิน (Wicklow et al. 1980) โดย Horn และ Wicklow. 1983 ได้ให้เหตุผลว่าการที่เชื้อ *A. niger* ที่เจริญร่วมกับเชื้อ *A. flavus* บนเมล็ดข้าวโพด แล้วทำให้ไม่สามารถตรวจพบอะฟลาทอกซิน เนื่องมาจากเชื้อ *A. niger* ทำให้ค่าพีเอช (pH) ของเมล็ดข้าวโพดลดต่ำลงจาก 5.9 เป็น 2.8 ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการสร้างอะฟลาทอกซิน ในกรณีนี้การสร้างอะฟลาทอกซินลดลงถึง 70-96 เปอร์เซ็นต์

Wicklow et al. 1988 ได้ทดลองโดยนำเชื้อรา *Fusarium moniliforme* และ *Acremonium strictum* (ปัจจุบันเปลี่ยนชื่อเป็น *Cephalosporium acremonium*) ลงบนเมล็ดข้าวโพดในฝักที่ได้รับการผสมแล้ว 7 วัน โดยการทำแผลที่เมล็ดด้วยไม้จิ้มฟัน หลังจากนั้น 14 วัน ถ่ายเชื้อ *A. flavus* ตามลงไป พบว่าการแพร่กระจายของเชื้อ *A. flavus* จากเมล็ดที่ได้รับการปลูกเชื้อไปยังเมล็ดข้างเคียงลดต่ำลง และปริมาณอะฟลาทอกซินในเมล็ดบริเวณใกล้เคียงลดต่ำลงเช่นกัน ส่วนการเลี้ยงเชื้อ *A. flavus* พร้อมกับ *F. moniliforme* หรือพร้อมกับ *A. strictum* บนเมล็ดอายุ 21 วัน หลังได้รับการผสมเชื้อ *F. moniliforme* ยังคงลดการแพร่กระจายของเชื้อ *A. flavus* และปริมาณของอะฟลาทอกซินลงได้ แต่ในกรณีของเชื้อ *A. flavus* การแพร่กระจายและปริมาณอะฟลาทอกซินไม่ลดลง

คุยฉีและคณะ. 2539 ได้รายงานว่เชื้อรา *Rhizopus oligosporus* สามารถยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* ในระหว่างการผลิตเทมเป้ได้ โดยการเติมสปอร์ของเชื้อรา *R. oligosporus* และ *A. parasiticus* ลงไปในถั่วเหลืองนึ่งพร้อมกัน พบว่า จะไม่มีการสร้างอะฟลาทอกซินเกิดขึ้น ในขณะที่ถั่วเหลืองนึ่งที่มีการเติมสปอร์ของเชื้อรา *A. parasiticus* เพียงชนิดเดียวจะมีการสร้างอะฟลาทอกซินเกิดขึ้น

2.4.9.2 แบคทีเรีย

มีรายงานว่ *Flavobacterium auratiacum* NRRL B-184 สามารถลดความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินในผลผลิตทางการเกษตรต่าง ๆ คือ นม น้ำมันพืช ถั่วลิสง ข้าวโพด และเนยถั่วลงได้อย่างสมบูรณ์และเมื่อนำผลผลิตไปทดสอบกับลูกเป็ดไม่พบความเป็นพิษเกิดขึ้น (Ciegler *et al.* 1966)

แบคทีเรีย *Acetobacter aceti* สามารถกระตุ้นการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของ *A. parasiticus* เนื่องจาก *A. aceti* เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็น 5-ketogluconic acid และ gluconic acid ทำให้ *A. parasiticus* นำไปใช้ในการเจริญได้ง่ายขึ้น (Weckbach และ Marth. 1977)

El-Gendy และ Mart. 1981 รายงานว่าการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อ *A. parasiticus* ลดต่ำลงเมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Lactobacillus casei* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT both แต่ในกรณีของการเลี้ยงเชื้อร่วมกันกับเชื้อ *Streptococcus lactis* ในระยะแรกเชื้อ *A. parasiticus* จะใช้กรดแลคติก (lactic acid) ที่เชื้อ *S. lactis* สร้างขึ้น ทำให้ค่าพีเอชในอาหารไม่ลดต่ำลง ช่วยให้เชื้อ *S. lactis* เจริญต่อไปได้ แต่เมื่อปริมาณอะฟลาทอกซินที่เชื้อ *A. parasiticus* สร้างขึ้นถูกสะสมเพิ่มมากขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. lactis* (Wiseman และ Marth. 1981)

Flores-Galarza *et al.* 1985 รายงานการเก็บรักษาข้าวโพดที่มีความชื้นภายในเมล็ด 27 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* และ/หรือ *Propionibacterium shermanii* คลุกเมล็ด เก็บรักษาไว้ในภาชนะปิดสนิท หรือเก็บภายในบรรยากาศที่มีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์นาน 60 วัน ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส พบว่าการเจริญของเชื้อราต่าง ๆ บนเมล็ดข้าวโพดถูกยับยั้งเมื่อค่าพีเอชของเมล็ดลดต่ำลง เมล็ดข้าวโพดที่คลุกด้วย *P. shermanii* มีปริมาณของยีสต์ลดลงในระยะแรกอย่างรวดเร็ว และ *L. plantarum* เร่งให้มีการสร้างกรดในระยะแรกของการเก็บรักษา

Cuero *et al.* 1987 ได้ทดสอบปฏิกริยาระหว่าง *A. flavus* กับ *Bacillus amyloliquefaciens* บนอาหาร maize extract agar ซึ่งปรับค่า water activity (a_w) เป็น 0.90 0.95 และ 0.96 ด้วย glycerol ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าที่ a_w 0.95 และ 0.98 จุลินทรีย์ทั้งสอง ชนิดเจริญช้าลง และเมื่อเจริญมาพบกันจะมีระยะห่างระหว่างโคโลนีของเชื้อทั้งสองเล็กน้อย เมื่อนำไปทดสอบบนเมล็ดข้าวโพดที่ยังมีชีวิตและผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้รังสีแกมมา ที่ความชื้น ภายในเมล็ด 3 ระดับคือ 26 23.5 และ 20.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 25 และ 16 องศาเซลเซียส *A. flavus* ยังคงเจริญได้ตามปกติ หรือถูกยับยั้งเพียงเล็กน้อย แต่ที่ความชื้นในเมล็ด 23.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส *B. amyloliquefaciens* กระตุ้นให้ *A. flavus* เจริญได้ดี ขึ้นและการสร้างอะฟลาทอกซินถูกกระตุ้นให้มีมากขึ้นในเมล็ดข้าวโพดที่มีความชื้นในเมล็ด 26 และ 20.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 25 องศาเซลเซียส ส่วนความชื้น 23.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ 25 และ 16 องศาเซลเซียส ปริมาณอะฟลาทอกซินไม่แตกต่างกัน และความชื้น 26 เปอร์เซ็นต์ ที่ 16 องศาเซลเซียสจะกระตุ้นให้มีการสร้างอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น

Kimura และ Hirano. 1988 ได้ทดสอบความสามารถของ *Bacillus subtilis* NK-330 ซึ่งแยกได้จากดิน และ *B. subtilis* NK-C-3 ซึ่งแยกได้จากการปนเปื้อนในห้องปฏิบัติการ ในการยับยั้งการเจริญของ *A. parasiticus* NRRL 2999 และ *A. flavus* NRRL 3357 บนเมล็ดข้าวโพดที่นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ มีระดับความชื้นในเมล็ด 77-81 เปอร์เซ็นต์ ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า NK-330 และ NK-C-3 สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อราทั้งสองชนิดบนเมล็ดข้าวโพดได้ โดยในกรณีของ NK-C-3 กับ *A. flavus* เมื่อตรวจหาอะฟลาทอกซินที่ 5 7 และ 25 วัน ไม่สามารถตรวจสอบได้เลย เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวโพดที่มี *A. flavus* เพียงชนิดเดียว พบว่าสามารถตรวจสอบอะฟลาทอกซิน B_1 ได้ 480 440 และ 350 พีพีบี ตามลำดับ

Thanaboripat *et al.* 1997 ได้รายงานว่าการเชื่อม *Streptococcus lactis* สามารถลดปริมาณของอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* ในโยเกิร์ตได้ โดยเลี้ยงเชื้อ *S. lactis* ร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* และเชื้อรา *A. parasiticus* ที่เจริญในโยเกิร์ตก่อนเป็นเวลา 3 วัน พบว่าในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อร่วมกันปริมาณอะฟลาทอกซินจะลดลงจาก 108.33 เป็น 94.18 และ 31.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงเชื้อ *S. lactis* เป็นเวลา 3 วัน ก่อนเติมสปอร์ของเชื้อรา *A. parasiticus* พบว่าเชื้อรา *A. parasiticus* จะสร้างอะฟลาทอกซินเพียง 58.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการลดปริมาณอะฟลาทอกซิน B_1 ของเชื้อ *S. lactis* กับเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในโยเกิร์ต พบว่าที่อายุการเก็บ 7 วัน เชื้อ *S. lactis* สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซิน B_1 จาก 50 เป็น 33.70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซิน B_1 จาก 50 เป็น 37.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Munimbazi และ Bullerman. 1998 รายงานว่า เชื้อ *Bacillus pumilus* ที่คัดแยกได้จำนวน 6 ไอโซเลต (isolate) สามารถยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* NRRL 2999 ได้ เมื่อเลี้ยงเชื้อร่วมกันในอาหารเหลว yeast extract sucrose broth (YES)

Taylor และ Draughon. 2001 ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Nannocystic exedens* ร่วมกับเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* บนอาหาร Trypticase peptone yeast extract agar (TPYA) ในจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน พบว่า ขนาดโคโลนีของเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* มีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อ *N. exedens* สามารถเจริญเติบโตได้บนสปอร์ เส้นใยและ sclerotium ของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด

2.4.9.3 ยีสต์

Weckbach และ Marth. 1977 ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *A. parasiticus* NRRL 2999 ร่วมกับเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหาร yeast extract sucrose broth พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดพร้อมกันในอาหาร พบว่าใน 3 วันแรก ปริมาณอะฟลาทอกซินทั้งหมดจะไม่แตกต่างกัน ระหว่าง *A. parasiticus* ที่เจริญเพียงชนิดเดียว และเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* แต่วันที่ 5, 7 และ 10 วัน การเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* จะให้ปริมาณอะฟลาทอกซินรวมต่ำกว่า โดยปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่ลดต่ำลงเนื่องมากจากมีการสร้างอะฟลาทอกซิน G_1 น้อยลง แต่ B_1 ยังคงเป็นไปตามปกติ ส่วนการปลูกเชื้อ *A. parasiticus* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลัง *S. cerevisiae* 3 วัน พบว่าเชื้อ *A. parasiticus* ไม่สามารถเจริญได้เลย

Wicklow et al. 1980 รายงานว่า *Candida guilliermondii* ซึ่งเป็นยีสต์ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวโพด เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *A. flavus* (NRRL 6412) บนอาหาร malt extract agar ค่าพีเอช 6.0 พบว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็น mutual intermingling เมื่อนำไปทดสอบบนเมล็ดข้าวโพดที่ปรับความชื้นโดยนำไปแช่ในน้ำ 2 ชั่วโมง นำมาเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 30 นาที ทำแผลด้วยใบมีดขนาดเล็กฆ่าเชื้อ (ขนาดแผล 1-2 ตารางมิลลิเมตร) ปลูกเชื้อลงบนแผลโดยใช้ suspension ของ *A. flavus* ผสมรวมกับ *C. guilliermondii* บ่มไว้ 4 วันที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่า *A. flavus* ยังคงเจริญได้ และมีปริมาณอะฟลาทอกซิน B_1 เฉลี่ย 3,562 พีพีบี (773—6,046 พีพีบี) เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวโพดที่มี *A. flavus* เพียงอย่างเดียว ตรวจพบอะฟลาทอกซิน B_1 เฉลี่ย 2,861 พีพีบี (1,310-5,106 พีพีบี) แต่เมื่อปลูกเชื้อ *C. guilliermondii* ลงบนเมล็ดข้าวโพดก่อน 5 วัน ตามด้วย *A. flavus* แล้วบ่มต่อไป 8 วัน สามารถตรวจพบอะฟลาทอกซิน B_1 16 พีพีบี

Cuero *et al.* 1987 รายงานปฏิกิริยา *A. flavus* กับ *Hyphopichia burtonii* บนอาหาร maize extract agar ที่มีค่า water activity (a_w) 0.98 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดเจริญชนกันเกิดชะงักการเจริญทั้ง 2 ฝ่าย โดยมีช่องว่างขนาดเล็กเกิดขึ้น แต่ที่ 0.95 a_w อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส *A. flavus* จะยับยั้งการเจริญของ *H. burtonii* แต่ที่ 0.98 และ 0.95 a_w อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส *H. burtonii* จะเจริญตามไปบน *A. flavus* เมื่อนำไปทดสอบบนเมล็ดข้าวโพดที่ฆ่าเชื้อโดยใช้รังสีแกมมา พบว่าที่ความชื้นในเมล็ด 23.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส *H. burtonii* กระตุ้นให้ *A. flavus* เจริญได้ดีขึ้น ส่วนที่ความชื้น 26 23.5 20.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความชื้น 26 20.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส *A. flavus* เจริญตามปกติ การสร้างอะฟลาทอกซินเพิ่มมากขึ้นในทุกสภาพของการเก็บรักษา โดยเพิ่มขึ้นถึง 10 เท่าในเมล็ดที่มีความชื้น 20.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 25 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดข้าวโพดที่ปลูกเชื้อ *A. flavus* เพียงอย่างเดียว

2.4.10 ปัจจัยอื่น ๆ

ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา เช่น วัสดุที่เชื้อราขึ้น การเข้าทำลายของแมลง ปริมาณวิตามิน และแร่ธาตุ (trace element) บางชนิดและยังพบว่าเมล็ดพืชที่พื้นเวลาเก็บเกี่ยวที่เหมาะสมจะช่วยให้เกิดการสร้างอะฟลาทอกซินได้มากขึ้นด้วย

2.5 เห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*)

เห็ดหลินจือจัดเป็นเห็ดที่มีโครงสร้างคล้ายเนื้อไม้พบอยู่ทั่วไปตามต้นไม้ผุที่มีความชื้นสูงพอสมควร มักจะพบเห็นเป็นประจำในเขตร้อนชื้น มีเกิดขึ้นบ้างในเขตอากาศหนาวเย็น เช่น ทางภาคใต้ของประเทศไทย ญี่ปุ่น บริเวณระดับความสูงไม่เกิน 3,000 ฟุตของเทือกเขาหิมาลัย ป่าดงดิบของทางทวีปแอฟริกา และอเมริกา เป็นต้น จะมีเกิดขึ้นชุกชุมมากในบริเวณที่มีฝนตกชุก อุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 24-32 องศาเซลเซียส มักพบเห็ดชนิดนี้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (อานนท์, 2541)

2.5.1 คุณลักษณะของเห็ดหลินจือ

เห็ดหลินจือ (Ling zhi) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Ganoderma lucidum* และมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามภาษาเรียกของแต่ละประเทศ เช่น

ภาษาไทยเรียกได้หลายชื่อตามแต่ละท้องถิ่น เช่น เห็ดกระด้าง เห็ดหัวงู เห็ดนางกวัก เห็ดหิ้ง เห็ดหิ้งขอ เห็ดเบ็ญงูเห่า เห็ดมะพร้าว เห็ดขอน เห็ดชะแล็ก เห็ดสวรรค์พันปี เห็ดหิมะ เห็ดคอมตะ เห็ดเทพเจ้า เห็ดศักดิ์สิทธิ์ เห็ดนำโชค (สาริต. 2539 ; อานนท์. 2541)

ภาษาอังกฤษเรียกว่า Mushroom of Immortality, Good-fortune Mushroom, Monkey's seat Mushroom, Lacquered Mushroom, Divine Mushroom, Spiritual Mushroom, Tree of life Mushroom และ Holy Mushroom (สาริต. 2539)

ภาษาญี่ปุ่น เรียกชื่อเห็ดชนิดนี้แตกต่างกันไป คือ

แมนเนน ตาเกะ (Mannen-take) แปลว่า เห็ดหมื่นปี

ไซวา ตาเกะ (Saiwai-take) แปลว่า เห็ดนำโชค

ซารุนาวชิ ตาเกะ (Sarunouchitake) แปลว่า เห็ดที่นั่งถึง

Reishi-take แปลว่า เห็ดวิเศษ หรือเห็ดที่เป็นยาอายุวัฒนะ

ภาษาทิเบตเรียก โอมะชามู (Oma-shamu) (อานนท์. 2541)

ภาษาจีน เรียกชื่อเห็ดชนิดนี้ว่า หลินซี หรือหลินจือ แปลว่า สุกยอดของต้นไม้วิเศษ และได้แบ่งแยกไปตามชนิดของเห็ดอีก (สุรพล และ เซาวลิต. 2539 ; อานนท์. 2541) ได้แก่

1. ดอกสีเขียว (Green Ganoderma) เรียกว่า ชิงจือ มีรสเปรี้ยว มักพบในบริเวณที่อากาศหนาวเย็น ชาวจีนนิยมใช้ในการรักษาโรคหัวใจ บำรุงตับ สายตา ประสาท ทำให้ระบบการย่อยอาหารและระบบการขับถ่ายปกติ
2. ดอกสีแดง (Red Ganoderma) เรียกว่า ฉื่อจือ หรือตันจือ มีรสชาติขมเล็กน้อย ชาวจีนนิยมใช้เป็นยาแก้การแน่นหน้าอก เลือดคั่งค้าง บำรุงหัวใจ โรคภูมิแพ้-เรื้อรัง โรคสมองเสื่อม โรคเบาหวาน และเป็นสายพันธุ์ที่ส่วนใหญ่นิยมเพาะกันทั้งในจีน ญี่ปุ่น และประเทศไทยด้วย
3. ดอกสีเหลือง (Yellow Ganoderma) เรียกว่า หวงจือ หรือจินจือ มีรสชาติหวานจืด มีสรรพคุณในการบำรุงประสาท ม้าม และระบบขับถ่าย
4. ดอกสีขาว (White Ganoderma) เรียกว่า ไปจือ หรือวีจือ มีรสเผ็ด มีสรรพคุณในการแก้โรคเกี่ยวกับทางเดินหายใจ ปอด จมูก ทำให้หายใจคล่อง รักษาผู้ที่เป็โรคภูมิแพ้ชนิดเรื้อรัง บำรุงประสาท ป้องกันประสาทหลอน
5. ดอกสีดำ (Black Ganoderma) เรียกว่า เฮจือ หรือเสียนจือ มีรสชาติเค็มเล็กน้อยไม่ขม มีสรรพคุณในการขับน้ำคั่งค้างในร่างกาย บำรุงไต ขับปัสสาวะ ทำให้ระบบขับถ่ายเป็นปกติ บำรุงประสาท บำรุงสมอง ใช้เป็นยาล้างไต
6. ดอกสีม่วง (Dark purple Ganoderma) เรียกว่า จื่อจือ หรือมู่จือ มีรสชาติขมเล็กน้อยหรือหวาน มีสรรพคุณรักษาโรคไขข้ออักเสบ หูอักเสบ บำรุงกระดูก จิตใจ แก่โรคสีดวงทวาร

เห็ดหลินจือสามารถจำแนกได้ ดังนี้ (Alexopoulos *et al.* 1996)

Phylum	Basidiomycota
Class	Basidiomycetes
Order	Aphyllorphales
Family	Ganodermataceae
Genus	<i>Ganoderma</i>
Species	<i>lucidum</i>

2.5.2 ส่วนประกอบของเห็ดหลินจือ

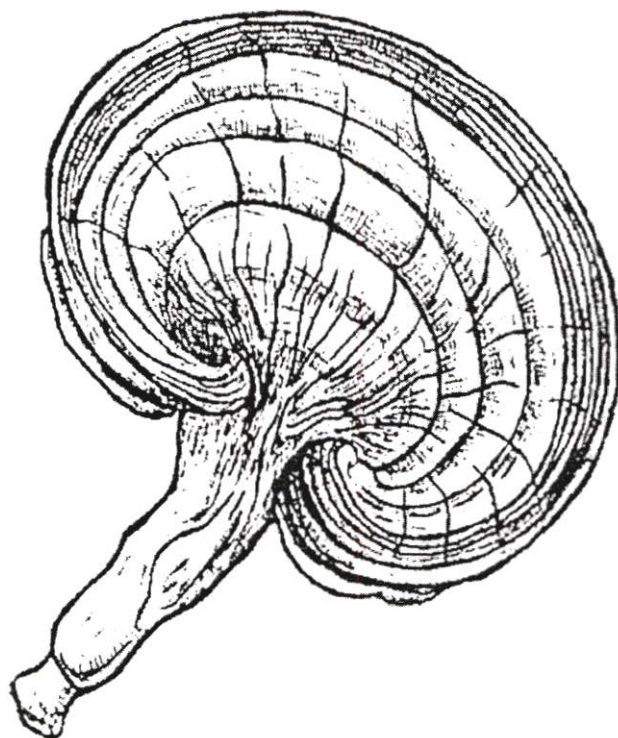
เห็ดหลินจือมีส่วนประกอบที่สำคัญ ดังนี้

2.5.2.1 หมวกของดอกเห็ด จะอยู่ส่วนบนสุดของดอกเห็ด ส่วนใหญ่จะแผ่ขนานราบไปกับพื้นดิน โดยในธรรมชาติจะเกิดปีละหน ถ้าสภาพเงื่อนไขดีไม่มีอะไรรบกวน ดอกเห็ดที่โตแล้วก็จะอยู่ในสภาพนั้น และสามารถเจริญได้อีกในในปีต่อ ๆ ไป เนื้อเห็ดคล้ายจุกไม้ก๊อก แต่บางที่อาจแข็งเหมือนไม้ ดอกมีรูปร่างคล้ายรูปไต เป็นทรงโค้ง ดังรูปที่ 2.3

ในขณะที่เริ่มเจริญเติบโต ด้านหลังดอกจะมีสีเหลืองน้ำตาล แล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงในที่สุด หรืออาจมีสีแตกต่างกันไปตามลักษณะของสายพันธุ์ เช่น สีแดง สีน้ำตาลแดง สีน้ำตาลแดงดำ สีเขียว สีเทา สีม่วง และสีเหลือง เป็นต้น สีของดอกจะเข้มขึ้น เมื่อได้รับแสงที่มีความเข้มสูง หรืออุณหภูมิต่ำที่ความชื้นต่ำพัดผ่าน

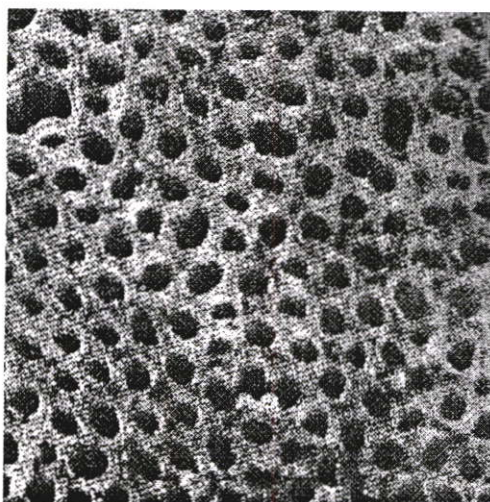
ดอกเห็ดในธรรมชาติเมื่อผ่าออก เนื้อดอกจะแบ่งเป็นสองชั้น ชั้นบนจะมีสีเข้มเหมือนเนื้อไม้ ชั้นล่างจะเป็นที่สำหรับสร้างสปอร์ จะมีสีอ่อนลง (สาธิต. 2539 ; อานนท์. 2541)

2.5.2.2 รูปร่างสร้างสปอร์ เป็นรูเล็กอยู่ใต้หมวก เมื่อดอกมีขนาดเล็กอยู่บริเวณนี้จะอัดแน่นติดอยู่ด้วยกัน มีสีแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ส่วนมากเป็น สีขาว สีเทา สีเหลือง เป็นต้น ขนาดของรูพอจะมองเห็นได้ชัดเมื่อดอกเห็ดเจริญเติบโตเต็มที่ พร้อมทั้งจะปล่อยสปอร์ออกมา ลักษณะของรูหากใช้กล้องขยายส่องดู จะมีลักษณะเป็นรูกลมเล็ก ๆ เชื่อมติดกัน มี 4-5 รูต่อมิลลิเมตร ภายในรูจะเป็นที่สร้างสปอร์ของดอกเห็ด และจะปล่อยออกมาเมื่อสปอร์แก่เต็มที่ ดังรูปที่ 2.4 (อานนท์. 2541)



รูปที่ 2.3 ลักษณะของดอกเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*)

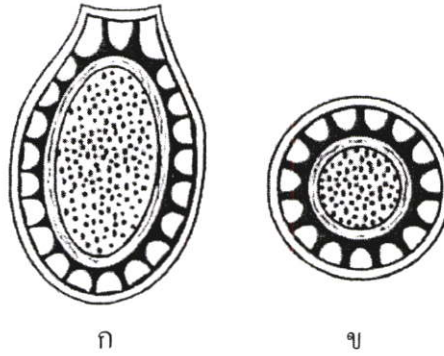
ที่มา: อานนท์. 2541



รูปที่ 2.4 ลักษณะของรูสำหรับสร้างสปอร์ของเห็ดหลินจือ

ที่มา : อานนท์. 2541

2.5.2.3 สปอร์ของเห็ดหลินจือ โดยทั่วไปมีสีน้ำตาลขนาด $6-8 \times 8.5 - 12.5$ ไมโครเมตร ปลายด้านหนึ่งตัดตรง ผิวเรียบ ผันงหนา 2 ชั้น ระหว่างชั้นมีลายหนามยอดเรียว ไปจดผนังชั้นนอก (ราชบัณฑิตยสถาน. 2539) ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ลักษณะภายในสปอร์ของเห็ดหลินจือ เมื่อผ่าตามยาว (ก) และตามขวาง (ข) ตามลำดับ
ที่มา : อานนท์. 2541

2.5.2.4 ก้านของดอกเห็ด มีหน้าที่ชูส่วนของหมวกให้อยู่สูงเหนือพื้น เป็นทางลำเลียงอาหาร เห็ดหลินจือบางชนิดมีก้านสั้น บางชนิดไม่มีก้าน บางชนิดมีขนาดบางเรียวยาวแบบมีก้าน ก้านจะมีสีน้ำตาลเข้ม หรือน้ำตาลดำ ยาว 2-10 เซนติเมตร บางครั้งอาจพบก้านอยู่ตรงกลางดอกแต่ไม่บ่ง แต่โดยทั่วไปจะอยู่เอียงไปข้างใดข้างหนึ่ง หรือติดขอบหมวก ทำให้ดอกมีรูปคล้ายไต ผิวก้านเป็นมันเงา เนื้อในมีสีน้ำตาลอ่อน (สาธิต. 2539 ; ราชบัณฑิตยสถาน. 2539 ; อานนท์. 2541)

2.5.2.5 ฐานก้านดอก เป็นจุดศูนย์รวมของเส้นใยเห็ดที่มารวมกัน เพื่อที่จะสร้างดอก เมื่อมีการพัฒนาจนกระทั่งได้ที่แล้ว จะเกิดเป็นตุ่มเล็กๆ ขึ้น แล้วชูขึ้นจากพื้นกลายเป็นก้านชูดอก ลักษณะของฐานเมื่อดอกเห็ดแก่เต็มที่ ส่วนฐานจะบานแผ่เล็กน้อย เพื่อยึดเหนี่ยวส่วนก้านให้แข็งแรงขึ้น (อานนท์. 2541)

2.5.3 ระบบเส้นใย แบ่งเป็น 3 ระยะ (สาธิต. 2539)

2.5.3.1 เส้นใยเกิดใหม่ จะมีผนังกันเซลล์บาง ๆ และแขนเชื่อมต่อเซลล์ (clamp connection) ผนังบางโปร่งใส แตกกิ่งก้านออกไป เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3.5-4.5 ไมโครเมตร อายุจะสั้นมาก

2.5.3.2 เส้นใยที่แก่ เกิดขึ้นจากการรวมตัวกันของเส้นใยที่เกิดขึ้นใหม่ จะมีสีหม่น ๆ โปร่งแสง จนสีน้ำตาลทอง ไม่มีผนังเซลล์ เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5 ไมโครเมตร จะมีกิ่งก้านแยกออกไป แต่ปลายกิ่งก้านนี้จะแคบเข้า ดูเป็นปลายแหลมเหมือนเส้น

2.5.3.3 เส้นใยที่รวมตัวกัน เป็นเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของดอกเห็ด ตรงจุดผนังของรูพวกนี้จะไม่มีสี ผนังเซลล์จะหนา มักจะโค้งงอ มีกิ่งก้านและเส้นผ่าศูนย์กลางทั่วไปประมาณ 1.5-2 ไมโครเมตร เส้นใยตรงแถบหลังหมวกดอกจะเป็นเซลล์ที่ค่อนข้างหนา ด้านหน้าจะมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 25-30 ไมโครเมตร มีผนังหนามาก อีกปลายของเซลล์จะคล้ายเป็งคกตะกอนจับอยู่ มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 7-11 ไมโครเมตร ส่วนเส้นใยที่รวมตัวกันเป็นเนื้อที่โคนดอกติดกับก้านดอก ดอกจะมีสีน้ำตาลอมเขียว โปร่งแสง เหลือง ๆ ผนังเซลล์หนา ไม่มีผนังกันเซลล์ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3.5 ไมโครเมตร เส้นใยบางส่วนจะพอมบาง แตกกิ่งก้านเหมือนกิ่งไม้ ผนังเซลล์หนา โปร่งแสง ไม่มีผนังกันเซลล์ เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-1.5 ไมโครเมตร และพบว่ามีสารสร้างคลาไมโดสปอร์ (clamydospore) ด้วยเมื่อเลี้ยงเส้นใยไว้ในอาหารและทิ้งไว้จนแก่ถึงช่วงอายุหนึ่ง สปอร์จะให้ผลลบ (negative) ต่อน้ำยาเมลเซอร์ (melzer's reagent) ให้สีน้ำตาลจางๆ ใน KOH

2.5.4 องค์ประกอบทางเคมีของเห็ดหลินจือ

ดอกเห็ดหลินจือประกอบด้วยสารเคมีมากมาย ได้มีการศึกษาถึงองค์ประกอบของสารเคมีเหล่านั้นในส่วนต่างๆ ของดอกเห็ดหลินจือดังนี้

รูปร่างสำหรับสร้างสปอร์ประกอบด้วยสารเคมีพวกคาร์โบไฮเดรต (รวมทั้งน้ำตาลรีดิวิซ์และพอลิแซคคาไรด์) กรดอะมิโน โปรตีน ไอออนของสารอนินทรีย์ (inorganic ions) สเตอรอยด์ ไตรเทอร์พีน (triterpenes) ไขมัน อัลคาลอยด์ (Alkaloids) ไกลโคไซด์ (glycoside) คูมารินไกลโคไซด์ (coumarin glycoside) น้ำมันระเหย (volatile oil) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) และ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) (Ying *et al.* 1987)

ก้านของดอกเห็ดหลินจือประกอบด้วยไอออนของสารอนินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น Mg, Ca, Zn, Mn, Fe, Cu และ Ge เป็นต้น ส่วนในหมวกของดอกเห็ดหลินจือประกอบด้วยไอออนของสารอนินทรีย์เช่นเดียวกับในก้านดอกยกเว้น Cu (Shin *et al.* 1986) สปอร์ของเห็ดหลินจือประกอบด้วยสารคลอรีน (choline) กรดเตตราโคซานอิก (tetracosanoic acid) กรดสเตียริก (stearic acid) กรดปาล์มมิก (palmitic acid) กรดโนนาดีคาโนอิก (nonadecanoic acid) กรดเบนินิก (behenic acid) เตตราโคซีน (tetracosane) เออร์โกสเตอรอล (ergosterol) และ เบต้าซิโทสเตอรอล (β - sitosterol) (Hou *et al.* 1988) นอกจากนี้ยังตรวจพบกรดไขมันชนิดไพโรฟอสฟาติก (pyrophosphatidic acid) (Sugai *et al.* 1986)

ในดอกเห็ดหลินจือยังประกอบด้วย เออร์โกสเตอรอล ฟังกอลไลโซไซม์ (fungal lysozyme) และ เอนไซม์โปรติเอส (protease) (Chang และ But. 1986) และเมื่อนำดอกเห็ดหลินจือไปสกัดในน้ำร้อนจะตรวจพบสารพอลิแซ็กคาไรด์ 51 เพอร์เซ็นต์ และ โปรตีน 5 เพอร์เซ็นต์ (Shin *et al.* 1986) และเมื่อนำส่วนของ sclerotium ไปสกัดจะพบสารพวกโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (soluble proteins) กรดอะมิโน พอลิเปปไทด์ (polypeptides) และ แซ็กคาไรด์ (Chang และ But. 1986)

ในเส้นใยของเห็ดหลินจือประกอบด้วยสารสเตอรอยด์ แลคโตน อัลคาลอยด์ และ พอลิแซ็กคาไรด์ (Chang และ But. 1986) ซึ่งเป็นสารพวกไตรเทอร์พีน (triterpenes) ซึ่งสารไตรเทอร์พีนนี้จะพบมากกว่า 100 ชนิดในส่วนของดอกเห็ดและเส้นใยของเห็ดหลินจือ (Shiao *et al.* 1994)

2.5.5 สารออกฤทธิ์ในเห็ดหลินจือ

ในดอกเห็ดหลินจือมีสารประกอบหลายชนิดที่เป็นประโยชน์แก่ร่างกายมนุษย์ จึงมีการศึกษาสารออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์แก่ร่างกาย โดยตรวจสอบโครงสร้างทางเคมี ซึ่งสารออกฤทธิ์ที่เป็นประโยชน์ในปัจจุบันพบมากกว่า 50 ชนิด และพอจำแนกได้ดังนี้ (สุรพล และ ชวลิต. 2539)

2.5.5.1 สารไตรเทอร์พีนอยด์ชนิดขม (Bitter Triterpenoid)

สารไตรเทอร์พีนอยด์ เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ใช่ไขมันแต่มีคุณสมบัติคล้ายไขมัน สารที่มีรสขมส่วนใหญ่จะอยู่ที่ดอกและก้าน

สารไตรเทอร์พีนอยด์ชนิดขม เป็นกลุ่มของสารประกอบที่แตกต่างกันประมาณ 100 ชนิด แต่ส่วนที่มีความสำคัญในการรักษาโรค คือ กรดกาโนเดอริก (ganoderlic acid A, B, C₁, C₂, D-K, R-K) และกรดลูซิเดนิค (lucidenic acid) ส่วนกรดกาโนเดอริก (ganodermic acid) ลูซิโดน (lucidone) กาโนเดอราล (ganoderal) กาโนเดอโรลล์ (ganoderols) กรดกาโนลูซิติก (ganolucidic acid) และอื่น ๆ พบไม่มากนัก กลุ่มของสารเหล่านี้โดยเฉพาะกรดกาโนเดอริกเป็นตัวยับยั้งการหลั่งของสารฮิสตามีน (histamine – release inhibition activity) ซึ่งเป็นตัวทำให้เกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้ชนิดหนึ่ง ช่วยลดความดันโลหิต (ACE-inhibitory activity) และช่วยลดไขมันในเส้นเลือด (hypercholesterolemic activity) การลดไขมันนี้ มีผลทั้งในด้านการป้องกันการอุดตันของไขมันในเส้นเลือด (antiarterogenic) และการบำบัดรักษาหลังจากเกิดการอุดตันแล้ว (antiarterosclerotic) นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ในการ

ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในตับ (cytotoxicity on hepatoma cells) และการต้านสารพิษที่มีต่อตับ (antihepatotoxic) อีกด้วย Kohda *et al.* 1985 ได้สกัดสารประกอบพวกกรดกาโนเดอริกซึ่งเป็นสารประกอบพวกไตรเทอร์พีนด้วยเมทานอลแล้วนำไปทดสอบพบว่าสามารถยับยั้งการหลั่งฮีสตามีนจาก must cells เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารบางชนิด

2.5.5.2 พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide)

พอลิแซ็กคาไรด์เป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่อาจเกาะติดกับโปรตีนหรือสารอื่น ๆ ในเห็ดหลินจือมีพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิดที่มีสรรพคุณทางยา ได้แก่ กาโนเดอแรนส์ (ganoderans A, B, C) ช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด (hypoglycemic effect) จากการเพิ่มขึ้นของอินซูลินซึ่งทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด สารเบต้าดีกลูแคน (beta-D-glucan) และพอลิแซ็กคาไรด์อีกหลายตัว มีฤทธิ์ร่วมกันในการเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนในเลือด ไช้กระดูกและในตับ ช่วยลดการอักเสบ (anti-inflammation) ช่วยกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิดบี-เซลล์ (B-cells) และทีเซลล์ (T-cells) Sone *et al.* 1985 ได้นำสารสกัดซึ่งเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเบต้าดีกลูแคนไปทดสอบกับเซลล์เนื้อเยื่อชนิด sarcoma 180 พบว่าให้ผลในการยับยั้งเนื้องอกดังกล่าวได้ Wang *et al.* 1993 ได้นำส่วนของดอกเห็ดหลินจือ สกัด แยกสารและทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสารที่สกัดได้นั้นเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ มีคุณสมบัติในการยับยั้งเนื้องอก Miyazaki และ Nishijima. 1981 ได้ศึกษาผลการยับยั้งเนื้องอกชนิด sarcoma 180 โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณขาหนีบของหนู ซึ่งเนื้องอกนี้จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นเป็นก้อน เมื่อปลูกเนื้องอกนี้แล้วจึงฉีดสารสกัดที่ได้จากส่วนของดอกเห็ดหลินจือให้แก่หนู แล้วทิ้งไว้ระยะหนึ่งจึงนำเนื้องอกนี้มาชั่งน้ำหนักเปรียบเทียบกันระหว่างหนูที่ได้รับสารสกัดกับหนูที่ไม่ได้รับสารสกัดและคำนวณหาอัตราส่วนการยับยั้งเนื้องอก พบว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเนื้องอกเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของพอลิแซ็กคาไรด์

2.5.5.3 สเตอรอยด์ (Steroids)

มีปริมาณอยู่เพียงเล็กน้อยแต่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ที่ตรวจพบในเห็ดราทั่วไปรวมทั้งเห็ดหลินจือคือ เออร์โกสเตอรอล หรือโปรวิตามินดี 2 (provitamin D₂) ส่วนที่มีเฉพาะในเห็ดหลินจือคือ กาโนสเตอโรน (ganosterone) หรือกาโนโดสเตอโรน (ganodosterone) มีฤทธิ์ในการลดพิษที่มีต่อตับ

2.5.4.4 กลุ่มสารนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide)

มีการค้นพบสารอะดีโนซีน (adenosine) ในเห็ดหลินจือ จากการทดลองพบว่าสารอะดีโนซีน มีผลในการบรรเทาปวด และมีฤทธิ์เช่นเดียวกับกัวโนซีน (guanosine) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์อีกตัวหนึ่งที่พบในเห็ดหลินจือ และยังมีสรรพคุณในการป้องกันการอุดตันจากลิ่มเลือดในเส้นเลือด (antithrombotic activity) ทำให้ช่วยลดอัตราการเกิดโรคอัมพาต อัมพฤกษ์ลงได้ นอกจากนี้ยังพบสารอาร์เอ็นเอ (RNA) ชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติคล้ายอินเตอร์เฟอรอน (interferon-like substance) ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อไวรัส (antivirus) และพบสารอัลคาลอยด์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการไหลเวียนของเลือดในหัวใจ

2.5.4.5 สารประกอบเยอรมาเนียม (Germanium)

เยอรมาเนียมเป็นธาตุแข็ง พบในโสมทั่วไป ในกระเทียมและพบมากในเห็ดหลินจือ เป็นตัวส่งเสริมการทำงานของร่างกาย สามารถรวมตัวและช่วยกำจัดสารพิษและสิ่งแปลกปลอมต่างๆ มีการใช้ร่วมกันยาแผนปัจจุบันเพื่อกำจัดพิษและอาการไม่พึงประสงค์ และยังพบว่าสามารถลดความเจ็บปวดในผู้ป่วยโรคมะเร็งได้

นอกจากสารออกฤทธิ์ที่กล่าวถึงข้างต้นแล้ว ยังมีการค้นพบองค์ประกอบอื่น ๆ อีกหลายชนิดเช่น กรดไขมันชนิดโอเลอิก (oleic acid) และสารไซโคลออกต้าซัลเฟอร์ (cyclooctasulfur) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านการหั่งของฮีสตามีน สารไกลโคโปรตีน (glycoprotein) บางชนิดมีฤทธิ์ต่อต้านความพิการของทารก มีโปรตีนที่เป็นเอนไซม์จำพวกไลโซไซม์ (lysozyme) เอนไซม์โปรติเอส ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะทำหน้าที่ย่อยสลายแบคทีเรีย มีการค้นพบสารที่สามารถระงับอาการไอ ขับเสมหะในผู้ป่วยหลอดลมเรื้อรัง สารที่ช่วยขยายหลอดลมในผู้ป่วยโรคหอบหืด สารที่ช่วยลอกฝ้า กระ และสารที่ช่วยชะลอความแก่

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1. *Aspergillus parasiticus* IMI 102566 จาก International Mycological Institute ประเทศอังกฤษ

3.1.2. *Ganoderma lucidum* L004 จาก สถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรม

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. haemocytometer
2. เข็มเขี่ยเชื้อ
3. จานเพาะเชื้อ บริษัท Pyrex
4. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHS บริษัท Olympus
5. กระดาษ cellophane membrane ร้านศึกษาภัณฑ์พาณิชย์ ถนนสุขุมวิท วัฒนา กรุงเทพฯ
6. กระดาษกรองวาทแมนเบอร์ 1 บริษัท Whatman
7. ถุงพลาสติกทนร้อน ขนาด 7x11 นิ้ว
8. คอขวดพลาสติก ร้านชมรมเห็ดสากล 2308/7 ถนนพหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ
9. หม้อนึ่งอัตโนมัติ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท TOMY
10. ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) รุ่น 13156 Pressure บริษัท Gelman Little Giant
11. กรวยแยก (separatory funnel) บริษัท Pyrex
12. ฟลาสกั๊กันกลมขนาด 250 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex
14. ฟลาสก์รูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex
15. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น BUT 123 บริษัท International Scientific Supply Co.,ltd
16. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น PG 803 บริษัท Mettler toledo
17. ชุดกรอง millipore
18. เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศ (rotary evaporator) รุ่น RE 111 บริษัท Büchi
19. เครื่อง LiChrolute® บริษัท MERCK

20. มินิคอลัมน์ LiChrolut® ชนิด Si บริษัท MERCK
21. คอลัมน์ HPLC ชนิด C₁₈ reverse phase รุ่น BDS-C₁₈ บริษัท Hypersil
22. เครื่อง HPLC รุ่น LC-6AD บริษัท Shimadzu
23. เครื่องตรวจวัด (detector) ชนิด UV spectrometric รุ่น SPD-6A บริษัท Shimadzu
24. เครื่องประมวลผล (integrator) รุ่น C-R6A บริษัท Shimadzu

สารเคมี

1. เมทานอลเกรด commercial บริษัท อาศรม จำกัด
2. เมทานอลเกรด laboratory และ HPLC บริษัท MERCK
3. คลอโรฟอร์มเกรด commercial บริษัท อาศรม จำกัด
4. คลอโรฟอร์มเกรด laboratory บริษัท MERCK
5. เฮกเซนเกรด commercial บริษัท อาศรม จำกัด
6. เฮกเซนเกรด laboratory บริษัท MERCK
7. แอมโมเนียมซัลเฟตเกรด laboratory บริษัท MERCK
8. เบนซีนเกรด laboratory บริษัท MERCK
9. กรดแอสซิติคเกรด laboratory บริษัท MERCK
10. เอทิลอีเทอร์เกรด laboratory บริษัท MERCK
11. ไคคลอโรมีเทนเกรด laboratory บริษัท MERCK
12. อะซีโตนเกรด laboratory บริษัท MERCK

3.3 การเตรียมเชื้อรา *Aspergillus parasiticus*

เตรียม semisolid suspension โดยใช้ ฟู่อง 0.2 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ 0.05 เปอร์เซ็นต์ tween 80 และ น้ำ 99.5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกันโดยใช้ความร้อน ถ่ายลงในขวดฝาเกลียวขนาดเล็ก ขวดละ 0.2 – 0.4 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นถ่ายสปอร์ของเชื้อรา *A. parasiticus* ลงใน suspension ที่เตรียมได้ ผสมให้เข้ากัน ใช้ loop ถ่าย semisolid suspension ของเชื้อราลงบนอาหาร PDA(ภาคผนวก ข) ในจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3-5 วัน ใช้เป็น stock culture

3.4 การเตรียมเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum*

นำเชื้อเห็ด *G. lucidum* จาก stock culture มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเพาะเชื้อให้มีอายุ 5 วัน สำหรับใช้เป็น stock culture

3.5 การทดสอบการยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* โดยเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* ในจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก โดยทริทเมนต์คือระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในจานเพาะเชื้อก่อนเป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน บล็อกคือระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* เป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อเห็ดจากข้อ 3.4 ย้ายไปวางบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน หลังจากนั้นใช้ cork borer เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* ในข้อ 3.3 วางลงตรงกันข้ามในแนวเส้นผ่าศูนย์กลางของจานเพาะเชื้อ ให้เชื้อทั้งสองห่างกัน 6 เซนติเมตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน โดยจะทดลองทั้งหมด 5 ซ้ำ โดยชุดควบคุมจะเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* เพียงชนิดเดียวแล้ววัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีทุกวันเป็นเวลา 7 วัน สำหรับชุดเปรียบเทียบการเจริญจะเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* และเชื้อรา *A. parasiticus* เพียงชนิดเดียวบนอาหาร PDA แล้ววัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อทั้งสองทุกวันเป็นเวลา 7 วัน

3.6 การทดสอบการสร้างสารของเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ในจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก โดยทริทเมนต์คือระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* บนกระดาษ cellophane membrane ก่อนการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* บล็อกคือระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* ภายหลังจากลอกกระดาษ cellophane membrane ออก การทดสอบนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Simon *et al.* 1988 โดยนำกระดาษ cellophane membrane มาตัดให้เป็นวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วจึงนำกระดาษ cellophane membrane ไปวางลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ในจานเพาะเชื้อ แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อเห็ดในข้อ 3.4 นำไปวางบนกระดาษ cellophane membrane โดยเลี้ยงเชื้อเห็ดก่อนเป็นระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน เมื่อครบระยะเวลาให้ลอกกระดาษ cellophane membrane ออก แล้วใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* ในข้อ 3.3 วางตรงตำแหน่งเดียวกันกับเชื้อเห็ด *G. lucidum* วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อรา *A. parasiticus* ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน สำหรับชุดเปรียบเทียบนั้นให้ทำตามวิธีการข้างต้น โดยเปลี่ยนจากการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* บนกระดาษ cellophane membrane มาเป็นการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* บน

กระดาษ cellophane membrane แทนหลังจากนั้นนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโดยใช้สูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [(D_1 - D_2) / D_1] \times 100$$

เมื่อ D_1 = ขนาดโคโลนีเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ที่เจริญบนอาหารที่มีเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* เจริญอยู่ก่อน

D_2 = ขนาดโคโลนีเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ที่เจริญบนอาหารที่มีเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* เจริญอยู่ก่อน

ซึ่งสูตรนี้คัดแปลงมาจาก Royse และ Ries. 1978

โดยชุดควบคุมจะเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* เพียงชนิดเดียวบนกระดาษ cellophane membrane ก่อนการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus*

3.7 การเตรียมสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus*

3.7.1. เชื้อเชื้อจาก stock culture ลงใน PDA slant ให้เชื้อมีการเจริญ 7 วัน

3.7.2. หลังจากนั้นนำมาถ่ายเชื้อลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร มีอาหาร PDA ประมาณ 200 มิลลิลิตร ให้มีการเจริญ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

3.7.3. ทำสารละลายสปอร์ โดยใช้ น้ำกลั่นผสม tween 80 ที่ฆ่าเชื้อแล้วเทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วใช้ loop เชี่ยสปอร์ให้หลุดออกจากอาหารให้หมด แล้วกรองสารละลายสปอร์ที่ได้ผ่านสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3.7.4. สารละลายสปอร์ที่ได้จะนำมาตรวจนับโดยใช้ haemocytometer ให้มีความเข้มข้นของสปอร์ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.7 การเตรียมข้าวฟ่าง

ใช้ข้าวฟ่างขาวพันธุ์เฮการี (จากร้านชมรมเห็ดสากล 2308/17 ถนนพหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ) โดยคัดแปลงจากวิธีของอานนท์. 2541 โดยนำข้าวฟ่างมาล้างน้ำ เพื่อเอาเมล็ดที่เสียและฝุ่นผงออกและแช่ในน้ำสะอาดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยระหว่างการแช่จะเปลี่ยนน้ำ 1 ครั้ง เมื่อแช่ได้ตามเวลาที่กำหนดจะล้างอีกรอบ ต้มข้าวฟ่างแบบไม่เช็ดน้ำ โดยต้มให้ข้าวฟ่างประมาณ 1 ใน 3 พองตัว หลังจากต้มข้าวฟ่างจนได้ที่แล้วนำมาผึ่งลมให้สะเด็ดน้ำ นำข้าวฟ่างที่ผึ่งลมแล้วมาบรรจุใส่ถุงพลาสติกขนาด 6 x 9 นิ้ว โดยใส่ข้าวฟ่างถุงละ 50 กรัม ใส่คอกขวด

รศยาง และอุดจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 45 นาที เมื่อครบเวลาในการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเอาออกมาทิ้งให้เย็นเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.9 การหาความชื้นในเมล็ดข้าวฟ่าง

ใช้ข้าวฟ่างที่เตรียมได้จากข้อ 3.8 นำมาวิเคราะห์ความชื้นโดยวิธีของ Pomeranz และ Meloan. 1994) ดังนี้

3.9.1. อบกระทั่งที่ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วนำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ทำอย่างน้อย 3 ซ้ำ จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ บันทึกค่าที่ได้ทั้งหมดไว้

3.9.2. ใส่ข้าวฟ่างลงไป 2 กรัมในแต่ละกระทง บันทึกค่าที่ชั่งข้าวฟ่างพร้อมกับกระทง แล้วนำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์

3.9.3. ชั่งน้ำหนักข้าวฟ่างและกระทงอีกครั้ง

3.9.4. วิเคราะห์หาความชื้นได้จากสูตรคำนวณดังนี้

เปอร์เซ็นต์ความชื้นที่อยู่ในข้าวฟ่าง =

$$\frac{(\text{น้ำหนักข้าวฟ่างและกระทงครั้งที่ 1}) - (\text{น้ำหนักข้าวฟ่างและกระทงครั้งที่ 2})}{\text{น้ำหนักข้าวฟ่างจริง}} \times 100$$

3.10 การทดสอบการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* โดยเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* ในข้าวฟ่าง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก โดยทริทเมนต์คือระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในข้าวฟ่างก่อนเป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน บล็อกคือระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตรเจาะเส้นใยบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อเห็ดในข้อ 3.4 นำมาใส่ข้าวฟ่างในข้อ 3.8 โดยใส่ 1 ชิ้นต่อ 1 ถุง จากนั้นใส่สารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A. parasiticus* ในข้อ 3.7 ให้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นในแต่ละตัวอย่างเป็น 10^6 สปอร์ต่อกรัมของข้าวฟ่าง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในข้าวฟ่าง โดยจะทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ สำหรับชุดควบคุมจะเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* ในข้าวฟ่างเพียงชนิดเดียวเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน แล้วนำมาตรวจวัดปริมาณอะฟลาทอกซิน

3.11 การสกัดอะฟลาทอกซิน

การสกัดอะฟลาทอกซิน โดยคัดแปลงจากวิธี Lichrolut Vacuum Manifold และวิธี Rapid Method (Seitz และ Mohr. 1974)

3.11.1 นำข้าวฟ่างที่ต้องการสกัดมา 50 กรัม ใสลงในเครื่องบด (blender) เติม เมทานอล 100 มิลลิลิตร ปั่น (blend) เป็นเวลา 1-2 นาที

3.11.2 กรองด้วยกระดาษฟิวแมนเบอร์ 1 จะได้สารละลายเมทานอลที่มีอะฟลาทอกซินละลายอยู่

3.11.3 แบ่งสารละลายเมทานอลที่มีอะฟลาทอกซินละลายอยู่มา 40 มิลลิลิตร ใสกรวยแยกเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 20 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 80 มิลลิลิตร (อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส) แล้วเติมเฮกเซน 40 มิลลิลิตร

3.11.4 เขย่าแล้วทิ้งไว้จนแยกชั้น แยกชั้นเฮกเซนออกจากสารละลายของเมทานอล และแอมโมเนียมซัลเฟต

3.11.5 เติมคลอโรฟอร์มลงในสารละลายที่เหลือจำนวน 50 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วแยกชั้นคลอโรฟอร์มออกมาทำซ้ำอีกครั้ง

3.11.6 นำสารละลายคลอโรฟอร์ม ที่มีอะฟลาทอกซินละลายอยู่ มาระเหยภายใต้สุญญากาศ โดยใช้เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศ(ภาคผนวก ก) จนแห้ง

3.11.7 เติมส่วนผสมของคลอโรฟอร์มกับเฮกเซนในอัตราส่วน 3 ต่อ 7 (3 : 7) ลงไป 10 มิลลิลิตร

3.11.8 นำสารละลายที่ได้มาผ่าน Lichrolut Column Chromatography (ภาคผนวก ก) หลังจากนั้นล้างคอลัมน์ โดยใช้ เฮกเซน 10 มิลลิลิตร แล้วใช้ส่วนผสมของเบนซีนกับกรดแอสติกในอัตราส่วน 95.5 ต่อ 4.5 (95.5 : 5) จำนวน 10 มิลลิลิตร ล้างผ่านครั้งสุดท้ายด้วยส่วนผสมของเอทิลอีเทอร์กับเฮกเซน ในอัตราส่วน 60 ต่อ 40 จำนวน 10 มิลลิลิตร

3.11.9 หลังจากนั้นชะล้างอะฟลาทอกซิน โดยใช้สารละลายไดคลอโรมีเทนกับอะซิโตนในอัตราส่วน 9 ต่อ 1 (9 : 1) จำนวน 15 มิลลิลิตร ล้างผ่านคอลัมน์

3.11.10 นำสารที่ได้ไประเหยภายใต้สุญญากาศจนแห้ง แล้วนำไปวิเคราะห์หาอะฟลาทอกซินต่อไป

3.12 การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินโดยใช้เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

นำเมทานอล 1 มิลลิลิตร ละลายอะฟลาทอกซินที่อยู่ในขวดตัวอย่างแล้วกรองผ่าน membrane filter (millipore) 0.45 ไมโครเมตร ใส่ในขวดเล็ก (vial) แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ก) ใช้ UV spectrophotometric detector SPD-6A 365 นาโนเมตร Absorbance 0.02 ใช้คอลัมน์ reverse phase C₁₈ (ภาคผนวก ก) ขนาด 4.9 × 25 เซนติเมตร flow rate ใช้ 1 มิลลิลิตรต่อนาที mobile phase ใช้อัตราส่วนของเมทานอล : น้ำ : กรดแอสซิติค เป็น 30 : 63 : 7 บันทึกลงโครมาโทแกรมของอะฟลาทอกซิน B₁ และ G₁ ประมาณนาที่ที่ 12 และ 20 แล้วใช้ data module model C-R6A Chromatopac เป็น integrator คำนวณค่าที่วัดได้ เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานโดยดูจาก peak area และ retention time

3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก เพื่อหาผลของระยะเวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* ต่อการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* (กานดา. 2530)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการทดสอบการยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* โดยเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* ในจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA

จากการศึกษาการสร้างโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ด *G. lucidum* โดยเลี้ยงเห็ด *G. lucidum* ก่อนเป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน แล้ววัดการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อร่วมกันเป็นเวลา 3 วัน เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ดที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 วันจะลดลงจาก 4.910 เซนติเมตร เป็น 4.350, 4.325, 4.205, 3.490 และ 0 เซนติเมตร ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในการเลี้ยงเชื้อร่วมกันเป็นเวลา 5 วัน เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ดที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 วันจะลดลงจาก 7.520 เซนติเมตร เป็น 5.705, 5.625, 5.230, 4.195 และ 0 เซนติเมตร ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และการเลี้ยงเชื้อร่วมกันเป็นเวลา 7 วัน เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ดที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 วันจะลดลงจาก 9.000 เซนติเมตร เป็น 6.730, 6.575, 5.800, 4.270 และ 0 เซนติเมตร ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่พบว่าการเลี้ยงเชื้อร่วมกันเป็นเวลา 1 และ 2 วัน เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ดที่ 0 วันจะลดลงจาก 2.010 และ 3.440 เซนติเมตรเป็น 1.607 และ 3.215 เซนติเมตรตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราจะเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ดที่ 1 และ 3 วันหลังจากนั้นเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราจะลดลงตามลำดับและจะลดเป็น 0 เซนติเมตรในวันที่ 7 ในทำนองเดียวกัน การเลี้ยงเชื้อร่วมกันเป็นเวลา 4 และ 6 วัน เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ดที่ 0 วันจะลดลงจาก 6.240 และ 8.880 เซนติเมตรเป็น 4.650 และ 6.210 เซนติเมตรตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังจากนั้นเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราจะเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ดที่ 1 วัน และหลังจากการเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ดที่ 1 วัน เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราจะลดลงตามลำดับและจะลดเป็น 0 เซนติเมตรในวันที่ 7

จากการทดลองข้างต้น พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* จนครบ 7 วันลักษณะการเจริญของเชื้อเห็ด *G. lucidum* โดยการเลี้ยงเชื้อเห็ดเป็นเวลา 0 และ 1 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* โคลนินของเชื้อเห็ดจะเจริญมาพบกับโคลนินของเชื้อราบริเวณกลางจานเพาะเชื้อ และเมื่อเลี้ยงเชื้อเห็ดเป็นเวลา 3 และ 5 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา โคลนินของเชื้อเห็ดจะเจริญโอบล้อมโคลนินของเชื้อรา ส่วนการเลี้ยงเชื้อเห็ด 7 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อราจะไม่พบการเจริญของเชื้อราเลย และจะไม่พบการเจริญของเชื้อราบนเส้นใยของเชื้อเห็ด ทุกระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ดร่วมกับเชื้อรา ดังรูปที่ 4.1 และจากการทดลองเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* และเชื้อรา *A. parasiticus* เพียงชนิดเดียวบนอาหาร PDA ในจานเพาะเชื้อ แล้ววัดการเจริญโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคลนินของเชื้อทั้ง 2 จนครบ 7 วัน พบว่าระยะแรกของการเลี้ยงเชื้อ เชื้อเห็ดจะเจริญอย่างช้าๆ และเมื่อถึงช่วงเวลาหนึ่งเชื้อเห็ดจะเจริญได้เร็วกว่าเชื้อรา ดังตารางที่ 4.2 พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน เส้นผ่าศูนย์กลางโคลนินของเชื้อเห็ดจะมีทั้งเพิ่มขึ้นและลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเส้นผ่าศูนย์กลางโคลนินของเชื้อราและภายหลังจาก 3 วัน เส้นผ่าศูนย์กลางโคลนินของเชื้อเห็ดจะมีขนาดใหญ่กว่าของเชื้อรา และภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อทั้งสองจนครบ 7 วัน ลักษณะการเจริญของเชื้อเห็ดจะเจริญจนล้นจานเพาะเชื้อในขณะที่เชื้อราจะเจริญเต็มจานเพาะเชื้อเท่านั้นดังรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* (เซนติเมตร) จำแนกตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* ร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* และระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>G. lucidum</i> ร่วมกับเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> (วัน)	ระยะเวลาที่เลี้ยงเชื้อเห็ด <i>G. lucidum</i> ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> (วัน)					
	ชุดควบคุม ^a	0	1	3	5	7
1	2.010	1.607	2.075	2.170	2.130	0
2	3.440	3.215	3.410	3.418	2.950	0
3	4.910	4.350	4.325	4.205	3.490	0
4	6.240	4.950	5.125	4.590	3.880	0
5	7.520	5.705	5.625	5.230	4.195	0
6	8.880	6.210	6.270	5.490	4.270	0
7	9.000	6.730	6.575	5.800	4.270	0

a ชุดควบคุม คือ การเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* เพียงชนิดเดียว

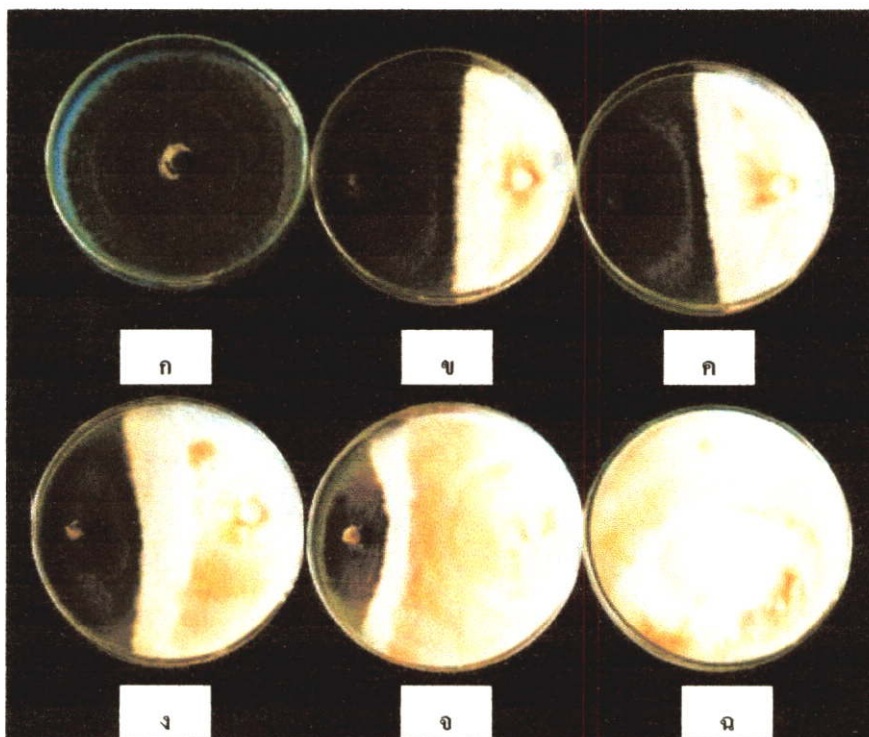
0 คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G.lucidum* พร้อมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

1 คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G.lucidum* 1 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

3 คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G.lucidum* 3 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

5 คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G.lucidum* 5 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

7 คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G.lucidum* 7 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*



รูปที่ 4.1 ลักษณะการเจริญของเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ในจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน

โดยที่ ก คือ การเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* เพียงชนิดเดียว

ข คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* พร้อมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

ค คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 1 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

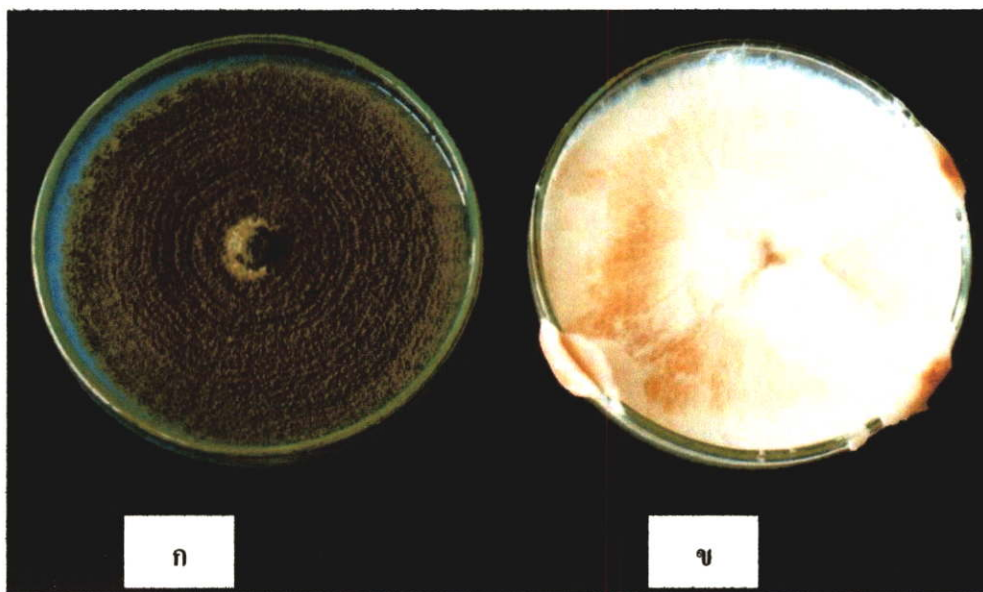
ง คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 3 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

จ คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 5 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

ฉ คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 7 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

ตารางที่ 4.2 เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) ของเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* และ เชื้อรา *Aspergillus parasiticus* เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA จนครบ 7 วัน

ระยะเวลา (วัน)	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเห็ด <i>G. lucidum</i> (เซนติเมตร)	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> (เซนติเมตร)
1	1.956	2.010
2	3.849	3.440
3	4.501	4.910
4	6.624	6.240
5	8.380	7.520
6	9.000	8.880
7	9.000	9.000



รูปที่ 4.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อเมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน
โดยที่ ก คือการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus*
ข คือการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum*

4.2 ผลการทดสอบการสร้างสารของเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ในจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA

จากการศึกษาการสร้างสารของเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* บนกระดาษ cellophane membrane ที่วางอยู่บนผิวหน้าอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดลอกกระดาษ cellophane membrane ออก แล้วเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* ลงไป และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* ทุกวันจนครบ 7 วัน โดยเปรียบเทียบกับเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่เคยใช้เลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* โดยวิธี cellophane membrane มาก่อนเป็นระยะเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วันและนำผลมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%inhibition) ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3 พบว่าในชุดควบคุมจะพบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ยกเว้นการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* เป็นเวลา 1 และ 3 วัน หลังจากลอกกระดาษ cellophane membrane ออกจะเป็นการกระตุ้นการเจริญของเชื้อรา ส่วนการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* บนอาหาร PDA ที่เคยใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดมาแล้วเป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน ส่วนใหญ่จะเป็นการกระตุ้นการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ยกเว้นการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* เป็นเวลา 1 วันหลังจากลอกกระดาษ cellophane membrane ออก บนอาหาร PDA ที่เคยใช้เลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* มาแล้ว 5 วัน จะเป็นการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus*

ตารางที่ 4.3 เส้นผ่านศูนย์กลางโคโกลีนของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* (เซนติเมตร) จำแนกตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* ภายหลังจากลอก
 กระดาษ cellophane membrane ออกและระยะเวลาในการเลี้ยงที่ขอบกระดาษ cellophane membrane ก่อนการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus*

ระยะเวลาในการเลี้ยง เชื้อรา <i>A. parasiticus</i> ภายหลังจากลอก	ระยะเวลาในการเลี้ยงที่ขอบกระดาษ cellophane membrane ก่อนการเลี้ยงเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> (วัน)														
	ชุดควบคุม			1			3			5			7		
	D ₁	D ₂	% inhibition	D ₁	D ₂	% inhibition	D ₁	D ₂	% inhibition	D ₁	D ₂	% inhibition	D ₁	D ₂	% inhibition
1	0.97	0.98	-1.030	0.90	0.95	-5.555	0.84	0.95	-13.095	0.71	0.65	8.450	0.53	0.55	-3.773
2	1.96	1.95	0.510	1.65	1.77	-7.272	1.44	1.47	-2.083	0.94	1.26	-28.723	0.82	1.07	-30.487
3	2.88	2.93	-1.736	2.35	2.67	-13.617	6.76	2.12	-20.454	1.17	1.61	-37.606	1.15	1.23	-6.956
4	3.47	3.43	1.152	2.90	3.26	-12.413	2.23	2.79	-25.112	1.14	2.05	-42.361	1.37	1.72	-25.547
5	4.01	4.15	-3.491	3.21	3.97	-23.676	2.69	3.41	-26.765	1.96	2.47	-20.647	1.53	1.83	-19.607
6	4.93	4.82	2.231	3.47	4.64	-33.717	3.02	4.07	-34.768	2.30	3.04	-32.174	1.62	1.89	-16.667
7	5.61	5.40	3.743	3.64	5.21	-43.131	3.04	4.59	-35.000	2.65	3.44	-22.965	1.73	1.96	-13.294

หมายเหตุ D₁ คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโกลีนของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่เจริญบนอาหารที่มีเชื้อรา *A. parasiticus* เจริญอยู่ก่อน

D₂ คือ เส้นผ่านศูนย์กลางโคโกลีนของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่เจริญบนอาหารที่มีเชื้อรา *G. lucidum* เจริญอยู่ก่อน

$$\% \text{ Inhibition} = [(D_1 - D_2) / D_1] \times 100$$

4.3 ผลการทดสอบการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* โดยเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* ในข้าวฟ่าง

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* ในข้าวฟ่าง โดยเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในข้าวฟ่างเป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* แล้วตรวจวัดปริมาณอะฟลาทอกซินที่เชื้อรา *A. parasiticus* สร้างขึ้นในข้าวฟ่างโดยเครื่อง HPLC ดังตารางที่ 4.4 พบว่าชนิดของอะฟลาทอกซินที่เชื้อรา *A. parasiticus* สร้างขึ้นในข้าวฟ่างเป็น B₁ และ G₁ โดยจะไม่พบการสร้างอะฟลาทอกซิน B₂ และ G₂ และพบว่าการเลี้ยงเชื้อร่วมกันในวันที่ 7 มีปริมาณอะฟลาทอกซินทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราพร้อมกับเชื้อเห็ดที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 วันเป็น 2.701, 3.356, 2.279, 0.778 และ 0 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณอะฟลาทอกซินทั้งหมดของชุดควบคุมเป็น 3.719 ไมโครกรัมต่อกรัม การเลี้ยงเชื้อร่วมกันในวันที่ 14 มีปริมาณอะฟลาทอกซินทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราพร้อมกับเชื้อเห็ดที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 วันเป็น 6.852, 5.076, 4.015, 1.382 และ 0 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณอะฟลาทอกซินทั้งหมดของชุดควบคุมเป็น 19.085 ไมโครกรัมต่อกรัม ในวันที่ 21 มีปริมาณอะฟลาทอกซินทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราพร้อมกับเชื้อเห็ดที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 วันเป็น 14.369, 9.345, 7.610, 4.674 และ 0 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณ อะฟลาทอกซินทั้งหมดของชุดควบคุมเป็น 27.044 ไมโครกรัมต่อกรัม ในวันที่ 28 มีปริมาณอะฟลาทอกซินทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราพร้อมกับเชื้อเห็ดที่ 0, 1, 3, 5 และ 7 วันเป็น 19.235, 13.715, 12.748, 7.990 และ 0 ไมโครกรัมต่อกรัมตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณอะฟลาทอกซินทั้งหมดของชุดควบคุมเป็น 36.760 ไมโครกรัมต่อกรัม

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.4 เมื่อนำมาเขียนกราฟเพื่อสังเกตรูปแบบการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในเมล็ดข้าวฟ่าง ดังรูปที่ 4.3 พบว่าการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อราในชุดควบคุมจะเพิ่มขึ้น ตั้งแต่การเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ถึง 28 วัน โดยปริมาณอะฟลาทอกซินสูงสุดในการเลี้ยงเป็นเวลา 28 วัน เท่ากับ 36.760 ไมโครกรัมต่อกรัม ส่วนปริมาณอะฟลาทอกซินในการเลี้ยงเชื้อเห็ดเป็นเวลา 0, 1, 3 และ 5 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา จะเพิ่มขึ้น ตั้งแต่การเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 7 วัน ถึง 28 วัน เช่นเดียวกับชุดควบคุม แต่จะมีปริมาณน้อยกว่าชุดควบคุม ซึ่งปริมาณอะฟลาทอกซินสูงสุด

เท่ากับ 19.235 ไมโครกรัมต่อกรัม ที่การเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 28 วันของการเลี้ยงเชื้อเห็ด 0 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา และพบว่า การเลี้ยงเชื้อเห็ด 7 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อราจะไม่พบการสร้างอะพลาทอกซินตั้งแต่วันที่ 7 ถึงวันที่ 28

จากการทดลองข้างต้น พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* จนครบ 28 วัน ลักษณะการเจริญของเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในการเลี้ยงเชื้อเห็ดเป็นเวลา 0 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา โคลนีย์ของเชื้อเห็ดจะเจริญได้เพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับเชื้อรา แต่หลังจากการเลี้ยงเชื้อเห็ด 0 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา เชื้อเห็ดจะแผ่ขยายโคลนีย์ใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ ตามลำดับ และจะเจริญจนเกือบเต็มถุงพลาสติกในการเลี้ยงเชื้อเห็ดเป็นเวลา 7 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา ดังรูปที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ปริมาณอะฟลาทอกซิน (ไมโครกรัมต่อกรัม) ที่เชื้อรา *Aspergillus parasiticus* สร้างขึ้นจาแนกตามระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* ร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ก่อนเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>G. lucidum</i> ร่วมกับเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> (วัน)	ระยะเวลาในการเลี้ยงเห็ด <i>G. lucidum</i> ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> (วัน)																
	ชุดควบคุม ¹			0			1			3			5			7	
	B ₁	G ₁	รวม	B ₁	G ₁	รวม	B ₁	G ₁	รวม	B ₁	G ₁	รวม	B ₁	G ₁	รวม	B ₁	G ₂
7	2.766	0.953	3.719	1.938	0.763	2.701	2.590	0.766	3.356	1.793	0.486	2.279	0.778	0	0.778	0	0
14	16.177	2.908	19.085	4.634	2.218	6.852	3.302	1.774	5.076	2.532	1.483	4.015	1.382	0	1.382	0	0
21	21.119	5.925	27.044	9.123	5.246	14.369	5.979	3.365	9.345	5.424	2.186	7.610	3.233	1.441	4.674	0	0
28	28.553	8.207	36.760	13.094	6.141	19.235	8.681	5.034	13.715	8.416	4.332	12.748	5.679	2.311	7.990	0	0

1 ชุดควบคุม คือ การเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* เพียงชนิดเดียว

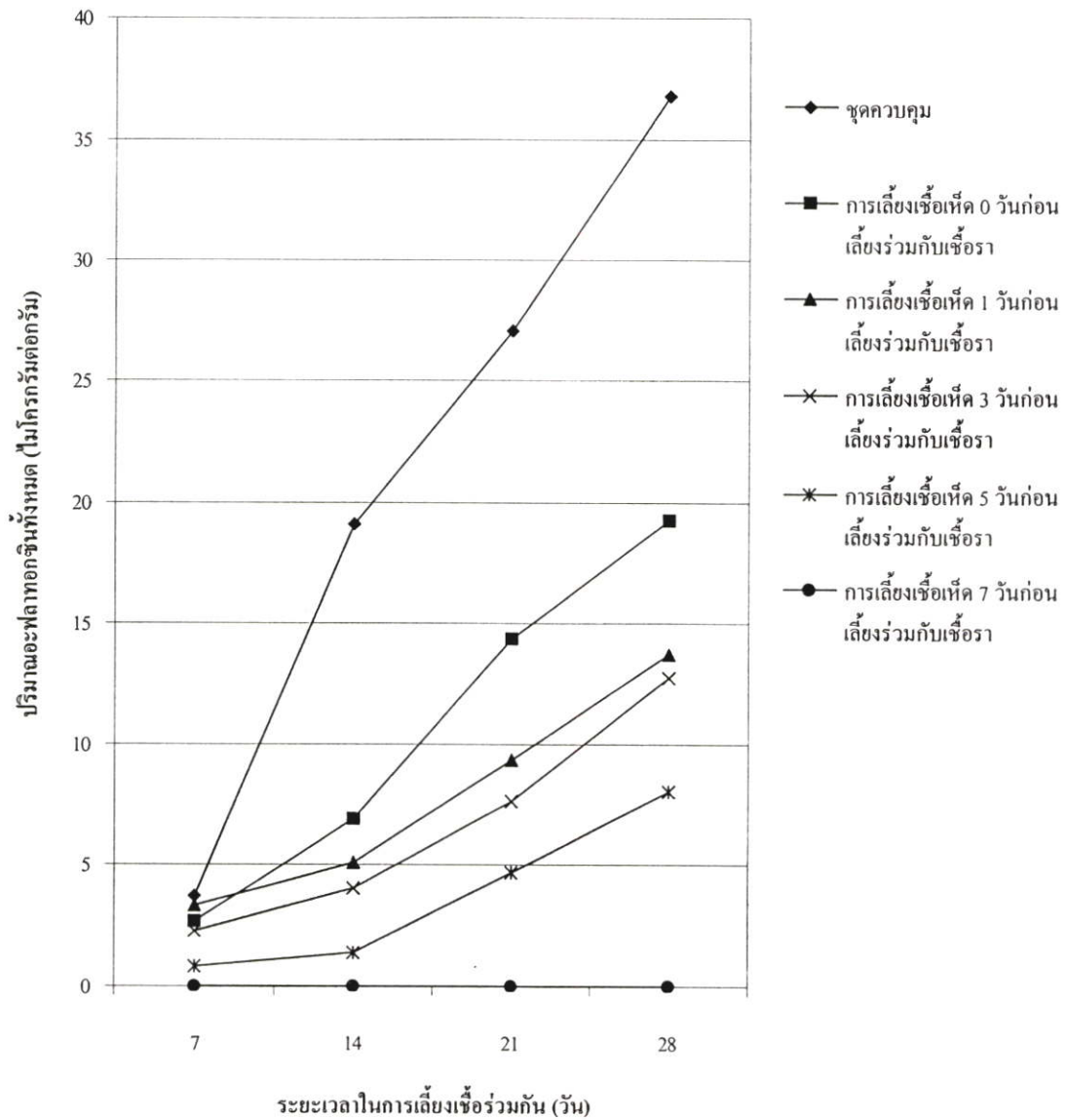
0 คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* พร้อมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

1 คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 1 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

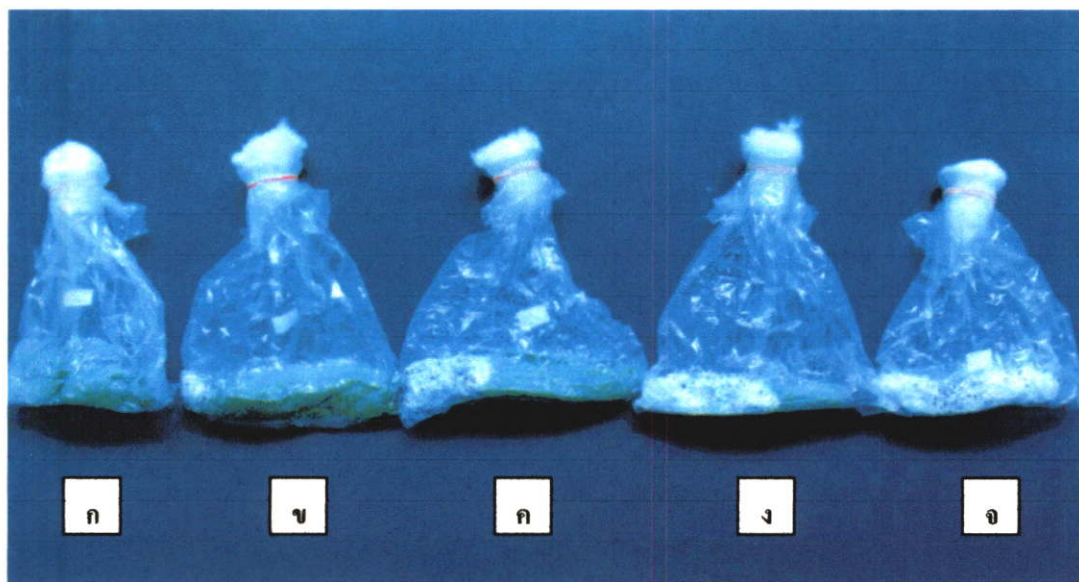
3 คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 3 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

5 คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 5 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

7 คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 7 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*



รูปที่ 4.3 ปริมาณอะฟลาทอกซินทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อกรัม) ที่เชื้อรา *Aspergillus parasiticus* สร้างขึ้น เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* ณ วันต่างๆ ในเมล็ดข้าวฟ่าง



รูปที่ 4.4 ลักษณะการเจริญของเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ในเมล็ดข้าวฟ่าง เป็นเวลา 28 วัน

โดยที่ ก คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* พร้อมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

ข คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 1 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

ค คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 3 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

ง คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 5 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

จ คือ การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 7 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

4.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ต่อการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus*

4.4.1 การวิเคราะห์ผลทางสถิติการยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.1 นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน ดังตารางที่ 4.5 พบว่า ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* มีผลต่อการยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยใช้วิธี DMRT ดังตารางที่ 4.6 พบว่า ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* ในชุดควบคุมจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ด *G. lucidum* แสดงว่าเชื้อเห็ด *G. lucidum* สามารถยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ โดยในระยะเวลา ในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 0, 1, 3 และ 5 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* จะให้ผลในการยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 7 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* จะให้ผลในการยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 0, 1, 3 และ 5 วันก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* ดังนั้นระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* ที่ดีที่สุดในการยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* คือ 7 วัน

ตารางที่ 4.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร) ของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* บนอาหาร PDA โดยเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* ณ วันต่าง ๆ

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	5	146.465748	29.292549	26.096277**
Block	6	67.007885	11.167980	
Error	30	33.674429	1.122480	
Total	41	247.148062		

Treatment คือ ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

Block คือ ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* (เซนติเมตร) เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* ณ วันต่าง ๆ

ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>G. lucidum</i> ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> (วัน)	ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> (เซนติเมตร)
7 วัน	0.000
5 วัน	3.598 ^a
3 วัน	4.413 ^a
1 วัน	4.772 ^a
0 วัน	4.681 ^a
ชุดควบคุม	5.897

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยในประชากรไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ DMRT ณ ระดับนัยสำคัญ 0.01

4.4.2 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของการสร้างสารของเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ในจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.3 นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนดังตารางที่ 4.7 พบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* บนกระดาษ cellophane membrane เป็นเวลา 0 (ชุดควบคุม), 1, 3, 5 และ 7 วันก่อนการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อนำค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยสารที่เชื้อเห็ด *G. lucidum* สร้างขึ้นมาเปรียบเทียบกันโดยใช้วิธี DMRT ดังตารางที่ 4.8 พบว่า ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* บนกระดาษ cellophane membrane เป็นเวลา 0 (ชุดควบคุม), 1, 3, 5 และ 7 วัน ก่อนการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่จากการทดลองพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมีค่าติดลบ ซึ่งหมายความว่าสารที่เชื้อเห็ด *G. lucidum* สร้างขึ้นจะไปกระตุ้นการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* จึงมีผลทำให้ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมีค่าเป็นลบ ดังนั้นในชุดควบคุมจึงพบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* แต่ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* บนกระดาษ cellophane membrane เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน ก่อนการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* จะให้ผลในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยการกระตุ้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* บนกระดาษ cellophane membrane เป็นเวลา 1 และ 3 วัน ก่อนการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* ตามลำดับ การกระตุ้นจะเพิ่มสูงสุดในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* บนกระดาษ cellophane membrane เป็นเวลา 5 วัน ก่อนการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* หลังจากนั้นการกระตุ้นจะลดลงในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* บนกระดาษ cellophane membrane เป็นเวลา 7 วัน ก่อนการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus*

ตารางที่ 4.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* บนอาหาร PDA ที่เคยใช้เลี้ยงเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* มาก่อนเป็นระยะเวลาต่าง ๆ

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	4	-2802.293824	-700.573456	-6.288061**
Block	6	-1444.005894	-240.667649	
Error	24	-2673.918596	-111.413275	
Total	34	-6920.218314		

Treatment คือ ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* บนกระดาษ cellophane membrane ก่อนการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus*

Block คือ ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* บนอาหาร PDA ที่เคยเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* มาก่อน

ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่เคยใช้เลี้ยงเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* ณ วันต่าง ๆ

ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> ภายหลังจากลอกกระดาษ cellophane membrane ออก (วัน)	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างโคโลนีของเชื้อรา <i>A. parasiticus</i>
7 วัน	-16.619 ^a
5 วัน	-25.147 ^b
3 วัน	-22.468 ^c
1 วัน	-19.912 ^d
ชุดควบคุม	0.197 ^e

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยในประชากรไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ DMRT ณ ระดับนัยสำคัญ 0.01

4.4.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติของการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา

A. parasiticus โดยเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในข้าวฟ่าง

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.4 นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนดังตารางที่ 4.9 พบว่า ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* มีผลต่อการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อนำค่าเฉลี่ยของปริมาณอะฟลาทอกซินรวมที่เชื้อรา *A. parasiticus* สร้างขึ้นมาเปรียบเทียบกันโดยใช้วิธี DMRT ดังตารางที่ 4.10 พบว่า ชุดควบคุมจะมีปริมาณอะฟลาทอกซินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กับปริมาณอะฟลาทอกซินที่เชื้อรา *A. parasiticus* สร้างขึ้นเมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ด *G. lucidum* แสดงว่าเชื้อเห็ด *G. lucidum* สามารถยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* ในข้าวฟ่าง โดยที่ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 0, 1, 3 และ 5 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* จะให้ผลในการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 3, 5 และ 7 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* จะให้ผลในการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและให้ผลในการยับยั้งได้ดีที่สุด แต่ในทางการค้า การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในข้าวฟ่าง เชื้อเห็ด *G. lucidum* จะเจริญเต็มขวดข้าวฟ่างในวันที่ 8-10 ของการเพาะเลี้ยง ก่อนจะถูกนำไปใช้ต่อก่อนขี้เลื่อย ดังนั้นระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ตั้งแต่ 3 วัน ขึ้นไปก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* จะให้ผลดี ในการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus*

ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณอะฟลาทอกซินรวม (ไมโครกรัมต่อกรัม) ที่สร้างจากเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* ในเมล็ดข้าวฟ่าง โดยเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* ณ วันต่าง ๆ

SOV	DF	SS	MS	F
Treatment	5	1108.526407	221.705281	9.473386**
Block	3	561.453202	187.151067	
Error	15	351.044396	23.402960	
Total	23	2021.024005		

Treatment คือ ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

Block คือ ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus*

ตารางที่ 4.10 ค่าเฉลี่ยของปริมาณอะฟลาทอกซินรวม(ไมโครกรัมต่อกรัม) ของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ในข้าวฟ่าง เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* ณ วันต่าง ๆ

ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด <i>G. lucidum</i> ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> (วัน)	ค่าเฉลี่ยของปริมาณอะฟลาทอกซินรวม ของเชื้อรา <i>A. parasiticus</i> (ไมโครกรัมต่อกรัม)
7 วัน	0.000 ^b
5 วัน	3.706 ^{ab}
3 วัน	6.663 ^{ab}
1 วัน	7.873 ^a
0 วัน	10.749 ^a
ชุดควบคุม	21.652

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเดียวกันแสดงว่าค่าเฉลี่ยในประชากรไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ DMRT ณ ระดับนัยสำคัญ 0.01

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาถึงผลของการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* บนอาหาร PDA โดยใช้เชื้อเห็ด *Ganoderma lucidum* พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ก่อนเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากเชื้อเห็ด *G. lucidum* สามารถเจริญและปรับตัวบนอาหาร PDA ได้เร็วกว่าเชื้อรา *A. parasiticus* เมื่อใส่เชื้อรา *A. parasiticus* ลงไป เชื้อเห็ด *G. lucidum* ซึ่งเจริญอยู่ก่อนแล้วจะแผ่ขยายโคโลนีเข้ามาใกล้กับโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* เมื่อโคโลนีของเชื้อทั้ง 2 เจริญมาชนกัน เส้นใยของเชื้อเห็ด *G. lucidum* จะโอบล้อมโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* และทำให้เชื้อรา *A. parasiticus* เจริญต่อไปไม่ได้ โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* เป็นเวลา 7 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* เส้นใยของเชื้อเห็ด *G. lucidum* จะเจริญแผ่ขยายจนเต็มจานเพาะเชื้อ ดังนั้นเมื่อใส่เชื้อรา *A. parasiticus* ลงไปจะไม่พบการเจริญของเส้นใยเกิดขึ้น เนื่องจากเส้นใยของเชื้อเห็ด *G. lucidum* ได้เจริญปกคลุมผิวหน้าอาหาร PDA ไว้ ประกอบกับลักษณะเส้นใยของเชื้อเห็ด *G. lucidum* ที่เจริญบนอาหาร PDA มีการเจริญที่แน่นและเหนียว (สาริต. 2539) ทำให้เส้นใยของเชื้อรา *A. parasiticus* ไม่สามารถเจริญทะลุเส้นใยของเชื้อเห็ด *G. lucidum* ลงไปพบอาหาร PDA ทำให้ไม่รับสารอาหาร เชื้อรา *A. parasiticus* จึงไม่สามารถเจริญได้ ซึ่งเมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* และเชื้อรา *A. parasiticus* เพียงชนิดเดียวบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อเห็ด *G. lucidum* จะเจริญจนล้นออกมาที่ขอบจานเพาะเชื้อ ส่วนเชื้อรา *A. parasiticus* จะเจริญเต็มจานเพาะเชื้อเท่านั้น แสดงว่าเชื้อเห็ด *G. lucidum* สามารถพัฒนาและปรับตัวได้ดีกว่าเชื้อรา *A. parasiticus* เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA ประกอบกับเชื้อเห็ด *G. lucidum* ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้รวดเร็วบนอาหาร PDA และเชื้อรา *A. parasiticus* จะเจริญได้ดีบนอาหาร Czapeck's solution agar มากกว่าบนอาหาร PDA (อุทัยวรรณ. 2522)

ส่วนการศึกษากการสร้างสารของเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ในจานเพาะเชื้อบนอาหาร PDA พบว่า การเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* บนอาหาร PDA ที่เคยใช้เลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* มาก่อนเป็นระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน ขนาดโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* จะมีขนาดใหญ่กว่าการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* บนอาหาร PDA ที่เคยได้เลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* มาก่อนเป็นระยะเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน ซึ่งมีผล

ทำให้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งมีค่าติดลบ (-) ซึ่งแปลว่า การสร้างสารของเชื้อเห็ด *G. lucidum* ไม่เป็นการยับยั้งการเจริญ แต่กลับเป็นการกระตุ้นการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากเส้นใยของเชื้อเห็ด *G. lucidum* ได้มีการสร้างสารชนิดต่าง ๆ ขึ้นแล้วซึมผ่านกระดาษ cellophane membrane ลงไปในอาหาร PDA โดยสารเคมีที่เชื้อเห็ด *G. lucidum* สร้างขึ้นนั้น ได้แก่ สเตอรอยด์, แลคโตน, อัลคาลอยด์ และ พอลิแซคคาไรด์ (Chang และ But. 1986) เป็นต้น โดยสารบางชนิด เชื้อรา *A. parasiticus* สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้นอกเหนือจากสารอาหารในอาหาร PDA เช่นเดียวกับรายงานของ El-Gendy (1981) ที่พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อราร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus lactis* การเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* จะเพิ่มขึ้น เนื่องจากกรดแลคติกที่เชื้อแบคทีเรีย *S. lactis* สร้างขึ้นจะทำให้ค่าพีเอชของอาหารลดต่ำลง ทำให้เชื้อรา *A. parasiticus* เจริญและสร้างอะฟลาทอกซินได้เพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่เคยใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดหรือเชื้อรามาก่อนจะมีขนาดเล็กลงเมื่ออาหาร PDA ที่ใช้นั้นเคยผ่านการเลี้ยงเชื้อมาก่อนเป็นระยะเวลาสั้น เนื่องจากสารอาหารที่อยู่ในอาหาร PDA ได้ถูกใช้ไปบางส่วนและเกิดการสะสมของสารพิษขึ้น สังเกตได้จากขนาดโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่เคยใช้เลี้ยงเชื้อมาก่อน 7 วัน จะมีขนาดเล็กกว่าโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่เจริญบนอาหาร PDA ที่เคยใช้เลี้ยงเชื้อมาก่อน 1, 3 และ 5 วัน

การศึกษาการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในข้าวฟ่าง จะพบอะฟลาทอกซินชนิด B_1 และ G_1 เท่านั้น โดยจะพบอะฟลาทอกซินชนิด G_1 มากกว่า B_1 โดยระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* จะให้ผลในการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากการแข่งขันการใช้สารอาหารของเชื้อทั้ง 2 ชนิด ซึ่งการทดลองนี้ได้เลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในข้าวฟ่างก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* ทำให้เชื้อเห็ด *G. lucidum* ปรับตัวและเพิ่มความหนาแน่นบนเมล็ดข้าวฟ่างได้มากกว่าเชื้อรา *A. parasiticus* เป็นผลทำให้เชื้อเห็ด *G. lucidum* ครอบครองพื้นที่บนเมล็ดข้าวฟ่างได้มากกว่า เชื้อรา *A. parasiticus* จึงเจริญและสร้างอะฟลาทอกซินได้น้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Aziz และ Shahin.1997 ที่ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* ในข้าวโพดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อร่วมกับเชื้อราชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อรา *A. niger* และ *Trichoderma viride* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ถึง 87 และ 66 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *A. niger* หรือ *T. viride* เป็นเวลา 72 ชั่วโมงก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. flavus* พบว่าปริมาณอะฟลาทอกซิน B_1 ในเมล็ดข้าวโพดที่ผ่านการฆ่าเชื้อจะลดลงจาก 700 พีพีบี เหลือ 160 และ 140 พีพีบี ตามลำดับ

ส่วนในเมล็ดข้าวโพดที่ไม่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจะไม่พบการสร้างอะฟลาทอกซิน B₁ เลข และ จากทดลองพบว่า การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* บนข้าวฟ่างก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* เป็นเวลา 7 วัน จะไม่พบการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา เนื่องจากเชื้อเห็ด *G. lucidum* ได้เจริญและครอบครองพื้นที่ในเมล็ดข้าวฟ่างจนเกือบเต็มถุงเมื่อใส่เชื้อรา *A. parasiticus* ลงไปจึงเหลือพื้นที่ในเมล็ดข้าวฟ่างให้เชื้อรา *A. parasiticus* เจริญได้เพียงเล็กน้อย อะฟลาทอกซินที่เชื้อรา *A. parasiticus* สร้างขึ้นจึงไม่สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hill *et al.* 1985 ที่พบว่า เมื่อสัดส่วนของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* เป็น 19 ต่อ 1 จะตรวจพบการสร้างอะฟลาทอกซิน แต่เมื่อสัดส่วนของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* เป็น 9 ต่อ 1 จะไม่พบการสร้างอะฟลาทอกซินเกิดขึ้น อีกทั้งลักษณะการเจริญของเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในเมล็ดข้าวฟ่าง มีการเจริญปกคลุมเมล็ดข้าวฟ่างจนมิดชิดและรัดตัวจนแน่น (อานนท์. 2541) ทำให้เส้นใยของเชื้อรา *A. parasiticus* ไม่สามารถเจริญแข่งขันกับเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในการครอบครองเมล็ดข้าวฟ่างได้ จึงส่งผลให้มีการสร้างอะฟลาทอกซินได้น้อยลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* ในเมล็ดข้าวฟ่างเพียงชนิดเดียว

การสร้างอะฟลาทอกซินโดยเชื้อรา *A. parasiticus* ในเมล็ดข้าวฟ่างจะน้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* ในเมล็ดข้าวโพด หรือในเมล็ดธัญพืชชนิดอื่น ๆ เนื่องจากเมล็ดข้าวฟ่างมีสารแทนนิน (tannin) เป็นส่วนประกอบ ซึ่งพบอยู่ในเมล็ดข้าวฟ่างประมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ (ประสิทธิ์. 2529) โดย Lansden (1982) รายงานว่า สารแทนนินที่สกัดได้จากผิวของเมล็ดธัญพืช จะยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ในอาหาร PDA และสามารถยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* ในอาหารเหลวได้ ในทำนองเดียวกัน Azaizch *et al.* (1990) ได้ทดลองใช้สารแทนนินผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* พบว่าการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อราจะลดต่ำลง และในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ข้าวฟ่างที่ผ่านการต้ม ผึ่งลม และ นึ่งฆ่าเชื้อมาแล้ว มีความชื้นในเมล็ดเริ่มต้น 33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อเห็ด *G. lucidum* แต่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างอะฟลาทอกซินอยู่ในช่วง 18 – 22.5 เปอร์เซ็นต์ (รณภพ. 2530; Christensen และ Mirocha. 1926; Sauer และ Burroughs. 1980) ซึ่งรูปแบบการสร้างอะฟลาทอกซินในการเลี้ยงเชื้อร่วมกันจะเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อม, ชนิดของเชื้อที่เลี้ยงร่วมกัน และระยะเวลาในการเลี้ยงร่วมกัน (Ramakrishna *et al.* 1996)

จากการทดลองครั้งนี้เห็นได้ว่าการยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* เป็นการยับยั้งแบบการแข่งขันการใช้อาหาร เนื่องจากเชื้อเห็ด *G. lucidum*

ได้เจริญบนแหล่งอาหารและพัฒนาตัวเองให้มีปริมาณมากก่อนที่จะมีการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* ลงบนแหล่งอาหารนั้น เป็นผลทำให้แหล่งอาหารที่เชื้อรา *A. parasiticus* ที่ใช้ในการเจริญเหื่อน้อยทำให้การเจริญและการสร้างอะพลาทอกซินลดน้อยตามไปด้วย และในฟาร์มเห็ดที่มีการเพาะเลี้ยงเห็ด *G. lucidum* เป็นการค้า ในขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* บนเมล็ดข้าวฟ่างในขวดแก้ว เมื่อเส้นใยเจริญจนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4-5 เซนติเมตร จะเขย่าขวดให้เชื้อเห็ด *G. lucidum* กระจายทั่วขวดเพื่อให้เชื้อเจริญทั่วเมล็ดข้าวฟ่างได้เร็วขึ้น (อานนท์, 2541) และใช้เวลาประมาณ 8-10 วัน เส้นใยจะเจริญทั่วเมล็ดข้าวฟ่าง (สาริต, 2539 , อานนท์, 2541) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้มีการเขย่าหัวเชื้อข้าวฟ่าง จึงทำให้เชื้อเห็ด *G. lucidum* เจริญและรัดตัวเองจนแน่น ทำให้เชื้อรา *A. parasiticus* ไม่สามารถแย่งอาหารจากเชื้อเห็ด *G. lucidum* ได้ และในการเพาะเห็ดเป็นการค้าจะมีการคัดเลือกหัวเชื้อข้าวฟ่างโดยลักษณะหัวเชื้อข้าวฟ่างที่ดี มีลักษณะดังนี้คือ เส้นใยของเชื้อเห็ดมีสีขาว เติบโตหนาแน่นกระจายเป็นวงกลม ปลายเส้นใยเสมอกัน เส้นใยควรเดินเต็มขวดภายในระยะเวลา 8-10 วัน และไม่มีจุลินทรีย์ชนิดอื่นปนเปื้อน (สาริต, 2539) ซึ่งเป็นการลดการปนเปื้อนจากเชื้อรา *A. parasiticus* และอะพลาทอกซินได้อีกทางหนึ่ง ถ้ามีการนำหัวเชื้อข้าวฟ่างที่มีการปนเปื้อนจากเชื้อรา *A. parasiticus* ไปใช้ต่อก่อนขึ้นเชื้อ ถ้าเชื้อรา *A. parasiticus* มีการเจริญอยู่บริเวณรอบนอกของก้อนเชื้อก็จะถูกคัดทิ้งและนำไปทำลายทันที (สาริต, 2539) แต่ถ้ามีการเจริญอยู่ภายในก้อนเชื้อจะสังเกตได้ยาก โดยถ้ามีการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* อยู่ภายในก้อนเชื้อหลายๆ จะมีผลต่อดอกเห็ดคือจะทำให้ดอกเห็ดมีลักษณะที่ไม่ดีไม่เหมาะต่อการนำไปบริโภค (สาริต, 2539) ซึ่งเป็นการเสี่ยงต่อการได้รับอะพลาทอกซินของผู้บริโภค แต่ถ้ามีการปนเปื้อนจากเชื้อรา *A. parasiticus* ภายในก้อนเชื้อเพียงเล็กน้อย เชื้อรา *A. parasiticus* จะถูกเส้นใยของเชื้อเห็ด *G. lucidum* เจริญโอบล้อมไว้ทำให้เชื้อรา *A. parasiticus* เจริญต่อไปไม่ได้ (สาริต, 2539) ซึ่งการปนเปื้อนของอะพลาทอกซินในเห็ดหลินจือ ส่วนใหญ่เกิดขึ้นภายหลังการเก็บเกี่ยวดอกเห็ด เช่น เก็บรักษาดอกเห็ดไม่ดีพอ ทำให้ดอกเห็ดขึ้นรา หรือเกิดการปนเปื้อนของเชื้อราระหว่างการนำไปบริโภค เป็นต้น ซึ่งเมื่อเกิดการปนเปื้อนโดยเชื้อราบนดอกเห็ดในระยะแรกจะสังเกตได้ยากจะทราบอีกทีเมื่อเชื้อราได้สร้างสปอร์ออกมา โดยจะเห็นเป็นฝุ่นสีเขียวออกเหลืองแฉะๆ ใต้ดอกเห็ด (สาริต, 2539) สาเหตุที่เชื้อราสามารถเจริญบนดอกเห็ดหลินจือได้เนื่องจากดอกเห็ดหลินจือได้ตายลงภายหลังจากการเก็บเกี่ยวจากก้อนเชื้อทำให้ไม่มีการผลิตสารบางชนิดที่ดอกเห็ดหลินจือสร้างขึ้นเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เชื้อราจึงสามารถเจริญบนดอกเห็ดหลินจือได้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาถึงผลของการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อเห็ด *G. lucidum* กับเชื้อรา *A. parasiticus* บนอาหาร PDA พบว่า การเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* จะมีผลต่อการสร้างโคโลนีของเชื้อรา *A. parasiticus* แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากเชื้อเห็ด *G. lucidum* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* 7 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีที่สุด จากการทดสอบถึงผลของสารที่เชื้อเห็ด *G. lucidum* สร้างขึ้นในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* พบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* บนกระดาษ cellophane membrane เป็นเวลา 0 (ชุดควบคุม), 1, 3, 5 และ 7 วัน จะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยชุดควบคุมจะให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ดี และจากการทดลองพบว่าสารที่เชื้อเห็ด *G. lucidum* สร้างขึ้นจะกระตุ้นการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยพบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* บนกระดาษ cellophane membrane เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน ก่อนการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* จะให้ผลในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* บนกระดาษ cellophane membrane เป็นเวลา 5 วัน ก่อนการเลี้ยงเชื้อรา *A. parasiticus* จะให้ผลในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ดี และจากการศึกษาการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในเมล็ดข้าวฟ่าง พบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ในเมล็ดข้าวฟ่างเป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* จะมีผลต่อการสร้างอะฟลาทอกซิน ของเชื้อรา *A. parasiticus* แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากเชื้อเห็ด *G. lucidum* สามารถยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* ได้ และพบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเห็ด *G. lucidum* ตั้งแต่ 3 วัน ขึ้นไป ก่อนการเลี้ยงร่วมกับเชื้อรา *A. parasiticus* จะให้ผลในการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินได้ดี

จากการทดลองครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการยับยั้งการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* โดยเชื้อเห็ด *G. lucidum* เป็นการยับยั้งแบบแข่งขันการใช้สารอาหาร เนื่องจากเชื้อเห็ด *G. lucidum* ได้เจริญและปรับตัวบนแหล่งอาหารก่อนการเลี้ยงเชื้อรา

A. parasiticus ทำให้มีขนาดโคโลนีที่ใหญ่กว่าจึงสามารถครอบครองแหล่งอาหารเป็นสัดส่วนที่มากกว่าเชื้อรา *A. parasiticus* มีผลทำให้เชื้อรา *A. parasiticus* เจริญและสร้างอะพลาทอกซินได้น้อยลง ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้ใช้ปริมาณข้าวฟ่างเพียง 50 กรัมเมื่อเทียบกับการเพาะเห็ด *G. lucidum* เป็นการค้ำที่ใช้ข้าวฟ่างปริมาณ 250 – 300 กรัม จึงควรมีการศึกษาในอนาคตต่อไป นอกจากนี้ควรมีการศึกษาถึงผลของสารต่างๆ ที่เชื้อเห็ด *G. lucidum* สร้างขึ้นแต่ละชนิดว่ามีผลต่อการเจริญและการสร้างอะพลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* อย่างไร รวมทั้งศึกษาผลของการเลี้ยงเชื้อร่วมกันในระดับก้อนเชื้อและควรมีการศึกษาการเจริญและการสร้างอะพลาทอกซินในดอกเห็ดหลินจือที่มีการปนเปื้อนจากเชื้อรา *A. parasiticus* ก่อนนำไปบริโภคด้วย

บรรณานุกรม

- กานดา พูนลาภทวี. 2530. สถิติเพื่อการวิจัย. กรุงเทพฯ : ฟิสิกส์เซ็นเตอร์.
- ชนิกา เอี่ยมสุภานิต และคณะ. 2529. โครงการแก้ไขปัญหาแอฟลาทอกซินในข้าวโพดโดยวิธี
ปรับปรุงพันธุ์และเขตกรรม. ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์. สถาบันวิจัยพืชไร่. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ 92 หน้า.
- ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2539. การเพาะเห็ดหลินจือ. กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- คุณิ ธนะบริพัฒน์ และคณะ. 2539. “การขยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในระหว่าง
การผลิตเห็ดแป้”. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 12(2) : 8-15.
- ธีรยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และชัชววัฒน์ ต่อสกุลแก้ว. 2524. อะฟลาทอกซิน (สารพิษจากเชื้อราที่
ทำให้เกิดมะเร็งตับ). กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ธีรยุทธ เวชรัตน์พิมล. 2529. “อาหารสัตว์และ Aflatoxin.” ธุรกิจอาหารสัตว์. 3(7) : 65-69.
- นรสีห์ ตระกูลช่าง. 2520. “เชื้อราบ่อนทำลายเศรษฐกิจ.” เกษตร. 5(6) : 269.
- นิธิยา รัตนานนท์ และวิบูลย์ รัตนานนท์. 2543. สารพิษในอาหาร. โอเดียนสโตร์.
กรุงเทพฯ. 284 หน้า.
- ประสิทธิ์ ใจศีล. 2529. ข้าวฟ่าง. ขอนแก่น : คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- रणภ บรรณเจตเชิดชู. 2530. “เชื้อราในโรงเก็บสารพิษอะฟลาทอกซินและการควบคุมด้วย
สารเคมีบนเมล็ดข้าวโพด.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
กรุงเทพฯ.
- ราชบัณฑิตยสถาน. 2539. เห็ดกินได้และเห็ดมีพิษในประเทศไทย ฉบับราชบัณฑิตยสถาน.
กรุงเทพฯ : อมรินทร์ พรินติ้ง แอนด์ พับลิชชิ่ง.
- ศรีสิทธิ์ การุณยวนิช. 2515. “ที่อกซินจากเชื้อราบางชนิด.” วารสารของกรมวิทยาศาสตร์
การแพทย์. 14(3-4) : 37-58.
- สุรพล รักปทุม และชวลิต สันติกิจรุ่งเรือง. 2539. เห็ดหลินจือ. กรุงเทพฯ : ที.พี. พรินท์.
- สาธิต ไทยทัตกุล. 2538 ก. เห็ดหลินจือ เห็ดหมื่นปี เห็ดสมุนไพรใช้รักษาโรค. กรุงเทพฯ :
วิชา.
- สาธิต ไทยทัตกุล. 2538 ข. เห็ดหลินจือสมุนไพรไทยใช้ในการรักษาโรค. กรุงเทพฯ :
สหภาพสื่อและการพิมพ์.

- สาธิต ไทยทัตกุล. 2539. การเพาะเห็ดหลินจือ. กรุงเทพฯ : ฟาอภัย.
- เสาวรส อิมวิทยา. 2526. “แอฟฟล่าทอกซิน.” วารสารสุขภาพ. 1(10) : 38-42.
- อานนท์ เอื้อตระกูล. 2541. การเพาะเห็ดหลินจือ. กรุงเทพฯ : ฟาอภัย.
- อุทัยวรรณ แสงวนิช. 2522. “การตรวจหา *Aspergillus* ที่สร้าง aflatoxin ในผลิตผลเกษตร.”
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 105 หน้า .
- Alexopoulos, C.J. et al. 1996. **Introductory mycology**. 4 th ed. New York : John Wiley and sons.
- Ashworth, L.J. et al. 1965. “Aflatoxin : Environmental factors governing occurrence in Spanish Peanuts.” **Sci**. 148 : 1228-1229.
- Azaizeh, H.A. et. al. 1990. “Effect of peanut tannin extracts on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production.” **Mycopathol**. 21 : 125-132.
- Aziz, N.H. and Shahin, A.A. 1997. “Influence of other fungi on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in maize kernels.” **J. Food Safety**. 17 : 113-123.
- Bressac, J. P. et al. 1991. “Selective G to T mutation of *p53* gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa.” **Nature**. 350 : 429-430.
- Blount, W.R. 1961. “Turkey X disease.” **Turkeys**. 9 : 52.
- Bothast, R. J. et al. 1974. “Microbiology of corn and milled corn products.” **Corn and Corn Products**. 51 : 829-838.
- Chang, H.M. and But, P.P. 1986. **Pharmacology and application of chinese materia medica**. 1. Singapore : World Scientific.
- Christensen, C.M. and Mirocha, C.J. 1976. “Relation of relative humidity to the invasion of rough rice by *Aspergillus parasiticus*.” **Phytopathol**. 66 : 204-205.
- Ciegler, A. et al. 1966. “Microbial detoxification of aflatoxin.” **Appl. Microbiol**. 14 : 934-939.
- Cole, R.J. and Kirksey, J.W. 1997. “Aflatoxin G₁ metabolism by *Rhizopus* species.” **J. Agr. Food Chem**. 19 : 222-223.
- Cook, R.J. and Baker, K.R. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The America Phytopathological Society. St. Paul. Minnesota. 533p.

- Cuero, R.C. et al. 1987. "Stimulation by *Hyphopichia burtonii* and *Bacillus amyloliquefaciens* of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in irradiated maize and rice grains." **App. Environ. Microbiol.** 53 : 1142-1146.
- Davis, N.D. et al. 1966. "Production of aflatoxin B and G *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium." **Appl. Microbiol.** 14 : 378-380.
- Diener, U.L. and Davis, N.D. 1970. "Limiting temperature and relative humidity for aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts." **J. Am. Oil. Chem. Soc.** 47 : 347-351.
- Diener, U. L. et al. 1987. "Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*." **Ann. Rev. Phytopath.** 25 : 249-270.
- Dvorackova I. 1990. **Aflatoxin and Human Health.** Florida : CRC Press, Inc.
- Eaton, D. L. and Groopman, J. D. 1993. **The Toxicology of Aflatoxin : human health, veterinary and agricultural significance.** California : Academic Press, Inc.
- El-Gendy, S.M. and Marth, E.H. 1981. "Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*." **J. Food Prot.** 44 : 211-217.
- Flores-Galrza, R.A. et al. 1985. "Preservation of high-moisture corn by microbial fermentation." **J. Food Prot.** 48 : 407-411.
- Glinsukon, T. et al. 1976. "Studies on the population of toxigenic fungi in market foods and foodstuffs. I. Mycoflora contamination." **J. Sci. Soc. Thailand.** 2 : 176.
- Goto T.E. et al. 1996. "Aflatoxin and cyclopiazonic acid production by sclerotium-producing *Aspergillus tamarii* strain." **Appl. Environ. Microbiol.** 62 : 4036-4038.
- Griffin, D. H. 1993. **Fungal Physiology.** 2nd ed. New York : Wiley-Liss, Inc.
- Gupta, S.K. et al. 1976. "Effect of zinc on adenine nucleotide pools in relation to aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*." **Appl. Env. Microbiol.** 32 : 753-756.
- Hill, R. A. et al. 1985. **Trichothecenes and Other Mycotoxin.** Chichester : John Wiley.
- Horn, B.W. and Wicklow, D.T. 1983. "Factors influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*." **Car. J. Microbiol.** 29 : 1087-1091.
- Hou, C. et al. 1988. "Chemical constituents of the spore from *Ganoderma lucidum*." **Acta Bot. Sin.** 22 : 837-840.
- Hsu, I. C. et al. 1991. "Mutational hotspot in the p53 gene in human hepatocellular carcinomas." **Nature.** 350 : 427-428.

- Hunter, J.H. 1969. "Growth and aflatoxin production in shelled corn by the *Aspergillus flavus* group as related to relative humidity and temperature." Ph.D. Thesis of Purdue University, West Lafayette.
- Jarvis, B. 1971. "Factors affecting the production of mycotoxin." **J. Appl. Bacteriol.** 34 : 199-213.
- Keanjak, A. 1984. Improved *Aspergillus* mutants of source production : International Congress of Culture Collections. Bangkok : Poster session abstract.
- Kimura, N. and Hirano, M. 1988. "Inhibitory strains of *Bacillus subtilis* for growth and aflatoxin production of aflatoxigenic fungi." **Agric. Biol. Chem.** 52 : 1173-1179.
- Kohda, H. et al. 1985. "The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (FR.) KARST. Histamine release-inhibitory triterpenes." **Chem. Pharm. Bull.** 33(4) : 1367-1374.
- Kurtzman, C. P. et al. 1986. "DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group." **Mycologia.** 78 : 955-959.
- Kurtzman, C.P. et al. 1987. "*Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*." **Ann. van Leeuw.** 53 : 147-158.
- Lansden, J.A. 1982. "Aflatoxin inhibition and fungistasis by peanut tannins." **Peanut Sci.** 9 : 17-20.
- Landers, K.E. et al. 1967. "Influence of atmospheric gases on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts." **Phytopathol.** 57 : 1086-1090.
- Lin, M.T. and Dianese, J. C. 1976. "Coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp." **Phytopathol.** 66 : 1466-1469.
- Marth, E.H. and Calanog, B.G. 1976. **Food Microbiology : Public Health and Spoilage Aspects.** Connecticut : AVI Publishing.
- Miyazaki, T. and Nishijima, M. 1981. "Studies on fungal polysaccharide. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*." **Chem. Pharm. Bull.** 29(12) : 3611-3616.
- Munimbazi, C. and Bullerman, L.B. 1998. "Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilus*." **Mycopathol.** 140 : 163-169.

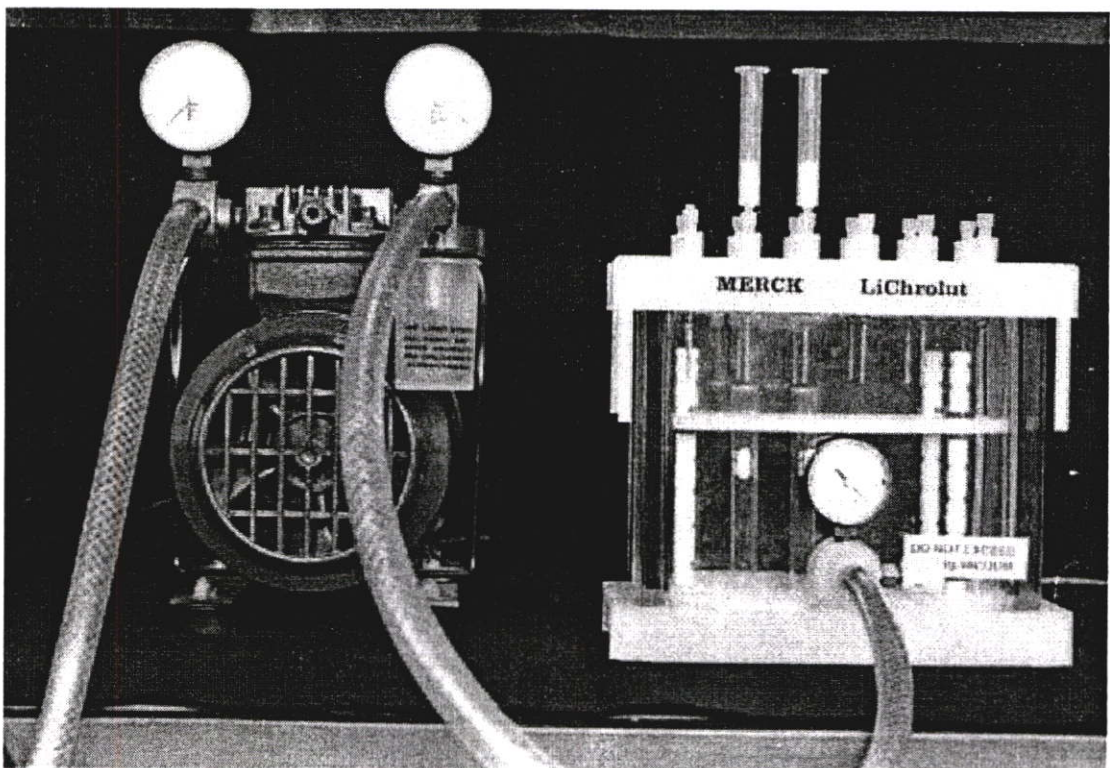
- Pitt, J. I. 1989. **Aflatoxin Contamination of Groundnuts**. India : Patancheru.
- Pomeranz, Y and Meloan, C.E. 1994. **Food Analysis : Theory and Practice**. 3 rd ed. New York : Chapman and Hall.
- Ramakrishna, N. et al. 1996. “*Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin B₁ formation in barley grain during interaction with other fungi.” **Mycopathol.** 136 : 53-63.
- Reddy, T.V. et al. 1971. “High aflatoxin production on a chemically defined medium.” **Appl. Microbiol.** 22 : 393-396.
- Royse, D.J. and Ries, S.M. 1978. “The influence of fungi isolate from peach twigs on the pathogenicity of *Cytospora cincta*.” **Phytopathol.** 68 : 603-607.
- Sargeant, K. et al. 1961 a. “The assay of a toxic principle in certain groundnut meals.” **Vet. Record.** 73 : 1219.
- Sargeant, K. et al. 1961 b. “Toxicity associated with certain samples of groundnut.” **Nature.** 192 : 1096.
- Sauer, D.B. and Burroughs, R. 1980. “Fungal growth, aflatoxin production, and moisture equilibration in mixtures of wet and dry corn.” **Phytopathol.** 70 : 516-521.
- Sauer, D.B. and Tuite, J. 1986. “Conditions that affect growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxin in stored corn.” 14.in **US-AID/CIMMWT aflatoxin workshop**. Mexico : El Batan.
- Seitz, L.M. and Mohr, H.E. 1977. A new method for quantitation of aflatoxin in corn. **Cereal Chem.** 54 : 179-183.
- Shiao, M.S. et al. 1994. “Natural production and biological activities of the Chinese medicinal fungus *Ganoderma lucidum*.” **Food Phytochemicals** 2. 342-354.
- Shin, et al. 1986. “Studies on constituents of higher fungi of Korea. Part XLIII. Studies on inorganic composition and immunopotentiating activity of *Ganoderma lucidum* in Korea.” **Saengyak Hakhoechi.** 16 : 181-190.
- Simon, A. et al. 1988. “*Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties.” **Soil Biol. Biochem.** 20 : 263-264.
- Sone, Y. et al. 1985. “Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*.” **Agric. Biol. Chem.** 49(9) :2641-2653.

- Sorenson, W.G. et al. 1967. "Effect of temperature on production of aflatoxin on rice by *Aspergillus flavus*." **Mycopath. Mycol. Appl.** 33 : 49-55.
- Sugai, T. et al. 1986. "Pyrophosphatidic acid in mushroom." **Lipids.** 21 : 666-668.
- Taylor, W.J. and Draughon, F.A. 2001. "*Nannocystis exedens* : A potential biocompetitive agent against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*." **J. Food Prot.** 64 : 1030-1034.
- Thanaboripat, D. et al. 1997. "Detoxification of aflatoxin by *Streptococcus lactis* and lactic acid bacteria in commercial yoghurt." **Kasetsart J.** 31 : 117-123.
- Torres, J. et al. 1980. "Morphological changes in strains of *Aspergillus flavus* Link Exfries and *Aspergillus parasiticus* Spears related with aflatoxin production." **Mycopathol.** 72(3) : 171-174.
- Wang, H. L. and Hesseltine, C. W. 1982. **Prescott and Dunn Industrial Microbiology.** 4th ed. Connecticut : Westport.
- Wang, G. et al. 1993. "Antitumor active polysaccharides from the chinese mushroom songshan lingzhi, the fruiting body of *Ganoderma tsugae*." **Biosci. Biotech. Biochem.** 57(6) : 894-900.
- Wicklow, D.T. et. al. 1980. "Interference competition and aflatoxin levels in corn." **Phytopathol.** 70 : 761-764.
- Wicklow, D.T. et. al. 1988. "Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment." **Phytopathol.** 78 : 68-74.
- Wiseman, D.W. and Marth, E.H. 1981. "Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis*." **Mycopathol.** 73 : 49-56.
- Weckbach, L.S. and Marth, E.H. 1977. "Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a competitive environment." **Mycopathol.** 62 : 39-45.
- WHO. 1979. **Environmental Health Criteria II : Mycotoxins.** World Health Organization. Geneva.
- Ying, J. et al. 1987. **Icones of medicinal fungi from China.** Translated by Yuehan, X. Beijing : Science Press.

ภาคผนวก ก.

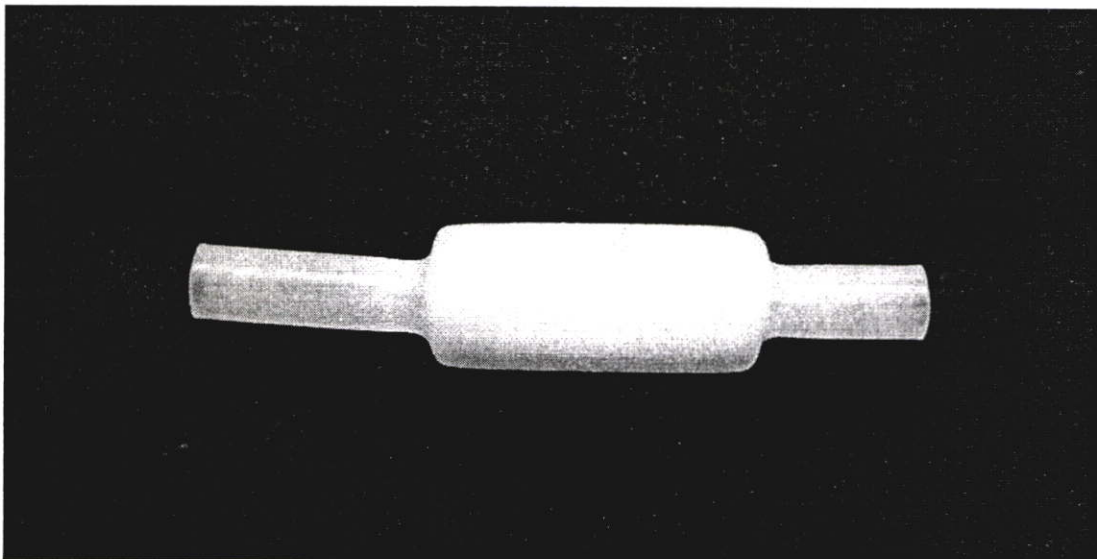
อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดและวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน

1. เครื่อง LiChrolut® จากบริษัท MERCK



รูปที่ ก-1 เครื่อง LiChrolut® เมื่อต่อเข้ากับปั๊มสุญญากาศ

2. มินิคอลัมน์ Sep-pak®



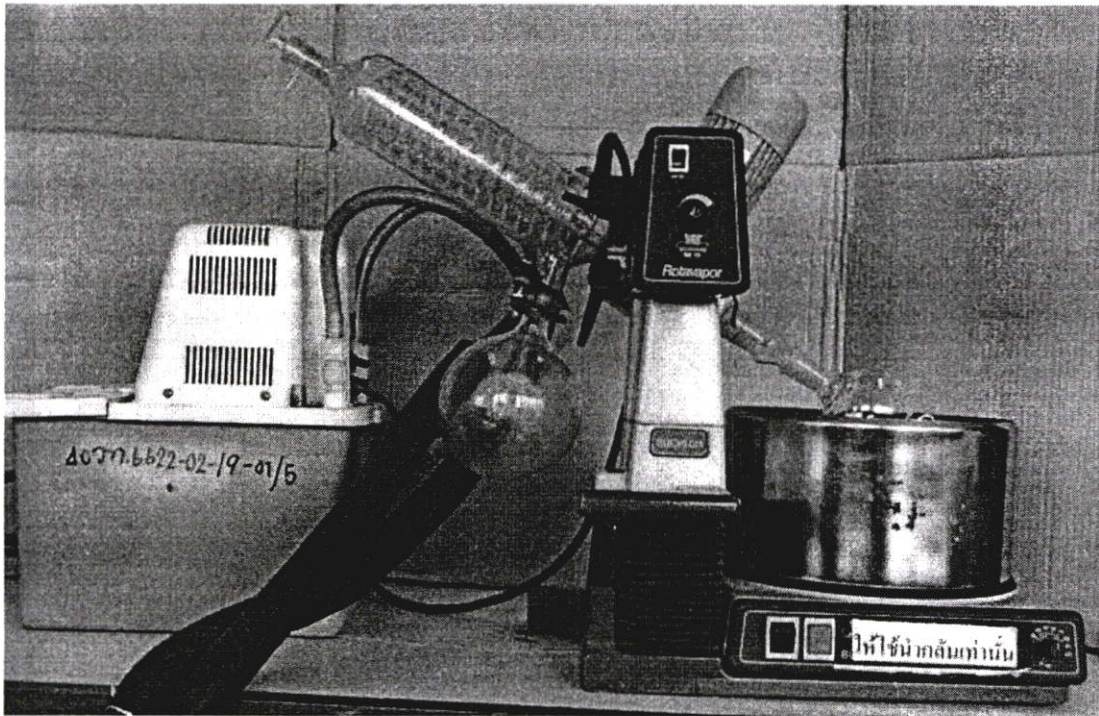
รูปที่ ก-2 ลักษณะของ Sep-Pak silica gel cartridge column chromatography

3. มินิคอลัมน์ LiChrolut®



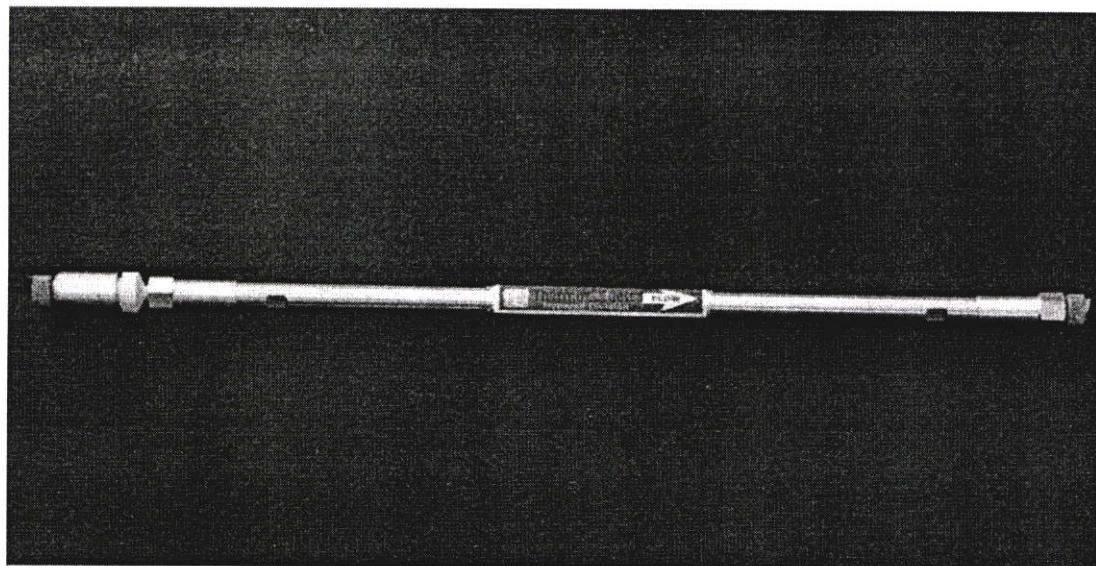
รูปที่ ก-3 ลักษณะของ LiChrolut® silica gel cartridge column chromatography

4. เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศ (rotary evaporator)



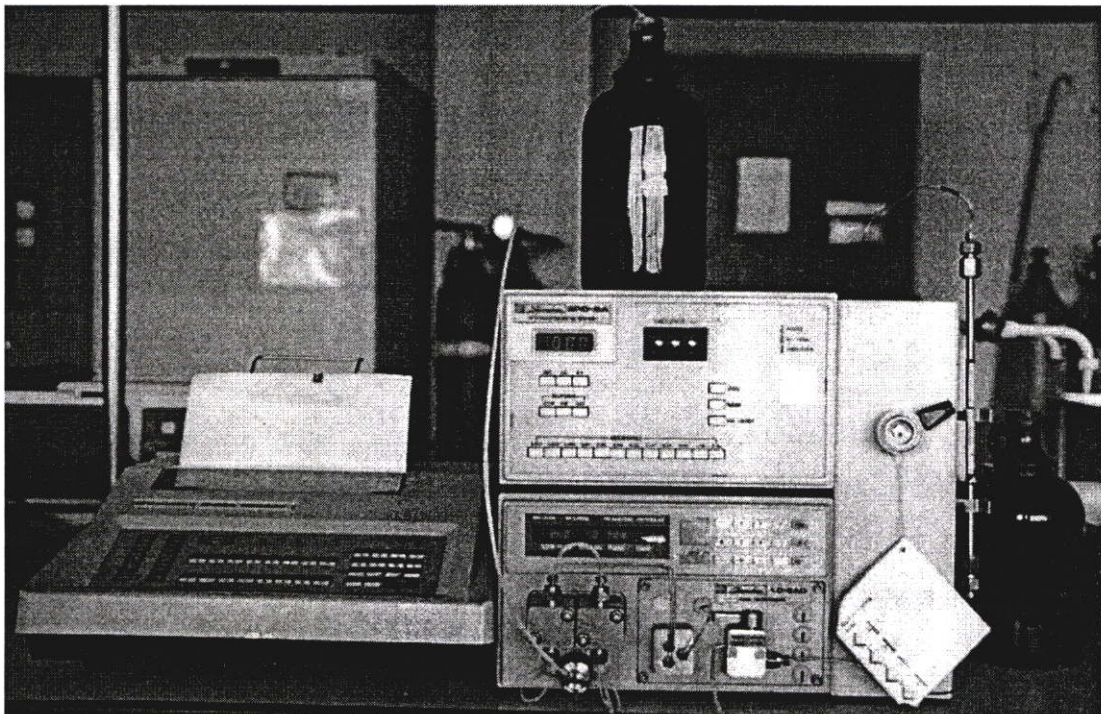
รูปที่ ก-4 เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศ

5. คอลัมน์ HPLC



รูปที่ ก-5 คอลัมน์ HPLC ชนิด C_{18} reverse phase

6. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)



รูปที่ ก-6 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร Potato dextrose agar (PDA)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDA	39.0	กรัม
ประกอบด้วย		
Potato extract	4.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar Powder	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมด้วยน้ำกลั่น ต้มให้ละลายแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ประวัติผู้เขียน

นายอัษฎา อิ่มเอิบ เกิดเมื่อวันที่ 12 ธันวาคม 2517 ที่จังหวัดชลบุรี สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์
บางพระ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ปีการศึกษา 2540