หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อราออกจากตัวอย่างวัสดุการเกษตร

การคัดแยกเชื้อราที่ปนเปื้อนมากับวัสดุการเกษตร โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบกระจายเชื้อบนอาหารวุ้น PDA และ RBA บ่มเชื้อเป็นเวลา 3-5 วัน ที่ อุณหภูมิห้อง ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 การแยกเชื้อราจากวัสดุการเกษตรชนิดต่างๆ ที่สุ่มตัวอย่างมา สามารถแยกเชื้อราบริสุทธิ์ได้เป็นจำนวน 98 สายพันธุ์ ได้แก่จาก ปลายข้าว 9 สายพันธุ์ รำละเอียด 9 สายพันธุ์ กากถั่วเหลือง 4 สายพันธุ์ ถั่วเหลือง 6 สายพันธุ์ ถั่วลิสง 7 สายพันธุ์ กระถินป่น 9 สายพันธุ์ มะพร้าวแห้ง 8 สายพันธุ์ ข้าวโพดป่นหยาบ 9 สายพันธุ์ ข้าวโพดป่นละเอียด No.1 ถึง No.9 มี 33 สายพันธุ์ และ ปลาป่น 4 สายพันธุ์ เชื้อราทั้ง 98 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้นี้ จะเป็นเชื้อราที่ปนเปื้อนมาตามธรรมชาติ ซึ่งสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้ จะนำไปทดสอบว่า มีสายพันธุ์ใดที่สามารถสร้างแอฟลาทอกซิน

2. ปริมาณความชื้นกับการงอกของสปอร์ที่ปนเปื้อนบนวัสดุการเกษตร

ทดลองให้ความชื้นในปริมาณต่างๆแก่วัสดุการเกษตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน แล้วตรวจสอบการงอกของสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอและตาเปล่า ซึ่งผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 คือจากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่า เมื่อให้ความชื้นแก่วัสดุการเกษตร โดยเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อในปริมาณตั้งแต่ 5 ถึง 20% (ป.ต่อนน.) เมื่อให้ความชื้นในปริมาณ 15%(ป.ต่อนน.) พบว่าในวัสดุการเกษตรที่ใช้ทดลองทั้งหมด จะมีการงอกของสปอร์และการเจริญของเชื้อราได้ คือในกระถินป่นและปลาป่นจะมีการงอกของสปอร์แต่การเจริญของเส้นใยเชื้อราได้เพียงเล็กน้อย ปลายข้าว รำละเอียด กากถั่วเหลือง ถั่วเหลือง และข้าวโพดป่นหยาบ จะมีการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้พอใช้ และในพวกถั่วลิสง มะพร้าวแห้ง ข้าวโพดป่นละเอียดจะมีการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดี และเมื่อได้ทดลองให้ความชื้น 20%(ป.ต่อนน.) ผลปรากฏว่าจะมีการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้ดีมาก นอกจากกระถินป่นและปลาป่นที่มีการงอกของสปอร์ และการเจริญของเส้นใยเชื้อราได้พอใช้ ซึ่งเพิ่มขึ้นมาจากการใช้ความชื้น 15% เพียงเล็กน้อย ดังนั้นจะเห็นว่าผลจากการให้ความชื้นลงในวัสดุการเกษตร

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณความชื้นกับการงอกของสปอร์ที่ปนเปื้อนบนวัสดุการเกษตร และจำนวนสกุลเชื้อราที่แยกได้จากวัสดุการเกษตรแต่ละชนิด

วัสดุการเกษตร	ปริมาณน้ำที่เติม (ป./นน.)					จำนวนสกุลเชื้อราที่แยกได้จากอาหาร PDA และ RBA
	5%	10%	12%	15%	20%	
ข้าวโพดป่นหยาบ	0	0	0	+2	+4	9
ปลายข้าว	0	0	0	+2	+4	9
รำละเอียด	0	0	0	+2	+4	9
กากถั่วเหลือง	0	0	0	+2	+4	4
ปลาป่น	0	0	0	+1	+2	4
กระดูกป่น	0	0	0	+1	+2	9
ถั่วเหลือง	0	0	0	+2	+4	6
ถั่วลิสง	0	0	0	+3	+4	7
ข้าวโพดป่นละเอียดNo.1	0	0	0	+3	+4	6
ข้าวโพดป่นละเอียดNo.2	0	0	0	+3	+4	4
ข้าวโพดป่นละเอียดNo.3	0	0	0	+3	+4	4
ข้าวโพดป่นละเอียดNo.4	0	0	0	+3	+4	4
ข้าวโพดป่นละเอียดNo.5	0	0	0	+3	+4	3
ข้าวโพดป่นละเอียดNo.6	0	0	0	+3	+4	3
ข้าวโพดป่นละเอียดNo.7	0	0	0	+3	+4	3
ข้าวโพดป่นละเอียดNo.8	0	0	0	+3	+4	3
ข้าวโพดป่นละเอียดNo.9	0	0	0	+3	+4	3
มะพร้าวแห้ง	0	0	0	+3	+4	8

หมายเหตุ: 0 : ไม่มีการงอกของสปอร์เชื้อร +1 : มีการเจริญของเส้นใยเชื้อราเล็กน้อย
+2 : มีการเจริญของเส้นใยพอใช้ +3 : มีการเจริญของเส้นใยได้ดี
+4 : มีการเจริญของเส้นใยได้ดีมาก

ในปริมาณต่ำกว่า 12% จะทำให้เห็นว่าความชื้นไม่เพียงพอ ที่เชื้อราจะใช้ในการงอกและเจริญของเส้นใยได้ ซึ่งผลของการทดลองนี้จะสอดคล้องกับการวิจัยของ ดุษณี และคณะ (2531) ที่ได้ศึกษาการป้องกันการเกิดแอฟลาทอกซินในอาหารสัตว์สำเร็จรูป โดยการลดความชื้นในอาหารสัตว์ลง ผลจากการวิจัยพบว่าเมื่อลดความชื้นให้ต่ำกว่า 13% แล้วจะมีผลทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญ และ มินา(2531) ได้ศึกษาถึงการอบแห้งข้าวโพดในฟลูอิไดเบทหลายชั้น ซึ่งผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการอบแห้งข้าวโพด จนมีความชื้น 13.5% จะทำให้เชื้อราที่ปนเปื้อนมาไม่สามารถเจริญได้ และจะไม่มีการสร้างแอฟลาทอกซินลงในข้าวโพดที่อบแห้ง แต่การซื้อขายข้าวโพดในปัจจุบัน โรงงานจะกำหนดรับซื้อข้าวโพดที่มีความชื้น 14.5% ซึ่งที่ความชื้นระดับนี้ได้สำรวจพบว่ายังมีการสร้างแอฟลาทอกซินลงในข้าวโพดได้

3. <u>การคัดแยก(screening)เชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างแอฟลาทอกซิน</u>

จากเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมด 98 สายพันธุ์นำมาทำการคัดแยก(screening)สายพันธุ์ที่สามารถสร้างแอฟลาทอกซินได้ ซึ่งในการคัดแยกสายพันธุ์ได้กระทำสองขั้นตอนดังนี้

3.1. การคัดแยกเชื้อราสายพันธุ์ที่ให้การเรืองแสงอัลตราไวโอเลตที่ช่วงคลื่น 365 นาโนเมตรบนอาหารมาตรฐานปรับปรุง(สูตรที่ 4ก.)

การคัดแยกในขั้นตอนนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง 98 สายพันธุ์ บนอาหารสูตรที่ 4ก.ที่ใช้อาหารเริ่มต้นจากวัสดุการเกษตร 6 ชนิดคือ ถั่วลิสง ข้าวโพด มะพร้าว ปลายข้าว ถั่วเหลือง และปลา นอกจากนี้ยังเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA เพื่อทดลองเปรียบเทียบอีกหนึ่งชนิด และเมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาตรวจสอบการเรืองแสงอัลตราไวโอเลตที่ 365 นาโนเมตร ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

ผลจากตารางปรากฏว่าการเรืองแสงของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์บนอาหารสูตรที่ 4ก. ขึ้นกับคุณสมบัติของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ และชนิดของสารอาหารเริ่มต้นซึ่งสกัดจากวัสดุการเกษตรที่ใช้เลี้ยงเชื้อราเช่น ผลของเชื้อราลำดับที่ 1 ซึ่งแหล่งที่คัดแยกเชื้อราคือ ข้าวโพดป่นหยาบปรากฏผลว่า เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นสกัดประเภท ข้าว ถั่วเหลือง ปลา และ PDA จะสามารถให้การเรืองแสงได้ แต่ในอาหารวุ้นสกัดประเภท ถั่วลิสง ข้าวโพด และมะพร้าว จะไม่มีการเรืองแสง หรือผลของเชื้อราลำดับที่ 3 ซึ่งแหล่งที่คัดแยกเชื้อราคือข้าวโพดป่นหยาบเช่นกัน จะมีเพียงสารอาหารเริ่มต้นจากมะพร้าวเท่านั้น ที่ตรวจไม่พบการเรืองแสง นอกนั้นตรวจพบให้การเรืองแสงได้ บนอาหารวุ้นสกัดทุกชนิดที่ใช้ทดลอง หรือผลของเชื้อราลำดับที่ 83 ที่คัดแยกเชื้อราจากแหล่งข้าวโพดป่นละเอียด No.7 ซึ่งให้ผลการเรืองแสงได้ทุกประเภทของอาหารวุ้นสกัดที่ใช้ทดลอง นั่นคือผลจากการเรืองแสง

ตารางที่ 2 แสดงผลการเรืองแสงอัลตราไวโอเลตของเชื้อราที่บ่มเลี้ยงบนอาหารมาตรฐานปรับปรุง(สูตรที่ 4ก.) และผลการตรวจสอบเชื้อราที่สร้างแอฟลาทอกซิน โดยวิธี TLC เปรียบเทียบกับแอฟลาทอกซิน บี$_1$ มาตรฐาน

ลำดับของเชื้อรา	ผลการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต บนอาหารสกัดสูตรที่ 4ก.							ผลของ TLC เทียบกับแอฟลาทอกซิน บี$_1$ มาตรฐาน	แหล่งที่คัดแยกเชื้อ
	ถั่วลิสง	ข้าวโพด	มะพร้าว	ปลายข้าว	ถั่วเหลือง	ปลาป่น	PDA		
1	-	-	-	+	+	+	+	N	
2	-	-	-	-	-	-	-	X	
3	+	+	-	+	+	+	+	N	
4	-	-	-	-	+	-	+	X	
5	+	+	+	+	+	+	+	N	ข้าวโพดป่นหยาบ
6	+	+	+	+	+	+	+	N	
7	-	-	-	-	+	-	+	X	
8	+	+	+	+	+	+	+	N	
9	-	-	-	-	-	-	-	X	
10	-	-	+	+	+	+	+	N	
11	+	-	-	-	-	-	+	X	
12	+	+	+	+	+	+	+	N	
13	+	-	-	-	-	-	+	X	
14	+	+	+	+	+	-	+	N	ปลายข้าว
15	-	-	-	-	-	-	-	X	
16	-	-	-	-	-	-	-	X	
17	+	+	-	+	+	-	+	Y	
18	-	-	-	-	-	-	-	X	

หมายเหตุ: - : ไม่มีการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต + : ให้ผลเรืองแสงอัลตราไวโอเลต
X : เชื้อราที่ให้ผลเรืองแสงต่ำกว่า +3 N : เชื้อราที่ไม่สร้างแอฟลาทอกซิน Y : เชื้อราที่สร้างแอฟลาทอกซิน

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับของเชื้อรา	ผลการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต บนอาหารสกัดสูตรที่ 4ก.							ผลของ TLC เทียบกับแอฟลาทอกซิน บี1 มาตรฐาน	แหล่งที่คัดแยกเชื้อ
	ถั่วลิสง	ข้าวโพด	มะพร้าว	ปลายข้าว	ถั่วเหลือง	ปลาป่น	PDA		
19	-	-	-	-	-	-	-	X	
20	+	+	+	+	+	+	+	N	
21	-	+	-	-	-	-	+	X	
22	+	-	-	-	+	+	-	N	
23	-	-	-	-	-	-	-	X	ร้าละเอียด
24	-	-	-	-	-	-	-	X	
25	+	+	+	+	+	+	+	N	
26	+	+	+	+	+	+	+	Y	
27	-	-	-	-	-	+	+	X	
28	-	-	+	-	-	-	+	X	
29	-	-	-	-	-	-	+	X	กากถั่วเหลือง
30	-	-	-	-	-	-	-	X	
31	-	-	-	-	-	-	-	X	
32	-	-	-	-	+	+	+	N	
33	-	-	-	-	+	+	+	X	ปลาป่น
34	-	-	-	-	-	-	+	X	
35	-	-	-	-	-	-	+	X	

หมายเหตุ: - : ไม่มีการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต + : ให้ผลเรืองแสงอัลตราไวโอเลต
X : เชื้อราที่ให้ผลเรืองแสงต่ำกว่า +3 N : เชื้อราที่ไม่สร้างแอฟลาทอกซิน Y : เชื้อราที่สร้างแอฟลาทอกซิน

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับของเชื้อรา	ผลการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต บนอาหารสกัดสุตรที่ 4ก.							ผลของ TLC เทียบกับแอฟลาทอกซิน บี1 มาตรฐาน	แหล่งที่คัดแยกเชื้อ
	ถั่วลิสง	ข้าวโพด	มะพร้าว	ปลายข้าว	ถั่วเหลือง	ปลาป่น	PDA		
36	-	-	+	-	+	+	+	Y	
37	-	-	-	+	+	-	-	X	
38	-	-	-	-	+	-	+	X	
39	+	-	+	-	+	+	-	N	
40	+	-	-	-	+	-	-	X	กระถินป่น
41	-	-	-	-	-	-	-	X	
42	-	-	-	-	-	+	-	X	
43	-	-	-	-	-	-	-	X	
44	+	-	-	+	-	+	-	N	
45	-	-	+	-	+	-	+	N	
46	-	-	-	-	-	-	-	X	
47	-	-	-	-	-	-	-	X	
48	-	-	+	-	+	-	+	N	ถั่วเหลือง
49	+	+	+	+	+	-	+	Y	
50	+	+	+	+	+	-	+	N	

หมายเหตุ: - : ไม่มีการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต + : ให้ผลเรืองแสงอัลตราไวโอเลต
X : เชื้อราที่ให้ผลเรืองแสงต่ำกว่า +3 N : เชื้อราที่ไม่สร้างแอฟลาทอกซิน Y : เชื้อราที่สร้างแอฟลาทอกซิน

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับของเชื้อรา	ผลการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต บนอาหารสกัดสูตรที่ 4ก.							ผลของ TLC เทียบกับแอฟลาทอกซิน บี$_1$ มาตรฐาน	แหล่งที่คัดแยกเชื้อ
	ถั่วลิสง	ข้าวโพด	มะพร้าว	ปลายข้าว	ถั่วเหลือง	ปลาป่น	PDA		
51	-	-	-	-	-	-	-	X	
52	+	-	-	-	-	-	+	X	
53	-	-	-	-	-	-	-	X	
54	+	+	+	+	+	+	+	Y	ถั่วลิสง
55	-	-	-	-	-	-	-	X	
56	-	-	-	-	-	-	-	X	
57	+	+	+	+	+	+	+	N	
58	-	-	-	-	-	-	-	X	
59	+	+	-	+	+	-	-	N	
60	-	+	+	-	-	+	+	N	ข้าวโพดปนละเอียดNo. 1
62	-	-	-	-	-	-	-	X	
63	+	-	-	+	+	+	+	N	
64	+	+	+	+	+	+	+	N	
65	-	-	-	-	-	-	-	X	ข้าวโพดปนละเอียดNo. 2
66	-	-	-	-	-	-	+	X	
67	-	-	-	-	-	-	-	X	

หมายเหตุ: - : ไม่มีการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต + : ให้ผลเรืองแสงอัลตราไวโอเลต
X : เชื้อราที่ให้ผลเรืองแสงต่ำกว่า +3 N : เชื้อราที่ไม่สร้างแอฟลาทอกซิน Y : เชื้อราที่สร้างแอฟลาทอกซิน

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับของเชื้อรา	ผลการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต บนอาหารสกัดสูตรที่ 4ก.							ผลของ TLC เทียบกับแอฟลาทอกซิน บี1 มาตรฐาน	แหล่งที่คัดแยกเชื้อ
	ถั่วลิสง	ข้าวโพด	มะพร้าว	ปลายข้าว	ถั่วเหลือง	ปลาป่น	PDA		
68	-	-	-	-	-	-	-	X	
69	-	+	-	+	+	-	+	N	ข้าวโพดป่นละเอียดNo.3
70	-	-	-	-	-	-	-	X	
71	-	+	-	-	-	+	+	N	
72	-	-	-	-	-	-	+	X	
73	-	-	-	-	-	-	-	X	ข้าวโพดป่นละเอียดNo.4
74	-	-	-	-	-	-	-	X	
75	-	-	-	-	-	-	+	X	
76	-	-	-	-	-	-	-	X	
77	-	-	-	-	-	-	-	X	ข้าวโพดป่นละเอียดNo.5
78	+	+	+	+	-	-	+	Y	
79	+	+	-	-	+	-	+	Y	
80	-	-	-	-	-	-	-	X	ข้าวโพดป่นละเอียดNo.6
81	-	-	-	-	-	-	+	X	

หมายเหตุ: - : ไม่มีการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต + : ให้ผลเรืองแสงอัลตราไวโอเลต
X : เชื้อราที่ให้ผลเรืองแสงต่ำกว่า +3 N : เชื้อราที่ไม่สร้างแอฟลาทอกซิน Y : เชื้อราที่สร้างแอฟลาทอกซิน

I 10309597

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับของเชื้อรา	ผลการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต บนอาหารสกัดสูตรที่ 4ก.							ผลของ TLC เทียบกับแอฟลาทอกซิน บี1 มาตรฐาน	แหล่งที่คัดแยกเชื้อ
	ถั่วลิสง	ข้าวโพด	มะพร้าว	ปลายข้าว	ถั่วเหลือง	ปลาป่น	PDA		
82	-	-	-	-	-	-	-	X	
83	+	+	+	+	+	+	+	Y	ข้าวโพดป่นละเอียดNo.7
84	-	-	-	-	-	-	-	X	
85	-	-	-	-	-	-	-	X	
86	-	+	+	-	+	-	-	N	ข้าวโพดป่นละเอียดNo.8
87	-	-	-	-	-	-	-	X	
88	-	-	-	-	-	-	-	X	
89	-	-	-	-	-	-	-	X	ข้าวโพดป่นละเอียดNo.9
90	+	+	+	+	+	+	+	N	
91	+	+	+	+	+	+	+	Y	
92	-	-	-	-	+	-	-	X	
93	-	-	-	-	-	-	-	X	
94	-	-	+	-	-	+	-	X	มะพร้าวแห้ง
95	-	-	-	-	-	-	-	X	
96	-	-	-	-	-	-	-	X	
97	-	-	-	-	-	-	-	X	
98	-	-	-	-	-	-	-	X	

หมายเหตุ: - : ไม่มีการเรืองแสงอัลตราไวโอเลต + : ให้ผลเรืองแสงอัลตราไวโอเลต
X : เชื้อราที่ให้ผลเรืองแสงต่ำกว่า +3 N : เชื้อราที่ไม่สร้างแอฟลาทอกซิน Y : เชื้อราที่สร้างแอฟลาทอกซิน

อัลตราไวโอเลตของเชื้อราทั้ง 98 สายพันธุ์ ที่แสดงในตารางที่ 2 นี้จะสามารถบอกได้ว่าการเรืองแสงอัลตราไวโอเลตนี้ จะขึ้นกับคุณสมบัติของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ และประเภทของสารอาหารเริ่มต้นที่ใช้

3.2. การคัดแยก(screening)เชื้อราที่สร้างแอฟลาทอกซิน โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3) และตรวจสอบการสร้างแอฟลาทอกซินด้วย TLC เปรียบเทียบกับแอฟลาทอกซิน บี$_1$ มาตรฐาน

ผลการเรืองแสงอัลตราไวโอเลตของเชื้อราทั้ง 98 สายพันธุ์ ได้คัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่ให้ผลการเรืองแสงบนอาหารสูตรที่ 4ก.ตั้งแต่ 3 ชนิดขึ้นไป มาทำการทดลองต่อไป จากตารางที่ 2 พบว่ามีเชื้อรา 36 สายพันธุ์ที่ให้ผลตามต้องการ โดยนำเชื้อราทั้ง 36 สายพันธุ์นี้มาทำการทดลอง เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมาตรฐาน เป็นเวลา 7 วัน ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที แล้วสกัดแอฟลาทอกซินออกจากอาหารเหลว ตามวิธีการสกัดในข้อ ก.1.1และ1.3 และตรวจหาแอฟลาทอกซินด้วย TLC ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ ก.2.

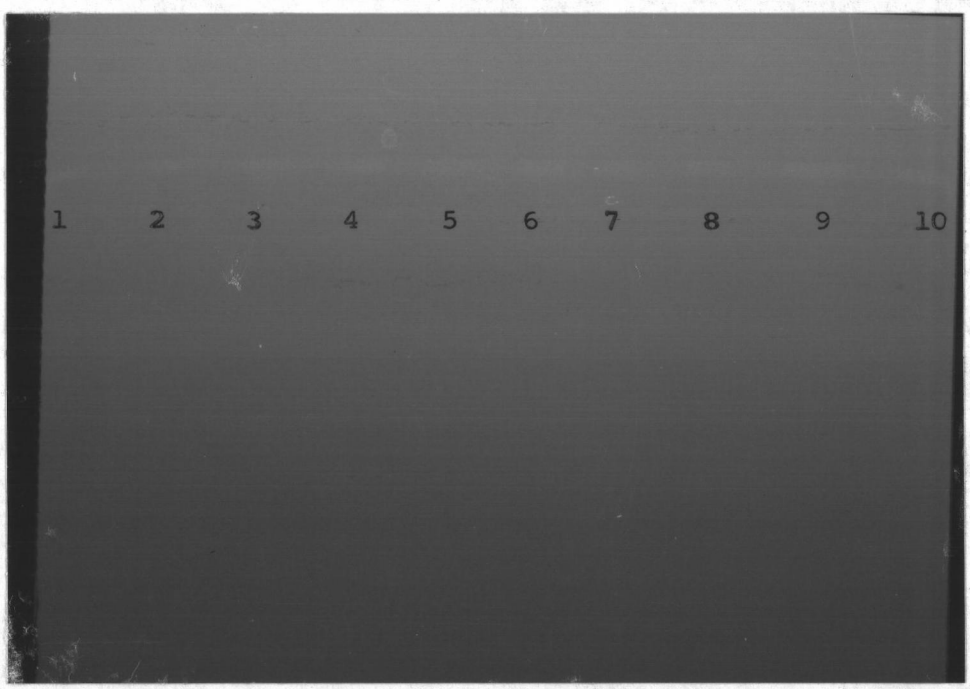
ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 ได้แสดงให้เห็นเชื้อราทั้ง 36 สายพันธุ์ที่ให้การเรืองแสงตามต้องการบนอาหารสกัด และจากการทดลองพบว่ามีเชื้อรา 9 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างแอฟลาทอกซินได้คือเชื้อราลำดับที่ 17, 26, 36, 49, 54, 78, 83 และ 91 ซึ่งแหล่งที่ใช้แยกเชื้อราคือ ปลายข้าว รำละเอียด กระถินป่น ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ข้าวโพดป่นละเอียด NO.5, 7 และมะพร้าวแห้งตามลำดับดังได้แสดงไว้ในตาราง และรูปที่ 1 ได้แสดงผลบนแผ่นกระจกซิลิกาเจล TLC ของแอฟลาทอกซินจากเชื้อราทั้ง 9 สายพันธุ์เทียบกับแอฟลาทอกซิน บี$_1$ มาตรฐาน(Gimeno, 1979.)

และจากการจัดจำแนกโดยใช้หลักการจำแนกเชื้อราของ Raper และ Thom(1949), Raper และ Fennell(1965), Kendrick(1971) และ Barnett และ Hunter (1972) พบว่าเชื้อราทั้ง 9 สายพันธุ์คือสกุล *Aspergillus* W17, *Rhizopus* W26, *Penicilluim* W36, *Fonsecaea* W49, *Aspergillus* W54, *Fusarium* W78, *Aspergillus* W79, *Aspergillus* W83 และ *Curvularia* W91 ตามลำดับ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5(ในภาคผนวก ก.)

ซึ่งการจัดจำแนกครั้งนี้พบว่า *Aspergillus* W17, *Aspergillus* W54 และ *Aspergillus* W83 ซึ่งมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับ *Aspergillus ochraceaous*, *Aspergillus niger* และ *Aspergillus flavus* ตามลำดับ (Raper และ Fennell, 1965) ลักษณะเชื้อราดังแสดงในรูปที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ และเชื้อราทั้ง 3 สกุลนี้ Shank และคณะ(1972) กับ Glinsukon และคณะ(1976) ได้รายงานไว้ว่าสามารถสร้างแอฟลาทอกซินได้ และ *Aspergillus* W79 มีลักษณะคล้ายคลึงกับ

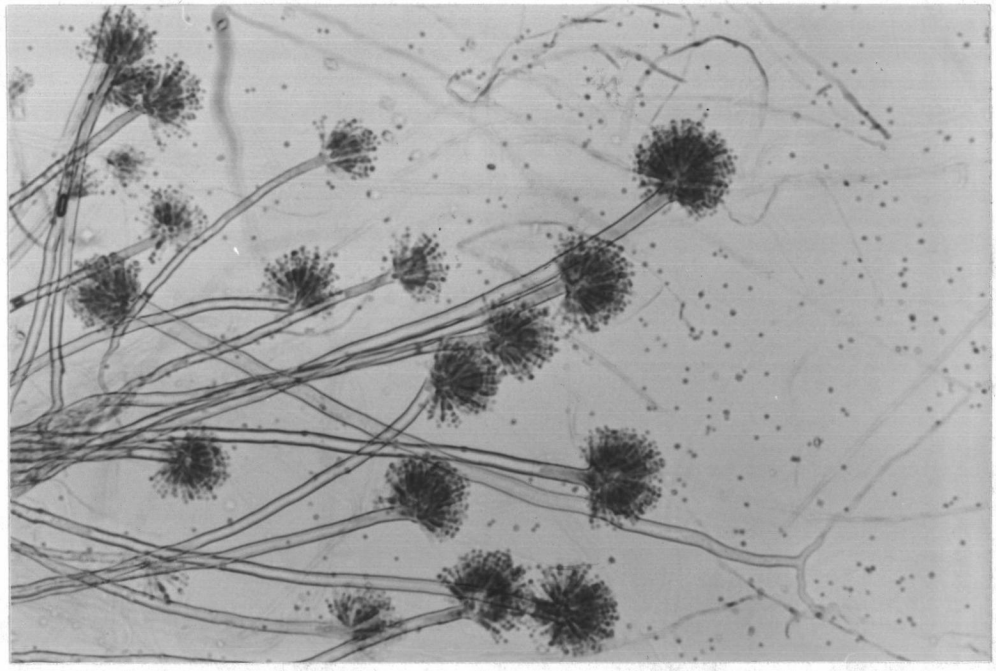
Aspergillus clavatus โดยมี vesicle รูปกระบองชัด เป็นลักษณะเด่นของเชื้อนี้ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 5 ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานว่าสามารถสร้างแอฟลาทอกซินได้

นอกจากนี้ Shank และคณะ(1972) กับ Glinsukon และคณะ(1976) ยังได้รายงานว่าเชื้อราสกุลที่สามารถสร้างแอฟลาทอกซินได้อีกคือเชื้อรา *Penicillium varible*, *Penicillium puberulum*, *Penicillium frequentans*, *Pencillium citrinum*, *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus wentii*, *Aspergillus ostianus*, *Aspergillus ruber*, *Aspergillus parasiticus*, และ *Aspergillus flavus* var. Columnaris ที่สามารถสร้างแอฟลาทอกซินได้นอกเหนือจาก *Aspergillus flavus* var. Link

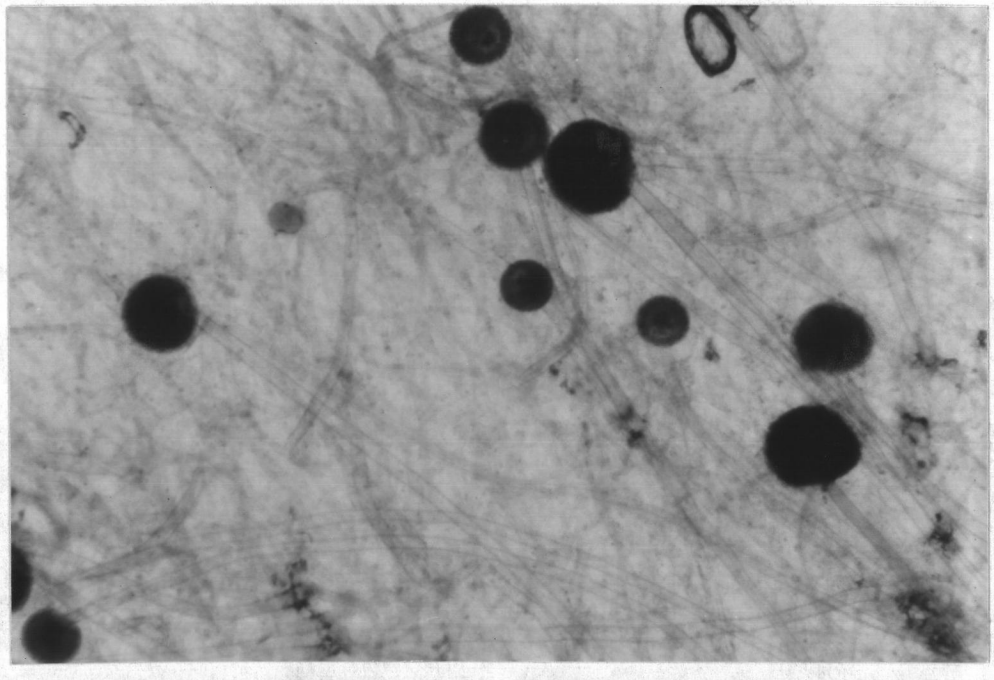


1: เชื้อราลำดับที่ 17, 2: เชื้อราลำดับที่ 26, 3: เชื้อราลำดับที่ 36
4: เชื้อราลำดับที่ 49, 5: เชื้อราลำดับที่ 54, 6: เชื้อราลำดับที่ 78
7: เชื้อราลำดับที่ 79, 8: เชื้อราลำดับที่ 83, 9: เชื้อราลำดับที่ 91
10: แอฟลาทอกซิน บี$_1$ มาตรฐาน

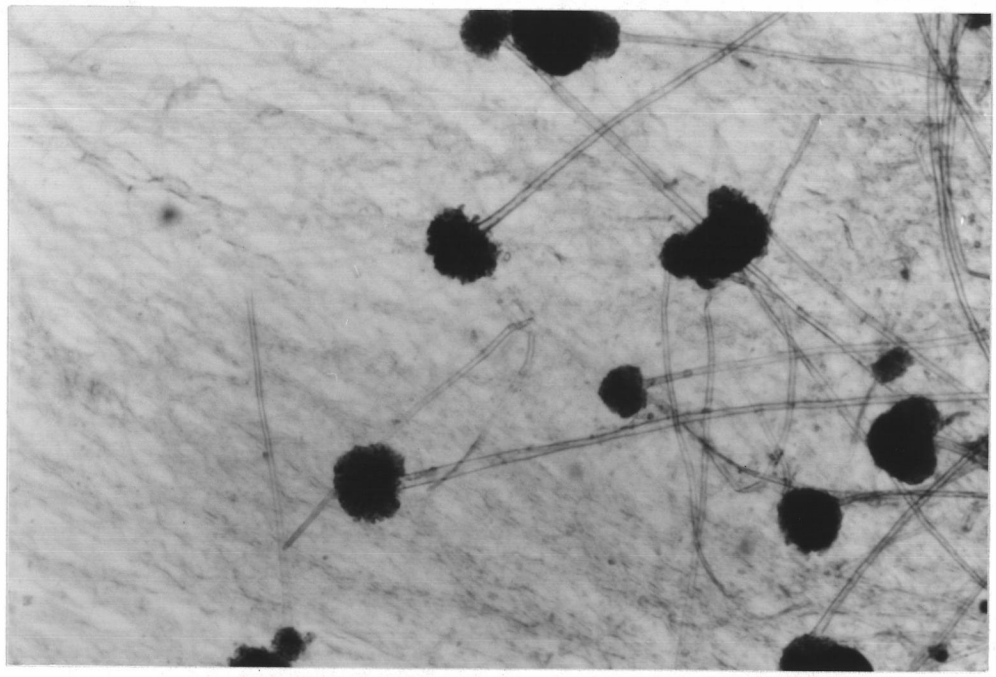
รูปที่ 1 ผลการตรวจหาแอฟลาทอกซินด้วยวิธี TLC ของเชื้อราทั้ง 9 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับแอฟลาทอกซิน บี$_1$ มาตรฐาน



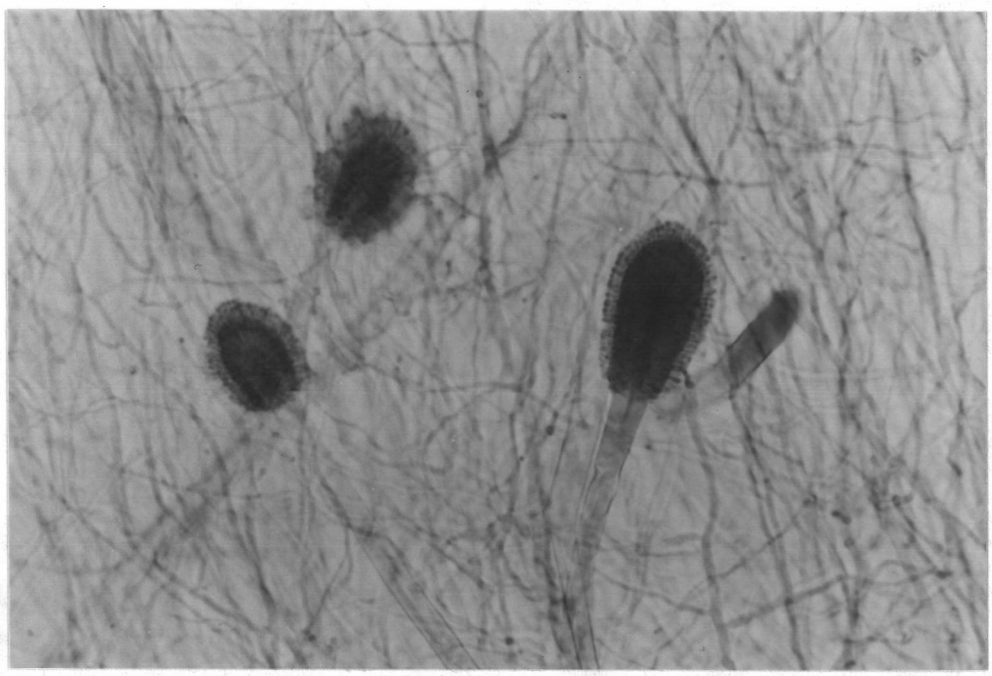
รูปที่ 2 แสดงลักษณะของเชื้อราลำดับที่ 17 จากการจัดจำแนกคือ เชื้อรา *Aspergillus* W17 (X100 เท่า)



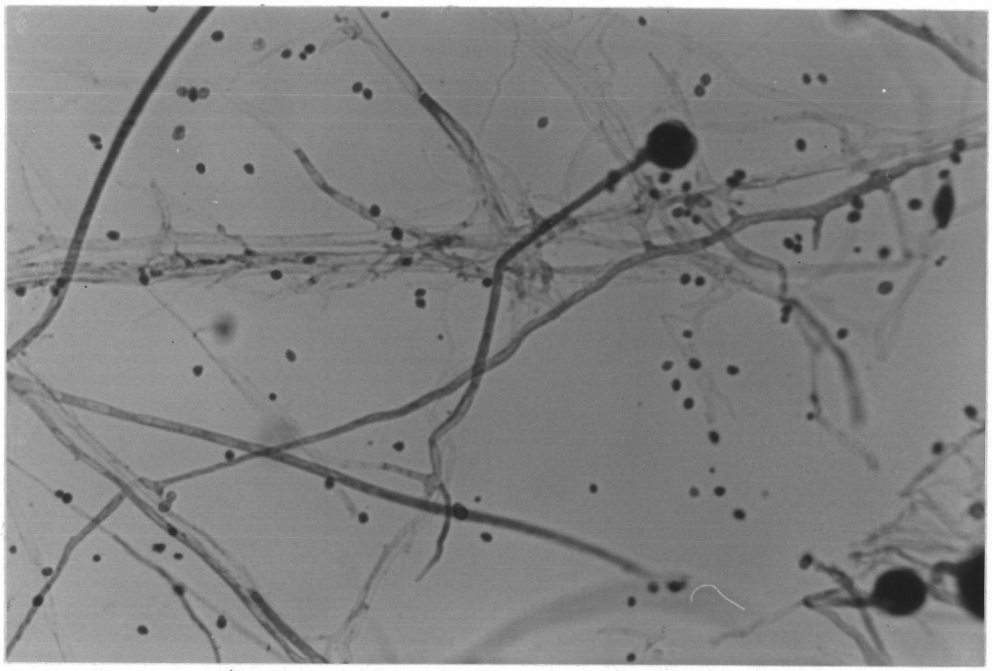
รูปที่ 3 แสดงลักษณะของเชื้อราลำดับที่ 54 จากการจัดจำแนกคือ เชื้อรา *Aspergillus* W54 (X100 เท่า)



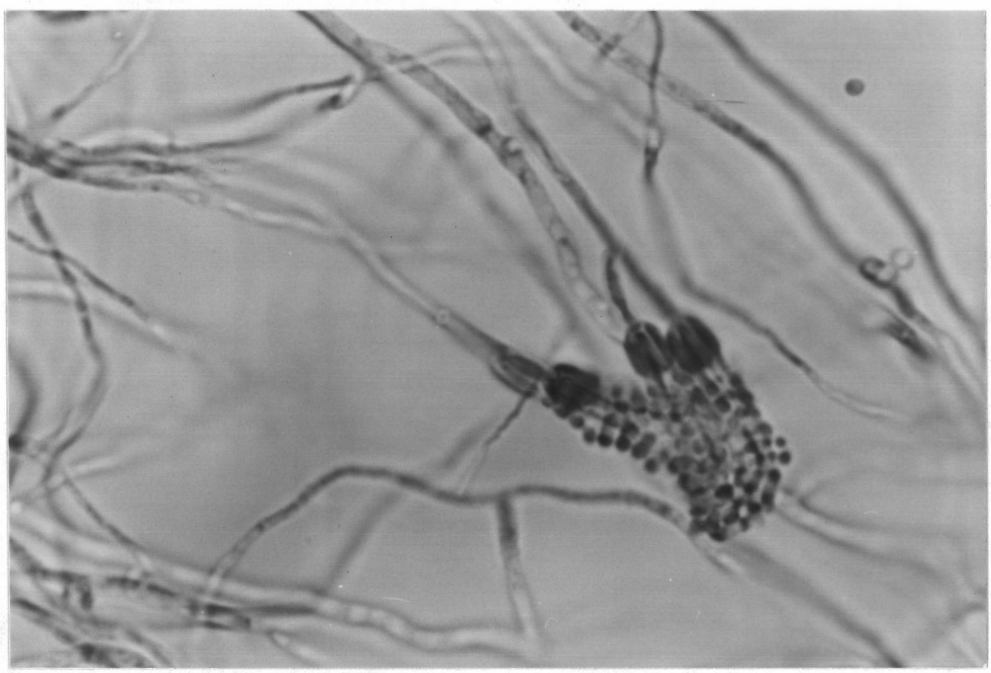
รูปที่ 4 แสดงลักษณะของเชื้อราลำดับที่ 83 จากการจัดจำแนกคือ เชื้อรา *Aspergillus* W83 (X100 เท่า)



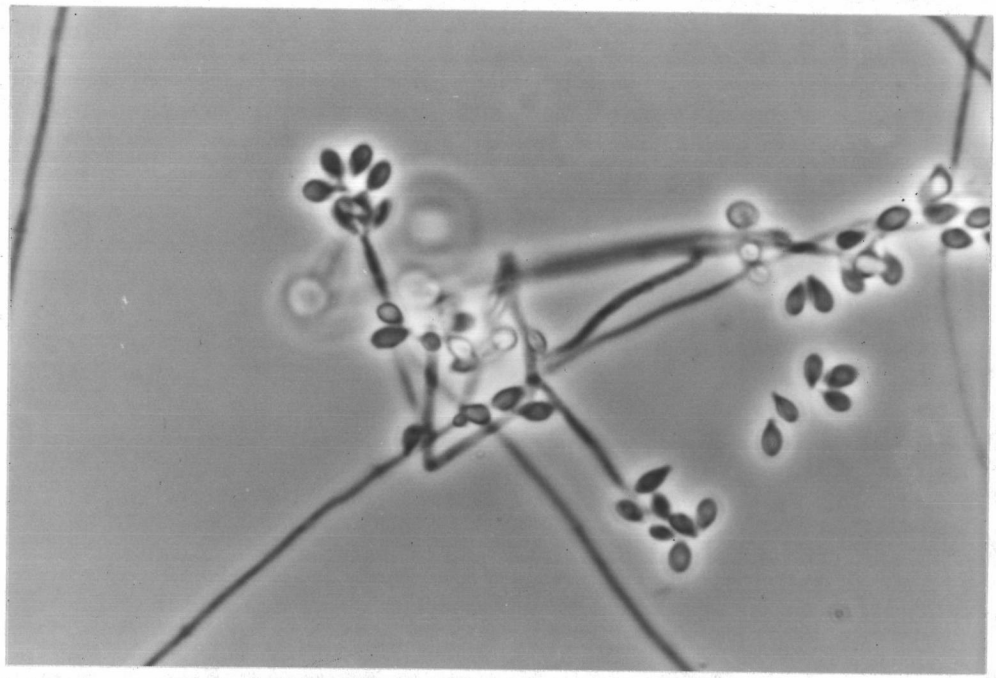
รูปที่ 5 แสดงลักษณะของเชื้อราลำดับที่ 79 จากการจัดจำแนกคือ เชื้อรา *Aspergillus* W79 (X400 เท่า)



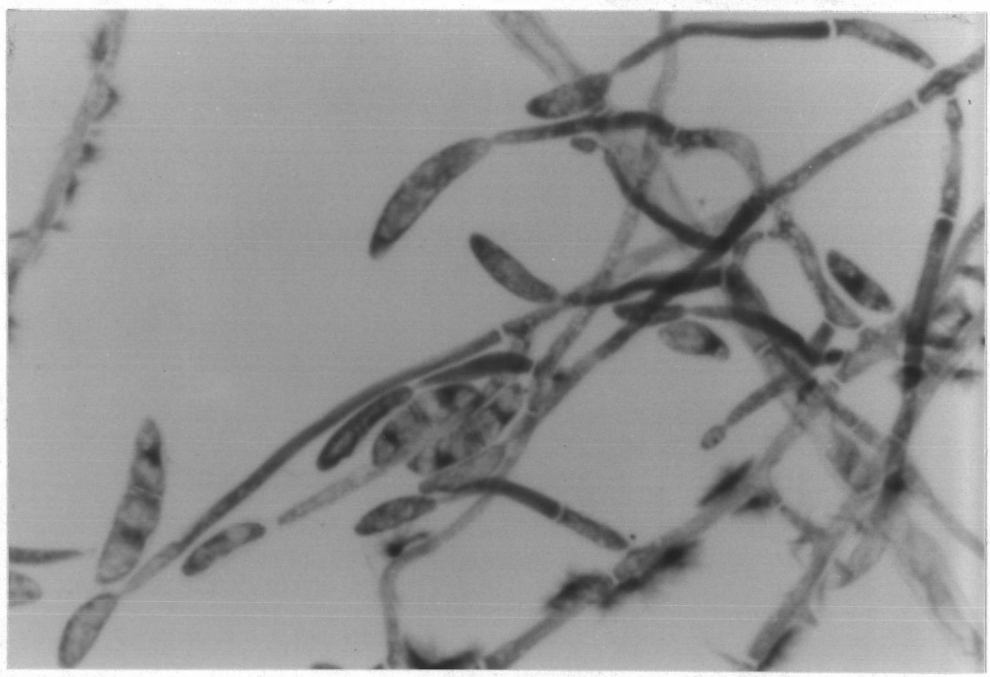
รูปที่ 6 แสดงลักษณะของเชื้อราลำดับที่ 26 จากการจัดจำแนกคือ เชื้อรา *Rhizopus* W26 (X100 เท่า)



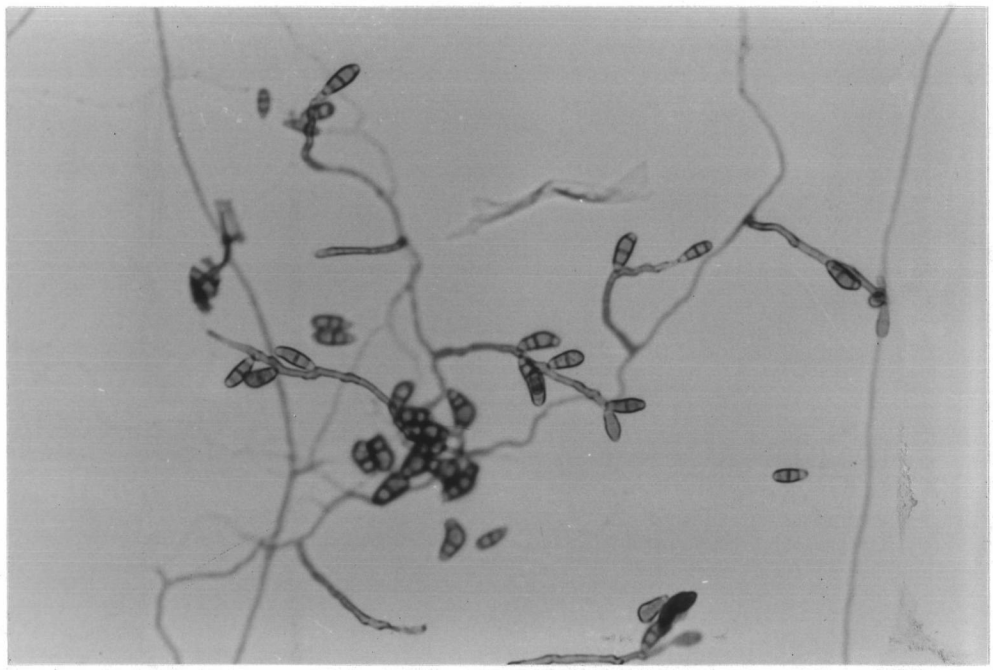
รูปที่ 7 แสดงลักษณะของเชื้อราลำดับที่ 36 จากการจัดจำแนกคือ เชื้อรา *Penicillium* W36 (X400 เท่า)



รูปที่ 8 แสดงลักษณะของเชื้อราลำดับที่ 49 จากการจัดจำแนกคือ เชื้อรา *Fonsecaea* W49 (X100 เท่า)



รูปที่ 9 แสดงลักษณะของเชื้อราลำดับที่ 78 จากการจัดจำแนกคือ เชื้อรา *Fusarium* W78 (X100 เท่า)



รูปที่ 10 แสดงลักษณะของเชื้อราลำดับที่ 91 จากการจัดจำแนกคือ เชื้อรา *Cervularia* W91 (X100 เท่า)

ดังนั้นในการคัดแยกเชื้อราที่สร้างแอฟลาทอกซิน จากวัสดุการเกษตรที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ครั้งนี้ พบว่าเชื้อราทั้ง 9 สกุลที่สร้างแอฟลาทอกซินได้ จะมีเชื้อรา 6 สกุล ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อราที่เคยมีรายงานมาแล้วว่า สามารถสร้างแอฟลาทอกซินได้คือ *Aspergillus* W17, *Aspergillus* W54, *Aspergillus* W83, *Penicillium* W36, *Rhizopus* W26 และ *Fusarium* W78

แต่เชื้อรา 3 สกุลคือ *Aspergillus* W79, *Fonsecaea* W49 และ *Curvularia* W91 ที่พบในการทดลองครั้งนี้ ยังไม่เคยมีรายงานว่า มีผู้สำรวจพบเชื้อราทั้ง 3 สกุล ว่าสามารถสร้างแอฟลาทอกซินได้ ในรูปที่ 6, 7, 8, 9 และ 10 ได้แสดงลักษณะของเชื้อรา *Rhizopus* W26, *Penicillium* W36, *Fonsecaea* W49, *Fusarium* W78 และ *Cervularia* W91 ตามลำดับ

4. <u>การสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อราแต่ละสกุลที่คัดแยกได้ ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3)</u>

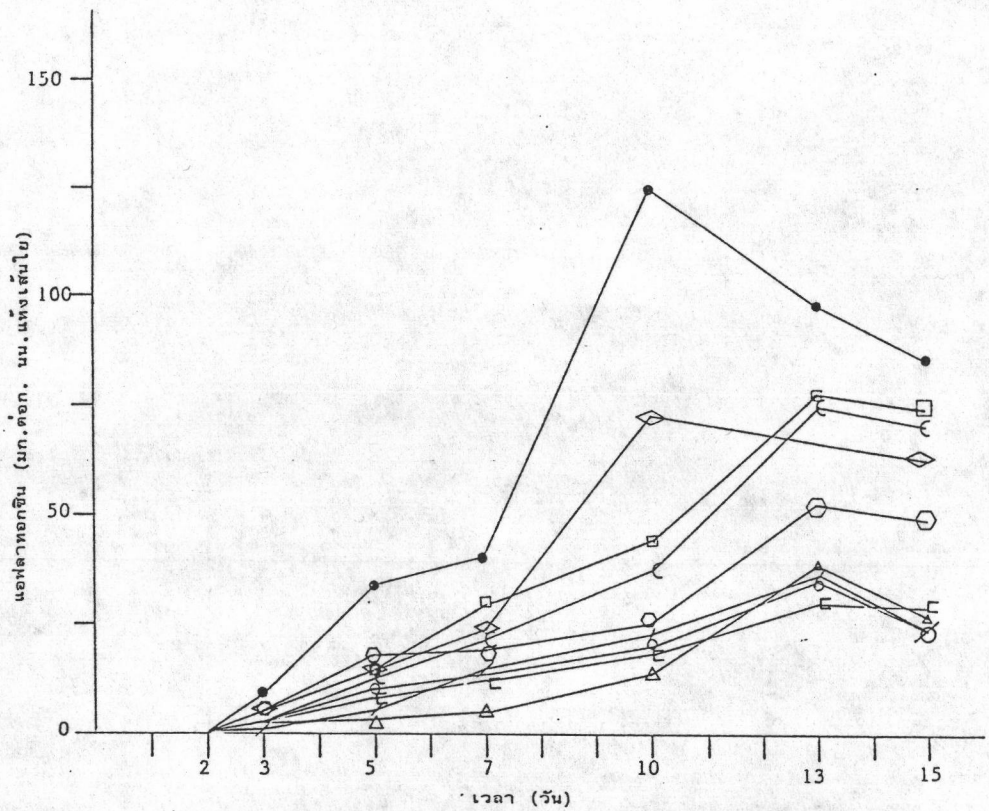
การหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของการสกัด และวิเคราะห์แอฟลาทอกซิน

การสกัดแอฟลาทอกซินในการวิจัยครั้งนี้ ได้มีการสกัดแอฟลาทอกซินออกจากตัวอย่างที่เป็นอาหารแข็ง และอาหารเหลว ซึ่งในการสกัดแอฟลาทอกซินออกจากตัวอย่างอาหารเหลว ด้วยวิธีการสกัดตามข้อ ก.1.1 และ1.3 และจากอาหารแข็งวัสดุการเกษตรตามวิธีการสกัดข้อ ก.1.2 และ 1.3 แล้ววิเคราะห์หาปริมาณแอฟลาทอกซิน ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ ก.3 (ตามวิธีสกัด และวิเคราะห์ในบทที่ 2) โดยเครื่อง HPLC Model LC-3A บริษัท Shimadzu แล้ว เมื่อทำการหาค่าเปอร์เซ็นต์ recovery จะได้ผลการทดลองดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 3 และ 4 (ในภาคผนวก ก.)

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{จำนวนแอฟลาทอกซินที่สกัดได้}}{\text{จำนวนแอฟลาทอกซินที่เติม}} \times 100$$

การทดลองหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของการสกัดแอฟลาทอกซิน โดยการเติมแอฟลาทอกซิน บี$_1$ มาตรฐาน ในปริมาณ 5, 10 หรือ 50 มค.ก.ใน 100 มล. ของอาหารเหลว หรือใน 100 ก. ของอาหารแข็งจากวัสดุการเกษตร ซึ่งผลการทดลองตามตารางที่ 3(ในภาคผนวก ก.) ได้แสดงผลการหาเปอร์เซ็นต์ recovery ของการสกัดแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ในอาหารเหลว พบว่าเปอร์เซ็นต์ recovery ของการสกัด เมื่อเติมแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ในปริมาณต่างๆ คือ 5, 10 และ 50 มค.ก.ต่อ 100 มล.ของอาหารเหลว จะมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 82.59, 93.14 และ 95.86% ตามลำดับ และจากตารางที่ 4 ผลเปอร์เซ็นต์ recovery เมื่อเติมแอฟลาทอกซิน บี$_1$ 5, 10 และ 50 มค.ก.ต่อ 100 ก. ของอาหารแข็งจากวัสดุการเกษตร มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 82.71, 91.55 และ 96.13% ตามลำดับ ซึ่งจากผลของเปอร์เซ็นต์ recovery จะเห็นว่าการสกัดแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ตลอดการวิจัยครั้งนี้ เราสามารถสกัดเอาแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ออกจากตัวอย่างได้ในปริมาณที่สูงเป็นที่น่าพอใจ

จากผลการทดลองคัดแยกเชื้อราสกุล ที่สร้างแอฟลาทอกซินได้ในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่ามีเชื้อรา 9 สกุลที่สามารถสร้างแอฟลาทอกซินได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาเปรียบเทียบการสร้างแอฟลาทอกซิน ของเชื้อราแต่ละชนิดทั้ง 9 สกุล โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมาตรฐาน บ่มเลี้ยงที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในช่วงเวลาวันที่ 2, 3, 5, 7, 10, 13 และ 15 นำน้ำเลี้ยงมาสกัดแอฟลาทอกซินตามวิธีการสกัด



: *Aspergillus* W17,
: *Penicillium* W36,
: *Aspergillus* W54,
: *Aspergillus* W79,
: *Curvularia* W91
: *Rhizopus* W26
: *Fonsecaea* W49
: *Fusarium* W78
: *Aspergillus* W83

กราฟที่ 1 ผลเปรียบเทียบการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของเชื้อราทั้ง 9 สกุล ที่คัดแยกได้ ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3) เป็นเวลา 15 วัน ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที

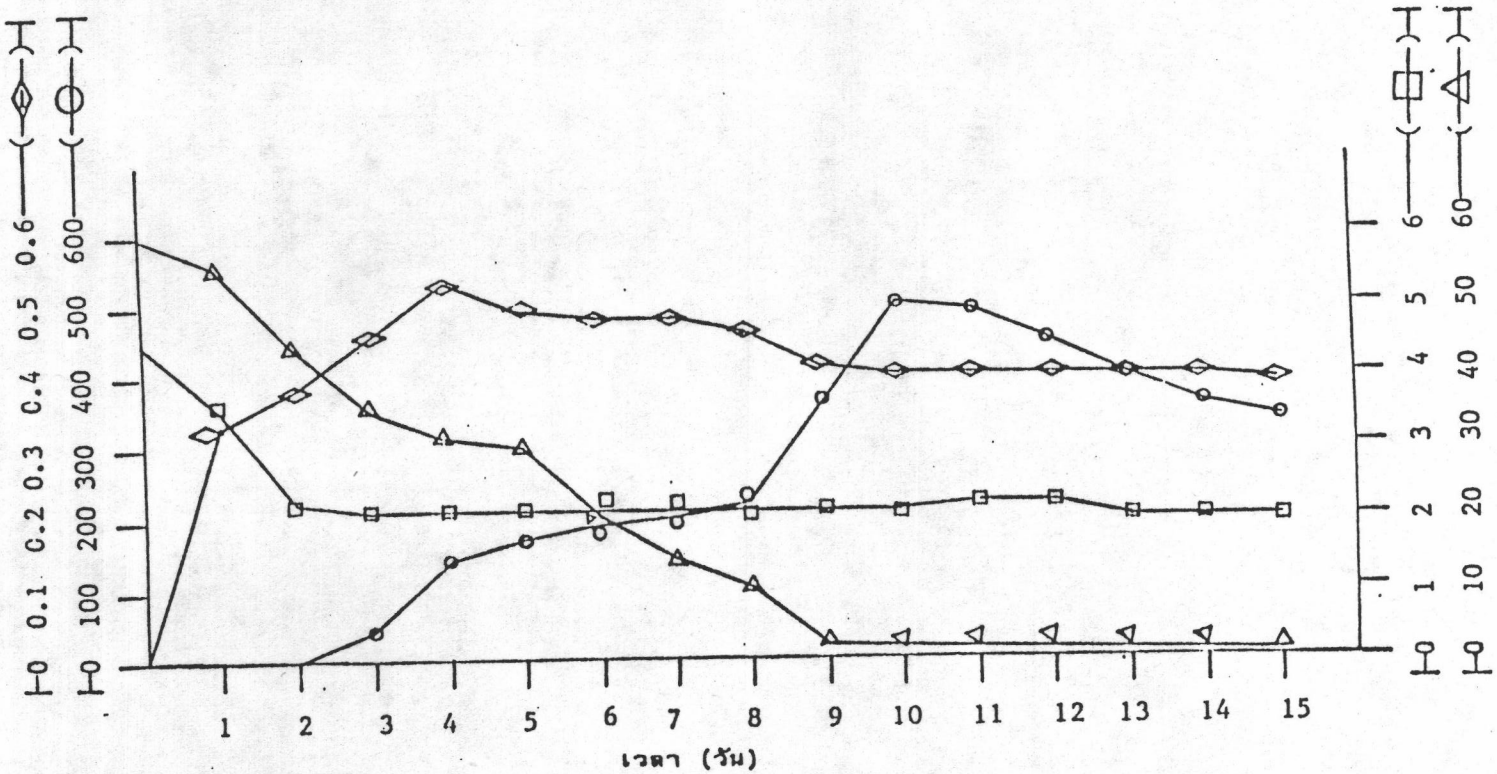
ข้อ ก.1.1 และ 1.3 แล้ว ตรวจหาปริมาณแอฟลาทอกซินด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ ก.3. แล้วเปรียบเทียบว่าเชื้อราทั้ง 9 สกุล มีสกุลใดสามารถสร้างแอฟลาทอกซินได้สูงกว่า สกุลทั้งหมดที่คัดแยกได้ ซึ่งผลการทดลองได้แสดงไว้ในกราฟที่ 1 ผลการทดลองพบว่าเชื้อราทั้ง 9 สกุล จะเริ่มมีการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง แต่ปริมาณการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของแต่ละสกุลจะแตกต่างกันไป คือจากกราฟที่ 1 *Aspergillus* W83 จะเป็นเชื้อราที่สร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้สูงกว่าเชื้อราตัวอื่นๆ คือมีปริมาณ 8.27, 33.92, 40.92, 123.58, 97.88 และ 85.82 มค.ก.ต่อก. นน.แห้งเส้นใย ในวันที่ 3, 5, 7, 10, 13 และ 15 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อตามลำดับ และเชื้อราทั้ง 3 สกุลที่ยังไม่เคยมีรายงานว่าสามารถสร้างแอฟลาทอกซินในการทดลองพบว่า *Fonsecaeas* W36, *Aspergillus* W79 และ *Curvularia* W91 จะสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้สูงถึง 39.10, 72.34 และ 35.53 มค.ก.ต่อก. นน.แห้งเส้นใย ตามลำดับ

ในกราฟที่ 1 จะเห็นว่าเชื้อรา *Aspergillus* W83 และ *Aspergillus* W79 จะมีการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ สูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง และเชื้อราที่เหลืออีก 7 สกุล จะสูงสุดในวันที่ 13 และเนื่องจากเชื้อรา *Aspergillus* W83 จะเป็นสกุลที่สามารถสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้สูงกว่าเชื้อราสกุลทั้งหมดที่คัดแยกได้ ซึ่งจะใช้ในการทดลองต่อไป

5. ศึกษาสภาวะของการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3)

เมื่อนำเชื้อรา *Aspergillus* W83 มาทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวมาตรฐาน ที่ อุณหภูมิ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาค่า นน.แห้งเส้นใย ปริมาณน้ำที่ใช้ ความเป็นกรดด่าง และการสร้างแอฟลาทอกซิน ทุกวันเป็นเวลา 15 วัน ดังผลการทดลองแสดงไว้ในกราฟที่ 2

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน จะเริ่มมีการเจริญของเชื้อราตั้งแต่ วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง และจะสูงสุดในวันที่ 4 มีค่า นน.แห้งของเส้นใย 0.5314 ก.ต่อ 100 มล.ของอาหารเหลว แล้วการเจริญจะคงที่มาจนถึงวันที่ 8 และค่อยๆลดลงในวันที่ 9 จากนั้นการเจริญจะลดลงเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณน้ำตาลกลูโคส เมื่อเริ่มมีการเจริญของเชื้อรา ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากถูกใช้ไปในการเจริญของเชื้อรา จนในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงจะเห็นว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะถูกใช้เกือบหมดคือเหลืออยู่ 2.6 มก.ต่อมล. จนสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 15 จะมีปริมาณอยู่ 0.8 มก.ต่อมล. จาก



กราฟที่ 2 แสดงสภาวะของการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3) เป็นเวลา 15 วัน ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที

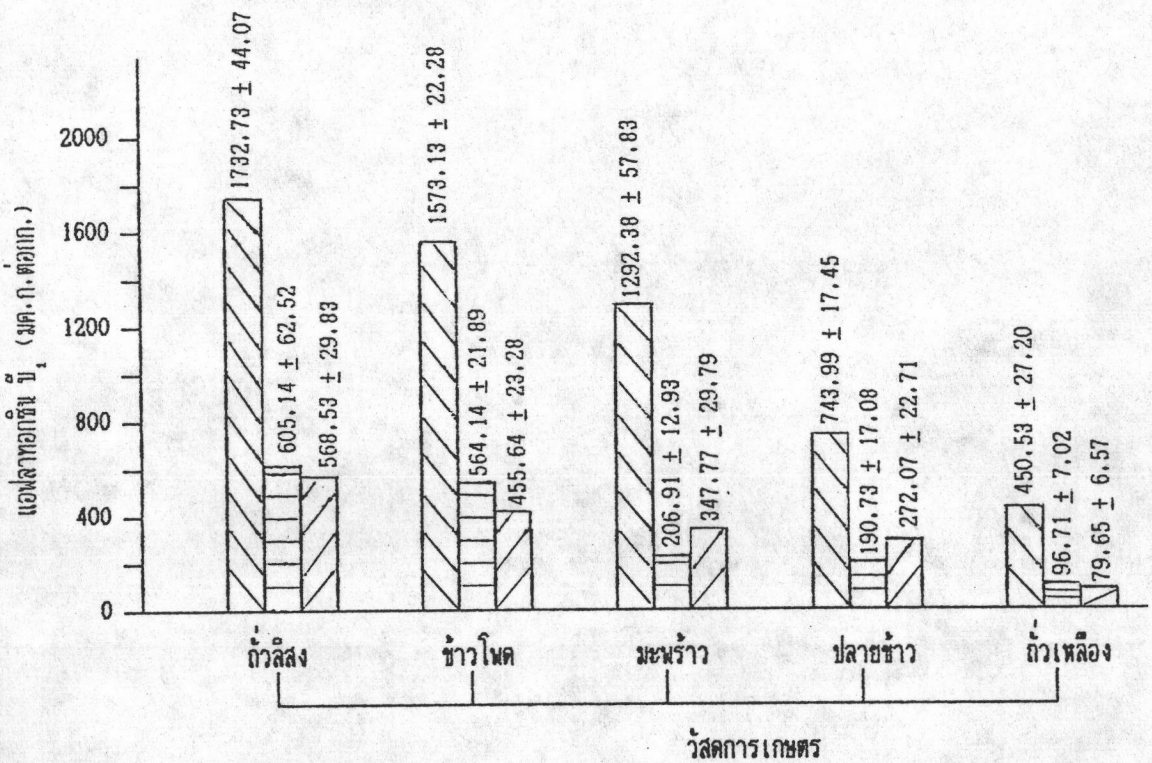
ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 60 มก.ต่อมล. ผลของความเป็นกรดด่างพบว่าจากความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 4.5 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราแล้วปรากฏว่าความเป็นกรดด่างจะลดลงคือ ในวันที่ 1 มีค่า 3.53 และในวันที่ 2 จะมีค่า 2.28 จากนั้นค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่วันที่ 3 จนสิ้นสุดการทดลอง จากกราฟจะเห็นว่ามีค่าเฉลี่ยคงที่ที่ 2.1 ผลของการสร้างแอฟลาทอกซินพบว่า ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จะปรากฏว่ามีการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ขึ้น มีค่า 38.26 มค.ก.ต่อล. และจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 4 มีค่า 131.63 มค.ก.ต่อล. ต่อจากนั้นก็จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนมีค่าสูงสุด 503.60 มค.ก.ต่อมล. ในวันที่ 10 แล้วจะมีการลดลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในการเพาะเลี้ยงวันต่อๆ มาจนสิ้นสุดการทดลอง(ค่าของผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5 ในภาคผนวก ก.)

6. <u>การศึกษาเปรียบเทียบการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสารอาหารเริ่มต้นจากวัสดุการเกษตรชนิดต่างๆ และสภาวะของการเพาะเลี้ยงเชื้อรา</u>

การเปลี่ยนแปลงสภาวะของการเพาะเลี้ยง 2 สภาวะคือทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวมาตรฐานปรับปรุง(สูตรที่ 4ข.) และบนอาหารวัสดุการเกษตร(สูตรที่ 5ก.) ซึ่งเติมสารละลายแร่ธาตุผสม กับอาหารวัสดุการเกษตร(สูตรที่ 5ข.)ที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ และสารอาหารเริ่มต้นที่ใช้วัสดุการเกษตร 5 ชนิดคือ ถั่วลิสง ข้าวโพด มะพร้าว ปลายข้าว และถั่วเหลือง เพื่อเปรียบเทียบผลการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 30°C และเขย่า 200 รอบต่อนาที สำหรับการทดลองในอาหารเหลวสูตรที่ 4ข. ผลของการทดลองแสดงไว้ในกราฟที่ 3

ผลของการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ในอาหารสูตรที่ 5ก.ที่นึ่งฆ่าเชื้อ อาหารสูตรที่ 5ข.ที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ และอาหารเหลวสูตรที่ 4ข. มีค่าดังนี้คือ ในประเภท ถั่วลิสงมีค่า 1732.73 + 44.07, 605.14 + 62.52 และ 568.53 + 29.83 มค.ก.ต่อกก., ข้าวโพดมีค่า 1573.13 + 22.28, 564.14 + 21.89 และ 455.64 + 23.28 มค.ก.ต่อกก., มะพร้าวมีค่า 1292.38 + 57.83, 206.91 + 12.93 และ 347.77 + 29.79 มค.ก.ต่อกก., ในปลายข้าวมีค่า 743.99 + 17.45, 190.73 + 17.08 และ 272.07 + 22.71 มค.ก.ต่อกก. และในถั่วเหลืองมีค่า 450.53 + 27.20, 96.17 + 7.02 และ 79.65 + 6.57 มค.ก.ต่อกก. ตามลำดับ

ค่าของปริมาณแอฟลาทอกซิน บี$_1$ จากกราฟที่ 3 ได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้อาหารวัสดุการเกษตรสูตรที่ 5ก.ที่นึ่งฆ่าเชื้อ เพาะเลี้ยงเชื้อรา จะทำให้ปริมาณการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้สูงกว่าการใช้อาหารวัสดุการเกษตรสูตรที่ 5ข.ที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ ไม่ว่าจะบ่มเลี้ยงบนอาหารประเภทใดทั้ง 5 ชนิด ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากการที่อาหารสูตรที่ 5ก.



: เลี้ยงเชื้อบนอาหารที่เตรียมจากวัสดุการเกษตร(สูตรที่ 5ก.)ที่ปรับปรุง(นึ่งฆ่าเชื้อ)

: เลี้ยงเชื้อบนอาหารที่เตรียมจากวัสดุการเกษตร(สูตรที่ 5ข.)ไม่ปรับปรุง(ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ)

: เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวมาตรฐานปรับปรุง(สูตรที่ 4ข.)

กราฟที่ 3 เปรียบเทียบการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 เมื่อเปลี่ยนแปลงสารอาหารเริ่มต้นจากวัสดุการเกษตร โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งและอาหารเหลวสกัดจากวัสดุการเกษตร

ได้รับการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำร้อน ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C ทำให้คุณสมบัติของวัสดุการเกตรที่ใช้เลี้ยงเชื้อรามีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม จึงทำให้เชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ 5ก.ที่เปลี่ยนแปลงการใช้วัสดุการเกษตรทั้ง 5 ประเภท สามารถมีการนำเอาสารอาหารมาใช้ และการเจริญของเส้นใยได้ดีกว่า การบ่มเลี้ยงเชื้อราบนอาหารสูตรที่ 5ข.ที่ไม่มีการนึ่งฆ่าเชื้อ และอาจมีสาเหตุจากการที่อาหารสูตรที่ 5ข. ไม่ได้รับการฆ่าเชื้อ จึงทำให้มีเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่มี ผลทำให้การสร้างแอฟลาทอกซินลดน้อยลงกว่าเดิม ปนเปื้อนมากับวัสดุการเกษตรที่ใช้เป็นอาหาร

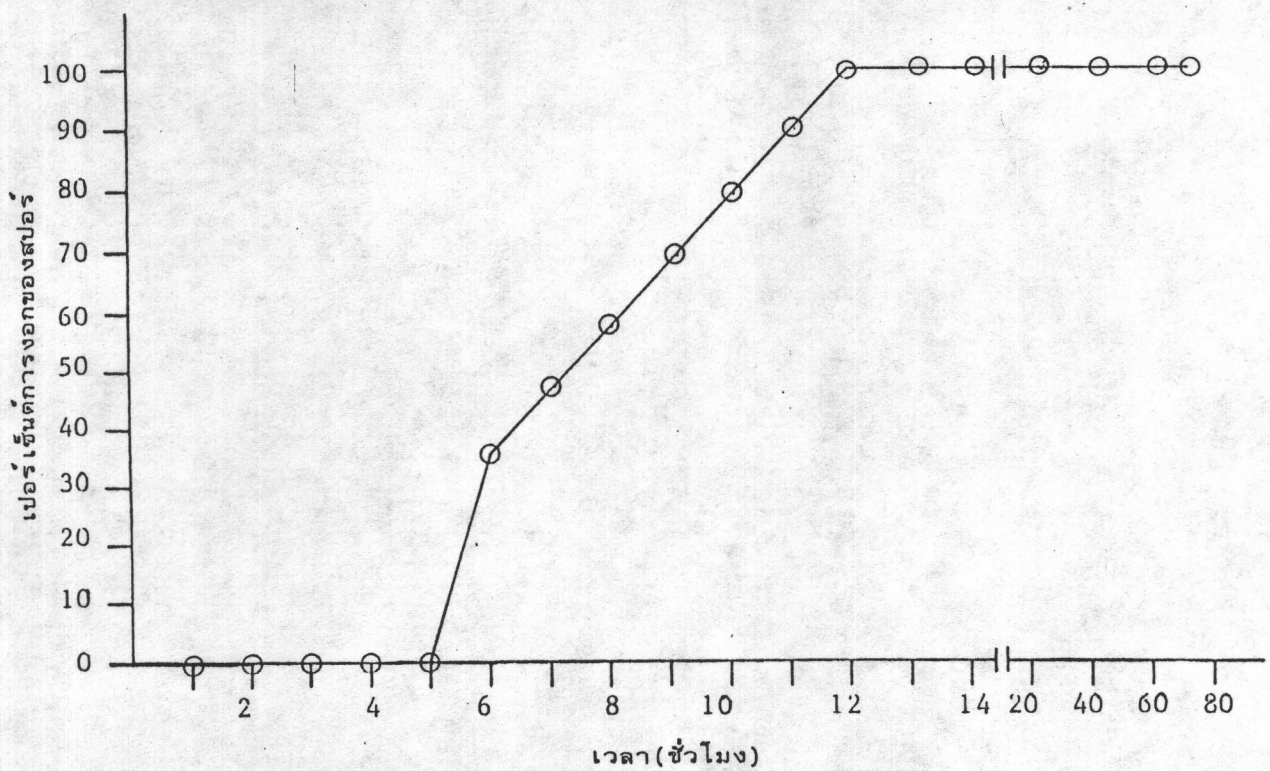
และเมื่อเปรียบเทียบการใช้อาหารสูตรที่ 5ก. กับการใช้อาหารเหลวมาตรฐานปรับปรุง(สูตรที่ 4ข.) ผลของการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของเชื้อราบนอาหารสูตรที่ 5ก. ก็จะสูงกว่าการใช้อาหารเหลวสูตรที่ 4ข. ไม่ว่าจะเปลี่ยนแปลงสารอาหารเริ่มต้น จากวัสดุการเกษตรเป็นชนิดใดที่ใช้ทดลองครั้งนี้ จึงเห็นว่าการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา เมื่อบ่มเลี้ยงบนอาหารแข็ง จะสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งปรากฏการณ์การสร้างแอฟลาทอกซินได้สูงในอาหารแข็งนี้ ก็ได้มีการรายงานมาแล้ว(ธีระยุทธ, 2525)

และผลของการใช้สภาวะอาหารสูตรที่ 5ข.ที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ ก็ยังให้ผลสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 4ข. ในสารอาหารเริ่มต้นประเภท ถั่วลิสง ข้าวโพด และถั่วเหลือง แต่ในประเภท มะพร้าว และปลายข้าว การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรที่ 4ข. จะให้ผลที่สูงกว่า อาจเนื่องจากว่าในอาหารสูตรที่ 5ข.ที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อ อาจจะมีเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่มีผลทำให้การสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ลดน้อยลง

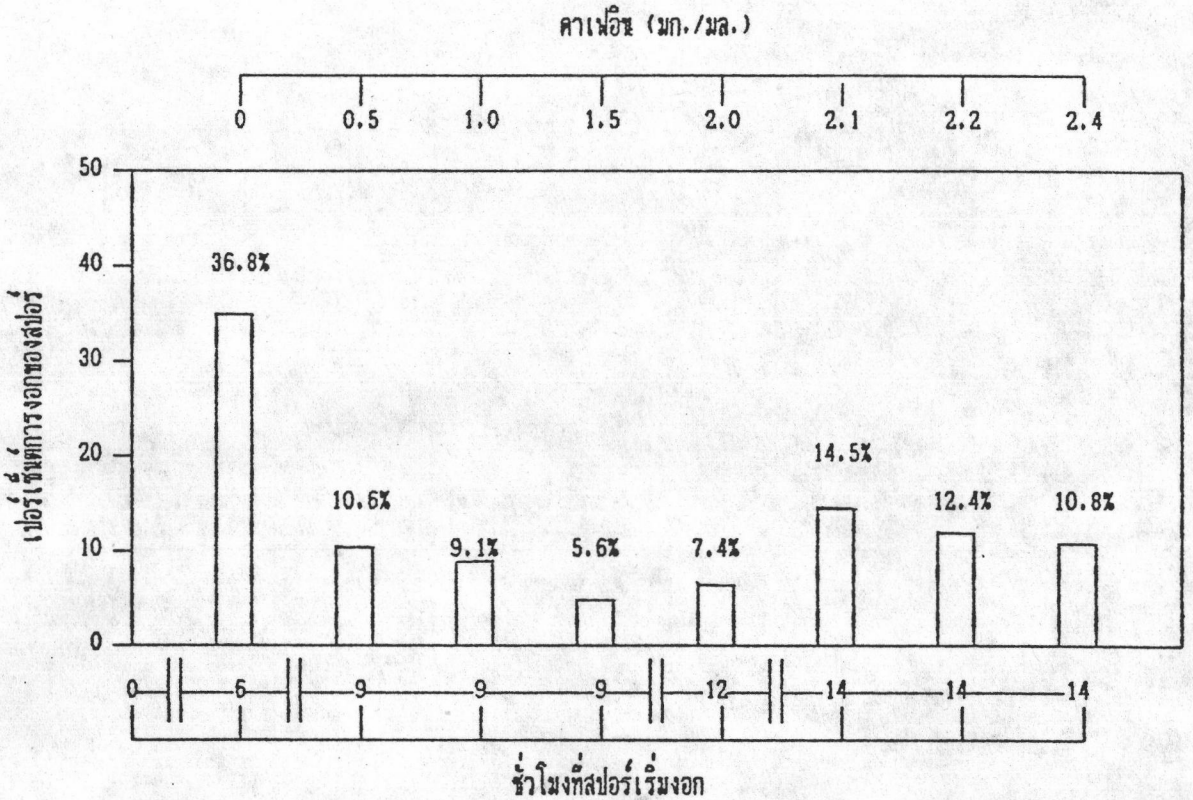
ผลการเปรียบเทียบสารอาหารเริ่มต้นทั้ง 5 ประเภทพบว่า ถั่วลิสงและข้าวโพดจะทำให้มีการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้ดีกว่าอาหารประเภทอื่น และที่รองลงมาคือ มะพร้าว ปลายข้าว และถั่วเหลือง โดยเฉพาะถั่วเหลืองจะพบว่า การสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ จะต่ำกว่าประเภทอื่นมาก ซึ่งผลการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของถั่วเหลืองนี้ ให้ผลเช่นเดียวกับ Dusanee และคณะ(1986) ที่รายงานการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ บนอาหารประเภทถั่วเหลืองจะมีน้อยกว่าบนวัสดุการเกษตรประเภทอื่นๆ อาจมีสาเหตุมากจากการขาดแคลนธาตุสังกะสีในถั่วเหลือง ซึ่งจากรายงานของ Stossel(1986) และ Failla และคณะ(1986) กล่าวว่า เชื้อราต้องการธาตสังกะสีช่วยในการสร้างแอฟลาทอกซิน และธาตสังกะสีที่อิสระในถั่วเหลืองจะมีปริมาณต่ำกว่าวัสดุการเกษตรชนิดอื่นๆ เนื่องจากธาตุสังกะสีสามารถเกาะติดกับอนุภาคภายในของถั่วเหลืองได้ดี น่าจะมีผลทำให้ปริมาณการสร้างแอฟลาทอกซินลดลง

7. <u>การศึกษาผลของสารคาเฟอีนและโซเดียมเบนโซเอท ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3)</u>

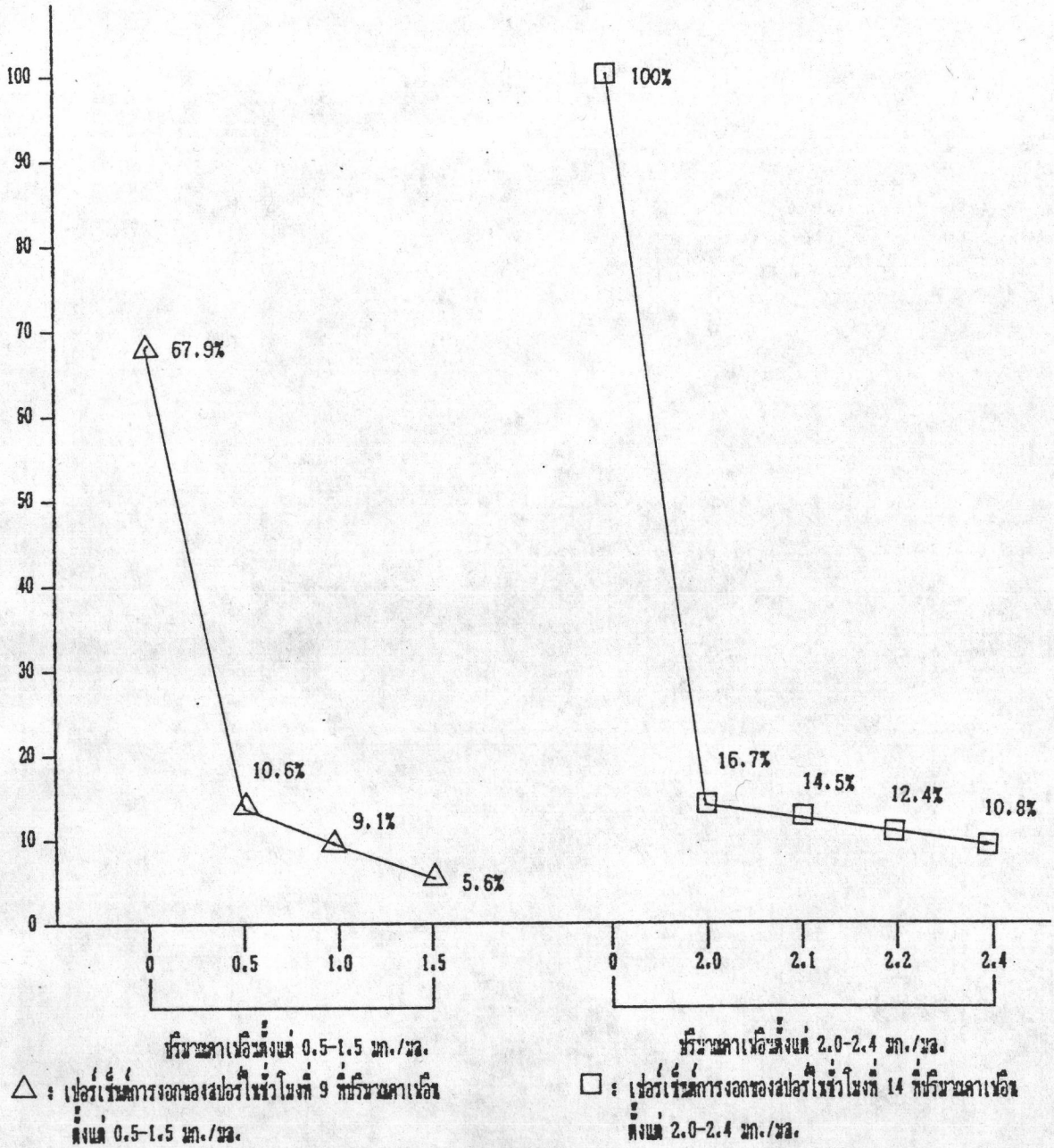
ในการทดลองจะเลี้ยงสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในปริมาตร 5 มล.



<u>กราฟที่ 4</u> แสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus* W83 ตั้งแต่เวลา 0-72 ชั่วโมง เมื่อไม่มีสารยับยั้งใดๆ ในอาหารเหลวมาตรฐาน ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที



กราฟที่ 5 ผลของสารคาเฟอีนที่ความเข้มข้น 0-2.4 มก./มล. ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3) ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที



กราฟที่ 6 แสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 9 ที่ปริมาณความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5-1.5 มก.ต่อมล. และในชั่วโมงที่ 14 ที่ปริมาณความเข้มข้นตั้งแต่ 2.0-2.4 มก./มล. เปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ เมื่อไม่มีสารยับยั้งใดๆ ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3)

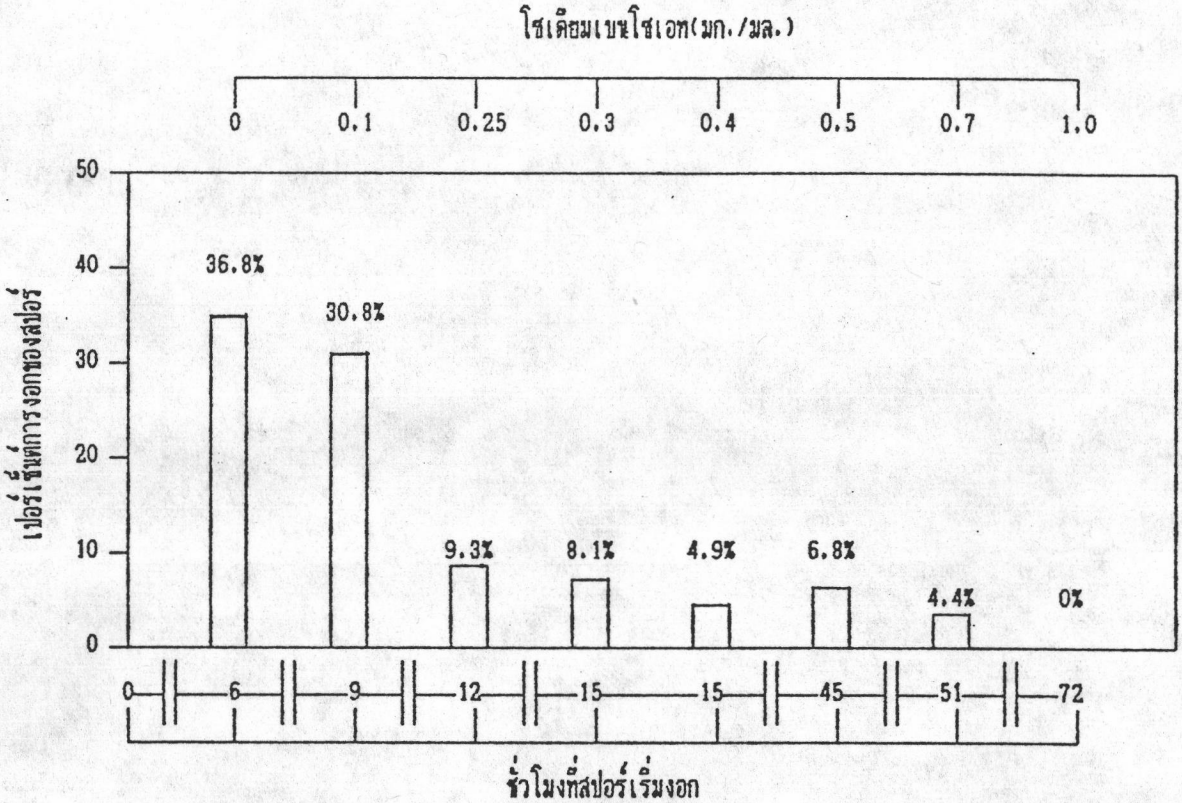
ของสปอร์ที่มีจำนวนสปอร์ $8x10^5$ สปอร์ต่อมล. ในอาหารเหลวมาตรฐานปริมาตร 95 มล. ที่มีสาร คาเฟอีน โซเดียมเบนโซเอท และสารผสมระหว่างคาเฟอีนกับโซเดียมเบนโซเอท ที่มีความเข้มข้นต่างๆละลายอยู่ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°C เขย่า 200 รอบต่อนาที แล้วทำการตรวจสอบการงอกของสปอร์ทุกชั่วโมงตั้งแต่ 0 ถึง 72 ชั่วโมงด้วยเครื่องนับ Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งผลการทดลองได้แสดงไว้ในกราฟที่ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9

จากกราฟที่ 4 ได้แสดงผลเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus* W83 เมื่อไม่มีสารยับยั้งใดๆ ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3) ซึ่งผลการทดลองจากกราฟสปอร์ของเชื้อรา จะเริ่มงอกในชั่วโมงที่ 6 เป็นจำนวน 36.8% และจำนวนการงอกของสปอร์จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆในชั่วโมงต่อมา และในชั่วโมงที่ 12 สปอร์จะงอกครบ 100%

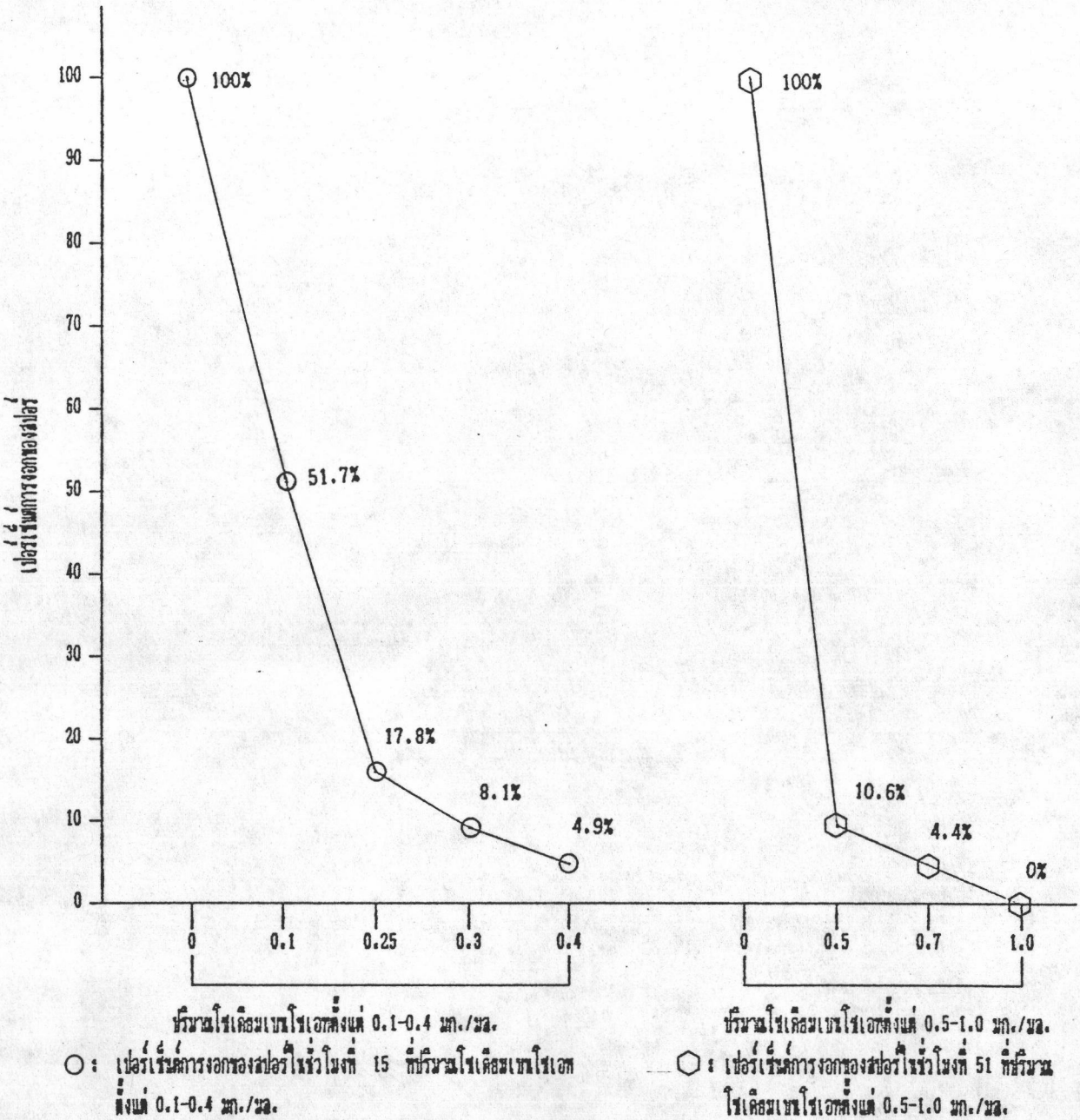
กราฟที่ 5 แสดงผลของสารคาเฟอีนที่ความเข้มข้น 0-2.4 มก.ต่อมล. ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน ผลจากกราฟคาเฟอีนสามารถยับยั้งการเริ่มงอกของสปอร์ได้นานในเวลาต่างๆกัน ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารคือที่ปริมาณสาร 0.5-1.5 มก.ต่อมล. สปอร์เริ่มงอกชั่วโมงที่ 9 ที่ 2.0 มก.ต่อมล. เริ่มงอกชั่วโมงที่ 12 และที่ความเข้มข้น 2.1, 2.2 และ 2.4 มก.ต่อมล. สปอร์จะเริ่มงอกชั่วโมงที่ 14 ทั้งสามความเข้มข้น

ความสามารถของคาเฟอีนที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งจำนวนการงอกของสปอร์ได้แสดงไว้ในกราฟที่ 6 ที่แสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 9 ของปริมาณคาเฟอีนตั้งแต่ 0.5-1.5 มก.ต่อมล. และชั่วโมงที่ 14 ที่ปริมาณคาเฟอีนที่ 2.0-2.4 มก.ต่อมล.จะเห็นว่าในชั่วโมงที่ 9 เปอร์เซ็นต์ การงอกของสปอร์ที่ปริมาณสาร 0.5, 1.0 และ 1.5 มก.ต่อมล. มีค่า 10.6%, 9.1% และ 5.6% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการงอกตามปกติของสปอร์ที่มีค่า 67.9% แล้ว การงอกของสปอร์จะลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น และการลดลงของการงอกมีค่า 84.38%, 86.59%, และ 91.75% ตามลำดับ

และในชั่วโมงที่ 14 เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ที่ความเข้มข้นสาร 2.0, 2.1, 2.2 และ 2.4 มก.ต่อมล. ก็จะมีค่าลดลงเช่นเดียวกับ ในช่วงปริมาณสาร 0.5-1.5 มก.ต่อมล. ซึ่งจำนวนสปอร์ที่งอกมีค่าเท่ากับ 16.7%, 14.5%, 12.4% และ 10.8% ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับการงอกของสปอร์ตามปกติ ซึ่งในชั่วโมงที่ 14 จะมีค่า 100% แล้ว จะมีค่าลดลง 83.3%, 85.5%, 87.6% และ 89.2% ตามลำดับ จะเห็นว่าในการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 9 กับชั่วโมงที่ 14 จำนวนการงอกของสปอร์ จะลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารคาเฟอีน ซึ่งปรากฏการณ์ของสารคาเฟอีนที่ยับยั้งการงอกของสปอร์ที่แบ่งเป็นสองช่วงความเข้มข้นแบบนี้ ยังไม่เคยมีใครพบหรือวิจารณ์ว่าเป็นผลเกิดจากสาเหตุใด



กราฟที่ 7 ผลของสารโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้น 0-1.0 มก./มล. ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3) ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที



○ : เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ในข่าวโมงที่ 15 ที่ปริมาณโซเดียมเบนโซเอทตั้งแต่ 0.1-0.4 มก./มล.

⬡ : เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ในข่าวโมงที่ 51 ที่ปริมาณโซเดียมเบนโซเอทตั้งแต่ 0.5-1.0 มก./มล.

กราฟที่ 8 แสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ในข่าวโมงที่ 15 ที่ปริมาณโซเดียมเบนโซเอทตั้งแต่ 0.1-0.4 มก.ต่อมล. และในข่าวโมงที่ 51 ที่ปริมาณโซเดียมเบนโซเอทตั้งแต่ 0.5-1.0 มก./มล. เปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เมื่อไม่มีสารยับยั้งใดๆ ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3)

กราฟที่ 7 แสดงผลของสารโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้น 0-1.0 มก.ต่อมล. ต่อการงอกของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน ผลในกราฟที่ 7 โซเดียมเบนโซเอทก็จะสามารถยับยั้ง เวลาที่สปอร์ใช้เริ่มต้นงอกในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้นคือ ที่ปริมาณสาร 0.1 และ 0.25 มก.ต่อมล. จะเริ่มงอกในชั่วโมงที่ 9 และ 12 ตามลำดับ ที่ 0.3 และ 0.4 มก.ต่อมล. เริ่มงอกชั่วโมงที่ 15 ทั้งสองความเข้มข้น และที่ 0.5 และ 0.7 มก.ต่อมล. จะเริ่มงอกชั่วโมงที่ 45 และ 51 ตามลำดับ ส่วนที่ 1.0 มก.ต่อมล. ในเวลา 72 ชั่วโมงยังไม่พบว่ามีการงอกของสปอร์เกิดขึ้น

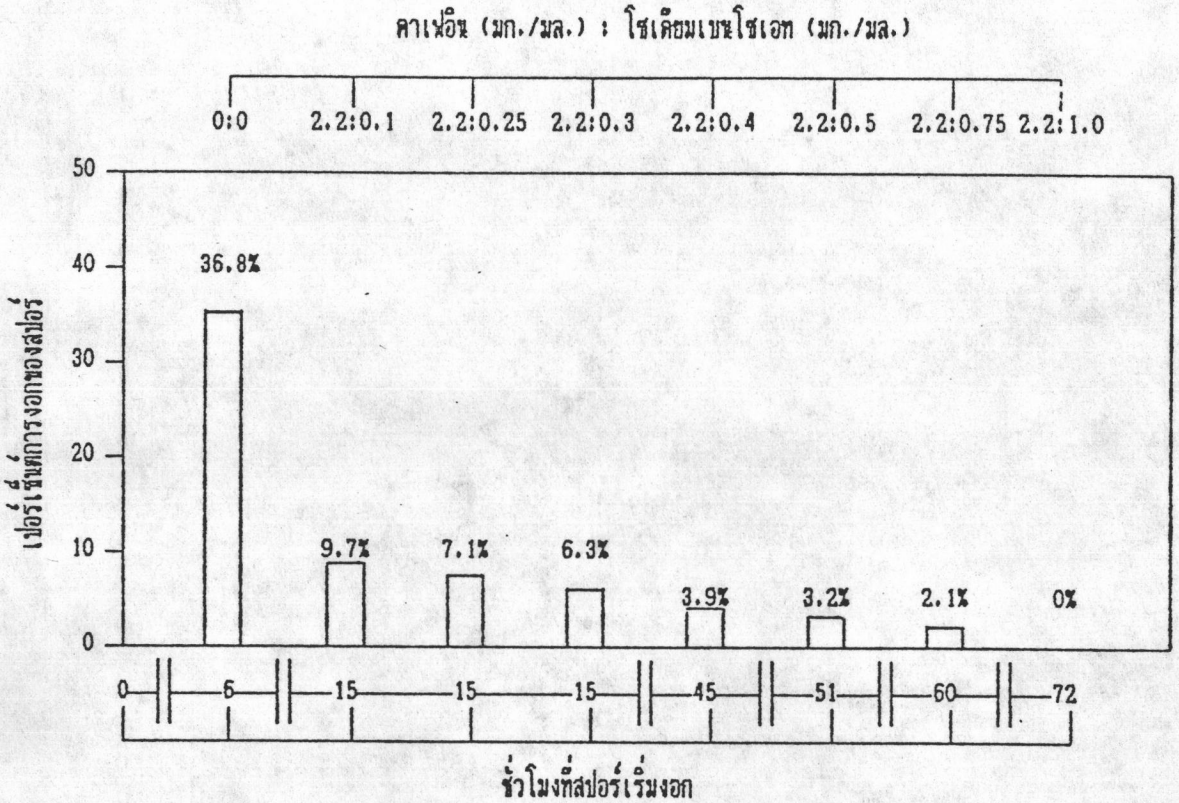
และความสามารถของโซเดียมเบนโซเอทในปริมาณต่างๆ ต่อการยับยั้งจำนวนสปอร์ที่มีการงอก ได้แสดงไว้ในกราฟที่ 8 ซึ่งแสดงเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 15 ที่ปริมาณสารตั้งแต่ 0.1-0.4 มก.ต่อมล. และชั่วโมงที่ 51 ที่ปริมาณสารตั้งแต่ 0.5-1.0 มก.ต่อมล.

ผลในกราฟที่ 8 จะเห็นว่าในชั่วโมงที่ 15 เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ที่ปริมาณสาร 0.1, 0.25, 0.3 และ 0.4 มก.ต่อมล. มีค่าเท่ากับ 51.7%, 9.3%, 8.1% และ 4.9% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับจำนวนสปอร์ที่งอกตามปกติในชั่วโมงที่ 15 ที่มีค่า 100% ค่าลดลงของจำนวนการงอกของสปอร์คือ 48.3%, 90.7%, 91.9% และ 95.1% ตามลำดับ

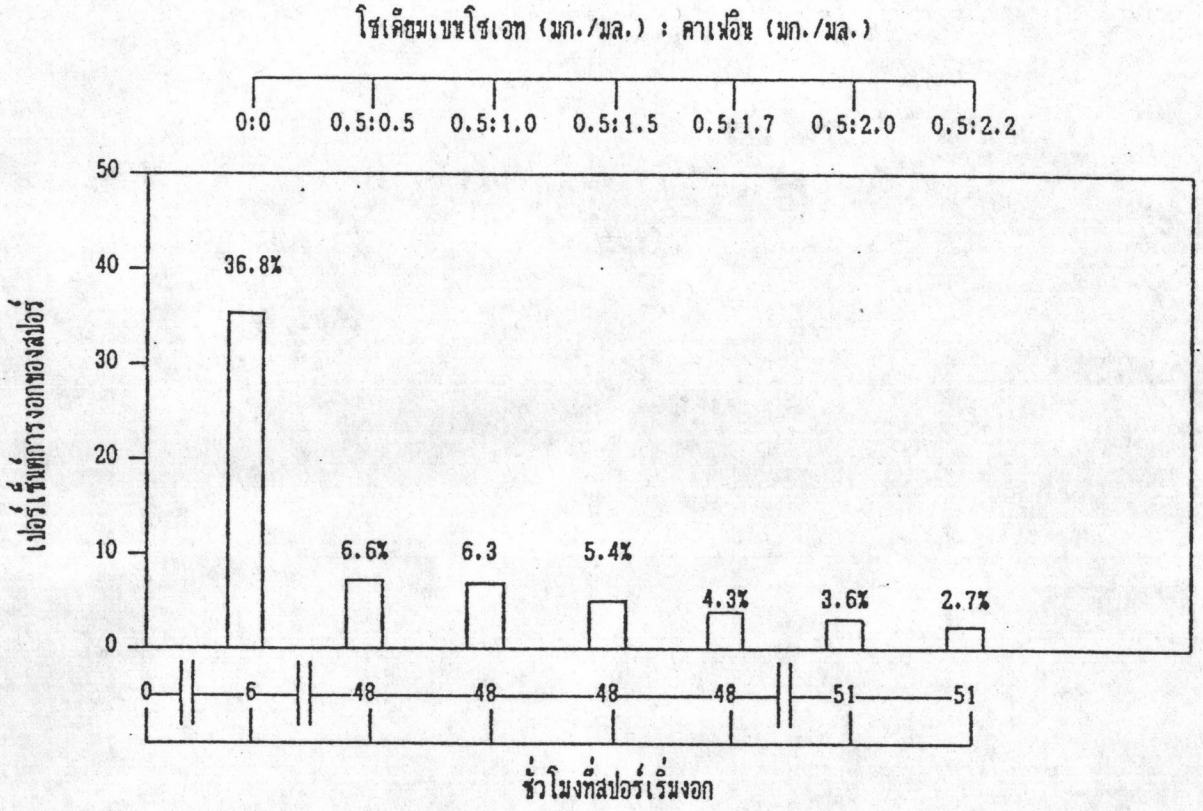
และชั่วโมงที่ 51 เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ที่ปริมาณโซเดียมเบนโซเอท 0.5, 7.0 และ 1.0 มก.ต่อมล. มีค่าเท่ากับ 10.6%, 4.4% และ 0% ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับการงอกตามปกติของสปอร์ในชั่วโมงที่ 51 ที่มีค่า 100% จำนวนสปอร์จะมีค่าการงอกลดลงเท่ากับ 89.4%, 95.6% และ 100% ตามลำดับ จะเห็นว่าในการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 15 กับชั่วโมงที่ 51 จำนวนการงอกของสปอร์จะลดลงตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของสารโซเดียมเบนโซเอท ซึ่งปรากฏการณ์ของโซเดียมเบนโซเอทที่ยับยั้งการงอกของสปอร์ที่แบ่งเป็นสองความเข้มข้นแบบนี้ ยังไม่เคยมีใครพบ หรือวิจารณ์ว่าเป็นผลเกิดจากสาเหตุใด

จากกราฟที่ 9 เป็นผลการงอกของสปอร์ *Aspergillus* W83 ในสารผสมคาเฟอีนกับโซเดียมเบนโซเอท เมื่อกำหนดให้คาเฟอีนคงที่ที่ 2.2 มก.ต่อมล. และแปรผันโซเดียมเบนโซเอทตั้งแต่ 0.1-1.0 มก.ต่อมล. ในอาหารเหลวมาตรฐาน ผลที่ได้พบว่าปริมาณสารทั้งสองในสารผสมแทบจะไม่มีการเสริมแรงกัน เพื่อยับยั้งการงอกของสปอร์เลย แต่เมื่อเพิ่มปริมาณโซเดียมเบนโซเอทตั้งแต่ 0.4 มก.ต่อมล. จะพบว่าสารทั้งสองสามารถเสริมแรงกันยับยั้งการเริ่มงอกของสปอร์ได้ในระยะเวลายาวนานขึ้น

และจากการกราฟที่ 10 เมื่อกำหนดให้โซเดียมโซเอทคงที่ที่ 0.5 มก.ต่อมล. แล้วแปรผันคาเฟอีนตั้งแต่ 0.5-2.2 มก.ต่อมล. พบว่าเมื่อใช้ปริมาณคาเฟอีนในช่วง 0.5-1.7 มก.ต่อมล. จะมีการเสริมแรงกันของสารทั้งสองได้แต่ไม่มากนัก ซึ่งจากกราฟ



กราฟที่ 9 ผลการงอกของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus* W83 ในสารผสมระหว่างคาเฟอีนกับโซเดียมเบนโซเอท เมื่อกำหนดให้คาเฟอีนคงที่ที่ 2.2 มก./มล. และแปรผันปริมาณโซเดียมเบนโซเอทตั้งแต่ 0.1-1.0 มก./มล. ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3) ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที



กราฟที่ 10 ผลการงอกของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus* W83 ในสารผสมระหว่างโซเดียมเบนโซเอท กับคาเฟอีน เมื่อกำหนดให้โซเดียมเบนโซเอทคงที่ที่ 0.5 มก./มล. และแปรผันปริมาณคาเฟอีนตั้งแต่ 0.5-2.2 มก./มล. ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3) ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที

เห็นว่าสามารถยับยั้งเวลาการเริ่มต้นงอกของสปอร์ออกไปอีก 3 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับการใช้โซเดียมเบนโซเอทเพียงสารเดียวที่ 0.5 มก.ต่อมล. ซึ่งสปอร์จะเริ่มงอกชั่วโมงที่ 45 และเมื่อใช้คาเฟอินเพิ่มขึ้นผลก็จะทำให้มีการมีการเสริมแรงมากขึ้น ทำให้มีการยับยั้งการเริ่มงอกของสปอร์ได้เป็นเวลานานกว่าเดิม

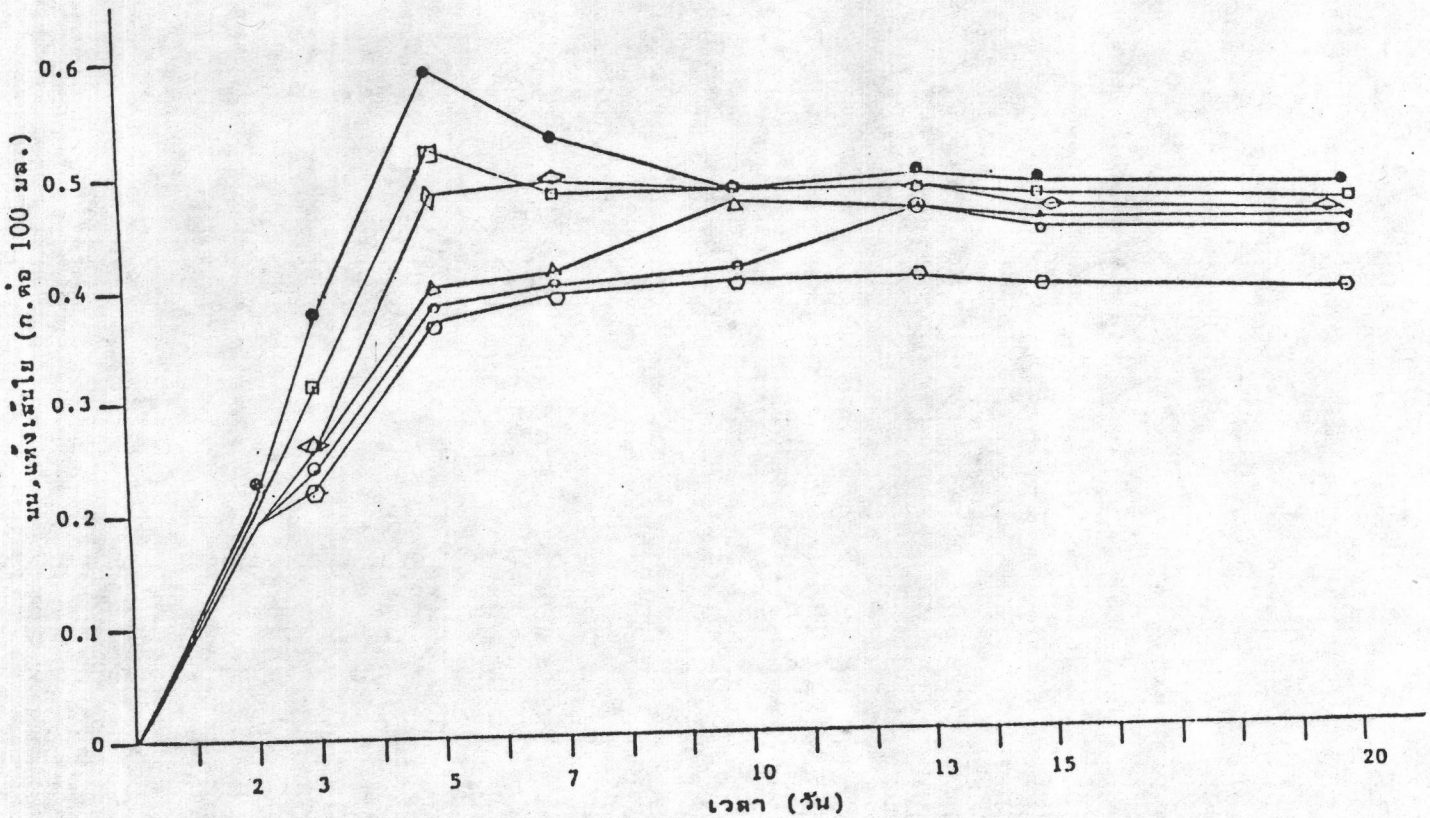
ดังนั้นจากการใช้สารผสมของสารทั้งสองจะเห็นว่า สารทั้งสองสามารถมีการเสริมแรงกัน เพื่อยับยั้งเวลาการเริ่มงอกของสปอร์ได้ และเมื่อพิจารณาค่าที่ได้จากกราฟที่ 9 และ 10 จะเห็นว่าโซเดียมเบนโซเอทมีอิทธิพลสูงกว่าคาเฟอิน

8. ผลของสารคาเฟอินและโซเดียมเบนโซเอท ต่อการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่3)

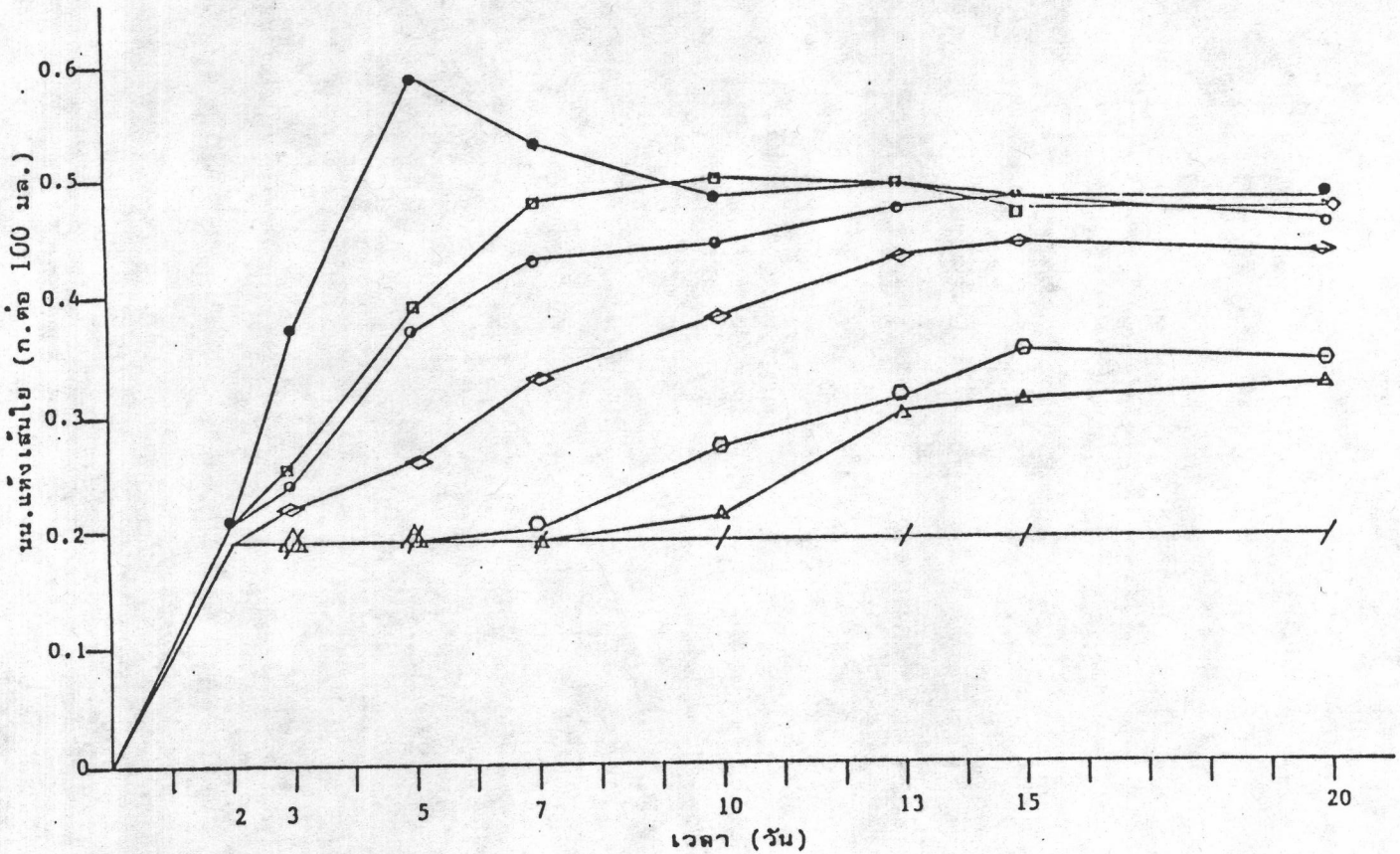
ในการทดลองจะเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารสูตรที่ 3 ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นเติมสารคาเฟอิน โซเดียมเบนโซเอท หรือสารผสมของสารทั้งสองลงไป แล้วเก็บตัวอย่างมาทดสอบ ในช่วงเวลาที่ 2, 3, 5, 7, 10, 15 และ 20 วันตามลำดับ และทำการทดสอบหาค่า การเจริญของเชื้อราจากค่า นน.แห้งของเส้นใย ดังผลแสดงในกราฟที่ 11, 12 และ 13 และหาค่าปริมาณแอฟลาทอกซิน ดังผลแสดงกราฟที่ 14, 15 และ 16

จากกราฟที่ 11 แสดงผลของคาเฟอีนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2.2 มก.ต่อมล. ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus* W83 เมื่อเติมคาเฟอินในปริมาณต่างๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา ภายหลังจากทำการเลี้ยงเชื้อราไปแล้ว 1 วัน ซึ่งจากกราฟการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมสารใดๆ ในเวลาวันที่ 1 ถึงวันที่ 5 การเจริญของเชื้อราจะอยู่ในช่วง log phase แต่เมื่อมีการเติมคาเฟอินปริมาณต่างๆลงไปจะทำให้การเจริญของเชื้อราในช่วง log phase นี้ลดลง ตามความเข้มข้นของคาเฟอินที่เพิ่มขึ้น และหลังจากวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง จะเห็นว่าเส้นใยของเชื้อราจะหยุดการเจริญ ในทุกความเข้มข้นของคาเฟอิน ซึ่งจะเห็นชัดในความเข้มข้นของคาเฟอินที่ 2.2 มก.ต่อมล. ภายหลังวันที่ 5 พบว่าไม่มีการเจริญของเส้นใย

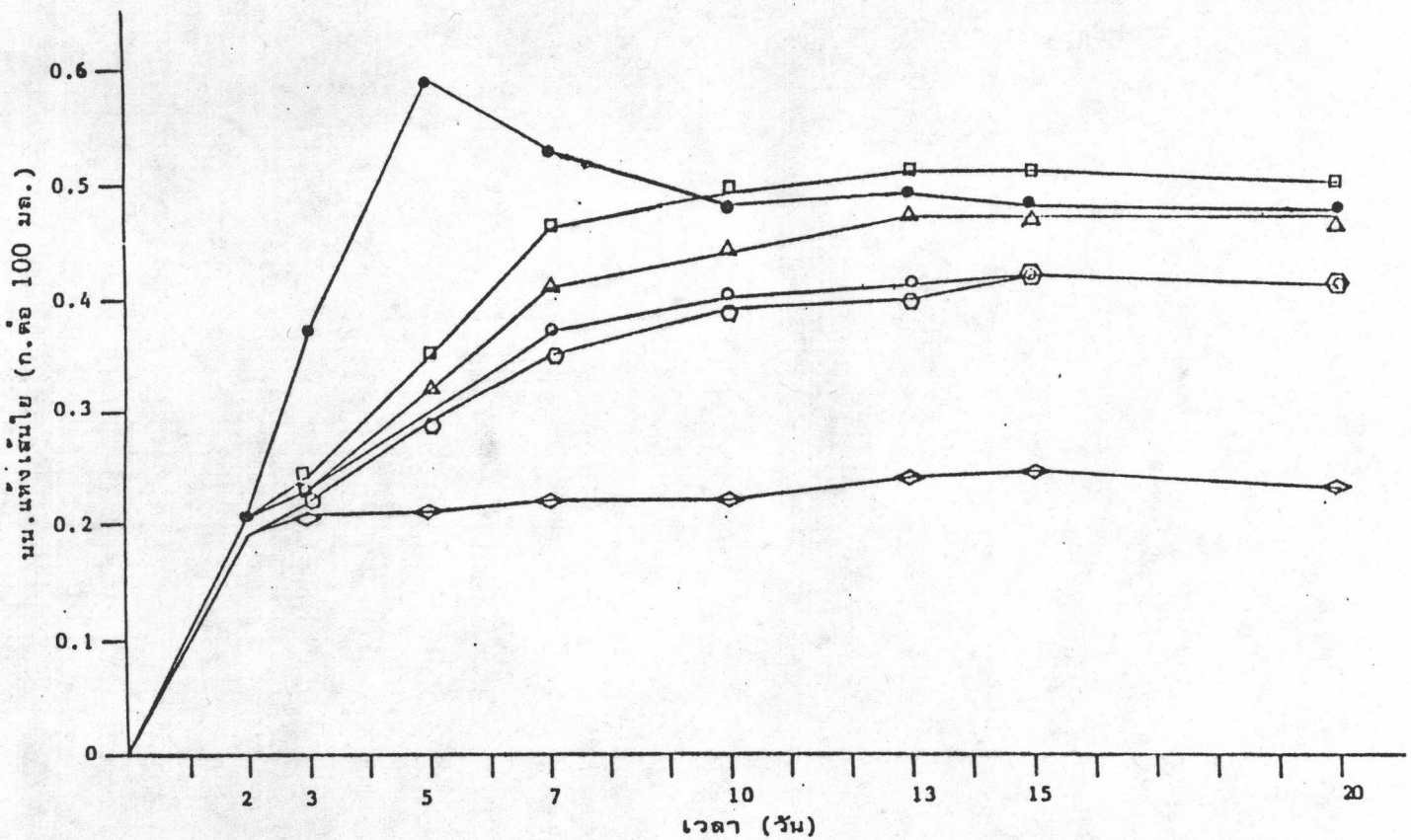
จากกราฟที่ 12 แสดงผลของโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.7 มก.ต่อมล. ต่อการเจริญของเส้นใยของ *Aspergillus* W83 เมื่อเติมโซเดียมเบนโซเอทปริมาณต่างๆลงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา ภายหลังจากทำการเลี้ยงเชื้อราไปแล้ว 1 วัน ผลก็จะพบว่าโซเดียมเบนโซเอทสามารถทำให้ การเจริญของเชื้อราในช่วง log phase ลดลงได้ ตามความเข้มข้นของโซเดียมเบนโซเอทที่เพิ่มขึ้น จากกราฟแสดงให้เห็นว่าผลของการเจริญของเชื้อราจะมีค่าลดลง และเวลาที่ใช้ในการเจริญให้ได้สูงสุดจะนานขึ้น จนเมื่อใช้ปริมาณ 0.7 มก.ต่อมล. จะทำให้เชื้อราหยุดการเจริญต่อไปได้



กราฟที่ 11 ผลของสารคาเฟอินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2.2 มก./มล. เติมเมื่อเลี้ยงไปแล้ว 1 วัน ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3) เป็นเวลา 20 วัน ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที



<u>กราฟที่ 12</u> ผลของโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.7 มก./มล. เติมเมื่อเลี้ยงไปแล้ว 1 วัน ต่อการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3) เป็นเวลา 20 วัน ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที



คาเฟอิน : โซเดียมเบนโซเอท(มก.ต่อมล.)

● = 0:0, □ = 0.5:0.02, △ = 0.5:0.05

○ = 0.5:0.075, ⬡ = 0.5:0.1, ◇ = 0.5:0.25

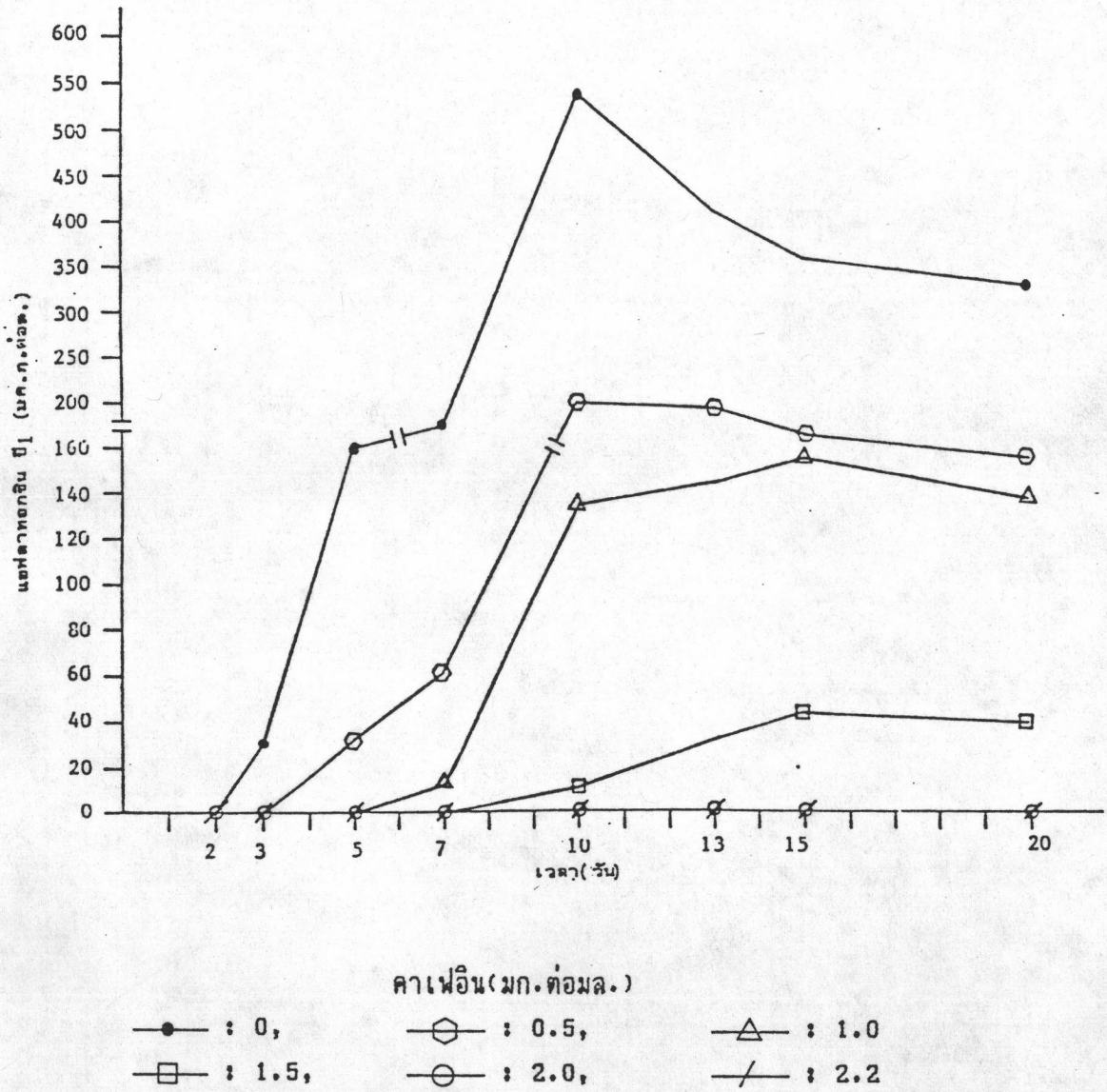
<u>กราฟที่ 13</u> ผลการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus* W83 เมื่อมีสารผสมระหว่างคาเฟอินกับโซเดียมเบนโซเอท โดยกำหนดให้คาเฟอินคงที่ที่ 0.5 มก/มล. และแปรผันปริมาณแอฟลาทอกซินตั้งแต่ 0.02-0.25 มก./มล. เติมเมื่อเลี้ยงไปแล้ว 1 วัน ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3) เป็นเวลา 20 วัน ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที

จากการทดลองใช้โซเดียมเบนโซเอทแล้ว มีผลปรากฏว่ามีการหยุดการเจริญของเส้นใยเกิดขึ้น เมื่อใช้สารโซเดียมเบนโซเอทถึงที่จุดๆหนึ่ง จึงได้ทำการทดลองตรวจสอบการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อรา โดยนำเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมเบนโซเอทอยู่ มาล้างในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วนำไปบ่มเลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA ผลคือเชื้อราสามารถเจริญให้โคโลนี(colony) บนอาหารเลี้ยงได้ ทุกความเข้มข้นของโซเดียมเบนโซเอทที่ใช้ทดลองและทุกเวลาของการทดลอง นั้นแสดงว่าโซเดียมเบนโซเอททำให้การเจริญของเส้นใยเชื้อราหยุดลงได้ แต่ไม่สามารถทำให้เส้นใยเชื้อราเกิดการตาย

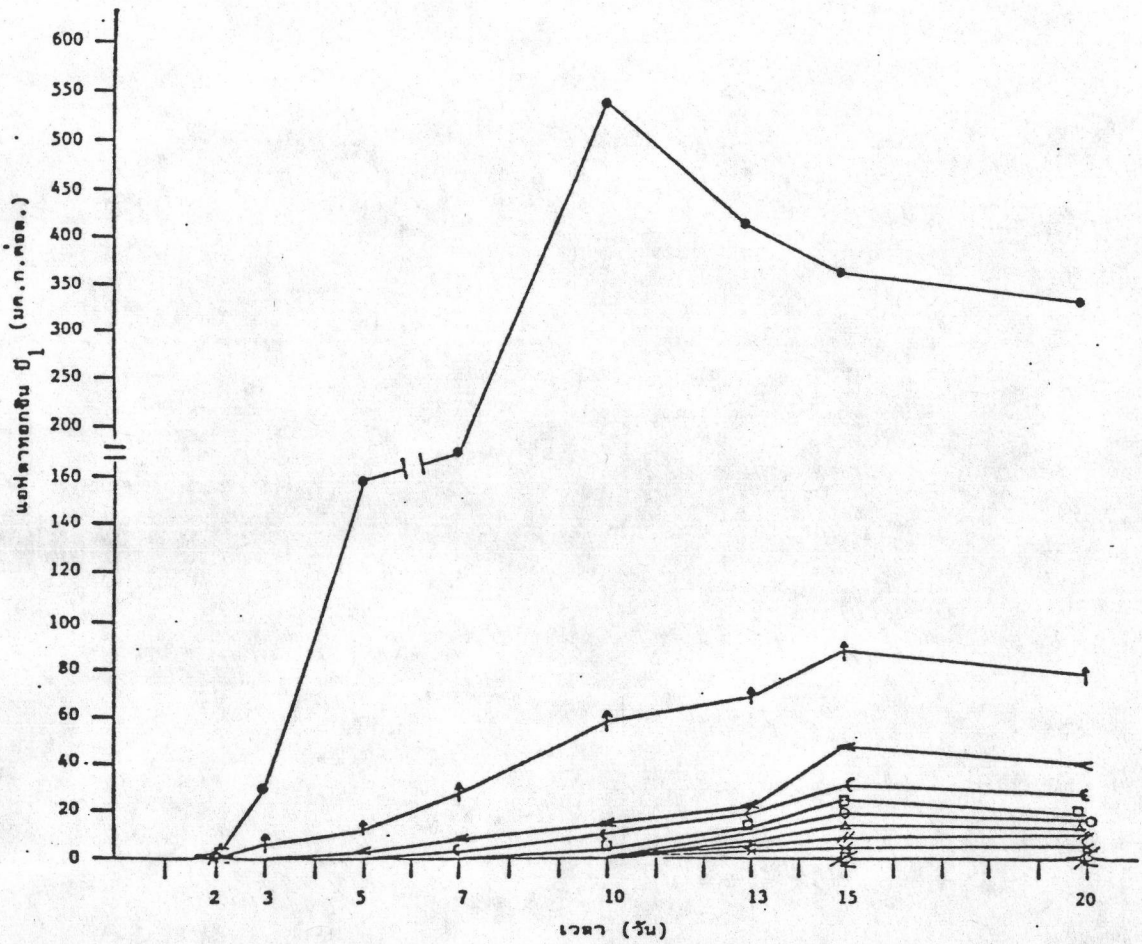
จากกราฟที่ 13 แสดงผลการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus* W83 เมื่อมีสารผสมระหว่างคาเฟอีน กับโซเดียมเบนโซเอท โดยกำหนดให้คาเฟอีนคงที่ที่ 0.5 มก.ต่อมล. และแปรผันปริมาณโซเดียมเบนโซเอทตั้งแต่ 0.02-0.25 มก.ต่อมล. เติมเมื่อเพาะเลี้ยงไปแล้ว 1 วัน ผลที่ได้คืออัตราส่วนต่างๆของสารผสมทั้งสอง สามารถทำให้การเจริญของเชื้อราในช่วง log phase ลดลงได้เช่นกัน ตามความเข้มข้นของโซเดียมเบนโซเอทที่เพิ่มขึ้นในส่วนผสมของสารทั้งสอง ซึ่งผลจากกราฟได้แสดงว่าผลของการเจริญ และเวลาที่ใช้เพื่อการให้ได้สูงสุดของเชื้อรา จะมีค่าลดลง และนานขึ้น ทำให้ระยะ log phase ใช้เวลายาวนานขึ้นจากเดิม และเมื่อใช้ปริมาณส่วนผสมของสารทั้งสองที่ 0.5:0.25 มก.ต่อมล. จะทำให้เชื้อราหยุดการเจริญต่อไปได้

ดังนั้นการใช้สารผสมคาเฟอีน กับโซเดียมเบนโซเอทนั้น จะมีผลทำให้สารทั้งสองมีการเสริมแรงกันและกัน ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ได้ ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อใช้โซเดียมเบนโซเอทเพียงตัวเดียว ต้องใช้ปริมาณสารถึง 0.7 มก.ต่อมล. จึงจะทำให้เชื้อราหยุดการเจริญได้ แต่ในขณะที่ใช้สารผสมของสารทั้งสอง โดยมีคาเฟอีนอยู่ 0.5 มก.ต่อมล. จะใช้โซเดียมเบนโซเอทเพียง 0.25 มก.ต่อมล.เท่านั้น ก็จะสามารถยับยั้งเชื้อราให้หยุดการเจริญต่อไปได้

กราฟที่ 14 แสดงผลของสารคาเฟอีนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2.2 มก.ต่อมล. เติมเมื่อเลี้ยงไปแล้ว 1 วัน ต่อการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ผลจากกราฟการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของเชื้อราในสภาวะที่ไม่มีสารยับยั้งใดๆ จะเริ่มสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ในวันที่ 3 และจะสร้างได้สูงสุดในวันที่ 10 เมื่อเติมมีการคาเฟอีนในปริมาณต่างๆ จะทำให้ปริมาณการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ลดลง และต้องการเวลาใช้ในการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ให้มีปริมาณสูงสุดนานขึ้น ขณะที่ใช้ปริมาณคาเฟอีนสูงตั้งแต่ 2.0 มก.ต่อมล.ขึ้นไปจะทำให้ไม่มีการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ขึ้นจนสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งจากการวิจัยของ Buchanan และคณะ(1978) ได้ใช้คาเฟอีนยับยั้งการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของเชื้อรา *Aspergillus psrasiticus* NRRL 2999 จากการทดลองพบว่าคาเฟอีนที่ปริมาณ 0.5, 1.0 และ 2.0 มก.ต่อมล. สามารถยับยั้งการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้ 86,96 และ 100% ตามลำดับ



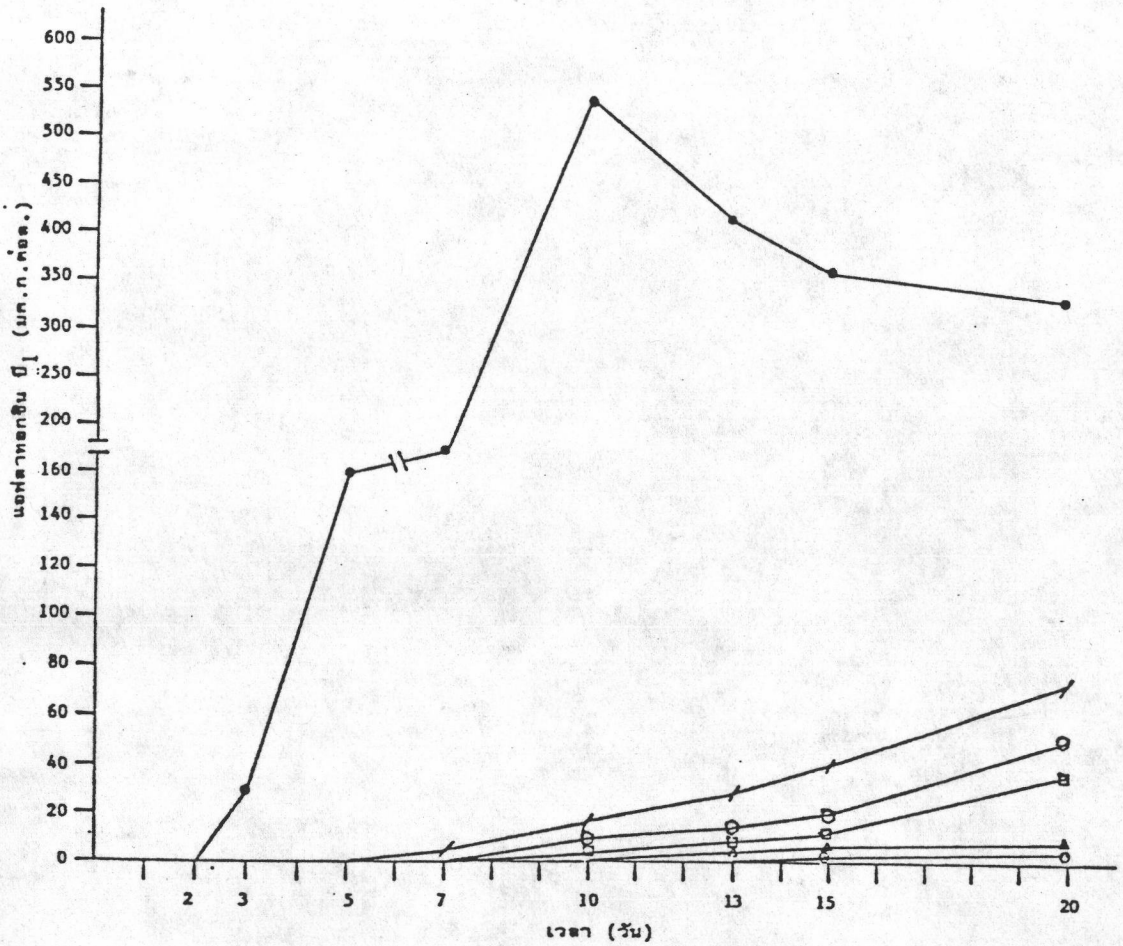
กราฟที่ 14 ผลของสารคาเฟอินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2.2 มก./มล. เติมเมื่อเลี้ยงไปแล้ว 1 วัน ต่อการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3) เป็นเวลา 20 วัน ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที



โซเดียมเบนโซเอท(มก.ต่อมล.)

: 0, : 0.02, : 0.05, : 0.075, : 0.1
: 0.25, : 0.3, : 0.4, : 0.5, : 0.7
: 0.75, : 1.0, : 2.0

กราฟที่ 15 ผลของโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2.0 มก./มล. เติมเมื่อเลี้ยงไปแล้ว 1 วัน ต่อการสร้างแอฟลาทอกซิน B_1 ของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่ 3) เป็นเวลา 20 วัน ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที



คาเฟอิน : โซเดียมเบนโซเอท(มก.ต่อมล.)

● = 0:0, / = 0.5:0.02, ⬡ = 0.5:0.05

□ = 0.5:0.075, △ = 0.5:0.1, ○ = 0.5:0.25

<u>กราฟที่ 16</u> ผลการสร้างแอฟลาทอกซิน B_1 ของเชื้อรา *Aspergillus* W83 เมื่อมีสารผสมระหว่างคาเฟอินกับโซเดียมเบนโซเอท โดยกำหนดให้คาเฟอินคงที่ที่ 0.5 มก./มล. และแปรผันปริมาณโซเดียมเบนโซเอทตั้งแต่ 0.02-0.25 มก./มล. เติมเมื่อเลี้ยงไปแล้ว 1 วัน ในอาหารเหลวมาตรฐาน(สูตรที่3) เป็นเวลา 20 วัน ที่ 30°C ความเร็วเขย่า 200 รอบต่อนาที

แต่ถึงอย่างไรการวิจัยของ Buchanan และคณะ(1978) นี้ ไม่ได้ทดลองหาเวลาที่เชื้อราต้องการเพื่อเริ่มต้นสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ นั้นคือ ประสิทธิภาพของสารที่สามารถยับยั้งการเริ่มต้นสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้เป็นเวลานานเท่าใด เมื่อเติมคาเฟอินในปริมาณต่างๆ และการทดลองสิ้นสุดในเวลาเพียง 7 วัน จึงทำให้ไม่ทราบว่าหลังจาก 7 วันแล้วเชื้อราจะสามารถสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้หรือไม่ หรือสร้างในปริมาณเท่าใด ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ จึงได้ทำการทดลองหาประสิทธิภาพของคาเฟอินว่า สามารถยับยั้งการเริ่มต้นสร้างแอฟลาทอกซินได้นานเท่าใด เมื่อเติมสารในปริมาณต่างๆ และขยายเวลาการทดลองเป็น 20 วัน เพื่อให้ทราบถึงปริมาณแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ที่ถูกสร้างขึ้น และสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมากน้อยเท่าใด

กราฟที่ 15 ผลของโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2.0 มก.ต่อมล. เติมเมื่อเลี้ยงเชื้อไปเป็นเวลา 1 วัน ต่อการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ผลจากกราฟจะพบว่า โซเดียมเบนโซเอทสามารถทำให้ปริมาณการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ลดลงมากมาย เมื่อเปรียบเทียบกับการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ตามสภาพปกติ และเชื้อรายังต้องการเวลาที่ใช้ในการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ให้ได้สูงสุดนานมากขึ้น จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้ปริมาณสาร 0.1-0.5 มก.ต่อมล. สามารถยับยั้งการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้นานเป็นเวลา 10 วัน และที่ปริมาณสารสูงตั้งแต่ 0.7 มก.ต่อมล. โซเดียมเบนโซเอทจะสามารถหยุดการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้จนสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งในการวิจัยของ Raul Valcarcel และคณะ(1986) ได้ทำการศึกษาคัดเลือกสารที่ใช้ยับยั้งการสร้างแอฟลาทอกซิน และโซเดียมเบนโซเอทก็เป็นสารหนึ่งที่ได้รับการศึกษาด้วย ผลการทดลองพบว่าโซเดียมเบนโซเอทที่ปริมาณ 1, 2, 4 และ 8 มก.ต่อมล. เมื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อราไปเป็นเวลา 2 วัน สามารถยับยั้งการสร้างแอฟลาทอกซินได้อย่างสมบูรณ์

แต่ในการวิจัยของ Raul Valcarcel และคณะ(1986) ไม่ได้ทำการทดลองใช้สารโซเดียมเบนโซเอทในปริมาณต่ำกว่า 1.0 มก.ต่อมล.ลงไป ทำให้ไม่สามารถทราบผลของสารในปริมาณต่ำๆว่า จะมีผลต่อการสร้างแอฟลาทอกซินเป็นอย่างไร และยังไม่ได้ทดลองถึงประสิทธิภาพของสารที่ปริมาณต่างๆ ต่อการยับยั้งการเริ่มต้นสร้างแอฟลาทอกซินได้เป็นเวลานานเท่าใด ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงได้ทดลองใช้โซเดียมเบนโซเอทในช่วงปริมาณ 0.02-2.0 มก.ต่อมล. ในระยะเวลา 20 วัน เพื่อหาผลของโซเดียมเบนโซเอทว่าจะมี ประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการเริ่มต้นสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้นานเท่าใด และปริมาณที่ถูกสร้างขึ้นมากน้อยเท่าใด เมื่อมีการเติมสารในปริมาณต่างๆ เพื่อจะได้นำผลการทดลองไปเป็นแนวพื้นฐานที่จะปรับปรุงไปใช้ประโยชน์ต่อไป

กราฟที่ 16 แสดงผลการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของเชื้อรา *Aspergillus* W83 เมื่อมีสารผสมระหว่างคาเฟอิน กับโซเดียมเบนโซเอท โดยกำหนดให้คาเฟอินคงที่ที่ 0.5

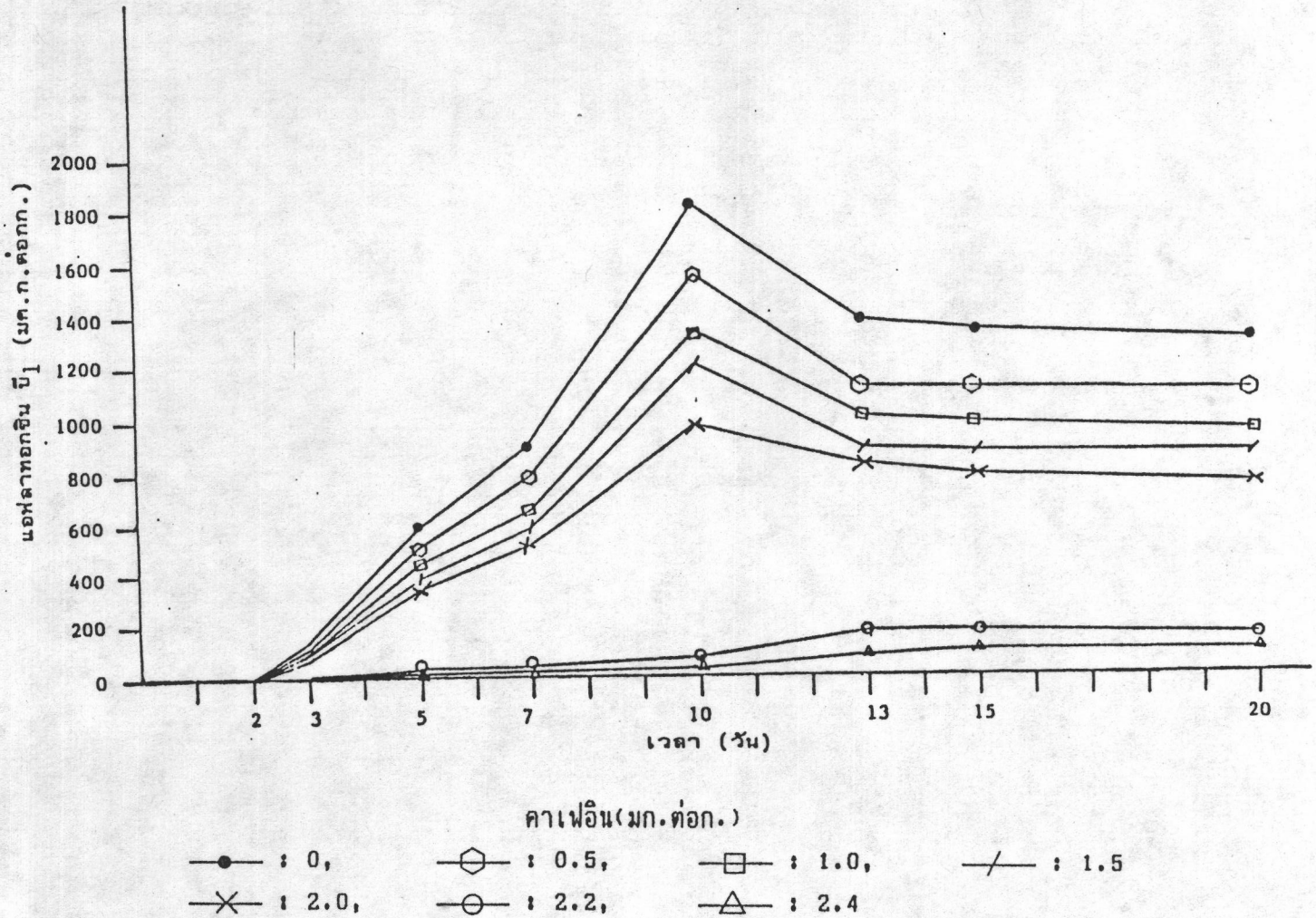
มก.ต่อมล. และแปรผันปริมาณโซเดียมเบนโซเอทตั้งแต่ 0.02-0.25 มก.ต่อมล. เติมเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 วัน ผลจากกราฟสารผสมของสารทั้งสอง สามารถทำให้ปริมาณการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ลดลงอย่างมาก และยังสามารถยับยั้งการเริ่มต้นสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้เป็นเวลานานด้วย จะเห็นได้จากการใช้สารผสมของสารทั้งสองที่ปริมาณ 0.5:0.25 มก.ต่อมล. จะสามารถยับยั้งการเริ่มสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้เป็นเวลา 13 วัน และมีปริมาณถูกสร้างเพียง 2.91 และ 3.37 มค.ก.ต่อล.ในวันที่ 15 และ 20 ตามลำดับ(ค่าจากตารางที่ 13 ในภาคผนวก ก.)

ดังนั้นจะเห็นว่าในการใช้สารผสมระหว่างคาเฟอินกับ โซเดียมเบนโซเอท สารทั้งสองสามารถมีการเสริมแรงกันยับยั้งการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถึงแม้ในสารผสมจะมีปริมาณโซเดียมเบนโซเอทต่ำเพียง 0.25 มก.ต่อมล. และคาเฟอินในปริมาณ 0.5 มก.ต่อมล.เท่านั้น

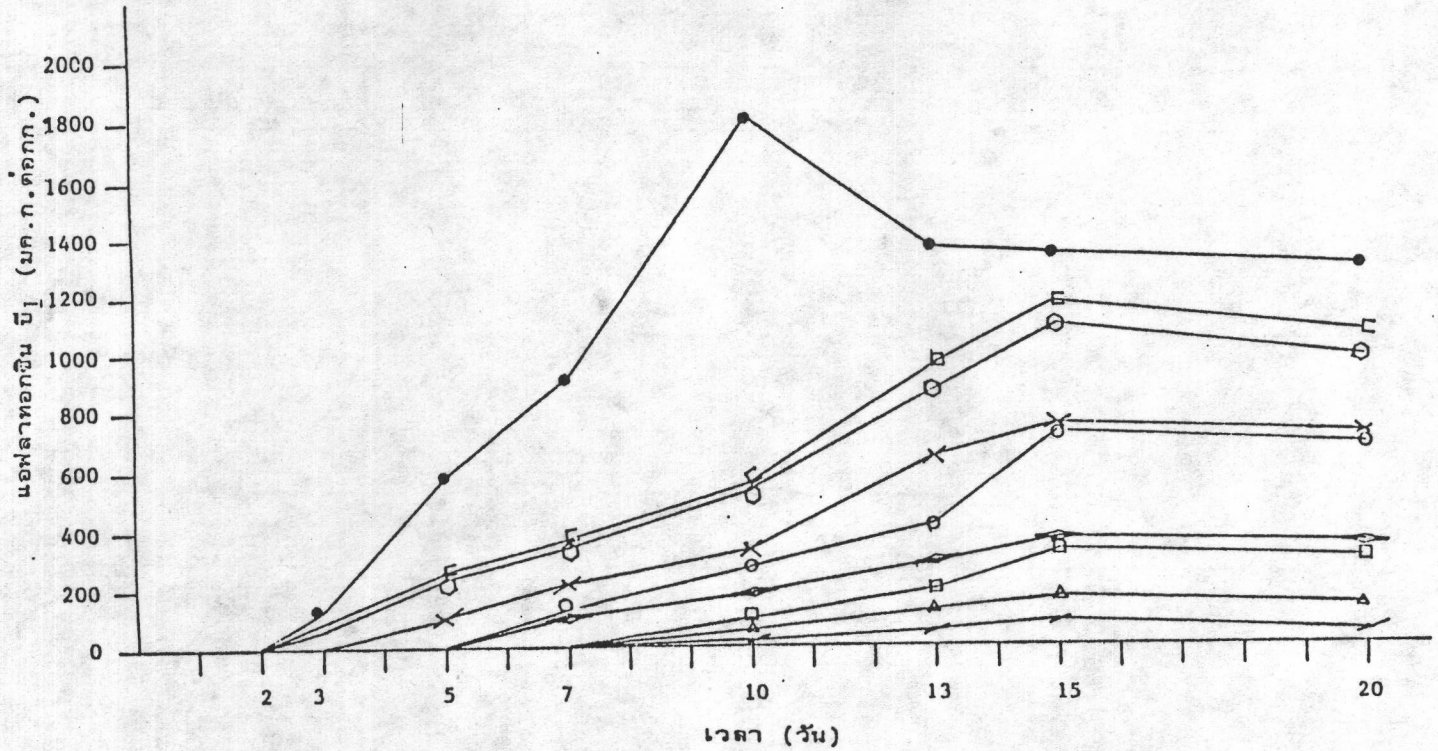
9. ผลของสารคาเฟอินและโซเดียมเบนโซเอท ต่อการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* W83 บนอาหารที่เตรียมจากเมล็ดถั่วลิสง(สูตรที่ 6)

การทดลองบ่มเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* W83 บนอาหารแข็งจากเมล็ดถั่วลิสง (สูตรที่ 6)ที่นึ่งฆ่าเชื้อ ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน แล้วเติมสารคาเฟอิน โซเดียมเบนโซเอท หรือ สารผสมของสารทั้งสอง และทำการบ่มเลี้ยงต่อ ทำการตรวจหาการสร้างแอฟลาทอกซินในช่วงเวลาต่างๆ ซึ่งผลการทดลองแสดงไว้ในกราฟที่ 17, 18 และ 19

จากกราฟที่ 17 แสดงผลของคาเฟอินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2.4 มก.ต่อก. ต่อการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของเชื้อรา จากผลการทดลองเมื่อทำการบ่มเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งสูตรที่ 6 ในสภาวะปกติคือ ไม่มีสารยับยั้งตัวใดอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$จะเริ่มในวันที่ 3 มีปริมาณ 136.84 มค.ก.ต่อกก. และสูงสุดวันที่ 10 ปริมาณ 1816.2 มค.ก.ต่อกก.(ค่าจากตารางที่ 14 ในภาคผนวก ก.) แล้วลดลงเล็กน้อยในวันต่อมา เมื่อมีการเติมสารคาเฟอิน ในปริมาณต่างๆแล้ว คาเฟอินสามารถทำให้ปริมาณการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ลดน้อยลงกว่าการสร้างตามปกติ ตามปริมาณของคาเฟอินที่เพิ่มขึ้น แต่พบว่าคาเฟอินที่ปริมาณต่างๆที่ใช้ทดลอง มีผลต่อการยับยั้งการเริ่มต้นสร้างแอฟลาทอกซินได้เป็นเวลาน้อยมาก คือที่ปริมาณคาเฟอิน 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มก.ต่อก. พบว่าทุกความเข้มข้นไม่สามารถทำให้การสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ช้าลงจากปกติได้ โดยยังเริ่มมีการสร้างในวันที่ 3 และสูงสุดวันที่ 10 แต่ปริมาณแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ที่ถูกสร้างจะลดลง และที่ปริมาณสาร 2.2 และ 2.4 มก.ต่อก. เริ่มสร้างวันที่ 5 แล้วสูงสุดวันที่ 15 ทั้งสองความเข้มข้น ซึ่งจะเริ่มสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$



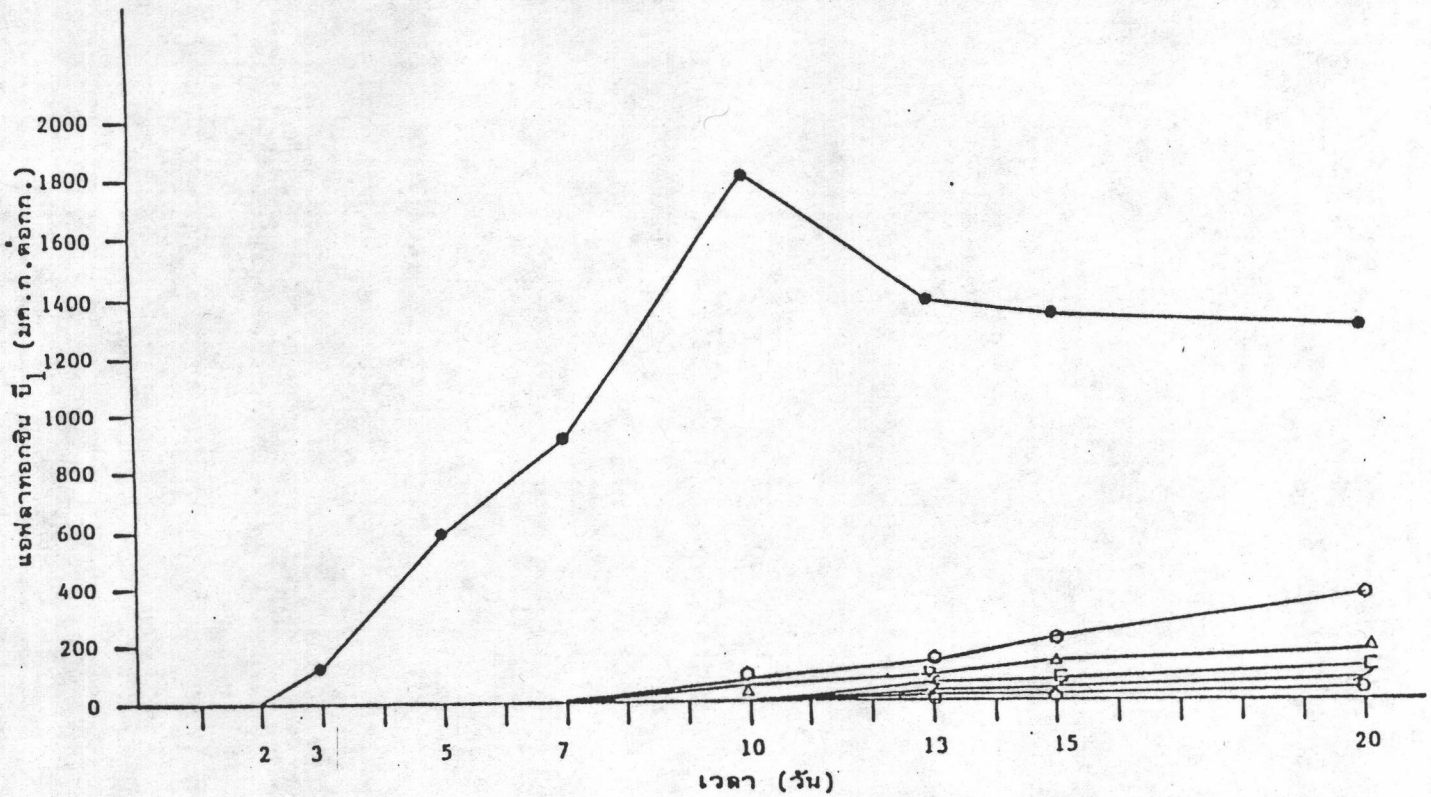
กราฟที่ 17 ผลของสารคาเฟอินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2.4 มก./ก. เติมเมื่อเลี้ยงไปแล้ว 1 วัน ต่อการสร้างแอฟลาทอกซิน บี1 ของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารแข็งจากเมล็ดถั่วลิสง(สูตรที่ 6)ที่นึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 20 วัน ที่ อุณหภูมิห้อง



โซเดียมเบนโซเอท(มก.ต่อก.)

● : 0, ⊏ : 0.25, ⬡ : 0.3, × : 0.4, ○ : 0.5
◇ : 0.7, □ : 0.75, △ : 1.0, / : 2.0

<u>กราฟที่ 18</u> ผลของโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-2.0 มก./ก. เติมเมื่อเลี้ยงไปแล้ว 1 วัน ต่อการสร้างแอฟลาทอกซิน บี1 ของเชื้อรา *Aspergillus* W83 ในอาหารแข็งจากเมล็ดถั่วลิสง(สูตรที่ 6)ที่นึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 20 วัน ที่ อุณหภูมิห้อง



คาเฟอิน : โซเดียมเบนโซเอท(มก.ต่อก.)

= 0:0, = 0.5:0.5, = 0.5:0.7

= 0.5:0.75, = 0.5:1.0, = 0.5:2.0

<u>กราฟที่ 19</u> ผลการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของเชื้อรา *Aspergillus* W83 เมื่อมีสารผสมระหว่างคาเฟอินกับโซเดียมเบนโซเอท โดยกำหนดให้คาเฟอินคงที่ที่ 0.5 มก./ก. และแปรผันโซเดียมเบนโซเอทตั้งแต่ 0.5-2.0 มก./มล. เติมเมื่อเลี้ยงไปแล้ว 1 วัน ในอาหารแข็งจากเมล็ดถั่วลิสง(สูตรที่ 6)ที่นึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 20 วัน ที่ อุณหภูมิห้อง

ช้ากว่าปกติเพียง 2 วันเท่านั้น แต่ปริมาณแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ที่สร้างขึ้นจะลดลงมากคือ มีปริมาณสูงสุดเพียง 175.34 และ 102.11 มค.ก.ต่อกก. เมื่อเปรียบเทียบกับการสร้างตามปกติที่สูงถึง 1816.2 มค.ก.ต่อกก.(ค่าจากตารางที่ 14 ในภาคผนวก ก.)

จากกราฟที่ 18 แสดงผลของโซเดียมเบนโซเอทที่ปริมาณตั้งแต่ 0-2.0 มก.ต่อก. ต่อการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ในอาหารแข็งจากเมล็ดถั่วลิสง(สูตรที่ 6) ผลการทดลองเมื่อเติมโซเดียมเบนโซเอทในปริมาณต่างๆแล้ว ก็จะให้ผลเช่นเดียวกับคาเฟอินคือสามารถทำให้การสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ลดลงกว่าเดิมมาก ตามปริมาณของสารที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจะเห็นว่าที่ปริมาณโซเดียมเบนโซเอท 1.0 และ 2.0 มก.ต่อก. สามารถสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้สูงสุด 176.48 และ 53.79 มค.ก.ต่อกก.(ค่าจากตารางที่ 15 ในภาคผนวก ก.) เมื่อเทียบกับการสร้างตามปกติคือ 1816.2 มค.ก.ต่อกก. ก็พบว่ามีปริมาณต่ำลงมาก และผลการยับยั้งการเริ่มต้นสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ก็จะมีเวลานานแตกต่างกันไปคือ ที่ปริมาณสาร 0.25 และ 0.3 มก.ต่อก. การสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ จะเริ่มวันที่ 3 โดยไม่มีการลดช้าลง ที่ 0.4 มก.ต่อก.เริ่มสร้างวันที่ 5 ที่ 0.5 และ 0.7 มก.ต่อก. เริ่มสร้างวันที่ 7 และที่ 0.75, 1.0 และ 2.0 มก.ต่อก. จะเริ่มสร้างในวันที่ 10 และการสร้างแอฟลาทอกซินได้สูงสุด ของโซเดียมเบนโซเอทที่ปริมาณต่างๆจะอยู่วันที่ 15

จากกราฟที่ 19 แสดงผลการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา เมื่อมีสารผสมระหว่างคาเฟอินกับโซเดียมเบนโซเอท โดยกำหนดให้คาเฟอินคงที่ที่ 0.5 มก.ต่อก. แล้วแปรผันปริมาณโซเดียมเบนโซเอทตั้งแต่ 0.5-2.0 มก.ต่อก. ผลการทดลองคือ เมื่อใช้อัตราส่วนของสารทั้งสองในปริมาณต่างๆ จะมีผลทำให้การสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ลดลงมาก เมื่อเทียบกับการสร้างตามปกติ และให้ผลที่ดีกว่าการใช้สารใดสารหนึ่งเพียงตัวเดียวคือ ที่ปริมาณสารผสมทั้งสอง 0.5:1.0 และ 0.5:2.0 มก.ต่อก. จะสามารถสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้เพียง 54.70 และ 20.97 มค.ก.ต่อกก.เท่านั้น ในวันที่ 20 ซึ่งสิ้นสุดการทดลอง(ค่าจากตารางที่ 16 ในภาคผนวก ก.) และผลต่อการยับยั้งการเริ่มสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ก็จะให้ผลเป็นระยะเวลานานคือ ที่ 0.5:0.5 และ 0.5:0.7 มก.ต่อก. จะเริ่มสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ วันที่ 10 ทั้งสองอัตราส่วน ที่ 0.5:0.75, 0.5:1.0 และ 0.5: 2.0 มก.ต่อก. จะเริ่มสร้างวันที่ 13 ทั้งสามอัตราส่วน ซึ่งผลจากการใช้สารผสมของสารทั้งสองจะเห็นว่า สามารถทำให้การเริ่มต้นสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ใช้ระยะเวลานานขึ้น และปริมาณแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ที่ถูกสร้างขึ้นก็ลดน้อยมาก เมื่อเทียบกับการใช้สารตัวใดตัวหนึ่งเพียงตัวเดียว แสดงว่าสารทั้งสองมีผลเสริมแรงกันยับยั้งการสร้างแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้ดี เมื่อเติมลงบนอาหารแข็งจากวัสดุการเกษตรที่นึ่งฆ่าเชื้อ และก็เป็นการให้ผลที่เหมือนกับการเติมสารทั้งสองลงในอาหารเหลว