การยับยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* โดยสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม

Inhibitory of Growth and Aflatoxin Production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by Citrus Extracts

เกศรินทร์ รามณี

Kadsarin Rammanee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biotechnology
Prince of Songkla University
2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* โดยสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม

ผู้เขียน นางสาวเกศรินทร์ รามณี

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	**คณะกรรมการสอบ**
.....	.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)	(รองศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)
	.....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)
	.....กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ทิพยางค์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การยับยั้งการเจริญ และการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* โดยสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม

ผู้เขียน นางสาวเกศรินทร์ รามณี

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

ฤทธิ์ในการยับยั้งของสารสกัดเอธิลอะซิเตตและน้ำมันหอมระเหยจากผิวเปลือกส้ม 5 ชนิด คือ มะกรูด มะนาว ส้มโอ ส้มเช้ง และส้มโชกุนที่มีผลต่อเชื้อราโดยวิธี disc diffusion assay พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นด้วยไอน้ำมีฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราสูงกว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตต น้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด และมะนาว มีกิจกรรมการยับยั้งในช่วงกว้างที่สุดเมื่อเทียบกับสารสกัดจากผิวส้มชนิดอื่นคือสามารถยับยั้งเชื้อรา *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276, *Aspergillus fumigatus* TISTR 3018, *Aspergillus niger* 6275 และ *Penicillium* sp. โดยน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดมีค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) เท่ากับ 0.56, 0.56, 0.56, 0.56 และ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า MFC (Minimum Fugicidal Concentration) เท่ากับ 1.13, 1.13, 1.13, 0.56 และ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวมีค่า MIC เท่ากับ 0.56, 0.56, 0.56, 1.13 และ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่า MFC เท่ากับ 1.13, 1.13, 1.13, 2.25 และ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารประกอบหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดคือ citronellol (10.67 เปอร์เซ็นต์), limonene (7.32 เปอร์เซ็นต์), linalool (5.83 เปอร์เซ็นต์) และ o-cymene (5.51 เปอร์เซ็นต์) ส่วนสารประกอบหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวคือ limonene (69.11 เปอร์เซ็นต์) และ *p*-cymene (12.77 เปอร์เซ็นต์)

การรอดชีวิตของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* หลังเติมน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวและมะกรูดที่ระดับความเข้มข้น 1.13, 0.56 และ 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 1.13 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อ *A. flavus* ลดลงจาก 5.37 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 3.14 และ 3.61 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายในเวลา 3 ชั่วโมง ส่วนการเติมน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดที่ระดับความเข้มข้น 1.13 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเชื้อ *A. parasiticus* ลดลงจาก 5.36 และ 5.29 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 3.24 และ 3.82 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายในเวลา 3 ชั่วโมง และพบว่าการเติมน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าการเจริญของเชื้อราใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย โดยน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและ

มะนาวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะองค์ประกอบภายในเซลล์จากภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่งผ่าน (TEM) โดยผนังเซลล์หนาขึ้น และองค์ประกอบภายในเซลล์ถูกทำลาย

น้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract Sucrose ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เติมในเมล็ดข้าวโพดที่เก็บที่อุณหภูมิห้องสามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์จนถึง 28 วัน แต่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เพียง 14 วันในเมล็ดข้าวโพดที่เก็บในสภาวะอุณหภูมิห้องที่มีการควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวทุกระดับความเข้มข้นสามารถลดการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้ดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

Thesis Title Inhibitory of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by citrus extracts.

Author Miss Kadsarin Rammanee

Major Program Biotechnology

Academic Year 2008

ABSTRACT

The antifungal effects of ethyl acetate extracts and steamdistillated essential oils of five *Citrus* spp. (*Citrus hystrix* DC., *Citrus aurantifolia* Swingle, *Citrus maxima* Merr., *Citrus paradisi* and *Citrus reticulate* Blanco cv shogun) on five strains of food spoilage fungi including *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276, *Aspergillus fumigatus* TISTR 3018, *Aspergillus niger* 6275 and *Penicillium* sp. were investigated by disc diffusion assay. Particularly, the essential oil of kaffir lime (*Citrus hystrix* DC.) and lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) showed the broad spectrum of antifungal activity against all the tested strains. The Kaffir lime oil exhibited the MIC values of 0.56, 0.56, 0.56, 0.56 and 1.13 mg/ml and MFC values of 1.13, 1.13, 1.13, 0.56 and 1.13 mg/ml, respectively. On the other hand, lime oil also showed the MIC values of 0.56, 0.56, 0.56, 1.13 and 1.13 mg/ml and MFC values of 1.13, 1.13, 1.13, 2.25 and 2.25 mg/ml, respectively. The kaffir lime and lime oils were analyzed for their chemical compositions using GC-MS. Citronellol (10.67%), limonene (7.32%), linalool (5.83%), *o*-cymene (5.51%) were major components for kaffir lime oil, while limonene (69.11%) and *p*-cymene (12.77%) were the major components for the lime oil.

The kaffir lime and lime oils at concentrations of 1.13 and 0.56 mg/ml reduced the growth of *A. flavus* from 5.37 log CFU/ml to 3.14 and 3.61 log CFU/ml, and *A. parasiticus* from 5.36 and 5.29 log CFU/ml to 3.24 and 3.82 log CFU/ml, respectively after 3 h exposure. According to transmisssion electron microscopy (TEM) observation, *A. parasiticus* and *A. flavus* treated with both oils (0.56 mg/ml) showed irreversible damage to cell wall and cellular organelles.

The growth and aflatoxin production of *A. flavus* in Yeast Extract Sucrose medium were completely inhibited at 2.25 mg/ml lime oils. Application of kaffir lime and lime oils at concentration of 60 mg/ml in maize kernels kept at room temperature completely inhibited growth and aflatoxin production by *A. flavus* and *A. parasiticus* for 28 days. However,

A. parasiticus and *A. flavus* were completely inhibited for 14 day at 60 mg/ml of both oils under room temperature with 90% relative humidity. All concentrations of both oils significantly ($P<0.05$) reduced aflatoxin production of *A. parasiticus* and *A. flavus* greater than the control (without oil).

สารบัญ

หน้า

สารบัญ..... (8)
LIST OFTABLES..... (9)
LIST OF FIGURES..... (11)
บทที่
1. บทนำ
บทนำต้นเรื่อง..... 1
การตรวจเอกสาร..... 4
วัตถุประสงค์..... 33
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ..... 34
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 45
4. บทสรุป..... 70
เอกสารอ้างอิง..... 72
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก..... 88
ภาคผนวก ข..... 95
ประวัติผู้เขียน..... 135

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Occurrence of *Aspergillus* in some agricultural commodities…….	7
2	Regulation of aflatoxin contaminated in foods foodstuffs……	14
3	Common terpenes found in essential oils……	28
4	Components of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil…….	30
5	Antifungal activity of essential oils and ethyl acetate extracts from citrus peels (1.0 mg). The activity was determined by disc diffusion assay and diameters of zones of inhibition were measured and expressed as millimeters……	49
6	MIC and MFC (mg/ml) of essential oils from kaffir lime and lime against food spoilage fungi……	50
7	Compositions of essential oil and ethyl acetate extracts of kaffir lime and lime peels……..	56
8	Results interpretation of pesticide test by GT-test kit…….	90
9	Contamination of organic phosphates and pesticides in citrus peel tested by GT-test kit……	95
10	Color of peels of citrus cultivars by color meter: Hunter lab…….	95
11	Production yields of ethyl acetate extracts and essential oils from peels of various citrus cultivars……...	95
12	Inhibitory activity of lime essential oil (0-1.13 mg/ml concentration) against *Aspergillus flavus* TISTR 3041 in PDB (log CFU/ml)…….	124
13	Inhibitory activity of kaffir lime essential oil (0-1.13 mg/ml concentration) against *Aspergillus parasiticus* TISTR 3041 in PDB (log CFU/ml)……	125
14	Effect of lime and kaffir lime peel essential oils on growth and aflatoxin production of *A. flavus* and *A. parasiticus*, respectively in YES medium……	126
15	Effect of kaffir lime essential oil on growth of *A. parasiticus* in maize kernel stored at room temperature under 90% RH…….	127
16	Effect of kaffir lime essential oil on aflatoxin producion of *A. parasiticus* in maize kernel stored at room temperature under 90% RH…….	128

LIST OF TABLES (CONT.)

Table		Page
17	Effect of lime essential oil on growth of *A. flavus* in maize kernel stored at room temperature under 90% RH……...	129
18	Effect of lime essential oil on aflatoxin production of *A. flavus* in maize kernel stored at room temperature under 90% RH……...	130
19	Effect of kaffir lime essential oil on growth of *A. parasiticus* in maize kernel stored at room temperature……	131
20	Effect of kaffir lime essential oil on aflatoxin production of *A. parasiticus* in maize kernel stored at room temperature……..	132
21	Effect of lime essential oil on growth of *A. flavus* in maize kernel stored at room temperature…….	133
22	Effect of lime essential oil on aflatoxin production of *A. flavus* in maize kernel stored at room temperature……	134

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Model morphology of *Aspergillus flavus*……...	8
2	Structural formulas of aflatoxins…….	11
3	Aflatoxin metabolites……...	12
4	Structure of citrus fruit…….	21
5	Steamdistillation equipment…….	37
6	MIC and MFC determination by broth microdilution assay……	39
7	Physical appearances of citrus extracts obtained from (A) ethyl acetate extraction, (B) steamdistillation……...	45
8	Production yields of ethyl acetate extracts (■) and essential oils (□) from peels of various citrus cultivars…….	46
9	GC chromatogram of essential oil from kaffir lime peel…….	52
10	GC chromatogram of ethyl acetate extract from kaffir lime peel……	53
11	GC chromatogram of essential oil from lime peel…….	54
12	GC chromatogram of ethyl acetate extract from lime peel……..	55
13	Inhibitory effect of lime essential oil on *Aspergillus flavus* TISTR 3041 in PDB.	58
14	Inhibitory effect of lime essential oil on *Aspergillus parasiticus* TISTR 3041 in PDB……..	58
15	Effect of kaffir lime essential oil on *A. parasiticus* growth and aflatoxin production in YES medium……..	60
16	Effect of lime essential oil on *A. flavus* growth and aflatoxin production in YES medium…….	60
17	Microphotograph (400×) of *A. parasiticus* mycelium exposed to 0.56 mg/ml of kaffir lime essential oil (A) and control (B)…….	61
18	Microphotograph (400×) of *A. flavus* mycelium to 0.56 mg/ml of lime essential oil (A) and control (B)…….	61
19	Transmission Electron Microscope (20000×) of *A. parasiticus* exposed to 0.56 mg/ml of kaffir lime essential oil (A) and control (B)…….	63

LIST OF FIGURES (CONT.)

Figure		Page
20	Transmission Electron Microscope (20000×) of *A. flavus* exposed to 0.56 mg/ml of lime essential oil (A) and control (B)……..	63
21	Effect of kaffir lime essential oil on growth (A) and aflatoxin production (B) by *A. parasiticus* in maize kernel stored at room temperature…….	65
22	Effect of lime essential oil on growth (A) and aflatoxin production (B) by *A. flavus* in maize kernel stored at room temperature……..	66
23	Effect of kaffir lime essential oil on growth (A) and aflatoxin production (B) by *A. parasiticus* in maize kernel stored at room temperature under 90% relative humidity……	67
24	Effect of lime essential oil on growth (A) and aflatoxin production (B) by *A. flavus* in maize kernel stored at room temperature under 90% relative humidity……	69
25	GC chromatogram of essential oil from kaffir lime peel……..	96
26	Mass spectrum comparison of o-cymene found in essential oil from kaffir lime peel with that in database……..	97
27	Mass spectrum comparison of limonene found in essential oil from kaffir lime peel with that in database……..	98
28	Mass spectrum comparison of (+)-2-carene found in essential oil from kaffir lime peel with that in database……..	99
29	Mass spectrum comparison of myrtenal found in essential oil from kaffir lime peel with that in database……..	100
30	Mass spectrum comparison of 4-pentanal found in essential oil from kaffir lime peel with that in database……..	101
31	Mass spectrum comparison of linalool found in essential oil from kaffir lime peel with that in database…….	102
32	Mass spectrum comparison of citronellal found in essential oil from kaffir lime peel with that in database……..	103

LIST OF FIGURES (CONT.)

Figure		Page
33	Mass spectrum comparison of 1-6 heptadiene found in essential oil from kaffir lime peel with that in database……..	104
34	Mass spectrum comparison of campene found in essential oil from kaffir lime peel with that in database…….	105
35	GC chromatogram of essential oil from lime peel……	106
36	Mass spectrum comparison of *p*-cymene found in essential oil from lime peel with that in database…….	107
37	Mass spectrum comparison of limonene found in essential oil from lime peel with that in database…….	108
38	GC chromatogram of ethyl acetate extract from lime peel……..	109
39	Mass spectrum comparison of gamma-terpinene found in ethyl acetate extract from lime peel with that in database…….	110
40	Mass spectrum comparison of 2,5-octadiene found in ethyl acetate extract from lime peel with that in database……..	111
41	Mass spectrum comparison of limonene found in ethyl acetate extract from lime peel with that in database……..	112
42	Mass spectrum comparison of piperitenone found in ethyl acetate extract from lime peel with that in database……..	113
43	GC chromatogram of ethyl acetate extract from kaffir lime peel…….	114
44	Mass spectrum comparison of sabinene found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database……..	115
45	Mass spectrum comparison of l-limonene found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database……	116
46	Mass spectrum comparison of delta-cadinene found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database……	117
47	Mass spectrum comparison of alpha-copaene found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database……	118

LIST OF FIGURES (CONT.)

Figure		Page
48	Mass spectrum comparison of beta-caryophyllen found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database……..	119
49	Mass spectrum comparison of tran-sabinene found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database……...	120
50	Mass spectrum comparison of beta-myrcene found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database……	121
51	Mass spectrum comparison of linalool found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database……..	122
52	Mass spectrum comparison of citronellal found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database……	123
53	Inhibitory activity of kaffir lime oil against *Aspergillus parasiticus* (A) lime oil against *Aspergillus flavus* (B)…….	124

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้น มีสภาวะอากาศและสิ่งแวดล้อมเหมาะสมและเอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา ทำให้อาหารและผลผลิตทางการเกษตรหรือวัตถุดิบที่นำมาเป็นอาหารของคนและสัตว์หลายชนิดมีการปนเปื้อนจากเชื้อรา เช่น เมล็ดธัญพืช ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ปลายข้าว ถั่วลิสง กากถั่วเหลือง เมล็ดฝ้าย มะพร้าวตากแห้ง ปลาป่น กระดูกป่น นม ไข่ เนยแข็ง น้ำผลไม้ เป็นต้น (ทัศนีย์ จุฬามรกต และดวงจันทร์ สุประเสริฐ, 2540) เชื้อราบางชนิดสามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อมนุษย์หรือสัตว์ที่บริโภคได้ ทั้งยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดความเสื่อมคุณภาพของอาหารและวัตถุดิบอีกด้วย (อนงค์ บิณฑวิหค, 2546) และยังพบว่าการปนเปื้อนของเชื้อรายังเป็นปัญหากับการเก็บรักษาพืชสมุนไพรและเป็นปัญหาใหญ่สำหรับนักเภสัชวิทยาและผู้ผลิตยา เนื่องจากปัจจุบันมีการใช้สมุนไพรเพื่อบำรุงสุขภาพ ป้องกันและรักษาโรคกันมากขึ้น ซึ่งในการนำมาใช้ถ้าใช้ในรูปสดมักไม่มีปัญหา แต่สมุนไพรที่ใช้เป็นยาส่วนใหญ่จะใช้ในรูปของสมุนไพรตากแห้งเก็บไว้ แล้วนำออกมาจำหน่ายเพื่อปรุงเป็นยา และในช่วงระหว่างการเก็บรักษาทำให้มีการปนเปื้อนของเชื้อรา และหากสภาวะแวดล้อมเหมาะสมก็จะมีการสร้างสารพิษขึ้น ซึ่งอาจทำให้การรักษาโรคด้วยสมุนไพรให้ผลที่ไม่แน่นอน (อัจฉรา พัฒนเดช, 2543) เชื้อราที่ได้รับความสนใจที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหารที่พบบ่อยๆ คือ *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. และ *Aspergillus* spp. ที่พบในเมล็ดธัญพืช และสมุนไพรอบแห้ง (อัมรา ชินภูติ และประวัติ ตันบุญเอก , 2543; อัจฉรา พัฒนเดช, 2543; Pitt and Hocking, 1999)

Aspergillus ซึ่งเป็นเชื้อราที่พบได้ทั่วไป เช่น ในดิน เศษซากพืช เมล็ดพันธุ์ และสามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมทั่วโลก (Rippon, 1982) ประเทศไทยตั้งอยู่ในเขตภูมิอากาศแบบร้อนชื้น มีสภาวะอากาศและสิ่งแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา อาหารและผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิดโดยเฉพาะ เมล็ดธัญพืช ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ปลายข้าว ถั่วลิสง กากถั่วเหลือง เมล็ดฝ้าย มะพร้าวตากแห้ง ปลาป่น กระดูกป่น นม ไข่ เนยแข็ง น้ำผลไม้ เป็นต้น (ทัศนีย์ จุฬามรกต และดวงจันทร์ สุประเสริฐ, 2540; Lee and Shau, 1981) จึงมีการปนเปื้อนจากเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* (Kurtzman *et al*., 1987) มักพบปนเปื้อนอยู่ในวัตถุดิบทางการเกษตรที่ใช้เป็นอาหารของคนและสัตว์ และเป็นสาเหตุทำให้วัตถุดิบเสื่อมคุณภาพ

ทางโภชนาการและก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคได้ เนื่องจากมีการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน การปนเปื้อนของสารพิษแอฟลาทอกซินมีความสำคัญทั้งทางด้านเกษตร การแพทย์ สาธารณสุข และเศรษฐกิจ เนื่องจากว่ามีผลทำให้เกิดมะเร็งในตับกับมนุษย์และสัตว์ โดยทำให้เกิดอาการได้ทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข ซึ่งผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้ความสนใจและเป็นกังวล

การถนอมอาหารเป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยยืดระยะเวลาการเจริญเติบโต และยับยั้งการสร้างสารพิษของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารและวัตถุดิบทางการเกษตร เช่น การเติมวัตถุเจือปนอาหารสังเคราะห์ และการใช้สารเคมีบางชนิดซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษของจุลินทรีย์ได้ดี เช่น แอมโมเนียมคาร์บอเนต และไบซัลไฟต์ พบว่าสามารถลดการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้ (วิไลวรรณ ธนโรจน์ประดิษฐ์, 2533; Mabrouk and El-Shayeb, 1980) นอกจากนี้ยังพบว่าโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ กรดเบนโซอิก และโซเดียมเบนโซเอตสามารถลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินได้เช่นกัน แต่สารเคมีเหล่านี้เมื่อใช้หรือได้รับในระยะเวลานานๆ อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพได้ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรคและสารเคมีที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร จึงได้มีการศึกษาและหาแนวทางแก้ไขปัญหาเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และหลีกเลี่ยงวัตถุเจือปนสังเคราะห์มาใช้สารจากธรรมชาติแทน สารสกัดธรรมจากชาติจากพืชบางชนิดจึงได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งด้านการปรุงแต่งกลิ่นรสชาติ และสีของอาหาร ด้านยารักษาโรค เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางค์ น้ำหอม และเครื่องดื่ม เนื่องจากประเทศไทยอุดมสมบูรณ์ไปด้วยพืชนานาชนิดและมีพืชสมุนไพรหลายชนิดทีมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและประโยชน์ด้านอื่นๆ ซึ่งได้มีงานศึกษาวิจัยสมุนไพรหลายชนิด เช่น อบเชย กานพลู ไทม์ พลู กระวาน เทียนขาว โป๊ยกั๊ก พริกขี้หนู มัสตาด ขิง พริกไทยดำ สาระแหน่ ดอกจันทร์ ยูคาลิปตัส กระเทียม โหระพา อบเชย ดอกดาวเรือง สาระแหน่ แครอท oregano funnel และ guysum พบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่สร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน คือสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ (Suzuki *et al.*, 1973; Tiwar, 1983; Paster, 1995; Montes-Belmont and Carvajal, 1998; Yine and cheng, 1998; Fan and Chen, 1999; Soliman and Badeaa, 2002; Rasooli and Razzaghi-Abyaneh, 2004) ดังนั้นสารสกัดธรรมชาติจากพืชจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ใช้ควบคุมการเจริญและการสร้างสารพิษของเชื้อรา

พืชตระกูลส้ม (citrus fruit) เป็นไม้ผลในเขตร้อนที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เช่น ส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulate*) ส้มโอ (*Citrus maxima* Merr.) มะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) ส้มโชกุน (*Citrus reticulata* cv Shogun) และมะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle) เป็นต้น ธิราภา แสนเสนา และ นภดล กิตติวราฤทธิ์ (2536) พบว่าสาร

สกัดเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ จากมะกรูดและมะนาวมีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีและมีรายงานว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อราได้ และสารประกอบบางชนิดจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดี เช่น น้ำมันหอมระเหยจาก citrange ยับยั้ง *Penicillium digitatum* ได้ (Caccioni *et al*., 1998) สุมลรัตน์ จันทะผล (2549) ได้ศึกษากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของพืชตระกูลส้มเมืองร้อน ได้แก่ มะกรูด (*Citrus hystrix* DC.) มะนาว (*Citrus aurantifolia* Swingle) ส้มโอ (*Citrus maxima* Merr) ส้มจุก (*Citrus reticulate* Blanco) ส้มโชกุน (*Citrus reticulata* cv Shogun) ส้มเช้ง (*Citrus paradise*) และส้มจี๊ด (*Citrus japonica* Thunb) พบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวส้มโอ ส้มเช้ง และส้มโชกุนมีฤทธิ์ยับยั้ง *A. fumigatus* TISTR 3180 ได้ดีโดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.56, 0.28 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า MFC เท่ากับ 1.13, 0.28 และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน Sharma และ Tripathi (2008) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก epicarp ของ *C. sinensis* (L) osbeck มีผลต่อการเติบโตและลักษณะรูปร่างของของ *A. niger* (L.) van Tieghem โดยเส้นใย (mycelium) ถูกยับยั้ง และตายที่ระดับความเข้มข้นคือ 2.50 และ 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษากิจกรรมการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม โดยคัดเลือกพืชตระกูลส้มจากวิธีการสกัดด้วยเอธิลอะซิเตตและการกลั่นด้วยไอน้ำจากนั้นนำสารสกัดแต่ละวิธีมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหาร (food spoilage fungi) จำนวน 5 สายพันธุ์ และนำสารสกัดที่มีความไวต่อเชื้อรามาวิเคราะห์องค์ประกอบเชิงคุณภาพด้วย Gas chromatograph-Mass spectrometry (GC-MS) รวมทั้งศึกษาผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดที่คัดเลือกได้ ต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และประยุกต์ใช้สารสกัดจากพืชตระกูลส้มที่คัดเลือกได้ ในการยับยั้งการเจริญและสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในเมล็ดข้าวโพด

การตรวจเอกสาร

1. เชื้อราในอาหาร (Food fungi)

เชื้อรา (mold หรือ fungi) จัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มหนึ่ง ที่มีการพบมากกว่า 200,000 สายพันธุ์ทั่วโลก โดยพบทั้งในรูปของเส้นใยเจริญในอินทรียวัตถุและปนเปื้อนในบรรยากาศในรูปของสปอร์ ราส่วนใหญ่มีวงจรชีวิตแบบอิสระเป็นตัวย่อยสลายซากพืชที่ตายแล้ว และอาจรวมไปถึงซากสัตว์ ด้วยอย่างไรก็ตามมีเชื้อราจำนวนน้อยไม่กี่สกุลที่ก่ออันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์สำหรับเชื้อราที่เกี่ยวข้องกับอาหารนั้นโดยทั่วไปจะสนใจเชื้อรากลุ่มที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และเชื้อราที่สร้างสารพิษเพราะเชื้อราทั้ง 2 กลุ่มนี้มีผลต่อคุณภาพของอาหาร และความปลอดภัยของผู้บริโภคโดยตรงซึ่งมักพบปนเปื้อนอยู่ในอาหาร และผลิตภัณฑ์

1.1 เชื้อราที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (food spoilage mold)

เชื้อราทุกชนิดสามารถทำให้อาหารเกิดการเสื่อมเสียได้ เนื่องจากแหล่งอาหารหลักของเชื้อรา คือ สารที่มีโครงสร้างเป็นคาร์โบไฮเดรต แต่ก็มีเชื้อราหลายชนิดที่สามารถใช้โปรตีน และไขมันเป็นแหล่งอาหารได้เพราะสามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิดโดยเฉพาะ amylase protease และ lipase จึงทำให้อาหารและวัตถุดิบอาหารที่มีเชื้อราเจริญมีคุณภาพที่ลดลง (Charlie and Watkinson, 1994)

1.2 เชื้อราที่สร้างสารพิษ (toxins producing mold)

เชื้อราทุกชนิดจะมีการสร้างสารเมตาบอไลท์จากกระบวนการเมตาบอลิซึม และสารที่เชื้อราผลิตออกมานั้น บางครั้งอาจมีพิษต่อมนุษย์และสัตว์ด้วย เชื้อราแต่ละชนิดสามารถสร้างสารพิษได้แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ เช่น สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ และ ความชื้น ปัจจุบันพบว่าสารพิษที่สำคัญสร้างจากราเพียง 5 จีนัส เท่านั้น คือ *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Chaetonium* และ *Claviceps* (เกรียงศักดิ์ พูนสุข, 2540)

2. การปนเปื้อนของเชื้อราในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ

การปนเปื้อนของเชื้อราในอาหารสามารถเกิดได้ในระหว่างการปลูก และการเก็บรักษาโดยมีเชื้อราเป็นจำนวนมากที่ปนเปื้อนในระหว่างการเพาะปลูกส่วนใหญ่แทบจะไม่มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์และมักเป็นพวกย่อยสลาย แต่เชื้อราที่มักก่อปัญหา คือ ราก่อโรคพืช (Nijs and Notermans, 2000) เช่น *Fusarium* สามารถก่อโรคในพืชได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังมีเชื้อราที่ก่อโรคพืชที่สำคัญอีกหลายชนิด เช่น *Collectotrichum* spp., *Alternaria solani*, *Diaporthe phaseolorum* และ *Phomopsis* sp. (มณีฉัตร นิกรพันธุ์, 2541) เชื้อราเหล่านี้แม้จะไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคแต่ก็มีโอกาสสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายโดยเฉพาะเชื้อราในกลุ่ม *Fusarium* โดยเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหารประเภทต่างๆ ได้แก่

2.1 ธัญพืชและผลิตภัณฑ์

เชื้อราที่พบปนเปื้อนเมล็ดธัญพืช มาจาก ดิน อากาศ มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม เชื้อราที่พบได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Fusarium* ซึ่งในแป้งพบว่ามีสปอร์ของเชื้อราเหล่านี้ปนเปื้อนอยู่ นอกจากนี้ในขนมปังยังพบการปนเปื้อนของเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* และ *Cladosporium* ซึ่งอาจปนเปื้อนมาจากอากาศ และภายหลังจากการทำขนมปังเสร็จแล้ว โดยอาจปนเปื้อนในขณะรอให้เย็น หั่น ห่อ เป็นต้น (วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล, 2539)

2.2 น้ำตาลและผลิตภัณฑ์

เชื้อราที่พบในน้ำตาลอาจมาจากวัตถุดิบ เช่น อ้อย มาจากดิน เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิตและบรรจุ ส่วนผสม หรือจากอากาศ ซึ่งในน้ำตาลมักพบเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* และ *Penicillium* (วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล, 2539)

2.3 ผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์

เชื้อราที่ปนเปื้อนในผักและผลไม้ อาจมาจากดินที่เพาะปลูก น้ำที่ใช้ล้าง การเก็บเกี่ยวผัก ผลไม้ใส่ภาชนะทำให้มีการปนเปื้อนจากภาชนะหนึ่งสู่ภาชนะหนึ่ง การขนส่ง การวางจำหน่าย เชื้อราที่พบในผัก และผลไม้จะแตกต่างกัน คือเชื้อราที่พบในผัก ได้แก่ รากลุ่ม *Fusarium, Alternaria, Penicillium, Botrytis* และ *Rhizopus* ในผลไม้ โดยเฉพาะผลไม้ที่มีค่าพีเอชต่ำๆ มักพบเชื้อราปนเปื้อนอยู่มาก ได้แก่ *Rhizopus, Penicillium, Fusarium, Alternaria, Botrytis* และ *Cladosporium* เชื้อรากลุ่ม *Alternaria* เป็นเชื้อราสาเหตุทำให้เกิดโรคเน่าสีน้ำตาลและสีดำกับผลไม้เนื้อแข็ง (stone fruits) แอปเปิ้ล และมะเดื่อ และเกิดโรคปลายกิ่งเน่าสีน้ำตาลและดำกับผลไม้ตระกูลส้ม เป็นราที่พบในไร่ข้าวสาลี นอกจากนี้ยังพบในเนื้อแดงของสัตว์ และบางสปีชีส์สามารถสร้างสารพิษได้ (สุมณฑา วัฒนสินธิ์, 2545)

2.4 เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์

เชื้อราที่ปนเปื้อนในเนื้อสัตว์จะมาจากภายนอก โดยอาจปนเปื้อนในระหว่างการฆ่าเชือและการชำแหละ ซึ่งมาจาก ขน หนัง กีบเท้า ทางเดินอาหารสัตว์ เครื่องมือเครื่องใช้ อากาศ เชื้อราที่พบได้แก่ *Alternaria, Monilia, penicillium, Moucor, Geotrichum, Cladosporium, Thamidium* และ *Sporotrichum.* (Bullerman, 2000)

2.5 ปลาและอาหารทะเล

การปนเปื้อนของเชื้อราในปลาและอาหารทะเลมาจากน้ำ ดินบริเวณหน้าดิน ที่สัตว์เหล่านั้นอาศัยอยู่ ซึ่งติดอยู่กับทางเดินอาหาร เหงือก ผิว และมาจากเรือ ภาชนะบรรจุ เครื่องมือเครื่องใช้ในการชำแหละ รวมถึงการขนส่ง ซึ่งจะพบการปนเปื้อนของเชื้อราในปลาและอาหารทะเลปริมาณน้อยมาก แต่อาจพบพวก *Aspergillus, Penicilium* และ *Fusarium* โดยส่วนใหญ่มักพบ

ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ที่ตากแห้ง ซึ่งอนุเทพ ภาสุระ (2541) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลตากแห้ง ได้แก่ หมึกตากแห้ง ปลา และกุ้งแห้ง ที่วางจำหน่ายในตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี เมื่อนำมาจำแนกพบว่าส่วนใหญ่เป็นเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ถึง 66.20 เปอร์เซ็นต์

2.6 นมและผลิตภัณฑ์

พบการปนเปื้อนของเชื้อราน้อย แต่ก็อาจเจอเชื้อรากลุ่ม *Penicillium, Cladosporium, Alternaria, Geotrichum* และ *Fusarium* แต่มักพบเชื้อราปนเปื้อนในอาหารสัตว์ซึ่งหากเชื้อราสร้างสารพิษก็จะมีผลต่อสัตว์ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เช่น นม ซึ่งลักษณ์กนก สินธุ์ประสพชัย และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาโดยตรวจหาปริมาณแอฟลาทอกซินรวมในอาหารโคข้นสำหรับเลี้ยงโคนมและในน้ำนมผลพบว่าปริมาณแอฟลาทอกซินรวมที่ตรวจพบในอาหารข้นที่ใช้เลี้ยงโคนมมีแนวโน้มสัมพันธ์กับปริมาณแอฟลาทอกซินรวม M_1 ที่ขับออกมากับน้ำนมซึ่งเป็นอนุพันธ์ของแอฟลาทอกซินชนิด B_1 เนื่องจากโคได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้างสารพิษแอฟลาทอกซินเข้าไป

2.7 เครื่องเทศ และสมุนไพรอบแห้ง

การปนเปื้อนของเชื้อรายังเป็นปัญหากับการเก็บรักษาพืชสมุนไพร เนื่องจากปัจจุบันมีการใช้สมุนไพรเพื่อบำรุงสุขภาพ ป้องกันและรักษาโรค ซึ่งในการนำมาใช้ถ้าใช้ในรูปสดมักไม่มีปัญหา แต่สมุนไพรที่ใช้เป็นยาส่วนใหญ่จะใช้ในรูปของสมุนไพรตากแห้งเก็บไว้ แล้วนำออกมาจำหน่ายเพื่อปรุงเป็นยา การปนเปื้อนเชื้อราจึงเป็นปัญหาสำคัญในผลิตภัณฑ์กลุ่มนี้ซึ่งจากการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราในเครื่องเทศและสมุนไพร 30 ชนิดในประเทศไทย พบว่าราที่แยกได้จากเครื่องเทศและสมุนไพรบ่อยที่สุดได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Rhizopus* โดยพบร้อยละ 56.7, 11.7 และ 10.8 ตามลำดับ (สุดารัตน์ บุญจันทร์ และอุษณีย์ เพชรสุรีย์, 2537) สำหรับในต่างประเทศพบว่าการปนเปื้อนของเชื้อราในเครื่องเทศชนิดต่างๆส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม *Aspergillus*, *Eurotium* และ *Penicillium* (Bullerman, 2000) โดยมีการพบว่าเชื้อราที่พบปนเปื้อนในเครื่องเทศและสมุนไพรในประเทศอียิปต์ส่วนใหญ่เป็น *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Fusarium* ตามลำดับ โดยเชื้อราที่พบมากที่สุดคือ *Aspergillus* ได้แก่ *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. niger* (Aziz *et al*., 1998) จะเห็นได้ว่าเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* และ *Rhizopus* เป็นราที่พบมากที่สุดโดยเฉพาะ 3 จีนัสแรกเป็นราที่สามารถสร้างสารพิษได้ ซึ่งอาจเป็นอันตรายแก่ผู้บริโภคได้หากเชื้อราเหล่านี้สามารถเจริญและสร้างสารพิษในผลิตภัณฑ์อาหาร จากการศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *Aspergillus* ในสมุนไพรตากแห้ง 50 ชนิดจากร้านขายยาแผนไทยในจังหวัดสงขลา พบว่าผลิตภัณฑ์สมุนไพรอบแห้งมีการปนเปื้อนเชื้อรา *A. niger* มากที่สุดและตรวจพบสารแอฟลาทอกซินในสมุนไพรอบแห้งทั้ง 50 ชนิด (อัจฉรา พัฒนเดช, 2543) ส่วนการปนเปื้อนของสารพิษแอฟลาทอกซิน

ในผลิตภัณฑ์สมุนไพรอบแห้งในประเทศไทยพบปนเปื้อนแอฟลาทอกซิน 5 ชนิด จากตัวอย่างทั้งหมด 28 ตัวอย่างคิดเป็น 18 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณแอฟลาทอกซิน 1.7-14.3 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งแสดงว่ามีการปนเปื้อนจากเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* (Tassaneeyakul *et al*., 2004)

Table 1. Occurrence of *Aspergillus* in some agricultural commodities.

Commodity	Country	species	Reference
Peanuts	Sudan	*A. flavus*	Elamin *et al*., 1988
	Egypt	*A. flavus*+*A. niger*	Moubasher *et al*., 1980
	S. Africa	*A. flavus*+*A. parasiticus*	Dutton & Westlake, 1989
Maize	China	*A. flavus*	Zhen-Zhen, 1989
	Egypt	*A. flavus*+*A. niger*	Moubasher *et al*., 1980
	India	*A. flavus*	Gaur & Siradhana, 1989
	Nigeria	*A. flavus*+*A. parasiticus*+*A.*	Aja Nwachukwu & Emejuaiwe,
	USA	*niger*	1994
		A. flavus	Guo *et al*., 1995
Wheat	China	*A. flavus*	Zhen-Zhen, 1989
	Russia	*A. flavus*	L'Vova *et al*., 1993
Rice	China	*A. flavus*	Zhen-Zhen, 1989
	India	*A. flavus*+*A. parasiticus*	Jayaraman&Kalyanasundaram,
			1990
Millet	India	*A. flavus*+*A. parasiticus*	Mishra & Daradhiyar, 1991
Soybean	Argentina	*A. flavus*+*A. parasiticus*	Pinto *et al*., 1991
Sunflower oil	China	*A. flavus*	Zhen-Zhen, 1989
	Russia	*A. flavus*	L'Vova *et al*., 1993

ที่มา : Ismail (1997)

3. เชื้อราที่สร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน

เชื้อรากลุ่มที่สำคัญสามารถสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้แก่ เชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* ได้แก่ *A. parasiticus* และ *A. flavus* และมีรายงานพบการสร้างใน *Aspergillus nomius* ซึ่งตัวที่สำคัญคือ *A. flavus* สปอร์ของเชื้อราเหล่านี้พบอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะในดิน (WHO, 1979; Pitt and Hocking, 1999)

Aspergillus เป็นเชื้อราที่พบได้ทั่วไป จัดเป็นเชื้อราจำพวก mitosporie fungi และ perfect stage อยู่ในไฟลัม Ascomycota เป็นเชื้อราชนิดที่เป็นเส้นใย (filamentous fungi) มีผนังกั้น (septate hypha) ไม่มีสีหรือสีน้ำตาลอ่อนหรือสีอื่นตามบริเวณที่ขึ้นโคโลนี มีสีต่างกัน มีก้านชู (conidiophore) งอกจากเส้นใย ตำแหน่งที่ก้านชูงอกจากเส้นใยมีขอบเขตที่ชัดเจน ปลายของก้านชูงอกจากใยเรียกว่า foot cell ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเส้นใย และมีขอบเขตที่ชัดเจน ปลายของก้านชูพองออกเป็นเวสิเคิล (vesicle) บนเวสิเคิลมีอวัยวะสร้างสปอร์ (phialide) เป็นแบบชั้นเดียว (uniseriate) หรือสองชั้น (biseriate) อวัยวะสร้างสปอร์เป็นที่เกิดของ โคนิเดียมซึ่งมีเซลล์เดียวมักมีรูปร่างกลม โคนิเดียมอ่อนจะอยู่ปลายอวัยวะสร้างสปอร์เมื่อโคนิเดียมอ่อนเกิดจะดันโคนิเดียมแก่ออกไปจึงปรากฏโคนิเดียมเป็นสาย (basipetal chain) ผิวของโคนิเดียมอาจเรียบหรือขรุขระคล้ายหนาม ซึ่งจากลักษณะดังกล่าวนี้สามารถนำมาใช้แยกสายพันธุ์เชื้อรา *Aspergillus* เช่น โดยอาศัยลักษณะโคโลนี รูปของเวสิเคิลที่กลมหรือรูปโดมมีอวัยวะสร้างสปอร์ชั้นเดียวหรือ 2 ชั้น โคนิเดียมผิวเรียบหรือขรุขระ เป็นต้น (Raper and Funnell, 1997)

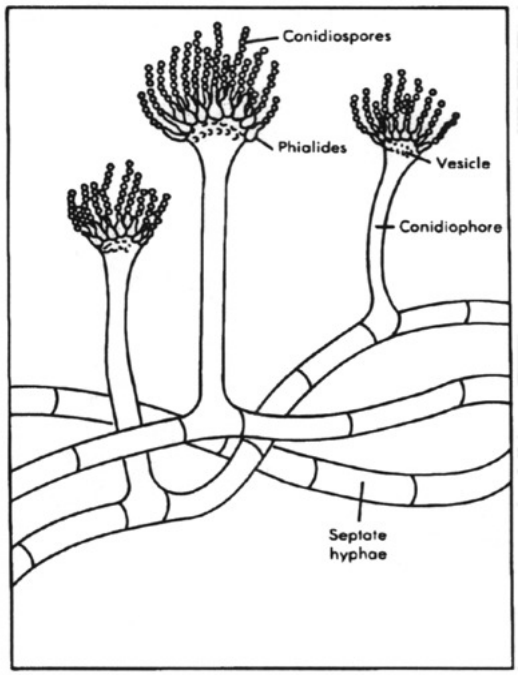


Figure 1. Model morphology of *Aspergillus flavus*.

ที่มา : http://www.cartage.org.lb/en/themes/Sciences/LifeScience/GeneralBiology/Microbiology/Fungi/Classification.html

เชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* จัดอยู่ใน sub division Deuteromycotina , class Hyphomycetes (Alexopoulos *et al*., 1996) *A. flavus* และ *A. parasiticus* เป็นเชื้อราที่มักพบปนเปื้อนในอาหาร และผลิตผลทางการเกษตรในระหว่างการเก็บรักษา การเจริญและการสร้างสารพิษเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในสภาพดินฟ้าอากาศของเขตร้อน เชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ซึ่งมีการปนเปื้อนในสิ่งมีชีวิต และสิ่งไม่มีชีวิตมากที่สุด ลักษณะทั่วไปเป็นเส้นใยที่มีผนังกั้น ขนาดของโคโลนีในอาหาร Czapek' s solution agar อายุ 10 วัน มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-4 เซนติเมตร สปอร์จะงอกจากเส้นใยโดยตรงสปอร์ที่อายุยังน้อยจะมีสีเหลือง เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวและสุดท้ายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ก้านชูสปอร์มีผนังหนาไม่มีสี ผิวหยาบ และความยาวปกติประมาณ 1 มิลลิเมตร เวสิเคิลจะมีลักษณะค่อนข้างกลมส่วนใหญ่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25-45 ไมครอน (Torres *et al*., 1980) ปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวกับการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* (พรรณกร อิ่มวิทยา, 2540) ได้แก่

3.1 ความชื้น (moisture) ความชื้นในอากาศถือเป็นปัจจัยสำคัญในการเจริญของรา โดยความชื้นที่เหมาะสมจะแปรผันไปตามประเภทของอาหารที่รานั้นขึ้นอยู่ ซึ่ง *Aspergillus* แต่ละชนิดเจริญได้ในความชื้นสัมพัทธ์ที่แตกต่างกัน เช่น *A. flavus*, *A. niger*, *Aspergillus candidus* ต้องการความชื้นสัมพัทธ์ 80-90 เปอร์เซ็นต์ *Aspergillus glaucus* และ *A. candidus* จะเริ่มเติบโตที่ความชื้นสัมพัทธ์ 70-75 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *Aspergillus echinulatus* และ *Aspergillus restrictus* จะเริ่มเติบโตที่ความชื้นสัมพัทธ์ 65 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น

3.2 อุณหภูมิ เชื้อ *Aspergillus* แต่ละชนิดสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิแตกต่างกัน เช่น อุณหภูมิที่เหมาะสมแก่ *A. glaucus* อยู่ระหว่าง 10-20 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อสามารถดำรงอยู่ได้ คือ 8 องศาเซลเซียส *A. flavus* อุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อสามารถเจริญได้ คือ 6-8 องศาเซลเซียส ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 36-38 องศาเซลเซียส เป็นต้น

3.3 สารอาหาร โดยทั่วไปเชื้อราสามารถเจริญได้บนอาหารเกือบทุกชนิด ไม่ว่าอาหารสดหรืออาหารแห้งตลอดจนอาหารแปรรูปและอาหารสัตว์หลายชนิด สารอาหารที่ราต้องการในการเจริญได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุบางชนิด

3.4 ค่าความเป็นกรดด่าง ในสภาวะเป็นกรด ช่วงพีเอช 4 ถึง 6 จะเป็นสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญมากที่สุด

3.5 ส่วนประกอบของบรรยากาศ ส่วนประกอบโดยเฉพาะออกซิเจนในอากาศมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* และเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ระบบสุญญากาศจึงถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการเก็บรักษาเมล็ดพืชอาหารสัตว์ เมล็ดพืชที่มีความชื้นสูง และการถนอมอาหาร

4. สารพิษแอฟลาทอกซิน

โดยทั่วไปการปนเปื้อนของสารพิษแอฟลาทอกซินทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์เป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงและคาดคะเนได้ยากเพราะเชื้อราที่สร้างสารพิษชนิดนี้ส่วนใหญ่พบอยู่ทั่วไปในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย สามารถเจริญได้ดีบนผลิตผลเกษตรเกือบทุกชนิด เชื้อราเหล่านี้ปนเปื้อนในอาหารตั้งแต่กระบวนการผลิต การเก็บเกี่ยว การขนส่ง และการเก็บรักษา การแบ่งชนิดของเชื้อราตามลักษณะการเข้าทำลายผลผลิตผลการเกษตรสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเชื้อราที่เกิดในแปลงปลูก (Field fungi) ซึ่งเข้าทำลายพืชก่อนการเก็บเกี่ยว และกลุ่มเชื้อราที่ปนเปื้อนหลังเก็บเกี่ยวหรือโรงเก็บ (Storage fungi) การปนเปื้อนของเชื้อราส่วนใหญ่เกิดจากสปอร์ หรือคอนิเดียและชิ้นส่วนเส้นใยที่กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในดินและอากาศ

สารพิษแอฟลาทอกซินจัดเป็น secondary metabolite ที่เชื้อรา *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *Aspergillus tamari*, *Aspergillus bombysis* (Kurtzman *et. al*., 1987; Goto *et. al*., 1996; Pittel., 1998 and Peterson *et. al*., 2001) สร้างขึ้นในสภาพที่จำกัด ซึ่งทำให้เกิดการสะสมของ pyruvate และกรดอะมิโนบางตัวโดยกระบวนการ polyketide biosynthesis pathway และสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินแทนกรดไขมัน (ชนิกา เอี่ยมสุภายิต และสมจินตนา ทุมแสน, 2542) สารพิษแอฟลาทอกซินเป็น heterocyclic compound จัดอยู่ในกลุ่ม difuranocoumarin (Cole and Cox, 1981) เป็นสารที่ไม่อิ่มตัว ตามธรรมชาติเป็นสารที่เสถียร (inert) แต่สามารถเปลี่ยนเป็นสารที่ไวได้ทั้งในและนอกร่างกาย ไม่ละลายในน้ำแต่ละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น เมทานอล เอทานอล คลอโรฟอร์ม สามารถทนร้อนได้สูงถึง 250 องศาเซลเซียส เรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ก่อให้เกิดความเจ็บป่วยในคนและสัตว์ที่บริโภคหรือได้รับสารนั้น สารพิษแอฟลาทอกซินที่พบในธรรมชาติมี 4 ชนิด คือ B_1, B_2, G_1 และ G_2 นอกจากนี้ยังพบ ชนิด M_1 และ M_2 ที่เป็นอนุพันธ์ของ B_1 และ B_2 ซึ่งพบในน้ำนมของคนและสัตว์ที่บริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของสารพิษแอฟลาทอกซินอยู่ โดยแต่ละชนิดจะมีความเป็นพิษมากน้อยแตกต่างกัน แอฟลาทอกซิน B_1 จะมีความเป็นพิษสูงสุด และยังเป็นชนิดที่พบมากที่สุด รองลงมาคือ แอฟลาทอกซิน G_1, B_2 และ G_2 ตามลำดับ ชื่อชนิดของแอฟลาทอกซินตั้งตามคุณสมบัติการเรืองแสงบนแผ่นโครมาโตรกราฟฟีผิวบาง (Thin-layer chromatographic TLC, plate) ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตขนาดคลื่น 365-366 นาโนเมตร โดยแอฟลาทอกซิน B_1 และ B_2 เป็นพวกเรืองแสงสีน้ำเงิน แอฟลาทอกซิน G_1 และ G_2 เป็นพวกที่เรืองแสงสีเขียวปนเหลือง (ธีรยุทธิ์ กลิ่นสุคนธ์ และชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, 2524; Ventura *et al*., 2004)

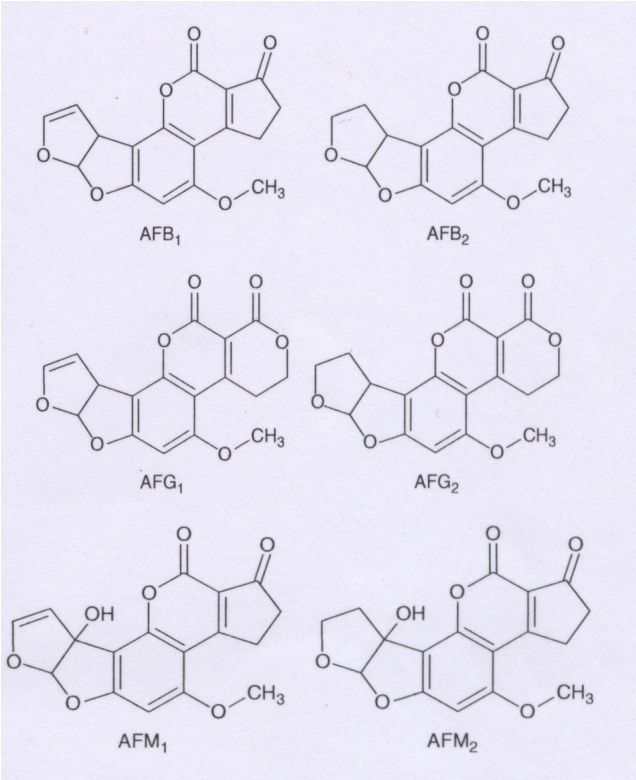


Figure 2. Structural formulas of aflatoxins.

ที่มา: Coppock and Christian (2007)

4.1 กระบวนการสังเคราะห์และการเปลี่ยนแปลงของสารพิษแอฟลาทอกซินในร่างกาย

แอฟลาทอกซินสังเคราะห์จากอะซิเตตและมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นวงแหวน ได้เป็นกรดไซคลิกโพลีคีโต (cyclicpolyketo acid) โดยมีคาร์บอน 20 ตัว ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นอะเวรูฟิน (avarufin) เวอร์ซิโคนอล (versiconol) สเตอริกมาโตซิสติน (sterigmatocystin) และแอฟลาทอกซิน B_1 ในที่สุด ไนโตรเจนและกรดอะมิโนเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมในการสังเคราะห์แอฟลาทอกซินโดย แอฟลาทอกซินจะถูกสังเคราะห์ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อหรือวัตถุดิบอาหารสัตว์ ภายใน 48 ชั่วโมง ภายหลังมีการเจริญของเชื้อราและมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 7 (Heathcote, 1984)

เมื่อสารแอฟลาทอกซิน B_1 เข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับโดยแอฟลาทอกซิน เคลื่อนย้ายมาสู่ตับและอวัยวะอื่นๆ เปลี่ยนเป็นอีพอกไซด์ (epoxide) แล้วรวมตัวกับดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน โดยไปรวมตัวกับ guanine residue ของดีเอ็นเอทำให้ดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป (นงนุช วณิตย์ธนาคม, 2540) แอฟลาทอกซินมีผลทำให้จำนวนไรโบโซมลดลงและมีลักษณะผิดปกติ ไมโตคอนเดรียเสื่อมสลาย ทำให้กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในการหายใจระดับเซลล์สูญหายไป การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของสารพิษจากเชื้อราในร่างกาย เริ่มต้นจากเมื่อสัตว์ได้รับพิษโดยผ่าน

ทางผิวหนัง สูดดมผ่านทางเดินหายใจ และกินผ่านทางเดินอาหารจะเกิดการดูดซึม (absorption) แล้วแพร่กระจาย (distribution) ผ่านกระแสโลหิต น้ำเหลือง ทางเดินหายใจ รก และอวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกาย ซึ่งสารพิษบางส่วนมีการสะสม (accumulation) หรือตกค้างที่อวัยวะสำคัญ เช่น ต่อมไทรอยด์ ตับ กระดูก ไขมัน เนื้อเยื่อต่างๆ เป็นต้น (อนงค์ บิณฑวิหค, 2546) สารพิษบางส่วนผ่านกระบวนการเมทาบอลิซึม (metabolism) ด้วยปฏิกิริยาทางเคมี ทำให้สารพิษมีฤทธิ์ลดลงหรือเพิ่มฤทธิ์รุนแรงขึ้น และจับกับสารที่มีในเซลล์ ซึ่งกระบวนการเมทาบอลิซึมสามารถจำแนกได้ 2 ระยะ คือระยะที่ 1 เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) รีดักชัน (reduction) และไฮโดรไลซีส (hydrolysis) เนื่องจากแอฟลาทอกซิน B_1 มีพิษรุนแรงมากกว่าแอฟลาทอกซินชนิดอื่นๆ ดังนั้นเมื่อสารพิษเข้าสู่ร่างกายจะทำให้เกิดกระบวนการเมทาบอลิซึม หรือเปลี่ยนแปลงสารพิษที่ตับโดยระยะที่ 1 ใช้ระบบไมโครโซมของตับเกิดปฏิกิริยาทางเคมี คือ ปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชั่น (hydroxylation) เปลี่ยนแอฟลาทอกซิน B_1 เป็น Q_1 และ M_1 ปฏิกิริยาโอ-ดีเม็ททิลเลชั่น (O-demethylation) เปลี่ยนแอฟลาทอกซิน B_1 เป็น P_1 ปฏิกิริยาอีพอกซิเดชั่น (epoxidation) เปลี่ยนแอฟลาทอกซิน B_1 เป็น แอฟลาทอกซิน B_1 epoxide ซึ่งไม่เสถียรและสามารถเปลี่ยนต่อไปเป็นสารแอฟลาทอกซิน B_1-dihydrodiol โดยใช้เอ็นไซม์อีพอกไซต์ไฮเดรส (epoxidehydrase) นอกจากนี้ยังใช้เอนไซม์ในระบบ cytoplasmic reduction system ของตับเกิดปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยนแอฟลาทอกซิน B_1 เป็น aflatoxicol ทำให้เกิดเมทาบอลิซึม แอฟลาทอกซิน B_1 ทั้งหมดจึงมีพิษน้อยลง ระยะที่ 2 เกิดปฏิกิริยาคอนจูเกชั่น (conjugation) โดยแอฟลาทอกซิน B_1 จับกับกลูตาไทโอน ซึ่งมีพิษรุนแรงน้อยลง แต่จะเกิดมะเร็งตับได้ด้วยการจับตัวกับดีเอ็นเอ หรือโปรตีนด้วยพันธะโควาเลนท์ นอกจากนี้สารพิษบางส่วนถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ อุจจาระ ลมหายใจ น้ำดี เหงื่อ น้ำนม น้ำลาย และของเสียผ่านต่อม หรืออวัยวะรวมทั้งน้ำย่อยจากระบบทางเดินอาหาร (Heathcote,1984)

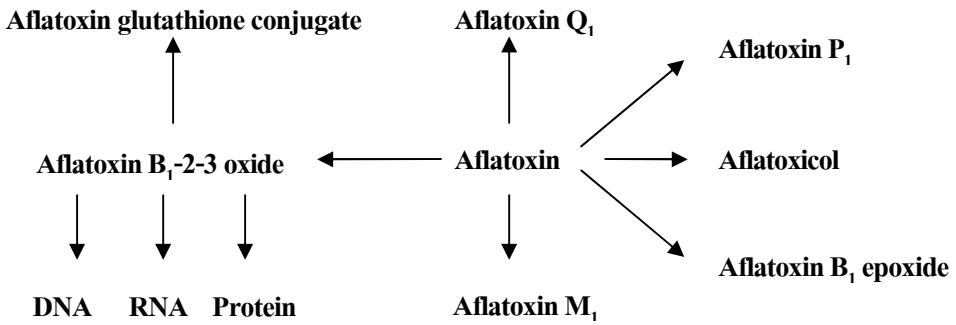


Figure 3. Aflatoxin metabolites.

ที่มา : ดัดแปลงจาก วรนันท์ ศุภพิพัฒน์ (2538)

4.2 อันตรายจากสารพิษแอฟลาทอกซิน

แอฟลาทอกซินที่พบในผลิตผลจากการเกษตรรวมถึงอาหารสำเร็จรูปของคนและสัตว์ มีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันตามชนิดของเชื้อรา ระยะเวลาของการเจริญ รวมถึงชนิดของอาหารด้วย ดังนั้นคนและสัตว์อาจได้รับแอฟลาทอกซินเข้าสู่ร่างกายผ่านทางเดินอาหารในปริมาณต่างกัน แต่ถ้าได้รับเป็นเวลานานอาจทำให้เกิดโรคตับแข็ง หรือมะเร็งตับได้ ถ้าได้รับปริมาณสูงในระยะเวลาสั้นๆ อาจเกิดอาการเป็นพิษเฉียบพลันได้ แอฟลาทอกซินสามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ที่บริโภคเอาอาหารที่มีสารพิษเหล่านี้เข้าไปโดยชักนำให้เกิด mutagenic activity และทำลาย DNA และพบว่าเป็นสารก่อมะเร็งในปลา หมู สัตว์เลี้ยง และสัตว์ทดลอง (พรรณกร อิ่มวิทยา, 2540) ทำให้คุณภาพของสัตว์เลี้ยงต่ำลง เกิดการกลายพันธุ์ และเป็นหมัน สารพิษแอฟลาทอกซินพบครั้งแรกที่ประเทศอังกฤษในปี 1960 โดยเกิดโรคระบาดขึ้นในไก่งวง นอกจากนี้ยังพบการระบาดในประเทศเคนยาและยูกานดา (Asplin and Carnaghan, 1961 อ้างโดย พรรณกร อิ่มวิทยา, 2540) สารพิษแอฟลาทอกซินมีผลต่อตับ ทำให้เกิดตับอักเสบ ตับแข็ง เนื้องอกในตับ และโรคมะเร็งตับ ลักษณะเด่นที่ปรากฏ คือ มีผลต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมและสุขภาพ เช่น ทำให้เกิดการเจริญเติบโตช้าลง มีปัญหาเกี่ยวกับกระบวนการหายใจ มีภูมิต้านทานลดลง เกิดอาการอุจจาระร่วง และตกเลือด (Guthrie, 1979) นอกจากนี้อาจมีอาการอื่นที่ปรากฏร่วมด้วย เช่น มีไขมันแทรกในตับ ท้องมาน บวมน้ำ ท่อน้ำดีเกิดการขยายตัวใหญ่ขึ้น ซึ่งอาการที่ปรากฏเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นด้วย (Cole and Cox, 1981) สำหรับอาการในเด็กพบว่ามีอาการคล้าย Reye's Syndrome คือเด็กจะมีอาการชัก หมดสติ เกิดความผิดปกติของเซลล์ตับและสมอง เด็กจะเสียชีวิตภายใน 2-3 วัน ซึ่งพบว่าเป็นภาวะของโรคที่เกิดขึ้นอย่างเฉียบพลันหลังจากได้รับสารพิษแล้ว ในผู้ใหญ่มักเกิดในรูปการสะสมสารพิษเป็นเวลานานจึงแสดงอาการ โดยความเป็นพิษจะมากหรือน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษที่ได้รับ ความถี่ของการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย อายุ เพศ น้ำหนัก ฮอร์โมน ชนิดพันธุ์สัตว์ สภาวะการทำงานของเอนไซม์ในตับ รวมถึงโภชนาการที่ได้รับ (กนกรัตน์ ป้องประทุม, 2540; สุกัญญา กองเงิน และคณะ 2540; Jackson and Groopman, 1999) Suttajit และ Pichitpaja (1983) พบว่าแอฟลาทอกซินในปริมาณ 0.30 พีพีบี สามารถก่อมะเร็งในตับสัตว์ทดลองได้ จากการทดลองในหนูพบว่าแอฟลาทอกซินสามารถส่งผ่านรกของแม่ไปสู่ตัวอ่อนได้มีผลทำให้ตัวอ่อนมีการเจริญผิดปกติและอาจถึงตายได้ และพบว่าแอฟลาทอกซินจะไปยับยั้งเอนไซม์ DNA-dependent RNA polymerase การสังเคราะห์ RNA และการสังเคราะห์โปรตีนในกระต่าย (Smitasiri, 1983) ส่วนในไก่พบว่าเมื่อไก่ได้รับสารพิษจะแสดงอาการซึม ท้องร่วง เบื่ออาหาร โลหิตจางและตายในที่สุด ในสุกรมีอาการซูบผอม ขนหยาบกร้าน อุจจาระร่วงมีสีเหลืองจัด บางครั้งอาจท้องผูก ขาหลังไม่มีกำลัง ยืนตัวโกร่ง มีอาการดีซ่าน โลหิตจาง อาจตายภายใน1-5 วัน (กวินดา ตั้งกิจวานิช และคณะ, 2538)

สารพิษแอฟลาทอกซิน B_1 เป็นสารพิษแอฟลาทอกซินที่มีความเป็นพิษสูงที่สุดพบมากในถั่ว และเมล็ดธัญพืช (Gowda *et al*., 2004) เมื่อสารพิษนี้ปนไปกับอาหารทำให้คนและสัตว์ได้รับสารพิษ ส่งผลให้เมทาบอลิซึมในร่างกายมีปัญหา ความเป็นพิษของแอฟลาทอกซินแม้ปริมาณเพียงเล็กน้อยก็ก่อให้เกิดอันตรายได้อย่างรุนแรง โดยมีหน่วยวัดความเป็นพิษเป็นส่วนในพันล้านส่วน หรือ พีพีบี หรือไมโครกรัมต่อกิโลกรัม โดย FAO รายงานว่าปริมาณสูงสุดของแอฟลาทอกซินที่อนุญาติให้ปนเปื้อนในผลิตผลทางการเกษตรในอาหารสัตว์ และอาหารคน กำหนดแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ในประเทศไทยกำหนดตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่องมาตรฐานสารปนเปื้อน ข้อ 4 กำหนดให้มีสารพิษแอฟลาทอกซินปนเปื้อนในอาหารไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (อรุณศรี วงศ์อุไร, 2542)

Table 2. Regulation of aflatoxin contaminated in foods and feedstuffs.

Country	Products	Levels must not exceed (ppb)
USA	Foods	20
	Milk	0.5
	Powdered milk	1
	Feeds	20-25
Japan	All food	10
	Peanut for feedstuffs	1000
Malaysia	foods	35
Philippine	Foods and Foodstuffs	20
	Feeds	200
Italy	Peanut	50
Israel	All food	20
France	Feeds	700
Denmark	Peanut	5-10
Canada	Peanut	15
Brazil	Pea garbage	50
Belgium	Feeds	40
Netherlands	Foods and Feeds	5

Table 2. Regulation of aflatoxin contaminated in foods and feedstuffs (cont.).

Country	Products	Levels must not exceed (ppb)
China	Corn and product	20
	Rice	10
	Pea	5
	Infant food	0
Thailand	Foods	20

ที่มา: กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ (2543)

5. ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อรา

5.1 ชนิดของเชื้อรา

เชื้อราต่างชนิดกันจะสร้างแอฟลาทอกซินแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณของแอฟลาทอกซิน มีเชื้อราบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถสร้างแอฟลาทอกซินได้ การที่พบเชื้อราบางชนิดเจริญอยู่บนอาหารไม่จำเป็นว่าจะต้องมีแอฟลาทอกซินปนเปื้อนอยู่ เพราะเชื้อราบางสายพันธุ์ไม่สร้างแอฟลาทอกซิน ในทางกลับกันการที่ไม่พบเชื้อราเจริญบนอาหารก็ไม่ได้หมายความว่าอาหารนั้นจะปลอดภัยจากแอฟลาทอกซิน เพราะแม้ว่าเชื้อราจะถูกทำลายไปแล้วแต่แอฟลาทอกซินก็ยังคงอยู่ในอาหารนั้น (ปริศนา สิริอาชา, 2534) ซึ่งจากการตรวจหาเชื้อราที่สร้างสารแอฟลาทอกซินในสมุนไพรแห้งจากร้านขายยาในจังหวัดสงขลา 50 ชนิดพบว่ามีสมุนไพร 9 ชนิดที่ตรวจไม่พบเชื้อราแต่กลับพบแอฟลาทอกซินในตัวอย่างสมุนไพรทุกชนิด (อัจฉรา พัฒนเดช, 2543) ยกตัวอย่าง เช่น *A. flavus* ที่พบในประเทศไทยสามารถสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ (ธีรยุทธิ์ กลิ่นสุคนธ์ และชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, 2524) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Glinsukon (1983) ที่พบว่า *A. flavus* ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติของประเทศไทยประมาณ 84.60 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้โดยเฉพาะชนิด B_1 และ B_2 Pitt (1989) พบว่า *A. parasiticus* จะผลิตสารพิษแอฟลาทอกซิน B กับ G ส่วน *A. flavus* จะผลิตสารพิษแอฟลาทอกซิน B อย่างเดียว และจากการรายงานของ Criseo และคณะ (2001) ได้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์พบว่า *A. flavus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษแอฟลาทอกซินกับสายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษจะให้แถบของดีเอ็นเอที่ต่างกัน

5.2 แหล่งอาหาร

เชื้อราจะเจริญและสร้างสารพิษได้มากน้อยแตกต่างกันในผลผลิตทางการเกษตรชนิดต่างๆ หรือแม้แต่ผลิตผลชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์บางครั้งพบว่าเชื้อรามีการเจริญแต่ไม่สร้างแอฟ

ลาทอกซิน ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของผลิตผลแต่ละชนิดและพันธุ์ของพืช (อรุณศรี วงศ์อุไร, 2540) โดยจากการศึกษาในอาหารสังเคราะห์พบว่าต้องมีปริมาณของไนโตรเจน กรดอะมิโน เช่น asparagines, aspatate, glycine, glutamine และ glutamate ปริมาณซูโครสและกลูโคสในปริมาณที่เหมาะสม เชื้อราจึงสามารถผลิตแอฟลาทอกซินได้สูงสุดโดยพบว่าซูโครสช่วยให้เชื้อราผลิตแอฟลาทอกซินได้ดีที่สุด (Betina, 1984) และแร่ธาตุที่สำคัญที่ช่วยให้เชื้อราสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้ดีคือ สังกะสี ซึ่งพบว่าถ้าปริมาณสังกะสีลดลงปริมาณของสารพิษแอฟลาทอกซินก็ลดลงด้วย (สุกัญญา กองเงิน และคณะ, 2540) และพบว่าอะลูมิเนียม เหล็ก สังกะสี ความเข้มข้น 40-160 กรัมต่อกรัม จะมีผลยับยั้งการผลิตแอฟลาทอกซิน B_1 จาก *A. flavus* NRRL 6513 ในถั่งลิสงได้ และนิกเกิล 4 กรัมต่อกรัม กระตุ้นการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินแต่ที่ 1 กรัมต่อกรัม จะยับยั้งการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน และนอกจากนี้ Ca^{2+} ความเข้มข้นมากกว่า 1 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินจาก *A. parasiticus* NRRL 2999 ได้ (กนกรัตน์ ป้องประทุม, 2540) Awuah and Kpodo (1996) ทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus* ด้วยสมุนไพร *Xylopia aethiopica*, *Monodera myristica*, อบเชย และพริกไทย โดยทำการเลี้ยงเชื้อราใน PDA พบว่าสมุนไพรเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินในอาหาร PDA ได้ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหาร yeast extract sucrose พบว่าเชื้อราสามารถเจริญและสร้างแอฟลาทอกซินได้

5.3 ปฏิกิริยาระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ด้วยกัน

ในอาหารโดยทั่วไปมักมีเชื้อจุลินทรีย์หลายๆ ชนิดขึ้นปะปนกันอยู่ ซึ่งเชื้อเหล่านี้จะมีปฏิกิริยาต่อกัน มีผลกระทบต่อการเจริญและการสร้างสารพิษของ *A. flavus* เช่น *Lactobacillus* sp. มีผลต่อการงอกของสปอร์ของ *A. flavus* subsp. *parasiticus* ในอาหารเหลว (Gourama and Bellerman, 1995) จุลินทรีย์หลายชนิดที่ปนเปื้อนกันจะมีผลต่อการเจริญและการสร้างสารพิษ Saner และ Burroughs (1980) รายงานว่าการแข่งขันของเชื้อรามีผลทำให้การผลิตแอฟลาทอกซินลดลง โดยพบว่าในข้าวโพดที่มีความชื้นสูงมีเชื้อรา *Fusarium* sp. และ *A. flavus* เจริญเป็นจำนวนมากแต่ไม่มีการผลิตแอฟลาทอกซิน ส่วน Ramakrishma และคณะ (1996) ได้ศึกษาลักษณะโคโลนีและการสร้างแอฟลาทอกซินเมื่อเลี้ยงเชื้อราร่วมกับเชื้อ *Penicilium verrucosum*, *Fusarium sporotrichioides* และ *Hyphopichia burtonii* โดยเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* ร่วมกับเชื้อ 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เชื้อราจะเจริญและสร้างสารพิษได้น้อยกว่าเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การเจริญและการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อราก็จะสูงไปด้วยแต่เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Penicillium verrucosu*, *Fusarium sporotrichioides* และ *H. burtonii* สามารถลดปริมาณแอฟลาทอกซินได้

5.4 สภาพแวดล้อม

5.4.1 ความชื้นและอุณหภูมิ จากการศึกษาพบว่าความชื้น อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญของเชื้อราระหว่างการเก็บรักษา Al-Yahya (1999) ได้ศึกษาการทำลายของเชื้อราระหว่างการเก็บข้าวสาลีที่ความชื้นและอุณหภูมิต่างๆ กัน พบว่ามีการเข้าทำลายของเชื้อราเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ที่ความชื้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่ 4 องศาเซลเซียส และการทำลายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ความชื้น 24 เปอร์เซ็นต์ ที่ 40 องศาเซลเซียส โดยมีระดับการทำลาย 30 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษอยู่ระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส และปริมาณความชื้นไม่ต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (Moss, 1996) รณภพ บรรเจิดเชิดชู (2530) ศึกษาการเจริญและการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* โดยใช้ข้าวโพดที่มีความชื้นภายในเมล็ด 18.8, 21.4 และ 22.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อราสามารถเจริญและสร้างแอฟลาทอกซินได้สูงสุดในวันที่ 8 ปริมาณแอฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างได้ 740, 550 และ 500 พีพีบี ตามลำดับ ส่วน Mahmoun และคณะ (1992) พบว่าความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นความชื้นสัมพัทธ์ต่ำสุดที่เชื้อราสามารถสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินและเจริญได้ในสมุนไพร anise และชะเอมเทศ และ Garaleni (1997) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร surface agar culture คือ 30 องศาเซลเซียส โดยเชื้อราจะสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้สูงสุด 0.30-0.33 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร หลังจากบ่ม 15 วัน มีค่า water activity เท่ากับ 0.996 Kurtzman และคณะ (1987) พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus* สามารถเจริญและสร้างแอฟลาทอกซินได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างมาก โดยเชื้อรา *A. flavus*, *A. nomius* และ *A. parasiticus* สามารถเจริญและสร้างแอฟลาทอกซินได้ที่ 32 องศาเซลเซียส

5.5 ระยะเวลา

ระยะเวลามีผลต่อการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อราโดยEfunyoye (1999) ได้ศึกษาการสังเคราะห์สารพิษจากเชื้อราซึ่งแยกได้จากสมุนไพรที่เก็บไว้เตรียมยาของประเทศไนจีเรีย ในอาหารกึ่งสังเคราะห์ พบว่าสารพิษแอฟลาทอกซินที่สร้างขึ้นโดยเชื้อรา *A. parasiticus* จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาสมุนไพรนานและพบว่าเชื้อราจะสร้างแอฟลาทอกซินในวัตถุดิบสมุนไพรได้ดีกว่าในอาหารกึ่งสังเคราะห์ และมีรายงานว่าเชื้อรา *A. flavus* สามารถเจริญและสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 11-37 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25-30 องศาเซลเซียส เชื้อรานี้จะสร้างแอฟลาทอกซินใน 48 ชั่วโมง (ปริศนา สิริอาชา, 2534)

5.6 พีเอช

พีเอชมีผลต่อการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินซึ่งพบว่าค่าพีเอชที่เป็นกรดทำให้สารสกัดมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus* คือ *A. niger* จะช่วยลดพีเอชในอาหารให้ต่ำลงทำให้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. flavus* (Horn and Wicklow, 1983)

6. วิธีควบคุมและป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษแอฟลาทอกซิน

การศึกษาถึงการป้องกันกำจัดเชื้อราและสารพิษแอฟลาทอกซิน อาจแบ่งเป็นวิธีใหญ่ๆ ได้ 3 วิธี คือ วิธีทางชีววิทยา วิธีทางกายภาพ และวิธีทางเคมี

6.1 วิธีทางชีววิทยา

การควบคุมการกำจัดเชื้อราและแอฟลาทอกซินในทางชีววิทยา ทำได้โดยการนำเอาจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ คือ แบคทีเรีย ยีสต์ รา แอคติโนมัยซีส และอื่นๆ มาทำการทดสอบความสามารถในการควบคุมการกำจัดเชื้อราและสารพิษแอฟลาทอกซินหรือเปลี่ยนรูปโครงสร้างของแอฟลาทอกซิน ทำให้เป็นสารพิษที่มีความเป็นพิษลดลงหรือไม่เกิดความเป็นพิษต่อสัตว์อื่นๆ สารสกัดโปรตีนจากแบคทีเรีย *Flavobacterium auranticum* สามารถทำลายพิษแอฟลาทอกซิน B_1 ซึ่งส่วนที่คาดว่ามีประสิทธิภาพในการทำลายสารพิษคือเอนไซม์และที่พีเอช 8 จะช่วยให้ทำลายพิษได้มากกว่าที่พีเอช 5 (Smiley and Draughon, 2000) Ceigler (1966) พบเชื้อราบางชนิดสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแอฟลาทอกซิน B_1 ไปเป็นสารเคมีตัวใหม่ได้ แต่พบว่ามีเชื้อแบคทีเรีย *F. anranticum* NRR ซึ่งสามารถทำลายแอฟลาทอกซินในอาหารเหลวได้ ดุษณี ธนะบริพัฒน์ (2532) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงรา *Rhizopus oligosporus* ร่วมกับ *A. parasiticus* ในถั่วเหลืองสามารถยับยั้งการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้ Gourama และ Bullerman (1995) รายงานว่าการผสม *Lactobacillus* sp. จะช่วยลดการเจริญเติบโตของรา *A. flavus* ได้ El-Nezami และคณะ (2000) ได้ศึกษาความสามารถในการกำจัดสารพิษแอฟลาทอกซิน B_1 ของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* สายพันธุ์ GG และสายพันธุ์ LC-705 โดยใช้วิธี chicken intestinal loop technique และการรวมตัวกับแอฟลาทอกซิน B_1 พบว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถกำจัดสารพิษแอฟลาทอกซินได้ และ *L. rhamnosus* สายพันธุ์ GG เป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด นอกจากนี้พบว่าอาหารที่ผ่านกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์สามารถลดปริมาณสารพิษแอฟลาทอกซินได้

6.2 วิธีทางกายภาพ

จากการใช้รังสีกับแอฟลาทอกซินพบว่าแอฟลาทอกซินจะตอบสนองต่อรังสีอุลตร้าไวโอเลตการใช้รังสีอุลตร้าไวโอเลตสามารถทำลายแอฟลาทอกซินในสภาพบริสุทธิ์ได้ดีกว่าแอฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบอาหาร การทำลายนี้ขึ้นกับชนิดและความหนาของตัวกลางที่ยอม

ให้รังสีผ่าน รวมทั้งส่วนประกอบทางเคมีอื่นๆ ในอาหารด้วย ซึ่งอัมรา ชินภูต และประวัติ ตันบุญเอก (2543) ได้นำถั่งลิสงป่นและพริกป่นมารับแสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 245 นาโนเมตร เป็นเวลา 90 นาที พบว่าสามารถลดสารพิษแอฟลาทอกซินในพริกป่น และถั่วลิสงป่นได้ 43.75 เปอร์เซ็นต์ และ 56.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การสกัดด้วยตัวทำละลาย สกัดโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ เนื่องจากสารแอฟลาทอกซินมีคุณสมบัติละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซิโตน แอลกอฮอล์ คลอโรฟอร์ม เบนซิน เฮกเซน และไอโซโพรพานอลในรูปสารบริสุทธิ์ และสารผสมสามารถสกัดแอฟลาทอกซิน ออกจากผลผลิตทางการเกษตรได้ดี (กนกรัตน์ ป้องประทุม, 2540) แต่ไม่คุ้มค่าในทางอุตสาหกรรม นอกจากนี้มีการใช้เกลือแกงและแคลเซียมคลอไรด์ พบว่าใช้ได้ดีในน้ำมันพืช

การให้ความร้อน การทำลายแอฟลาทอกซินในอาหารด้วยการใช้ความร้อนระหว่างการเตรียมอาหารอาจทำให้แอฟลาทอกซินลดลงไปได้บ้างบางส่วน ความพยายามที่จะใช้ความร้อนในรูปการต้ม อบ คั่ว และนึ่งโดยใช้ความดันไม่ค่อยได้ผลต่อการทำลายแอฟลาทอกซิน B_1 เท่าที่ควร แอฟลาทอกซินที่แยกมาจากอาหารจะคงสภาพเดิมจนกระทั่งใกล้จุดหลอมตัวที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส (Feuell, 1966; อ้างโดย กนกรัตน์ ป้องประทุม, 2540)

การทำให้เจือจาง ทำให้เจือจางโดยการนำวัตถุดิบที่มีสารพิษแอฟลาทอกซินไปผสมกับวัตถุดิบที่ปราศจากสารพิษแอฟลาทอกซินเพื่อลดระดับสารพิษในวัตถุดิบนั้นๆ ให้ลดลงจนอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดอันตราย (สุกัญญา จัตตุพรพงษ์, 2530)

การดูดซับ เป็นการใช้สารที่มีคุณสมบัติในการดูดซับ ได้แก่ สารประกอบประเภทอะลูมิโนซิลิเกต ผสมลงในวัตถุดิบอาหาร สารประเภทนี้มีโครงสร้างเป็นผลึก ที่ประกอบด้วยรูพรุนจำนวนมากมายกระจายอยู่ระหว่างโมเลกุล มีความสามารถในการดูดซับสารพิษแอฟลาทอกซินไว้ในโครงสร้างได้ ในประเทศไทยมีรายงานของ สุมาลัย ศรีกำไลทอง และสุภัทรา มั่นสกุล (2525) ใช้สารฟอกสีซึ่งเป็นสารประกอบซิลิเกตเชิงซ้อนชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วยแร่มอนท์โมริลโลไนท์ ในการลดปริมาณแอฟลาทอกซินในน้ำมันถั่วลิสง และน้ำมันมะพร้าวโดยใส่ดินฟอกสี 0.30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของน้ำมันจะสามารถลดปริมาณแอฟลาทอกซินในน้ำมันถั่วลิสงจาก 76 พีพีเอ็ม เป็น 7.85 พีพีเอ็ม และลดปริมาณแอฟลาทอกซินในน้ำมันมะพร้าวจาก 25 พีพีเอ็ม ให้หมดไปได้

6.3 วิธีการทางเคมี

การใช้สารเคมีสังเคราะห์ สารเคมีหลายชนิดใช้ได้ผลดีและมีประสิทธิภาพในการกำจัดสารพิษแอฟลาทอกซิน รวมทั้งสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อราที่สร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้ด้วย เช่น โซเดียมคลอไรด์ แอมโมเนีย กรดเบนโซอิก สารฟีนอลลิก โซเดียมเบนโซเอต โซเดียมไบซัลไฟต์ ยาฆ่าแมลงบางชนิด Tanaboripat (1992) ทดลองใช้โซเดียมคลอไรด์ กรดโพรพิโอนิก

และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ กันเพื่อยับยั้งการเจริญและสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อรา โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 40, 80 และ 120 มิลลิกรัมต่อกรัม แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.20, 0.50, 1.00 และ 1.50 เปอร์เซ็นต์ และกรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 500, 1000 และ 1500 ไมโครกรัมต่อกรัม พบว่าการใช้โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 40 และ 80 มิลลิกรัมต่อกรัม สามารถยับยั้งการผลิตแอฟลาทอกซินได้ และที่ความเข้มข้น 120 มิลลิกรัมต่อกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และการผลิตแอฟลาทอกซิน กรดโพรพิโอนิกความเข้มข้น 1500 ไมโครกรัมต่อกรัม สามารถยับยั้งการสร้างแอฟลาทอกซินได้ และการใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดการสร้างแอฟลาทอกซินได้ การใช้สารยับยั้งชีวภาพ เนื่องจากการใช้สารเคมีสังเคราะห์อาจมีข้อจำกัดในเรื่องความปลอดภัยทำให้ปัจจุบันได้มีการนำเอาองค์ประกอบในสมุนไพรบางชนิด เครื่องเทศ และพืชบางชนิดมาใช้ยับยั้งการเจริญของ เชื้อราที่สร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน เนื่องจากประเทศไทยมีพืชหลายชนิด ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและประโยชน์ด้านอื่นๆ ต่างกันไป ผลการศึกษาพบว่ามีสมุนไพรหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษแอฟลาทอกซินและเชื้อราอื่นๆ ได้ เช่น มะนาว, กระเทียม, ขิง, น้ำมันจากใบตะไคร้, เมล็ดโป๊ยกั๊ก, รากแฝกหอม, oregano, หัวกระเทียม, ต้นกระเทียม, ต้นหอม และไทม์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* ได้แก่ *A. niger*, *A. flavus* และ *A. ochraceus* โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย และเป็นพิษต่อสปอร์เชื้อรา นอกจากนี้สามารถยับยั้งเชื้อราสายพันธุ์อื่น ได้แก่ *Fusarium oxysporium*, *Penicillium* sp. ได้ (ดุษณี ธนบริพัฒน์ และคณะ, 2532; Gangrade *et. al.*, 1991; Yine and Cheng , 1998; and Paster *et. al*., 1995) Montes-Belmont และ Carvajal (1998) ได้ทำการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืช 11 ชนิด ต่อการเจริญของ *A. flavus* ในเมล็ดข้าวโพด พบส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหย 8 ชนิด คือน้ำมันหอมระเหยของอบเชย, เปปเปอร์มินต์, โหระพา, origanum, epazote, กานพลู และไทม์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราในเมล็ดข้าวโพดได้ Suzuki และคณะ (1973) รายงานว่า กระวาน อบเชย พริกหอม เทียนขาวมีคุณสมบัติลดความเป็นพิษของแอฟลาทอกซิน B_1 B_2, G_1 และ G_2 ของ *Aspergillus* sp. ได้ น้ำมันอบเชย และน้ำมันกานพลู ที่ความเข้มข้นต่างๆ สามารถยับยั้งการเจริญและการผลิตแอฟลาทอกซิน B_1 ของเชื้อ *A. flavus* ได้ (Patkar *et.al*.,1993; Sinha *et.al.*, 1993) Mahmoud (1994) ได้ศึกษาผลของสารประกอบน้ำมันหอมระเหย 20 ชนิดต่อการเจริญและการผลิตแอฟลาทอกซิน พบน้ำมันหอมระเหย 5 ชนิด ได้แก่ geraniol, nerol, citronellol และ cinnamaldehyde ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างแอฟลาทอกซินได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 500 พีพีเอ็ม

7. พืชตระกูลส้ม

พืชตระกูลส้มจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากชนิดหนึ่งของประเทศไทยสามารถปลูกได้ทั่วทุกภาคของประเทศ จัดเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก หรือไม้ต้นขนาดเล็กในตระกูล Citrus วงศ์ Rutaceae จีนัส *Citrus* มีมากกว่า 1,000 สปีชีส์ เติบโตกระจายอยู่ทั่วโลก (Roy, 1996) ส้มเป็นผลไม้ที่นิยมบริโภคเนื่องจากเป็นผลไม้รสเปรี้ยว หรือหวานตามแต่ชนิด และมักมีแคลเซียม โปแทสเซียม วิตามินเอ และวิตามินซี มากเป็นพิเศษ ซึ่งในส่วนเหลือทิ้งคือเปลือกนั้นเป็นวัตถุดิบในการเตรียมน้ำมันหอมระเหยได้เป็นอย่างดีนอกจากนั้นในส่วนใบและดอกก็พบว่ามีน้ำมันหอมระเหย โดยจะสังเกตได้ชัดเมื่อนำผิวของผลหรือใบขึ้นไปส่องแสงแดดจะเห็นเป็นจุดเล็กๆ ซึ่งจุดเหล่านั้นคือต่อมที่เก็บน้ำมันหอมระเหย (oil gland)

ส้มจัดเป็นผลไม้ชนิด hesperidium เจริญมาจาก superior ovary แบ่งตามลักษณะสัณฐานวิทยาของผลส้มประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนผิวนอกสุดของผลส้มเรียกว่าชั้น epicarp ประกอบด้วยส่วนที่เป็นสีของเปลือกส้ม หรือเรียกว่าชั้น flavedo ประกอบด้วยเซลล์จำนวนมากซึ่งมีคาร์โรทีนอยด์เป็นองค์ประกอบผนังเซลล์ด้านนอกของเซลล์ประกอบด้วยคิวติน (cutin) และขี้ผึ้ง (wax) เป็นเครื่องป้องกันการสูญเสียน้ำของผลส้ม และสามารถพบต่อมน้ำมันได้ในชั้น flavedo ซึ่งเป็นโครงร่างที่เกาะติดกับผิวส้มภายในประกอบด้วยน้ำมัน ซึ่งแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของส้มถัดมาเป็นชั้น mesocarp หรือ albedo เป็นชั้นที่อยู่ถัดจาก epicarp เป็นชั้นบางสีขาวคล้ายฟองน้ำประกอบด้วยสารพวกเพคติน และเอมิเซลลูโลสจำนวนมากและส่วนในสุดของผลส้มเป็นส่วนที่รับประทานได้ หรือ endocarp ซึ่งประกอบด้วยกลีบส้มจำนวนมากภายในกลีบประกอบด้วยเมล็ดเล็กน้อยและเต็มไปด้วยถุงน้ำส้มจำนวนมากที่เชื่อมติดกันกับผนังกลีบส้ม

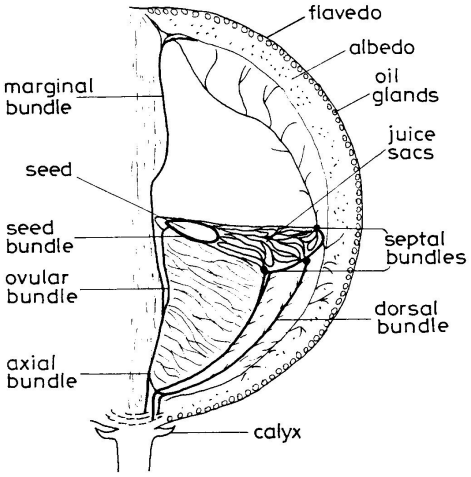


Figure 4. Structure of citrus fruit.

ที่มา : Roy (1996)

7.1 ชนิดของส้มที่พบในประเทศไทย

7.1.1 ส้มโอ (pomelo) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus maxima* Merr เป็นไม้ผลยืนต้นสูง 5-10 เมตร แตกกิ่งก้านสาขาซึ่งมีขนและหนามเล็กๆ ใบประกอบมีใบย่อยใบเดี่ยวเรียงสลับกัน ผลเป็นรูปทรงกลม บางพันธุ์ตรงขั้วมีจุกสูงขึ้นมาเหนือผิวผล ผลอ่อนมีสีเขียวเมื่อแก่จัดเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลืองผิวของผลไม่เรียบ ผิวของผลมีน้ำมันหอมระเหย มีการนำไปใช้ประโยชน์ส่วนของเปลือกผลสีขาวสามารถเชื่อมเป็นอาหารหวาน เนื้อผลรับประทานเป็นผลไม้ได้

7.1.2 ส้มโชกุน (Shogun) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus reticulate* cv Shogun เป็นส้มเขียวหวานที่ได้จากการผสมพันธุ์ระหว่างส้มเขียวหวานธรรมดากับส้มจีนพันธุ์บิกกาจากซัวเถา ส้มโชกุนมีลักษณะที่พิเศษคือมีรสหวานเข้ม ไม่มีกาก กลิ่นหอมคล้ายส้มจีน ผลส้มมีทรงกลมแป้นเล็กน้อย ส่วนสูงจะสั้นกว่าส่วนกว้าง ผลส้มขนาดกลางสูงประมาณ 5.9 เซนติเมตร และกว้าง 6.8 เซนติเมตร ส่วนผลที่มีขนาดโตจะสูงประมาณ 6.5 เซนติเมตร กว้าง 7.5 เซนติเมตร ด้านปลายผลราบเป็นแอ่งตื้นๆ ฐานผลส่วนใหญ่มัน ผิวผลเรียบ มีตุ่มน้ำมันเกิดถี่เต็มผิวผล ผิวผลแก่จัดมีสีเขียวอมเหลือง เปลือกบาง (ปิยะ เฉลิมกลิ่น, 2541)

7.1.3 ส้มเช้ง (acidless orange) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus paradisi* เป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลางแตก กิ่งก้านสาขามาก มีใบเป็นใบประกอบ มีดอกเดี่ยวหรือดอกช่อ ผลเป็นผลเดี่ยวกลม ผลฉ่ำน้ำเนื่องจากมีถุงน้ำจำนวนมาก เนื้อในมีสีเหลืองนวลเป็นกลีบ เปลือกบางมีต่อมน้ำมันหอมระเหย เมื่อสุกผิวเปลือกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมเขียวการใช้ประโยชน์นอกจากรับประทานเป็นผลไม้แล้วยังมีสรรพคุณเป็นยา โดยเปลือกแก้ลมวิงเวียน จุกเสียดแน่นท้อง (วันดี กฤษณพันธ์, 2539)

7.1.4 มะกรูด (kaffir lime, leech lime) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus hystrix* DC. เป็นไม้ผลยืนต้นขนาดเล็กถึงกลางสูง 10-15 เมตร ลำต้นสีเทาอมน้ำตาล เปลือกค่อนข้างฉ่ำน้ำมีหนามแหลมยาวตามลำต้นและกิ่งก้าน ลักษณะทรงพุ่ม ใบเดี่ยวคอดตรงกลาง ดอกสมบูรณ์เพศ ผลค่อนข้างกลมเป็นผลเดี่ยว ผิวเปลือกนอกขรุขระเป็นคลื่น บริเวณผิวมีต่อมน้ำมันกระจายอยู่ทั่วไปและมีจุกที่ขั้วและก้นผล ผลอ่อนมีสีเขียวแก่ เมื่อผลสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองขนาดผลเท่ากับผลมะนาวหรือใหญ่กว่าเล็กน้อย ภายในผลมีเมล็ดจำนวนมาก มีประโยชน์ทางด้านอาหารนิยมใช้ใบปรุงแต่งกลิ่นคาวอาหาร ส่วนน้ำมะกรูดช่วยถนอมอาหารเมื่อนำใบมะกรูดมากลั่นด้วยไอน้ำจะให้น้ำมันหอมระเหยในปริมาณ 1.29 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผิวมะกรูด 6-7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้ำมันหอมระเหยจากมะกรูดจะมีกรด ซิตริก วิตามินซี และกรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ทางด้านสมุนไพรมีคุณสมบัติแก้ไอ เจ็บคอ แก้พิษฝีภายใน แก้ปวดท้อง (ปิยะ เฉลิมกลิ่น, 2541) นอกจากมะกรูดเป็นสมุนไพรที่ใช้เป็นยาแพทย์แผนโบราณแล้วปัจจุบันยังนิยมใช้ในอุตสาหกรรมสปาและเครื่องสำอางโดยเฉพาะในด้านการบำรุงผม

และหนังศีรษะ นอกจากนี้มะกรูดยังมีสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งรา และแบคทีเรียได้หลายชนิด ปัจจุบันความต้องการมะกรูดของตลาดในประเทศและต่างประเทศมีแนวโน้มสูงขึ้น จากการทดลองผลผลิตในหน่วยบริการอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีพบว่า มะกรูด 1 ตันได้น้ำมะกรูด 80 กิโลกรัม ผิวมะกรูด 300 กิโลกรัม เนื้อมะกรูด 604 กิโลกรัม และเมล็ดมะกรูด 16 กิโลกรัม ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตเป็นมะกรูดผง 13.50 กิโลกรัม น้ำมันหอมระเหยมะกรูด 6 ลิตร ผิวเปลือกมะกรูดผง 160 กิโลกรัม เนื้อมะกรูดอบแห้ง 240 กิโลกรัม เมล็ดมะกรูดบดย่อย 12 กิโลกรัม (Chaisawadi *et al*., 2005)

7.1.5 มะนาว (lime) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus aurantifolia* Swingle เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก ทรงพุ่ม มีหนามตามต้น ก้านใบสั้น ดอกเล็กมีสีขาวอมเหลืองกลิ่นหอมอ่อนๆ มีผลกลมเปลือกบางเรียบและมีน้ำมันหอมระเหย มีฤทธิ์ขับลม แก้ท้องอืดท้องเฟ้อได้ โดยทั่วไปมะนาวเป็นเครื่องเทศใช้เป็นส่วนประกอบและปรุงแต่งรสอาหาร นอกจากนี้มีสรรพคุณทางยา แก้เจ็บคอ แก้ซางเด็ก แก้พิษฝีภายใน รักษาบาดแผลเรื้อรัง รักษาเกลื้อน (Sotheeswaran and Doyle, 1998)

7.1.6 ส้มจุก (neck orange) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus reticulate* Blanco เป็นส้มที่มีรูปทรงกลม ตรงหัวจะเป็นมนป้านยื่นขึ้นไปคล้ายจุกจึงเรียกกันว่า ส้มจุก ผลมีสีเขียว กลิ่นหอม ลักษณะโตกว่าส้มเขียวหวาน เปลือกหนามีต่อมน้ำมันหอมระเหย รสชาติหวานอมเปรี้ยว มีกลิ่นหอม (มนตรี แสนสุข, 2543)

7.1.7 ส้มจี๊ด (round kumquat) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Citrus japonica* Thunb เป็นไม้พุ่มขนาดกลางแตกแขนงเป็นพุ่มแน่น ใบรูปไข่ มีสีเขียวสดเป็นมัน ดอกเดี่ยวแต่มักออกรวมกันเป็นกลุ่ม มีสีขาว ติดผลดก ผลกลมเหมือนส้มทั่วไปแต่มีขนาดเล็ก มีต่อมน้ำมันหอมระเหยเล็กๆ อยู่รอบผล ผลสุกมีสีเหลือง รับประทานแทนมะนาวได้เนื่องจากมีรสเปรี้ยวคล้ายมะนาว มีสรรพคุณทางยา แก้ไอขับเสมหะ อมแก้เจ็บคอ (วันดี กฤษณพันธ์, 2539)

8. วิธีการแยกและสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม

น้ำมันหอมระเหยเป็นสารอินทรีย์ที่พืชสร้างขึ้น มักมีกลิ่นหอม ระเหยง่ายโดยพืชจะมีเซลล์พิเศษต่อมหรือท่อ เพื่อสร้างและกักเก็บน้ำมันหอมระเหย ซึ่งจะเห็นต่อมน้ำมันได้ชัดในส่วนของใบและเปลือกผลของพืชจำพวกส้ม น้ำมันหอมระเหยพบได้ตามส่วนต่างๆ ของพืชได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก ผล เมล็ด โดยมีคุณสมบัติในการระเหยได้เร็วเมื่อได้รับความร้อนจะระเหยออกมารอบๆ ทำให้ต้นพืชมีกลิ่นอบอวลไปทั่ว บางกลิ่นช่วยดึงดูดให้แมลงมาช่วยผสมเกสร รักษาความชุ่มชื้นให้แก่พืชนั้นๆ (สุรัตน์วดี จิวะจินดา, 2545) การเตรียมน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดใน

พืชแต่ละชนิดจะต่างกันขึ้นกับการทนความร้อนขององค์ประกอบ การนำไปใช้ประโยชน์ และความเหมาะสมของน้ำมันหอมระเหยในพืช ซึ่งมีหลายวิธีดังนี้

8.1 การกลั่น (distillation)

เป็นการกลั่นโดยนำเอาสารอินทรีย์ และน้ำออกมาด้วยกัน โดยสารที่กลั่นด้วยวิธีนี้ต้องไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำ ทั้งสารอินทรีย์และน้ำจะกลั่นออกมาที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเดือดของของเหลวทั้งสอง การกลั่นด้วยไอน้ำมีประโยชน์ในการแยกสารที่ระเหยง่าย และไม่ละลายน้ำออกจากสารที่เป็นไอได้ง่าย มักใช้แยกผลิตภัณฑ์ธรรมชาติอย่างพวกน้ำมันหอมระเหยจากใบ ดอก ผล เมล็ด รากของพืช ชุดเครื่องกลั่นประกอบด้วย 3 ส่วนคือ 1) ขวดแก้วก้นกลมใช้สำหรับต้ม2) เครื่องควบแน่น 3) ตัวดักจับน้ำมันหอมระเหย ซึ่งในขณะกลั่นน้ำมันหอมระเหยจะถูกพาออกมากับไอน้ำร้อนซึ่งเมื่อผ่านเข้าเครื่องควบแน่นจะกระทบกับความเย็นก็จะกลั่นตัวเป็นของเหลวตกลงมาในเครื่องดักจับน้ำมันหอมระเหย ซึ่งน้ำมันหอมระเหยที่ได้เบากว่าน้ำจึงลอยแยกตัวอยู่ชั้นบน การกลั่นมีหลายวิธี ได้แก่

8.1.1 การกลั่นด้วยไอน้ำ (steamdistillation)

นำตัวอย่างพืชใส่ลงในภาชนะแล้วผ่านไอน้ำลงไปในตัวอย่างเพื่อให้ได้น้ำมันหอมระเหยและน้ำมันหอมระเหยออกมาควบแน่นลงในภาชนะรองรับ พืชที่นำมากลั่นด้วยวิธีนี้เป็นพืชสดที่น้ำมันหอมระเหยถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน วิธีการนี้เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพได้น้ำมันปริมาณมากแต่มีชิ้นส่วนของเครื่องมือมาก (คมสันต์ หุตะแพทย์, 2545)

8.1.2 การกลั่นโดยใช้น้ำ (hydrodistillation)

วิธีนี้ทำโดยนำชิ้นส่วนของพืชที่ต้องการกลั่นมาต้มกับน้ำ ส่วนของไอน้ำและน้ำมันหอมระเหยจะระเหยขึ้นมาควบแน่นในเครื่องควบแน่น (condenser) แล้วลงมาในภาชนะรองรับ พืชที่นำมากลั่นด้วยวิธีนี้ ต้องมีน้ำมันที่ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนได้แก่ น้ำมันสน น้ำมันยูคาลิปตัส เป็นต้น (ศรีรัตน์ กสิวงศ์, 2534)

8.1.3 การกลั่นโดยใช้น้ำและไอน้ำ (water and steamdistillation)

วิธีนี้นำตัวอย่างพืชมาให้ความชื้นด้วยน้ำในภาชนะ แล้วผ่านไอน้ำลงไปในตัวอย่างพืชเพื่อให้น้ำมันหอมระเหยระเหยออกมาพร้อมกับไอน้ำแล้วควบแน่นลงในภาชนะรองรับ พืชที่นำมากลั่นด้วยวิธีนี้อาจเป็นพืชแห้งหรือสดก็ได้ เหมาะสมกับน้ำมันที่ถูกทำลายด้วยความร้อนจากการต้มโดยตรง เช่น เปลือกอบเชย

จากการกลั่นทั้งสามวิธีจะมีน้ำมันหอมระเหยและน้ำควบแน่นลงมาในภาชนะรองรับ ซึ่งส่วนใหญ่น้ำมันจะเบากว่าน้ำและลอยขึ้นเหนือน้ำ สามารถแยกน้ำมันออกมาได้ส่วนน้ำซึ่งอยู่ข้างล่าง การกลั่นเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากสามารถสกัดพืชได้ครั้งละมากๆ

ประหยัดทำได้ไม่ยาก และสูญเสียน้ำมันเพียงเล็กน้อย (สุรัตน์วดี จิวะจินดา, 2545) แต่ใช้พลังงานมากในการทำน้ำให้กลายเป็นไอน้ำเพื่อใช้ในกระบวนการกลั่น และความร้อนจากไอน้ำอาจทำให้สารที่สกัดได้บางตัวสลายตัวได้

8.2 การสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย (solvent extraction)

ใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีสมบัติระเหยได้ เช่น ปิโตเลียมอีเทอร์ เบนซีน อะซิโตน เฮกเซน เอธิลอะซิเตต และเอทานอล เป็นต้น โดยเฉพาะปิโตรเลียมอีเทอร์นิยมใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรมการทำน้ำหอมเนื่องจากราคาถูก และมีจุดเดือดต่ำ จึงกำจัดได้ง่าย วิธีนี้จะใช้ถังหมักขนาดใหญ่มีลักษณะคล้ายเพอร์โคเลเตอร์ (percolator) ภายในมีตะแกรงวางซ้อนกันหลายๆ ชั้นบรรจุตัวอย่างพืชและตัวทำละลายแล้วนำตัวทำละลายจากการหมักมากลั่นเพื่อแยกน้ำมันหอมระเหยออกมา นอกจากนี้ก็มีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือสกัดต่อเนื่อง (soxhlet apparatus) ซึ่งวิธีนี้เหมาะสำหรับการสกัดน้ำมันที่มีปริมาณน้อย หรือสกัดน้ำมันในกากพืชที่เหลือจากการบีบ ข้อดีของการสกัดสารด้วยสารเคมีเนื่องจากตัวทำละลายต่างๆ เช่น เอทานอล เมทธานอล อะซิโตน ราคาถูก มีจุดเดือดต่ำจึงกำจัดออกได้ง่าย ข้อเสียของการใช้วิธีการสกัดด้วยสารเคมีดังนี้

ก. ใช้ตัวทำละลายในปริมาณมากเพื่อจะให้ได้ตัวถูกละลายออกมาในปริมาณมาก

ข. ใช้เวลานานในการสกัดเนื่องจากตัวทำละลายที่เป็นของเหลวจะผ่านเข้าไปในโครงสร้างที่ แข็งแรงของพืชทำให้ละลายออกมาได้ช้า

ค. ประสิทธิภาพในการสกัดโดยรวมต่ำ

ง. ใช้ตัวทำละลายที่มีค่าการละลายสูง เพื่อที่จะทำการละลายเอาตัวถูกละลายที่อยู่ภายในโครงสร้างของแข็ง หรืออนุภาคออกมาให้มากที่สุด มีผลทำให้ตัวทำละลายเหลือตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ในปริมาณมาก

จ. ความสามารถในการเลือกละลายของตัวทำละลายต่ำทำให้กรณีที่มีตัวถูกละลายที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันที่อยู่ในโครงสร้างของแข็งหรืออนุภาคนั้นถูกละลายออกมาด้วย มีผลทำให้ได้สารบางตัวที่ไม่ต้องการ และจำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนการผลิตเพื่อกำจัดสารที่ไม่ต้องการนี้ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ต้นทุนสูงขึ้น

ง. ไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตเนื่องจากตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักใช้สารประกอบไฮโดรคาร์บอนเป็นหลัก เนื่องจากเป็นสารที่ระเหยง่ายและไวไฟ ซึ่งสามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย และทรัพย์สินได้ (สมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม และอาทิตย์ รังษีสันติวานนท์, 2546; ศรีรัตน์ กสิวงศ์, 2534)

8.3 การสกัดด้วยไขมัน (enfleurage)

การสกัดด้วยไขมันเป็นวิธีการสกัดแบบดั้งเดิม เป็นวิธีที่ใช้สกัดน้ำมันหอมระเหยที่มีปริมาณน้อยๆ ในกลีบดอกไม้โดยการสกัดเอาน้ำมันหรือไขมัน เช่น น้ำมันหมูบริสุทธิ์ใส่ในกะบะที่อุณหภูมิต่ำๆ น้ำมันหมูจะแข็ง แล้วนำกลีบดอกไม้ไปวางบนไขมัน เก็บในที่เย็น น้ำมันหอมระเหยจะถูกดูดซับกลิ่นด้วยน้ำมันหมู เมื่อดอกไม้หมดกลิ่นจะเปลี่ยนกลีบดอกไม้ ซึ่งแต่ละครั้งจะใช้เวลาประมาณ 7 วัน จากนั้นสกัดน้ำมันหอมระเหยจากไขมันด้วยแอลกอฮอล์ (ศรีรัตน์ กสิวงศ์, 2534)

8.4 การบีบ (expression)

เป็นวิธีการเตรียมน้ำมันหอมระเหย โดยไม่ใช้ความร้อนแต่ใช้แรงบีบหรือเป็นวิธีการทำให้เซลล์ที่มีน้ำมันแตกออก แล้วน้ำมันจะออกมาได้เอง ซึ่งมีวิธีการที่แตกต่างกันออกไปดังนี้

8.5 วิธีการใช้ฟองน้ำ (sponge process)

เป็นวิธีการสกัดเบื้องต้น โดยทั่วไปใช้กับผลส้ม มะนาว โดยการนำผลมาผ่าซีกตามขวาง ควักเอาเนื้อออก ส่วนของเปลือกนำมาผ่าเป็น 3 แฉก ล้างน้ำให้สะอาดแล้วกดในเครื่องมือที่มีลักษณะคล้ายกับที่ทับกล้วยปิ้ง ซึ่งมีไม้แข็งสองแผ่น มีบานพับติดอยู่ด้านหนึ่ง ตรงกลางแผ่นไม้จะบุด้วยฟองน้ำ ซึ่งเป็นส่วนที่วางเปลือกส้ม เมื่อกดบีบน้ำมันจะถูกซับด้วยฟองน้ำ และไหลลงในภาชนะที่รองรับ (ศรีรัตน์ กสิวงศ์, 2534)

8.6 การกลั่นทำลาย (destructive distillation)

เป็นวิธีการกลั่นโดยใช้ความร้อนสูงแต่ไม่ให้อากาศเข้าไป จะได้ส่วนของสารที่ระเหยออกมาและส่วนที่เหลือมักจะเหนียวๆ หรือกลายเป็นถ่าน วิธีการกลั่นแบบนี้มักใช้กับเนื้อไม้หรือเรซินของพืช สำหรับสารที่ระเหยออกมาจะแยกเป็นสองชั้นคือ ชั้นน้ำ ประกอบด้วยเมทานอลกับกรดไพโรลิเนียส และชั้นของเหลวเหนียวๆ ประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหยกับทาร์ของแก่นไม้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (ศรีรัตน์ กสิวงศ์, 2534)

9. ประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชตระกูลส้มต่อการยับยั้งเชื้อรา

น้ำมันหอมระเหย คือ สารประกอบที่มีกลิ่นหอม ระเหยง่าย เป็นของเหลวใสไม่มีสีหรือมีสีเหลืองอ่อน เป็นสารทุติยภูมิที่ได้จากส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ กลีบเลี้ยง ผล เมล็ด เนื้อ และเปลือกไม้ ลำต้น ราก และเหง้า เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยละลายได้ในแอลกอฮอล์ ไขมันและน้ำมัน แต่ไม่ละลายในน้ำ (วิริยา คณารักษ์, 2546)

9.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหย

น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยส่วนประกอบทางเคมีที่สลับซับซ้อนสามารถแบ่งน้ำมันหอมระเหยตามชนิดขององค์ประกอบใหญ่ๆ ดังนี้ (วันวิสาข์ ศรีนวลไชย, 2547)

9.1.1 Hydrocarbon volatile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มี hydrocarbon เป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างของสารที่จัดเป็น hydrocarbon monocyclic terpene ได้แก่ limonene ซึ่งพบในน้ำมันหอมระเหยจากมินท์ ส้ม กระวาน และน้ำมันสน และ *p*-cymene ซึ่งพบได้ในน้ำมันลูกผักชี อบเชย นอกจากนี้พวก bicyclic monoterpene เช่น pinene ซึ่งพบได้ในน้ำมันยูคาลิปตัส น้ำมันดอกส้ม และน้ำมันลูกผักชี

9.1.2 Alcohol volatile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มี alcohol เป็นองค์ประกอบหลัก ที่สำคัญได้แก่ น้ำมันมินท์ น้ำมันลูกผักชี ผลกระวาน ดอกส้ม และน้ำมันสน ตัวอย่างที่พบบ่อยได้แก่ geraniol และ citronellol ซึ่งเป็น acyclic alcohol ส่วน menthol และ terpineol เป็น monocyclic alcohol เป็นต้น

9.1.3 Aldehyde volatile oils ได้แก่ น้ำมันหอมระเหยที่มี aldehyde เป็นองค์ประกอบหลัก น้ำมันหอมระเหยที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ น้ำมันอบเชย น้ำมันจากมะนาว และตะไคร้หอม ตัวอย่างของ aldehyde ที่พบบ่อย เช่น geranial, neral และ citronellal

9.1.4 Ketone volatile oils มีสารพวก ketone เป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างของ ketone ที่พบได้บ่อยได้แก่ menthone, carvone, pipertione และ pulegone ซึ่งเป็น monocyclic terpene ketone นอกจากนี้ยังพบ fenchone และ thujone ซึ่งเป็น bicyclic ketones น้ำมันหอมระเหยที่สำคัญในกลุ่มนี้ได้แก่ การบูร และมินท์

9.1.5 Phenol volatile oils มีสารจำพวก phenol เป็นองค์ประกอบหลัก phenol ที่พบได้แก่ eugenol, thymol, carvacrol เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยกลุ่มนี้ได้แก่ น้ำมันการพลู, thyme oil, creosote pine tar และ juniper tar

9.1.6 Phenolic ester volatile oils มีสารจำพวก phenolic ether เป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างของน้ำมันหอมระเหยในกลุ่มนี้ ได้แก่ น้ำมันโป๊ยกั๊ก

9.1.7 Oxide volatile oils มีสารจำพวก oxide เป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างของสาร oxide ที่พบในน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ cineol ซึ่งพบในน้ำมันยูคาลิปตัส

9.1.8 Ester volatile oils มีสารจำพวก ester เป็นองค์ประกอบหลัก ตัวอย่างของ ester ที่พบในน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ allyl isothiocyanate พบในน้ำมันมัสตาด

9.1 องค์ประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม

น้ำมันหอมระเหยจากพืชประกอบด้วยสารเคมีหลายๆ กลุ่มรวมกันการวิเคราะห์หาส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยนิยมใช้ gas chromatography Mass spectrometry (GC-MS), high performance liguid chromatography (HPLC) และ nuclear magnetic resonance (NMR) สารประกอบหลักคือไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) สารประกอบออกซิจิเนต (oxygenated compound) และสารประกอบพวกซัลเฟอร์ซึ่งพบในพืชบางชนิดเท่านั้นกลิ่นและรสของน้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่เกิดมาจากสารประกอบออกซิจิเนต น้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มพบได้มากในส่วนของ flavedo oil gland และ albedo (Caccioni *et al*., 1998) จัดเป็นไขมันประเภทไม่อิ่มตัวและไม่เสถียร มีส่วนผสมของสารที่ระเหยง่ายและมีสารประกอบพวก monoterpene hydrocarbon เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งถูกทำลายได้ง่ายด้วยแสง ความร้อน การออกซิเดชัน (oxidation) และไฮเดรชัน (hydration) นอกจากนี้ยังมีสารอนุพันธ์ในกลุ่ม flavonoids คือ hesperidine, narirunin, naringin, diosmin และ eriocitrin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Del-Rio *et al*., 2004)

โครงสร้างของสารประกอบที่พบในพืชตระกูลส้มส่วนใหญ่เป็นสารประกอบในกลุ่มเทอร์ปีน (terpenes) ดังแสดงใน Table 3. ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีเป็น$(C_5H_8)_n$ มักพบได้ในรูปของ diterpenes (C_{20}) triterpenes (C_{30}) และ sesquiterpene (C_{15}) เมื่อรวมตัวกับออกซิเจนจะได้สารประกอบในรูปของ terpenoids นอกจากนี้ยังมีสารพวกที่ให้กลิ่นรส เช่น แอลดีไฮด์ และเอสเตอร์ เป็นต้น

Table 3. Common terpenes found in essential oils.

Monoterpenes	Susquiterpene
Camphene	Bisabolene
Careen	Cadinene
Cymene	Cedrene
Limonene	Caryophyllene
Dipentene	Copaene
Myrcene	Chamazulene
Ocimene	Farnesene
Sabinene	Germacrene D
Terpinene	Selinene
Phellandrene	Terpinolene

ที่มา : Tisserand และ Balacs (1995)

จากรายงานของ Dugo และคณะ (1993) พบว่าองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจาก Italian bitter orange มีปริมาณของ monoterpene hydrocarbon ระหว่าง 97.30-97.80 เปอร์เซ็นต์ susquiterpene hydrocarbon ประมาณ 0.20 เปอร์เซ็นต์ สารประกอบ oxygenated ระหว่าง 1.80-2.20 เปอร์เซ็นต์ สารประกอบ carbonyl 0.35-0.63 เปอร์เซ็นต์ และ alcohol ประมาณ 0.35-0.63 เปอร์เซ็นต์ โดยองค์ประกอบที่พบเยอะที่สุดคือ limonene มีประมาณ 93 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ myrcene, β-pinene และ γ-pinene ต่อมา Blanco และคณะ (1995) พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากผิวเปลือกและใบของ colombian lemon (*C. volkameriana*), mandarin (*C. reticulate* Blanco) และ orange (*C. senesis* Osbeck) มี limonene เป็นองค์ประกอบหลักอยู่ระหว่าง 77.27-79.36 เปอร์เซ็นต์, 83.45-84.29 เปอร์เซ็นต์ และ 91.03-92.57 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำมันหอมระเหยจาก colombian lemon, mandarin และ orange ตามลำดับ สำหรับน้ำมันหอมระเหยจากใบพบว่ามี monoterpene ของ colombian lemon, mandarin และ orange เพียง 65.26, 31.23 และ 79.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบว่ามี citronellal, linalool และ citrol อยู่สูง ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากการกลั่นด้วยไอน้ำจาก *Citrus tangerine* ในจังหวัดฮูนาน ประเทศจีน พบสารประกอบทั้งหมด 22 ชนิด โดยสารประกอบส่วนใหญ่เป็นเทอร์ปีนและมีสารประกอบพวก aromatic และ aliphatic เล็กน้อย (Dongyan *et al*., 1998) Roberto และ Biondi (1993) ศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยของสายพันธุ์ส้มผสมระหว่าง grapefruit กับ clementine พบมีองค์ประกอบรวม 58 ชนิดโดยมี limonene เป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากผิวเปลือกและใบของส้ม *Citrus reticulate* Blanco จำนวน 41 สายพันธุ์ พบสารที่สำคัญในผิวเปลือกส้ม 2 ชนิด คือ limonene และ limonene/γ-terpinene ในใบพบสารสำคัญ 3 ชนิดคือ sabinene/linalool, linalool/γ-terpinene และ methyl N-methylanthranilate (Lota *et al*., 2000) Gonzalez และคณะ (2002) ศึกษาส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากส่วน pericarp ของพืชตระกูลส้ม 4 ชนิดคือ *Citrus paradisi*, *Citrus limon*, *Citrus grandis* และ *Citrus reticulate* ซึ่งเก็บในช่วงเดือนตุลาคมถึงธันวาคม ที่ San Joaquin de Navay รัฐ Tachira ประเทศเวเนซูเอล่าพบองค์ประกอบหลักคือ limonene ยกเว้น *Citrus grandis* ซึ่งองค์ประกอบหลักคือ linalool Guelay และ Ismail (2003) ศึกษาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจาก Turkish bitter orange (*Citrus auratium* L.) ที่ปลูกใน antalya และ marmaris ของตุรกีด้วยวิธี GC และ GC-MS พบว่าองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ปลูกในทั้ง 2 พื้นที่มีความคล้ายคลึงกัน แต่จะมีปริมาณแตกต่างกัน โดยพืชที่ปลูกที่ marmaris จะมีปริมาณของ susquiterpene, alcohol และ carbonyl compound สูงกว่าแต่มีปริมาณ ester น้อยกว่า องค์ประกอบหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหย bitter orange คือ limonene (93.68-94.32 เปอร์เซ็นต์) องค์ประกอบที่พบรองลงมาคือ myrcene (1.73-1.86 เปอร์เซ็นต์), beta-pinene (0.40-0.57 เปอร์เซ็นต์), linalyl acetate (1.17-1.32 เปอร์เซ็นต์), linalool (0.33-0.46 เปอร์เซ็นต์) และ decanal (0.16-0.22 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจาก Turkish bitter orange กับ

Italian และ spainish oil พบว่าองค์ประกอบของ Turkish bitter orange จะมี linalyl acetate, linalool และ dodecanol มากกว่าใน Italian และ Spanish oil และพบว่ามีองค์ประกอบบางชนิดที่พบใน Italian และ Spanish oil และพบว่ามีองค์ประกอบบางชนิดที่พบใน Italian และ Spanish oil แต่ไม่พบใน Turkish bitter orange Selli และคณะ (2004) พบว่าสารประกอบใน *Citrus sinensis* ซึ่งเป็นส้มพันธุ์พื้นเมืองของประเทศตุรกีมีสารสำคัญ 34 ชนิด โดยมีเอสเตอร์ 7 ชนิด แอลดีไฮด์ 2 ชนิดแอลกอฮอล์ 5 ชนิด เทอร์ปีน 5 ชนิด เทอร์ปีนอยด์ 12 ชนิด และคีโตน 3 ชนิด ซึ่งสารประกอบสำคัญๆ คือ linalool, limonene, β-phellandrene, terpinene-4-ol และ ethyl-3-hydroxy hexanoate Selvaraj และคณะ (2004) ศึกษาสารประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผิวเปลือกมะนาว *Citrus aurantifolia* swingle ที่มีผิวเปลือกสีเขียวแก่และสีเหลืองพบว่าสารประกอบจะไม่แตกต่างกันแต่ปริมาณของสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากมะนาวที่มีผิวเปลือกสีเหลืองจะลดลงแต่ปริมาณของสารประกอบหลักอย่าง limonene, β-pinene และ γ-terpinene ใกล้เคียงกันในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากมะนาวควายโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำและการสกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซนพบมีองค์ประกอบของ limonene 2.88 และ 5.77 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยส่วนใหญ่น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยสารประกอบ monoterpene ได้แก่ terpinen-4-ol, sabinene, myrcene, pinene ฯลฯ (Kamkuan *et al*., 2005) ส่วน Sharma และ Tripathi (2008) ศึกษาส่วนประกอบของน้ำมันหอมระเหยของ *Citrus sinensis* (L.) พบสารประกอบทั้งหมด 10 ชนิดแสดงใน Table 4. โดยมี limonene (84.4 เปอร์เซ็นต์) เป็นองค์ประกอบหลัก

Table 4. Components of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil.

Components	%
α- pinene	0.9
β- pinene	0.6
myrcene	4.1
limonene	84.2
linalool	4.4
citral	0.5
α- terpineol	0.8
terpinolene	1.3
citronellal	1.9
geraniol	1.3

ที่มา : Sharma และ Tripathi (2008)

สมบัติของน้ำมันหอมระเหยในพืชแต่ละชนิดขึ้นกับปัจจัยทางภูมิอากาศ ฤดูกาล และภูมิประเทศ ดิน ฟ้า อากาศ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อส่วนประกอบในพืชแต่ละชนิด (Lanciotti *et al*., 2004) เช่นเดียวกับพืชตระกูลส้มจะมีสารประกอบที่มีความหลากหลายแตกต่างกันออกไปโดยองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรม สิ่งแวดล้อมและการดูแลรักษา และยังพบว่าน้ำมันหอมระเหยที่มาจากชิ้นส่วนของพืชที่แตกต่างกันมีองค์ประกอบที่ต่างกัน (Lota *et al*., 2000)

9.2 กิจกรรมการยับยั้งเชื้อราของสารสกัด และน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม

เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีองค์ประกอบของสารเคมีหลายๆ กลุ่มซึ่งมีสมบัติต่อการยับยั้ง จุลินทรีย์ และทำลายผนังเซลล์จุลินทรีย์ (Knobloch *et al*., 1988 อ้างโดย Cox *et al*., 2000) และพบว่าสารประกอบออกซิจิเนตเป็นสารที่มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง (Lanciotti *et al*., 2004) ซึ่งมีรายงานว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อรา สารประกอบบางชนิดจากน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราได้ดี (Caccioni *et al*., 1998) ซึ่งพบมีการนำสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยมาทดลองใช้ยับยั้งเชื้อรากลุ่มต่างๆ เช่น Caccioni และคณะ (1998) ศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม 6 ชนิด คือ *Citrus sinensis* cvv. “washington navel”, “Sangvinello”, “Tarocco”, “Moro”, “Valencia late”, และ “Ovale”), bitter (sour) orange *(Citrus aurantium*), mandarin (*Citrus deliciosa* cv “Avana”), grapefruit (*Citrus paradise* cvv. “Marsh seedless” และ “Red Blush”), Citrange (*Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliate* cvv. “Carrizo” และ “Troyer”) และ lemon (*Citrus limon* cv “Femminello”) ต่อการเติบโตของ *Penicillium digitatum* และ *Penicillium italicum* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในส้มหลังการเก็บเกี่ยว พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก citrange และ lemon สามารถยับยั้ง *P. digitatum* ได้ดีโดยมีค่า ED_{50} (Median effective dose) คือปริมาณของน้ำมันหอมระเหยที่ให้ผลต่อกิจกรรมการยับยั้งเชื้อราร้อยละ 50 Stange และคณะ (2002) พบว่าสารสกัดจากผิวเปลือก *Citrus medica*, *C. auratium*, *C. paradise* ‘Marsh’, *C. limon* ‘Bearss’, *C. grandis* ‘Mato Buntan’, *C. paradise* ‘Duncan’, *C. sinensis* ‘Hamlin’, *C. reticulate* ‘Kawano Wase’ และ *C. reticulate* ‘Nin Kat’ ที่สกัดด้วย 80 เปอร์เซ็นต์ เอทธานอล พบมีกิจกรรมยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* และ *P. italicum* Statti และคณะ (2004) พบว่าสารสกัดจาก bergamot (*Citrus bergamia*) ที่สกัดด้วยเมทธานอลที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีกิจกรรมการยับยั้งของรา *Trichoderma meniagrophytes* ได้ดีกว่า *P. ultimum* ซึ่งยับยั้งได้ที่ระดับ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Sharma และ Tripathi (2008) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากส่วน epicarp ของ *C. sinensis* (L) osbeck มีผลต่อการเติบโต และลักษณะรูปร่างของของ *A. niger* (L.) van Tieghem โดยเส้นใย (mycelium) ถูกยับยั้ง และตายที่ระดับความเข้มข้นคือ 2.5 และ 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato dextrose broth และ Potato dextrose agar ตามลำดับ Krishnamurthy และ Shashikala (2006) ศึกษาผลของสารสกัดผงของผิวเปลือก *C. sinesis* และ *Citrus medica* ต่อกิจกรรมยับยั้งสปอร์ของ *Trichoderma harzianum* และ *A. niger* พบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และสามารถยับยั้ง *A. flavus* ที่สร้างสารแอฟลาทอกซิน B_1 ที่แยกจากเมล็ดถั่วเหลือง พบว่าสารสกัดจาก *C. sinesis* สามารถยับยั้งได้ 49.73 และ 71.04 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสารสกัดจาก *C. medica* สามารถยับยั้งได้ 76.50 และ 70.49 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระยะเวลา 30 วัน ส่วน Pawar และ Thaker (2006) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม ได้แก่ *C. arantuim* L. (Rutaceae), *C. bergamia* Risso and Poit (Rutaceae), *C. limon* (Linn.) Burm.f. (Rutaceae) และ *C. bigaradia* Hook. f. (Rutaceae) มีกิจกรรมยับยั้ง hyphae และสปอร์ของเชื้อ *A. niger* โดยเฉพาะสารสกัดจาก *C. bergamia* Risso and Poit (Rutaceae) ที่มีผลยับยั้งสูงสุด คือ 18 และ 27 มิลลิเมตร (hyphae และสปอร์ ตามลำดับ)

10. กลไกการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหย

สมบัติของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยในการยับยั้งจุลินทรีย์มีการศึกษามาตั้งแต่อดีต แต่กลไกการเกิดปฏิกิริยานั้นยังไม่ได้มีการศึกษากันมากนัก (Burt, 2004) สารประกอบกลุ่มต่างๆ ที่พบในสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยจะแสดงกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่จะไม่แสดงความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์ใดเซลล์หนึ่ง (Carson *et al*., 2002 อ้างโดย Burt, 2004) เมื่อน้ำมันหอมระเหยทำปฏิกิริยากับจุลินทรีย์ตำแหน่งของจุลินทรีย์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงคือ ผนังเซลล์เกิดการฉีกขาด เยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) ถูกทำลาย (Ultee *et al*., 2002 อ้างโดย Burt, 2004) โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane proteins) ถูกทำลาย ส่งผลให้ชั้นของไขมัน(lipid bilayer) แยกออกจากกัน ส่วนประกอบของเซลล์ถูกทำลาย (Cox *et al*., 2000) ไซโต พลาสซึมเกิดการตกตะกอนและโปรตรอนโมทีฟฟอซ (proton motive force) ถูกทำลาย (Burt, 2004)

สารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพพวกเทอร์ปีนที่มักพบในน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้มมีผลทำให้ผนังเซลล์จุลินทรีย์ถูกทำลาย มีรูรั่วในแบคทีเรีย และรา (Lanciotti *et al*., 2004) โมเลกุลของส่วนที่ไม่ชอบน้ำของน้ำมันหอมระเหยละลายในเยื่อเซลล์พลาสมาทำให้ส่วนที่ชอบน้ำเข้าสู่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดการยับยั้งเอนไซม์ (Cox *et al*., 2000) เมื่อมีการฉีกขาดของผนังเซลล์จะเกิดการรั่วไหลของไอออนจำเพาะต่างๆ ทำให้เซลล์สูญเสียองค์ประกอบภายในเซลล์ โมเลกุลและไอออนเกิดภาวะวิกฤตภายในเซลล์ทำให้เชื้อราถูกทำลายในที่สุด ส่งผลให้เกิดโปรตรอนโมทีฟฟอซลดการสร้าง ATP (Lanciotti *et al*., 2004)

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกสารสกัดจากเปลือกพืชตระกูลส้ม ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. ศึกษาผลของความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดจากเปลือกพืชตระกูลส้มที่คัดเลือกได้ ต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. ประยุกต์ใช้สารสกัดที่คัดเลือกได้ ในการยับยั้งการเจริญและสร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน ของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในเมล็ดข้าวโพด

ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการสกัดสารจากผิวเปลือกสดของ ส้มโอ ส้มโชกุน ส้มเช้ง มะกรูด และมะนาว โดยวิธีการสกัดด้วยเอธิลอะซิเตต และการกลั่นด้วยไอน้ำ จากนั้นนำสารสกัดมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งราที่ปนเปื้อนในอาหาร และผลิตภัณฑ์ ได้แก่ *A. flavus, A. parasiticus, A. niger, A. fumigatus* และ *Penicillium* spp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* รวมถึงศึกษาผลของสารสกัดจากส้มที่คัดเลือกได้ต่อการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และทำการศึกษาผลของสารสกัดจากผิวเปลือกส้มที่คัดเลือกได้ต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างพิษแอฟลาทอกซิน ของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในเมล็ดข้าวโพด

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

ใช้ส่วนเปลือกของพืชตระกูลส้ม ดังนี้

1.1 ส้มโอ (pomelo, *Citrus maxima*)

1.2 ส้มเช้ง (acidless orange, *Citrus paradise*)

1.3 ส้มโชกุน (shogun, *Citrus reticulata* Blanco cv shogun)

1.4 มะนาว (lime, *Citrus aurantifolia* Swingle)

1.5 มะกรูด (kaffir lime, *Citrus hystrix* DC)

2. เชื้อราที่ใช้วิเคราะห์

2.1 *Aspergillus flavus* TISTR 3041

2.2 *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276

2.3 *Aspergillus fumigatus* TISTR 3108

2.4 *Aspergilus niger* ATCC 6275

2.5 *Penicillium* sp.

ข้อ 2.1-2.3 ได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์ (TISTR) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ส่วนข้อ 2.4-2.5 ได้รับจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3. สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

Chemical and Media	Company, Grade, Country
1. Dimethylsulfoxide (DMSO)	Lab scan Asia, Analyzed, Thailand
2. Sodium sulfate anhydrous (Na_2SO_4)	Fisher Scientific, UK
3. Potato Dextrose Broth (PDB)	Himedia, Analyzed, India
4. Potato Dextrose Agar (PDA)	Himedia, Analyzed, India
5. Tween 80	Labchem, Analyzed, Australia
6. NaCl	Ajex Finechem/ analytical/ Australia

9. KH_2PO_4	Ajex Finechem/ analytical/ Australia

Chemical and Media	Company, Grade, Country
7. YES medium	
- Yeast extract	Ajex Finechem/ analytical/ Australia
- Sucrose	Ajex Finechem/ analytical/ Australia
8. KCl	Ajex Finechem/ analytical/ Australia
9. methanol	Lab scan/ Analytical/ Thailand
10. Nitrogen gas	Com. Grade 98 เปอร์เซ็นต์
11. $BaCl_2$	Sharlau cheme S.A, Spain
12. Ethyl acetate	Lab scan/ Analytical/ Thailand

4. วัสดุ และอุปกรณ์

Equipment	Company, Country
1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S	Satorious, USA
2. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BP2100S	Satorious, USA
3. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporation)	Büchi Rotavapor® R-200/205, Switzerlans
4. ตู้ถ่ายเชื้อ (Biological Safety Cabinet) ยี่ห้อ hotpack	Scientific promotion, Philadephia
5. ตู้อบแรงดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SS 325	Tomy, Japan
6. ถาด 96 หลุม (Microtiter plate 96 flat botton WI)	NUNC™, Denmark
7. Microplate reader รุ่น Power wave X	Biotek, UK
8. Paper disc	Macherey-nagel, Germany
9. เครื่องวัดสี Color meter : Hunter lab	รุ่น colorflex, Hunter associates Laboratory, INC Reston, Virginia
10. พีเอชมิเตอร์ รุ่น cyberscan PC 510	EUTECH Instrument Ltd, Natherland
11. ไมโครปิเปตขนาด 10-100 ไมโครลิตร	Lab Mate, USA
12. ไมโครปิเปตขนาด 1000ไมโครลิตร	Gilbson, France
13. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB 14	Memert, USA
14. เครื่องปั่น (blender)	Moulinex, France
15. Heamacytometer	BOECO, Germany
16. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น Memert BE 500	Schwabach, Germany

17. ชุดทดสอบ DOA-Aflatoxin ELISA test kit	กรมวิชาการเกษตร, Thailand

Equipment	Company, Country
18. Multichanels pipet 20-200 ไมโครลิตร (Transferpette®-8)	Treff Lab, Switzerland
19. Vortex Mixer	Labnet, USA
20. กล้องจุลทรรศน์	Nikon, USA
21. ขวด Vial ขนาด 20 มิลลิลิตร	-
22. เครื่อง GC-MS	Hewlette Packard, USA
23. กล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน รุ่น JEM-2010	JOEL Ltd, UK
24. ชุดตรวจยาฆ่าแมลง GT-test kit	กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, Thailand
25. Syring-Filter ขนาด 0.45 μm	Sartorious – Minisart, Germany

วิธีดำเนินการ

1. การเตรียมสารสกัดจากเปลือกส้ม

1.1 การเตรียมวัตถุดิบ

เลือกส้มโอ ส้มโชกุน ส้มเช้ง มะนาว และมะกรูด ที่ผลแก่จัดที่มีผิวเปลือกสีเขียวอมเหลือง (ส้มโอ ส้มโชกุน ส้มเช้ง มะนาว และมะกรูด) และสีเขียวแก่ (มะนาว) โดยการวัดสีด้วยเครื่อง Color meter: Hunter lab Hunter (Associates Laboratory, INC Reston, Virginia) โดยมีค่าสีเขียวอ่อนอยู่ในช่วง -6.32 ± 0.88, -11.24±0.37, 5.70±0.37, -9.21±0.29 และ -8.40±0.4 ตามลำดับ (สุมลรัตน์ จันทะผล, 2549) จากนั้นนำไปทดสอบสารตกค้างกลุ่มฟอสเฟตและคาร์บาเมตด้วยน้ำยา GT-pesticide residual test kit (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) รายละเอียดในอยู่ในภาคผนวก ก

1.2 วิธีการสกัด

1.2.1 การสกัดโดยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ (Steamdistillation) นำเปลือกส้มหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ มา 500 กรัม แล้วนำมากลั่นด้วยเครื่องกลั่นไอน้ำ (Figure 5.) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำน้ำมันหอมระเหยที่ได้มาแยกชั้นน้ำออกโดยใช้กรวยแยก แล้วเติม Na_2SO_4 anhydrous เพื่อกำจัดน้ำออก ชั่งน้ำหนัก สารสกัดที่ได้เรียกว่าน้ำมันหอมระเหย คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลได้จากสูตรข้างล่างและเก็บภายใต้สภาวะที่มีการเติมก๊าซไนโตรเจนที่ 4 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจาก Yadav *et al*., 2004)

1.2.2 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction) นำเปลือกส้ม และผิวเปลือกส้มจากข้อ 1.1 ตัวอย่างละ 500 กรัม ปั่นด้วยเครื่องบดเติมเอธิลอะซิเตต จำนวน 1 ลิตรปั่นรวมกันด้วย

เครื่องปั่นเป็นเวลา 20 นาที กรองสารที่สกัดได้ด้วยสำลี เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเติมเอธิลอะซิเตตจำนวน 1 ลิตร ลงในตัวอย่างเปลือกส้มอีกครั้ง โดยเขย่าที่ 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 ชั่วโมง กรองด้วยสำลี และนำไปรวมกับสารสกัดที่ได้จากครั้งแรกจะได้สารสกัดหยาบนำสารสกัดหยาบแยกชั้นน้ำออกโดยใช้กรวยแยก แล้วเติม Na_2SO_4 anhydrous เพื่อกำจัดน้ำออก นำสารสกัดมาระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ สารสกัดที่ได้เรียกว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตต ชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบ คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ผลผลิตที่ได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณสารสกัดที่ได้ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักสารสกัดแห้งที่ได้}}{\text{น้ำหนักสดของเปลือกส้มที่ใช้สกัด}} \times 100$$

นำสารสกัดไปเก็บภายใต้สภาวะที่มีการเติมก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Figure 5. Steamdistillation equipment.

2. การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสารสกัดจากผิวเปลือกพืชตระกูลส้มโดยวิธี disc diffusion assay

(ดัดแปลงจากวิธีของ Rassooli และ Razzaghi-Abyaneh, 2004)

2.1 การเตรียมสปอร์ของเชื้อรา

เขี่ยเชื้อรา *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. niger* และ *Penicillium* sp.จากอาหารวุ้นแข็งเอียงที่เก็บใน stock มาเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ โดยใช้น้ำที่ผสม tween 80 เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ฆ่าเชื้อแล้วเทใส่จานเพาะเชื้อรา ใช้แท่งแก้วคนปลอดเชื้อขูดให้สปอร์ออกมา แล้วกรองผ่านกรวยแก้วที่มีสำลีปลอดเชื้อ เพื่อแยกเส้นใยออกจากสปอร์จะได้สารแขวนลอยสปอร์นับ

จำนวนสปอร์โดยใช้ hemacytometer (ภาคผนวก ก. ข้อ 4) ปรับโดยใช้อาหารPDB เจือจาง ให้ได้ปริมาณสปอร์ 1×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2.2 การเตรียมสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม

ชั่งสารสกัดผิวส้มจากข้อ 1.2 จำนวน 100 มิลลิกรัม ละลายใน Dimethylsulfoxide (DMSO) จำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเป็น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลายผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นดูดสารสกัดที่ผ่านการกรองแล้วมา 10 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น paper disc ไร้เชื้อทำให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดเป็น 1 มิลลิกรัมต่อ paper disc ส่วนแผ่น paper disc ชุดควบคุมจะใช้ตัวทำละลาย DMSO ไร้เชื้อแทนสารสกัด

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา

ใช้ไม้พันสำลีไร้เชื้อ (cotton swap) จุ่มสปอร์เชื้อราที่เตรียมจากข้อ 2.1 มาพอหมาดๆ แล้ว streak ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร PDA วางทิ้งไว้ 3-5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าอาหารแห้ง ใช้ forcep ลนไฟทิ้งให้เย็นคีบแผ่น disc ที่ชุบสารสกัด และแผ่น disc ที่เป็นชุดควบคุม วางบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นนำไปบ่มเพาะเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ทำการทดลองสารสกัดละ 3 ซ้ำ

2.4 การอ่านผล

สังเกตการณ์เกิดวงใส (clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และวัดขนาดวงใสด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ และรายงานเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเป็นมิลลิเมตร

3. หาค่า Minimum Inhibition Concentration (MIC) และ Minimum Fungicidal Concentration (MFC) ของสารสกัดที่คัดเลือกได้ต่อการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี broth microdilution assay

คัดเลือกสารสกัดที่มีความไวต่อเชื้อราจากการทดลองข้อที่ 2 มาหาค่า MIC และ MFC โดยวิธี broth microdilution assay ในถาด 96 หลุม โดยแต่ละหลุมมีปริมาตรรวมเท่ากับ 200 ไมโครลิตร เตรียมสารสกัดจากส้มที่คัดเลือกได้ให้มีความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหาร PDB มาอย่างละ 360 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมแถวแรกแล้วเจือจางแบบครั้งละสองเท่า (two–fold dilution) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ปริมาตร 180 ไมโครลิตรของทุกหลุมโดยดูดสารสกัดจากหลุมแรกปริมาณ 180 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมแถวที่สองแล้วผสมกันโดยดูดขึ้นลง 5 ครั้ง จากนั้นดูดสารสกัดใส่ลงในหลุมต่อไปเรื่อยๆ โดยหลุมสุดท้ายจะดูดปริมาตร 180 มิลลิลิตรทิ้ง ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้น 2.50, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16 และ 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมสปอร์ราที่ต้องการทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1 ซึ่งมีปริมาณสปอร์ 1×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ซึ่งทำให้มีปริมาณสปอร์เชื้อราสุดท้ายเป็น 1×10^{5} สปอร์ต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเป็น 2.25, 1.13, 0.56, 0.28, 0.14 และ 0.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีชุด

ควบคุม (control) เป็น positive control ซึ่งเป็นอาหารเหลวที่ไม่เติมสารสกัดแต่เติมเชื้อรา negative control เป็นอาหารที่มีสารสกัดแต่ไม่มีการเติมเชื้อรา วัดการเจริญของเชื้อราโดยวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในชั่วโมงที่ 48 ทำการทดสอบเพื่อหาค่า MFC (Minimal Fugicidal Concentration) โดยนำชุดการทดลองที่ไม่พบการเติบโตของเชื้อรามา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อดูการเจริญของเชื้อรา

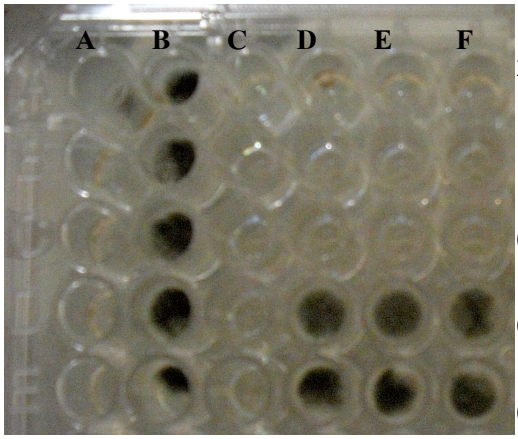


Figure 6. MIC and MFC determination by broth microdilution assay.

Where, A = Medium broth (PDB)

B = Positive control (medium broth + fungal spores)

C = Negative control (medium broth + citrus extract)

D-F = Medium broth + citrus extract + fungal spores

3.1 การอ่านผล

อ่านค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากพืชตระกูลส้มที่คัดเลือกได้ ที่ให้ผลการยับยั้งการเติบโตของเชื้อราที่ 48 ชั่วโมง โดยค่าที่มีระดับความขุ่นไม่แตกต่างไปจากชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมสปอร์รา อ่านค่า MFC ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อราโดยนำหลุมที่ให้ค่า MIC มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สังเกตเชื้อเติบโตหรือไม่ถ้าเชื้อไม่เจริญแสดงว่าเป็นค่า MFC คัดเลือกสารสกัดพืชตระกูลส้มที่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา โดยพิจารณาสารสกัดที่มีกิจกรรมการยับยั้งในช่วงกว้างและมีค่า MIC ต่ำสุดมาใช้ทดสอบกิจกรรมอื่นๆ ต่อไป

4. วิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากส้มที่คัดเลือกได้

นำสารสกัดจากส้มที่ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดในแต่ละวิธีการสกัดวิเคราะห์หาองค์ประกอบของสารเชิงคุณภาพด้วยเครื่อง GC-MS โดยใช้คอลัมน์แบบ Rtx-5MS fuse silica gel (Restex, USA) หนา 0.25 ไมโครเมตร ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 25 เมตร ภายใต้สภาวะการวิเคราะห์ดังนี้ อุณหภูมิของ injector เท่ากับ 240 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มจาก 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพิ่มขึ้นเป็น 220 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที และเพิ่มเป็น 300 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงที่ที่ 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ส่วนอุณหภูมิของ detector เท่ากับ 300 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีอัตราการไหลของแก๊สฮีเลียม เมื่อ GC-MS พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ ฉีดสารสกัดจากส้มที่คัดเลือกได้ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ที่ injector port (Atilep, USA) และสแกนด้วยระบบสแกนอัตโนมัติ ซึ่งจะวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดแต่ละชนิดจาก retention time ของพีค พื้นที่ใต้พีค และเปรียบเทียบกับ mass spectra กับฐานข้อมูลใน Wiley 275. L (Hewlett Packard company Americans, technical center 20, terimeter summit, BCW, Atlanta, GA 30319.) (Agnihotri *et al.,*2004)

5. ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวต่ออัตราการรอดชีวิตและการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus*

5.1 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด และมะนาวต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* (ดัดแปลงจาก Moriera *et al*., 2005)

เตรียมน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด และมะนาว สำหรับทดสอบเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ตามลำดับ ให้มีความเข้มข้น 1.13, 0.56 และ 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และเติมสปอร์เชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร โดยมีปริมาณสปอร์สุดท้ายเป็น 1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ชุดควบคุมไม่เติมสารสกัดจากส้มแต่เติมน้ำกลั่นไร้เชื้อแทนสารสกัด นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30 และ 48 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อราที่รอดชีวิตด้วยวิธี plate count บนอาหาร PDA

5.2 ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวต่อการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในอาหาร YES (ดัดแปลงจาก Dikbas *et al*., 2008)

เตรียมน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด และมะนาว สำหรับทดสอบเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ตามลำดับ ให้มีความเข้มข้น 2.25, 1.13, 0.56 และ 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหาร YES ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมสปอร์เชื้อรา 1×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตรปริมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่างที่เวลา 7 วัน นำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษแอฟลาทอกซิน โดยใช้ชุดทดสอบ DOA-aflatoxin ELISA test kit (กรมวิชาการเกษตร)

6. ศึกษาการทำลายของสารสกัดต่อเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิชชัน (Transmisson Electron Microscopy: TEM) (ดัดแปลงจาก Rasooli *et al*., 2006)

การเตรียมตัวอย่างของเชื้อราที่มีความไวจากข้อ 3 โดยนำความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดจากพืชตระกูลส้มที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (MIC) เตรียมเซลล์โดยนำสารสกัดจากพืชตระกูลส้มที่คัดเลือกได้ ที่ความเข้มข้นที่คัดเลือกได้ ปริมาณ 4.5 มิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB จากนั้นเติมเชื้อราที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 1×10^{8} สปอร์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารมาเหวี่ยงแยกเอาตัวเซลล์ออกที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นก็นำตัวอย่างเพื่อดูด้วย TEM โดยการตรึงเซลล์ขั้นต้น (primary fixative) ด้วย 2.5 เปอร์เซ็นต์ กลูตารอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างเซลล์ใน 0.1 โมล phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และตรึงเซลล์ขั้นที่สอง (post fixative) ด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ ออสเมียมเตตรอกไซด์ (OsO_4) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำเซลล์มาย้อมสีขั้นต้นใน 2 เปอร์เซ็นต์ ยูรานิลอะซิเตต (uranyl acetate) เป็นเวลา 20 นาที แล้วดึงน้ำออก (dehydration) จากตัวอย่างโดยทำเป็นขั้นตอนดังนี้

ก. แช่ใน 30 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

ข. แช่ใน 50 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

ค. แช่ใน 70 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

ง. แช่ใน 80 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

จ. แช่ใน 100 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

จากนั้นนำตัวอย่างมาทำการแทรกซึม (infiltration) ซึ่งเป็นการนำสารตัวกลางเข้าสู่เซลล์ โดยใช้โพรพอลีนออกไซด์ 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที, โพรพอลีนออกไซด์ เอทธานอล (1:1) เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง และอีพอกซีเรซิน บริสุทธิ์ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาใส่ลงในเบ้าหลอม

แล้วหยดอีพอกซีเรซินบริสุทธิ์ ลงในแคปซูล ประมาณหนึ่งในสี่ แล้วไล่ฟองอากาศออกทำให้ตัวอย่างแข็งจับตัวกัน (polymerization) โดยนำตัวอย่างใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ค้างคืนจากนั้นตัดตัวอย่างโดยใช้อุลตราไมโครโทมตัดแต่งตัวอย่างบนกริดทองแดงให้เป็นรูปพีระมิดขนาดประมาณ 0.5-1.0 ไมครอน หลังจากนั้นย้อมด้วยสีโทลูดีนบลูโดยแช่เซลล์ใน 5 เปอร์เซ็นต์ ยูรานิลอะซิเตตที่จำเพาะกับกรดนิวคลีอิกและลีดซิเตรดที่จำเพาะกับองค์ประกอบของเซลล์ดูตัวอย่างโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิชชัน

7. การประยุกต์ใช้สารสกัดส้มที่คัดเลือกได้ในการควบคุมการเจริญและสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในเมล็ดข้าวโพด

7.1 การเตรียมเมล็ดข้าวโพด

หาความชื้นเริ่มต้นในเมล็ดข้าวโพด (วิธีการข้อ 7.1.2) และเตรียมเมล็ดข้าวโพดปริมาณ 30 กรัมต่อชุดการทดลอง ปรับความชื้นของเมล็ดเป็น 22-23 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีของ Ramakrisna (1996) ดังสูตร บรรจุในกล่องพลาสติกปิดฝา

$$V = \frac{W\,(Y-A) - I}{100 - Y}$$

เมื่อ V คือ ปริมาณน้ำที่ใช้ปรับความชื้น (มิลลิลิตร)
W คือ น้ำหนักของเมล็ดข้าวโพด (กรัม)
Y คือ ความชื้นที่ต้องการ (23 เปอร์เซ็นต์)
A คือ ความชื้นในเมล็ดข้าวโพด (เปอร์เซ็นต์)
I คือ ปริมาณสปอร์เชื้อรา (มิลลิลิตร)

หลังจากปรับความชื้นตามวิธีการดังกล่าวแล้วจึงนำตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดไปหาความชื้นตามวิธีการในข้อ 7.1.2

7.1.2 การหาความชื้นในเมล็ดข้าวโพด

นำเมล็ดข้าวโพดมาวิเคราะห์หาความชื้นโดยวิธีของ Pomeranz และMeloan (1994) โดยอบภาชนะที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์แล้วนำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ใส่เมล็ดข้าวโพดลงไป 5 กรัมในแต่ละภาชนะบันทึกค่าน้ำหนักที่ชั่งนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักเมล็ดข้าวโพดพร้อมภาชนะอีกครั้ง วิเคราะห์หาความชื้นจากสูตร

เปอร์เซ็นต์ความชื้นในเมล็ดข้าวโพด = $\frac{\text{(น.น ข้าวโพดและภาชนะ 1 – น.น ข้าวโพดและภาชนะ 2)}}{\text{น้ำหนักเมล็ดข้าวโพดจริง}} \times 100$

7.2 ศึกษาผลของสารสกัดส้มที่คัดเลือกได้ต่อการควบคุมการเจริญและการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในเมล็ดข้าวโพดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องอุณหภูมิห้องที่มีการควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์

เตรียมสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* เช่นเดียวกับข้อ 2.1 และเติมลงเมล็ดข้าวโพดที่ปรับความชื้นแล้ว (30 กรัม) จากข้อ 7.1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติมสารสกัดจากส้มที่คัดเลือกได้โดยเตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 25, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนชุดควบคุมไม่เติมสารสกัดจากพืชตระกูลส้มแต่เติมสปอร์เชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยผสมกันในกล่องพลาสติกจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิห้องที่มีการควบคุมความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สารละลายอิ่มตัวของเกลือแบเรียมคลอไรด์($BaCl_2$) 8.74 กรัม ละลายในน้ำกลั่นไร้เชื้อปริมาตร 23 มิลลิลิตร (Rockland, 1960) บรรจุในแก้วขนาดเล็กและนำไปวางในกล่องพลาสติกปิดฝาที่บรรจุเมล็ดข้าวโพดและปิดทับด้วยพาราฟิล์มเพื่อกันการระเหยออกของน้ำเป็นเวลา 0, 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน เก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดเพื่อนับปริมาณของเชื้อราโดยวิธี plate count และวัดปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่เชื้อสร้างขึ้นด้วยชุดทดสอบ DOA-Aflatoxin ELISA test kit (กรมวิชาการเกษตร)

7.2.1 การนับปริมาณของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยวิธี plate count

เก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดมา 10 กรัม ใส่บีกเกอร์ฆ่าเชื้อ เติมสารสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 90 มิลลิลิตรและนำไปตีปั่นด้วยเครื่องstomacher เป็นเวลา 1 นาที และนำตัวอย่างมาทำเจือจางแบบ 1:10 นำความเจือจางที่เหมาะสมมาspread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนับจำนวนโคโลนีเชื้อราที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และคำนวณเป็น CFU ต่อกรัม

7.2.2 การสกัดและวิเคราะห์ปริมาณสารพิษแอฟลาทอกซิน

นำเมล็ดข้าวโพดในแต่ละชุดการทดลองมา 20 กรัม เพื่อสกัดสารแอฟลาทอกซินโดยปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียด จากนั้นเติมเมทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100มิลลิลิตร นำไปเขย่า 30 นาที และนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จะได้สารละลายเมทธานอลที่มีสารพิษแอฟลาทอกซินละลายอยู่ แล้วเจือจางสารสกัดจนมีความเข้มข้นเป็น 1:20 เท่าด้วยwashing buffer (PBS-T) และทำการทดสอบสารแอฟลาทอกซินที่เจือจางแล้วด้วยชุดทดสอบDOA-Aflatoxin ELISA test kit จากกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร โดยหยดสารAFB_1 standard ความเข้มข้น 0, 2, 4,

10, 20 และ 40 พีพีบี ปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในหลุม 2 หลุมต่อความเข้มข้น หยดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ ตัวอย่างละ 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ลงในหลุมที่เหลือ 3 หลุมต่อตัวอย่าง จากนั้นหยดเอนไซม์คอนจูเกตที่เจือจางแล้วลงในทุกหลุมๆ ละ 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันแล้วเก็บในที่มืดในสภาอุณหภูมิห้องนาน 30 นาที คว่ำเทสารในหลุมทิ้งแล้วล้างหลุมด้วย washing buffer วางทิ้งไว้ 3 นาที เททิ้งและทำซ้ำอีก 2 ครั้ง หลังจากล้างครั้งสุดท้ายคว่ำและสะบัดให้สะเด็ดน้ำ หยดสับสเตรตที่เตรียมไว้ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทุกหลุม แล้วบ่มไว้ 5-10 นาที ในที่มืด อ่านค่าการปนเปื้อนสารพิษในตัวอย่างโดยดูจากความเข้มสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นและวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยโดย microplate reader และวิเคราะห์ปริมาณแอฟลาทอกซินด้วยโปรแกรม kinetic calculation แบบ log/logic

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการเตรียมสารสกัดจากผิวเปลือกพืชตระกูลส้ม

จากการคัดเลือกพืชตระกูลส้ม 5 ชนิด คือ ส้มโอ ส้มโชกุน ส้มเช้ง มะกรูด และมะนาวที่มีผลโตเต็มที่หรืออยู่ในระยะเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนพฤศจิกายน-กุมภาพันธ์ ซึ่งมีลักษณะผิวเปลือกสีเขียวอมเหลือง (ส้มโอ ส้มโชกุน ส้มเช้ง และมะกรูด) และผิวเปลือกสีเขียวแก่ (มะนาว) ที่มีค่าสีเขียวอ่อนอยู่ในช่วง -6.32 ± 0.88, -11.24±0.37, -5.70±0.37, -8.40±0.40 และ -9.21±0.29 ตามลำดับ (สุมลรัตน์ จันทะผล, 2549) มาทดสอบยาฆ่าแมลงกลุ่มฟอสเฟตและคาร์บาเมตซึ่งเป็นยาฆ่าแมลงที่เกษตรกรมักใช้กันมาอย่างยาวนานและแพร่หลายด้วยชุดทดสอบ GT-pesticide residual test kit (กองอาหาร, กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ผลการทดสอบไม่พบการปนเปื้อนยาฆ่าแมลง จึงนำตัวอย่างเปลือกส้มที่ไม่พบยาฆ่าแมลงมาทำการสกัดด้วยเอธิลอะซิเตต และการกลั่นด้วยไอน้ำ (steamdistillation) จากผลการสกัดพบว่าลักษณะทางกายภาพของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวพืชตระกูลส้มเป็นสารลักษณะข้น หนืด มีสีน้ำตาลเข้มผสมกับสีเหลือง ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่กลั่นด้วยไอน้ำเป็นของเหลวสีเหลืองอ่อนๆ ถึงขาวใสยกเว้นสารสกัดจากส้มโอที่มีสีเหลืองเข้ม ดังแสดงใน Figure 7.

A **B**

Figure 7. Physical appearances of citrus extracts obtained from (A) ethyl acetate extraction, (B) steamdistillation.

การสกัดด้วยเอธิลอะซิเตตให้ปริมาณของสารสกัดหยาบสูงกว่าการกลั่นด้วยไอน้ำ โดยปริมาณของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากส้มโอ ส้มโชกุน ส้มเช้ง มะกรูด และมะนาว เท่ากับ 1.91, 2.15, 1.08, 2.36 และ 1.53 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตามลำดับ ในขณะที่การกลั่นด้วยไอน้ำมีปริมาณของสารสกัดหยาบ เท่ากับ 0.20, 0.49, 0.15, 0.77 และ 0.45 เปอร์เซ็นต์

น้ำหนักแห้ง (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ดังแสดงใน Figure 8 โดยที่ผิวเปลือกมะกรูดให้ปริมาณสูงที่สุดจากการสกัดทั้ง 2 วิธี สอดคล้องกับการทดลองของ สุมลรัตน์ จันทะผล (2549) พบว่าการสกัดผิวเปลือกพืชตระกูลส้มด้วยเอธิลอะซิเตตให้ปริมาณของสารสกัดสูงกว่าการกลั่นด้วยไอน้ำ โดยพบว่าผิวมะกรูดให้ปริมาณของสารสกัดสูงสุดจากการสกัดทั้งสองวิธี นอกจากนี้ศิริวรรณ ศรีสัจจะเลิศวาจา (2539) ได้ทำการสกัดเปลือกส้มโอด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ เอธานอลได้ปริมาณ 2.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสิริวิภา สัจจพงษ์ (2541) ได้ทำการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากพืช 19 ชนิด ด้วยวิธีการกลั่นด้วยไอน้ำพบว่าผิวมะกรูด และส้มเขียวหวานให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหย 0.90 และ 0.66 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ Yadav และคณะ (2004) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวของมะนาว *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle จากการกลั่นด้วยไอน้ำให้ปริมาณของสารสกัดเท่ากับ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) Kamkuan และคณะ (2005) ได้สกัดผิวของมะนาวควาย มะนาว และมะกรูดด้วยการกลั่นด้วยไอน้ำ พบว่าผิวมะกรูดให้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยมากที่สุดคือ 0.96 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับ Sharma และ Tripathi (2008) พบว่าการกลั่นน้ำมันหอมระเหยจาก *Citrus sinensis* (L.) Osbeck ได้ปริมาณ 1.8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ซึ่งปริมาณของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้นี้ นอกจากขึ้นอยู่กับชนิดของส้มแล้วยังขึ้นอยู่กับ ความสดของพืช อายุของพืช ฤดูกาลที่นำพืชมาสกัด และเทคนิควิธีการสกัด (สิริวิภา สัจจพงษ์, 2541; Sharma and Tripathi, 2008)

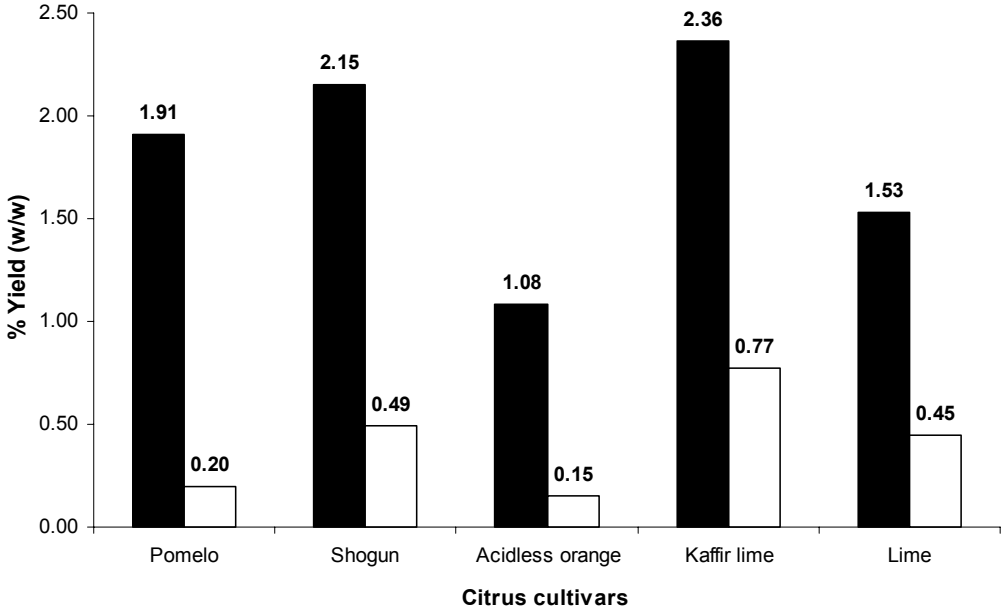


Figure 8. Production yields of ethyl acetate extracts (■) and essential oils (□) from peels of various citrus cultivars.

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสารสกัดจากเปลือกส้ม

เมื่อทำการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราของสารสกัดเอธิลอะซิเตต และการกลั่นไอน้ำของผิวเปลือกพืชตระกูลส้มที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้วิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดจากวิธีกลั่นด้วยไอน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *A flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. niger* และ *Penicillium* sp. ได้ดีกว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตต โดยเฉพาะน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด และมะนาวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราที่ทดสอบได้ดีโดยน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดมีความกว้างของวงใสยับยั้ง 17.33, 29.63, 29.85, 27.38 และ 24.91 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากมะนาวมีความกว้างของวงใสยับยั้งเท่ากับ 24.13, 18.13, 28.63, 22.82 และ 22.85 มิลลิเมตร ตามลำดับ (Table 5.) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวส้มโอ ส้มโชกุน ส้มเช้ง และมะนาว มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *A. fumigatus* ได้ แต่ไม่มีผลต่อเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของสุมลรัตน์ จันทะผล (2549) ที่พบว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวส้มโอ ส้มเช้ง และส้มโชกุนมีฤทธิ์ยับยั้ง *A. fumigatus* ได้ดีเมื่อทดสอบโดยวิธี broth microdilution ขณะที่น้ำมันหอมระเหยจากผิวส้มโอ ส้มเช้ง และส้มโชกุนไม่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราทั้ง 5 สายพันธุ์ จากรายงานของ Pawar และ Thaker (2006) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชตระกูลส้ม ได้แก่ *C. arantuim* L. (Rutaceae), *C. bergamia* Risso and Poit (Rutaceae), *C. limon* (Linn.) Burm.f. (Rutaceae) และ *C. bigaradia* Hook. f. (Rutaceae) มีฤทธิ์ยับยั้งเส้นใย และสปอร์ของเชื้อรา *A. niger* โดยเฉพาะสารสกัดจาก *C. bergamia* Risso and Poit (Rutaceae) ที่มีผลยับยั้งเชื้อราได้สูงสุด คือ 18 และ 27 มิลลิเมตร (เส้นใยและสปอร์ ตามลำดับ)

จากการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราโดยใช้วิธี disc diffusion พบน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด และมะนาวซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด จึงนำน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด และมะนาวมาหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) และ MFC (Minimum Fungicidal Concentration) โดยวิธี broth microdilution จากผลการทดลองพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวยับยั้งเชื้อรา *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus* และ *A. niger* ที่MIC เท่ากับ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำลายเชื้อราที่ค่า MFC เท่ากับ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ทำลาย *A. fumigatus* ที่ MFC เท่ากับ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่า *A. fumigatus* มีความไวต่อน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดมากกว่าเชื้อราสายพันธุ์อื่น ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวยับยั้งเชื้อ *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. fumigatus* ที่ MIC เท่ากับ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำลายเชื้อราที่ค่า MFC เท่ากับ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองพบว่า *A. niger* มีฤทธิ์ต้านทานต่อน้ำมันหอมระเหยจากมะนาวมากกว่าเชื้อราสายพันธุ์อื่น และพบว่า *Penicillium* sp. มีฤทธิ์ต้านทานต่อน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวได้ดีกว่าเชื้อราสายพันธุ์อื่น (MIC เท่ากับ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (Table 6.) แต่จากการศึกษาของ Sharma และ Tripathi (2008)

พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากส่วน epicarp ของ *Citrus sinensis* (L) osbeck มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *A. niger* โดยเส้นใย ถูกยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย 2.50 และ 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน Matan และ Matan (2008) รายงานว่าน้ำมันหอมระเหยจากมะนาวมีกิจกรรมยับยั้งเชื้อรา *Penicillium chrysogenum* และ *Penicillium* sp. และทำให้เชื้อราตายที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 140 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. niger* ได้ จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่ามีค่า MIC และ MFC ที่ต่ำกว่างานทดลองนี้ ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับปัจจัย คือลักษณะทางพฤษศาสตร์ของพืช ช่วงการเก็บเกี่ยว ระยะเวลาในการเจริญเติบโตและวิธีการสกัด (Smith-Palmer *et al*., 2001) ซึ่งลักษณะเหล่านี้จะมีผลต่อสารประกอบชีวภาพของพืชชนิดนั้นๆ ที่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา นอกจากนี้สายพันธุ์เชื้อรา และปริมาณเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบก็เป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อฤทธิ์การยับยั้งเชื้อราของสารสกัดเอธิลอะซิเตตและการกลั่นไอน้ำ อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ได้ดีที่สุด ตามลำดับ จึงเลือกมาใช้ในการทดลองต่อไป

3. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหย และสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดและมะนาว

จากการศึกษากิจกรรมการยับยั้งเชื้อราของสารสกัดเอธิลอะซิเตต และการกลั่นด้วยไอน้ำจากผิวเปลือกมะกรูดและมะนาว พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ดี จึงนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบเชิงคุณภาพด้วยเครื่องมือ GC-MS พบมีองค์ประกอบเป็นจำนวนมากในน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดแต่มีองค์ประกอบหลักคือ citronellol (11.86%), limonene (7.32%), linalool (5.83%) และ *o*-cymene (5.52%) และองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวพบ limonene (69.12%) และ *p*-cymene (12.77%) ส่วนสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดพบว่ามีองค์ประกอบหลักเป็น *o*-cymene (33.07%), L-limonene (28.94%) และ sabinene (9.44%) สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากมะนาวพบ limonene (61.60%) และ γ -terpinene (4.76%) เป็นองค์ประกอบหลักดังแสดงใน Table 7. ปริมาณของสารประกอบสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของหลายท่านที่ได้ศึกษาส่วนประกอบของพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ ซึ่งสารประกอบที่พบเป็นกลุ่มสาร monoterpene hydrocarbon, oxygenated compounds และ non-volatile compounds พบพวกเทอร์ปีน 50 ถึง > 95 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนใหญ่สารประกอบหลักคือ limonene ซึ่งจะพบได้ในพืชตระกูลส้มชนิดต่างๆ เช่น *C. tangerine*, *C. reticulate* Blanco, *C. paradisi*, *C. limon*, *C. reticulate, C. aurantium amara* L. และ *C. aurantifolia* Swingle.

Table 5. Antifungal activity of essential oils and ethyl acetate extracts of citrus peels (1.0 mg). The activity was determined by disc diffusion assay and diameters of zones of inhibition were measured and expressed as millimeters.

Fungal strain	Diameter of clear zone (mm) including disc diameter of 6 mm										
		Essential oil					Ethyl acetate extracts				
	Control	pomelo	acidless orange	shogun	kaffir lime	lime	pomelo	acidless orange	shogun	kaffir lime	lime
A. flavus	NI	NI	NI	NI	17.33±0.28	24.13±0.32	NI	NI	NI	13.33±0.57	NI
A. parasiticus	NI	NI	NI	NI	29.63±0.23	18.13±0.32	NI	NI	NI	15.13±0.32	NI
A. fumigatus	NI	NI	NI	NI	29.85±0.25	28.63±1.09	11.10±0.35	12.27±0.48	12.83±0.28	14.78±0.73	9.65±0.56
A. niger	NI	NI	NI	NI	27.38±0.24	22.82±0.42	10.83±0.28	NI	NI	12.98±0.02	NI
Penicillium sp.	NI	NI	NI	NI	24.91±0.38	22.85±6.15	NI	12.83±0.28	NI	12.25±0.25	NI

NI= No inhibition

Table 6. MIC and MFC (mg/ml) of essential oils from kaffir lime and lime against food spoilage fungi.

Fungal strain	kaffir lime		lime	
	MIC	MFC	MIC	MFC
A. flavus	0.56	1.13	0.56	1.13
A. parasiticus	0.56	1.13	0.56	1.13
A. fumigatus	0.56	0.56	0.56	1.13
A. niger	0.56	1.13	1.13	2.25
Penicillium spp.	1.13	1.13	1.13	2.25

สารประกอบรองที่พบคือ linalool, myrcene, geranial, β-nerolidol, sabinene, β-pinene, citronellol, terpinen-4-ol, α-terpineol เป็นต้น Manosroi และคณะ (1999) รายงานว่าสารประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดประกอบด้วย β-pinene, limonene, sabinene และ citronellal นอกจากนี้มีรายงานว่า limonene, *p*-cymene, citonellal, α-terpinene และ α-gergamotene เป็นองค์ประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหยจากมะนาว (Vekiari *et al*., 2002; Mondello *et al.,* 2003 and Viuda-Martos *et al*., 2008) ส่วน Sharma และ tripathi (2008) รายงานว่าในน้ำมันหอมระเหยจากส่วน epicarp ของ *C. sinensis* มีองค์ประกอบหลัก คือ limonene (84.2%), linalool (4.4%) และ myrcene (4.1%) อย่างไรก็ตามปริมาณองค์ประกอบของสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยขึ้นอยู่กับตัวแปรหลายประการ ได้แก่ ฤดูกาลที่เก็บเกี่ยว ระยะการเจริญ ลักษณะทางภูมิศาสตร์ สภาวะการเก็บและวิธีการสกัด นอกจากนี้สารประกอบที่พบในพืชตระกูลส้มแต่ละชนิดอาจจะเหมือนหรือแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรม ภูมิประเทศ ภูมิอากาศ และการดูแลรักษาในการปลูกด้วย (Lota *et al*., 2000 and Smith-Palmer *et al*., 2001) ซึ่งมีผลต่อปริมาณองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดจากพืชตระกูลส้ม

จากองค์ประกอบหลักสำคัญที่พบในพืชตระกูลส้ม มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมยับยั้งเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยและสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากพืชตระกูลส้ม จากการทดลองพบกิจกรรมยับยั้งเชื้อราในน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตต ซึ่งจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดพบ citrolnellal, citrolnellol และ linalool เป็นองค์ประกอบหลักโดยส่วนใหญ่ องค์ประกอบเหล่านี้อาจมีผลต่อกิจกรรมยับยั้งการเจริญของเชื้อราซึ่งมีรายงานว่า citronellal, citronellol, limonene และ linalool มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา (Carson *et al*., 1998; Saikia *et al*., 2001 and Fisher *et al*., 2008)

Shin (2003) ได้ศึกษาผลของ citronellol ต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* พบว่า citronellol สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.78 และ 0.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน Yamasaki และคณะ (2007) ได้ศึกษาผลของสารประกอบในกลุ่ม monoterpenes ประกอบด้วย citronellal, linalool, citrolnellol, limonene, β-myrcene และ β-pinene ต่อการงอกของสปอร์ และการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา *Alternaria alternate* พบว่า citronellal และ linalool สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้ 97 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยได้ 98 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามกิจกรรมการยับยั้งเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวอาจเป็นผลมาจากการมี limonene ซึ่งเป็นองค์ประกอบโดยส่วนใหญ่ที่มีถึง 69.11 เปอร์เซ็นต์ โดย Dambolena และคณะ (2008) รายงานว่า limonene ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครลิตรต่อลิตร มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium verticillioides* อย่างไรก็ตามจากภาพโครมาโทแกรมขององค์ประกอบน้ำมันหอมระเหยที่วิเคราะห์ด้วย GC-MS (Figure 9-12.) พบมีพีคขององค์ประกอบที่เป็นสารไม่ทราบชนิดอยู่จำนวนหนึ่ง โดยเฉพาะในน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้อาจจะเป็นองค์ประกอบหลักที่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งเชื้อรา อย่างไรก็ตามกิจกรรมยับยั้งก็อาจเป็นผลมาจากองค์ประกอบของสารหลายๆ ชนิดร่วมกัน ซึ่งกิจกรรมการยับยั้งของสารสกัดจากพืชเกิดจากการร่วมกันของสารประกอบแต่ละชนิดไม่ว่าจะเป็นกลุ่มสารพวกเทอร์ปีนและสารประกอบออกซิจิเนต (Smith-Palmer *et al*., 2001)

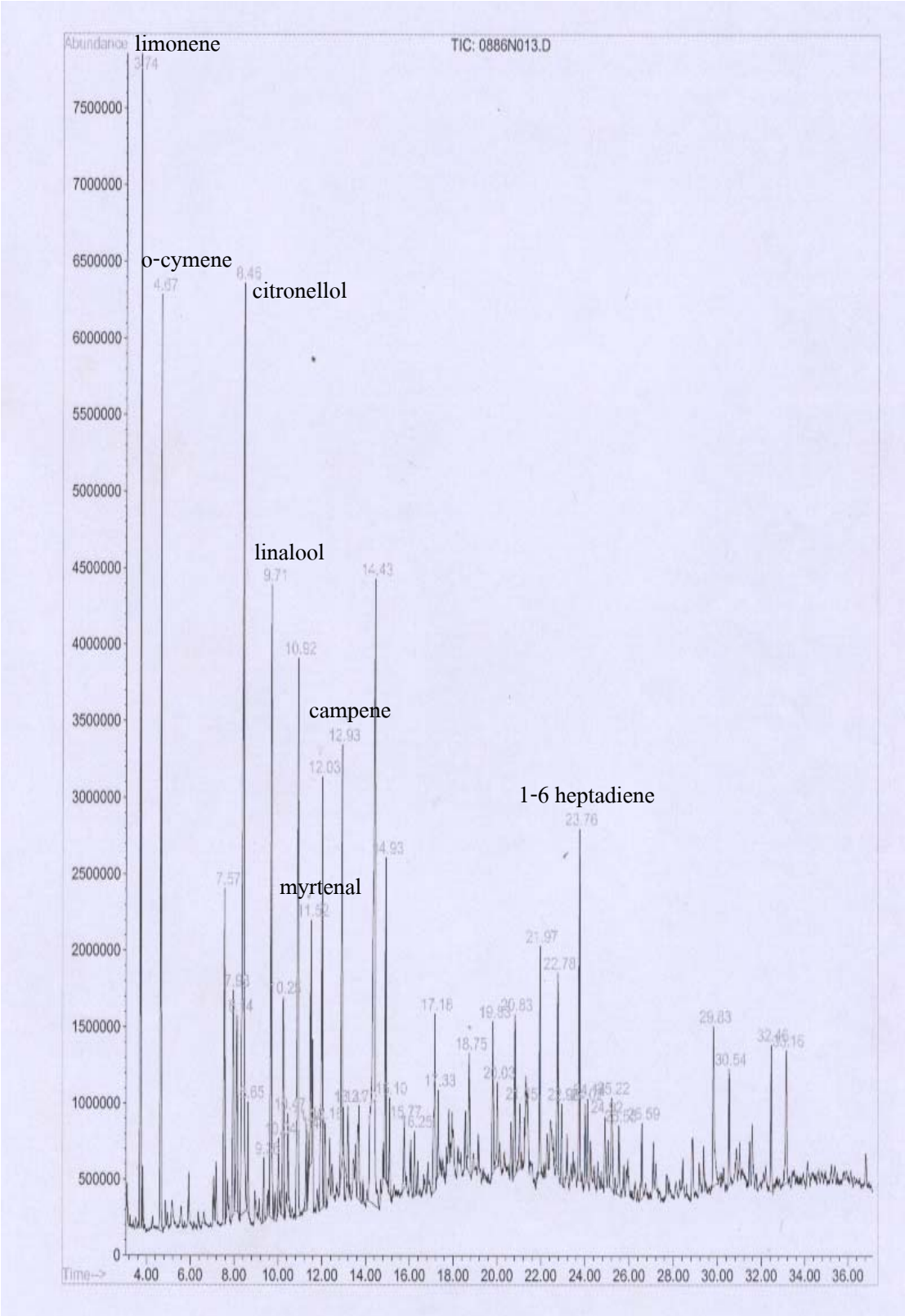


Figure 9. GC chromatogram of essential oil from kaffir lime peel.

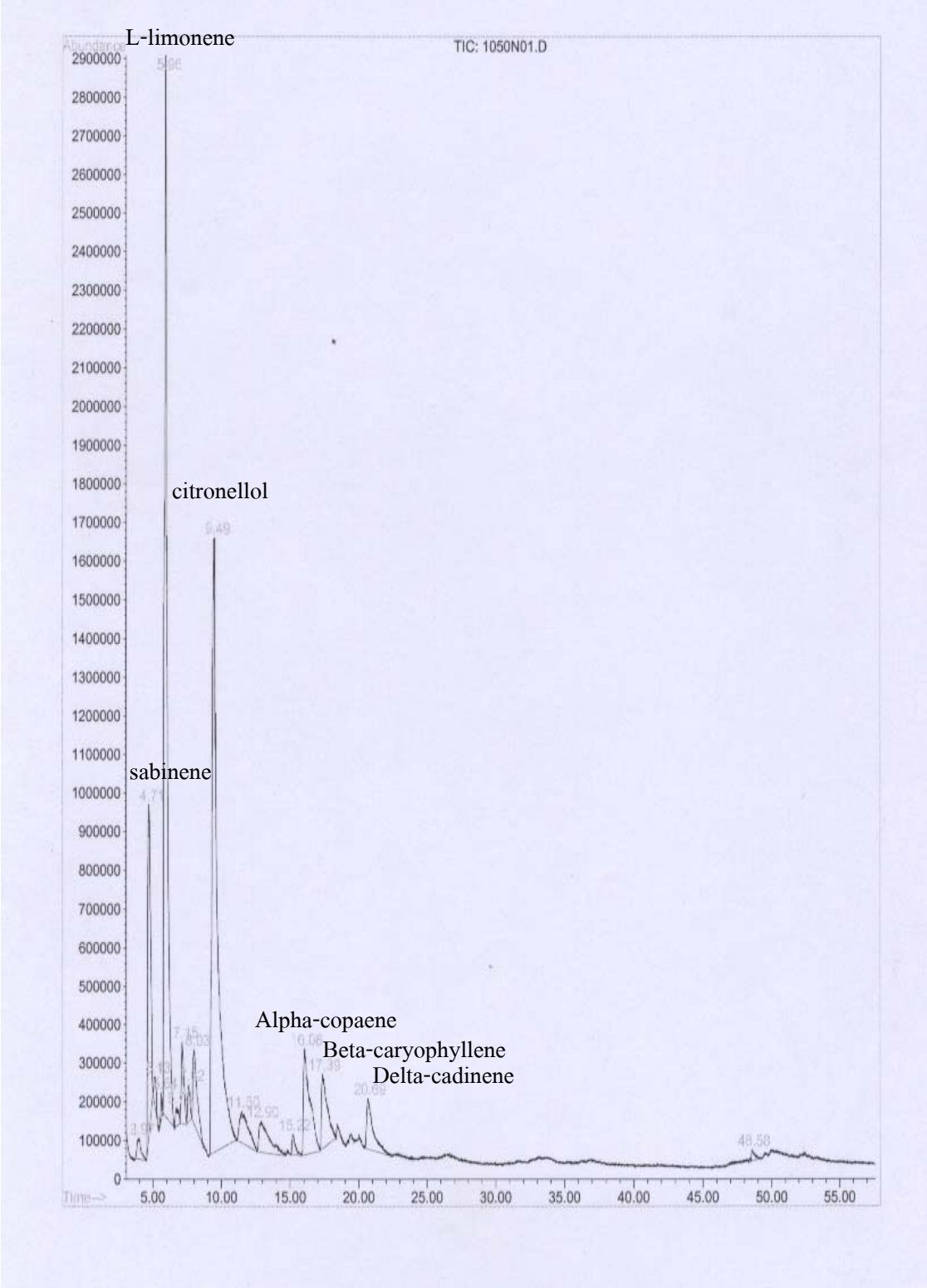


Figure 10. GC chromatogram of ethyl acetate extract from kaffir lime peel.

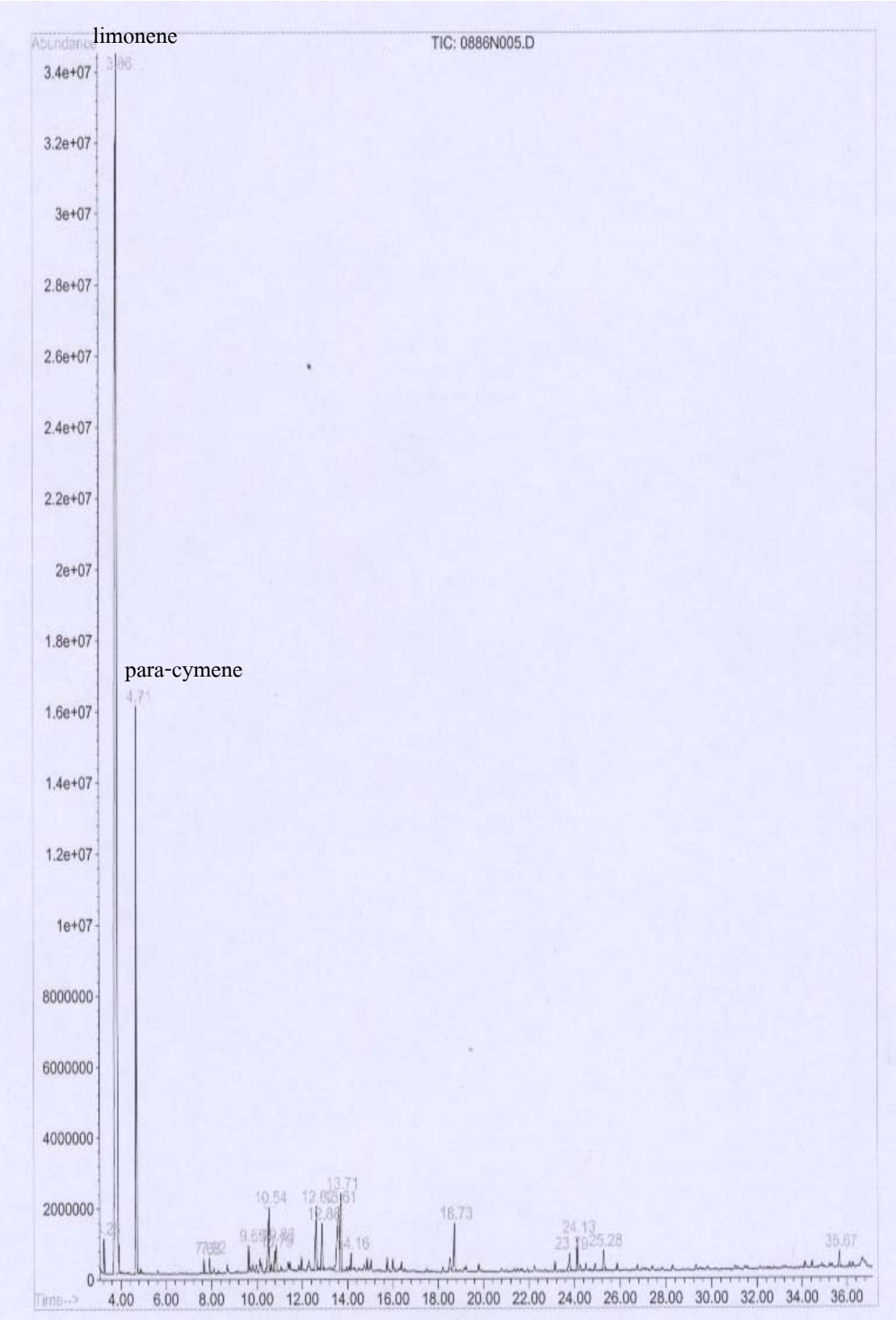


Figure 11. GC chromatogram of essential oil from lime peel.

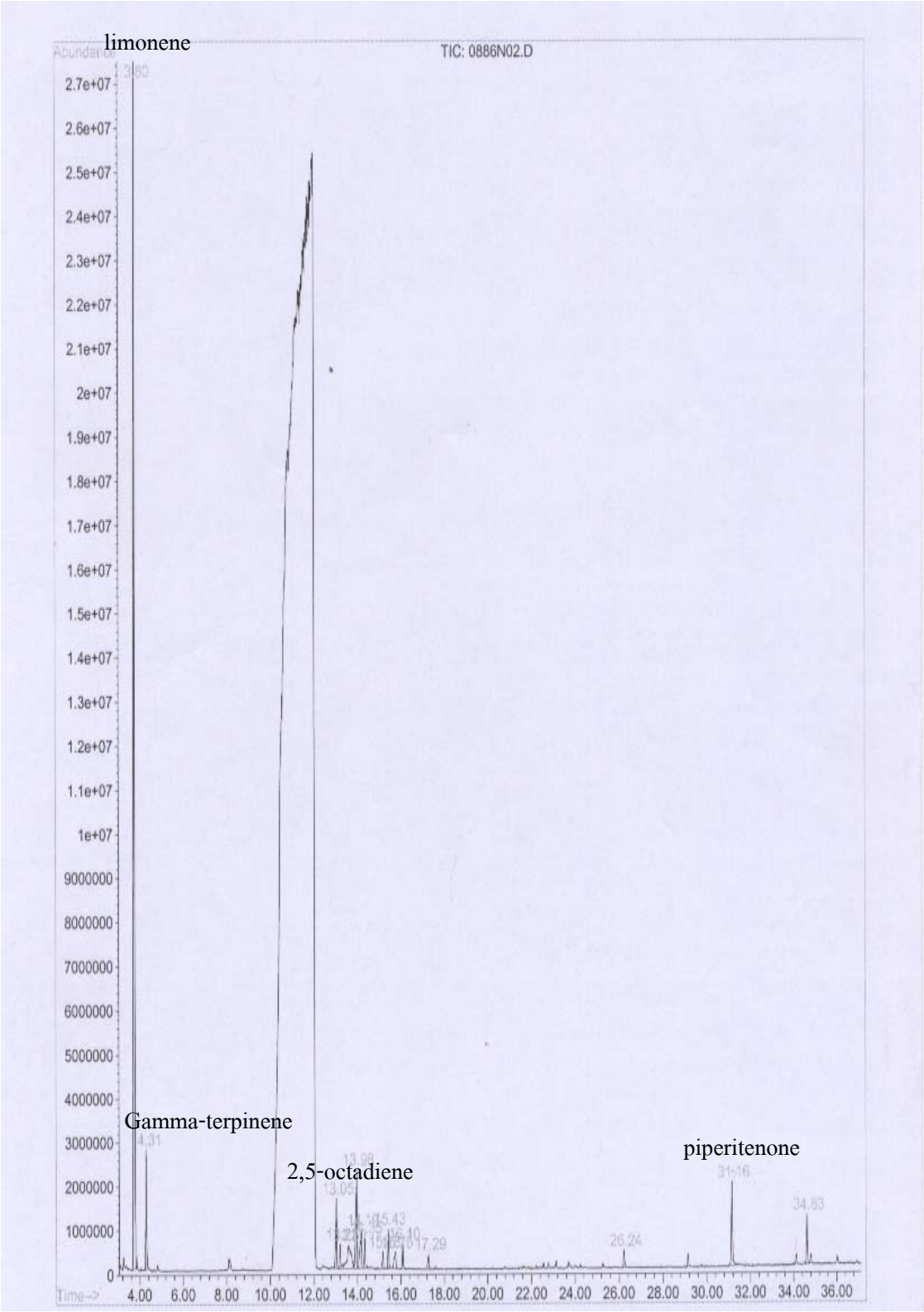


Figure 12. GC chromatogram of ethyl acetate extract from lime peel.

Table 7. Compositions of essential oils and ethyl acetate extracts of kaffir lime and lime peels.

Components	Composition (%)			
	Essential oil		Ethyl acetate extracts	
	lime	kaffir lime	lime	kaffir lime
Limonene	69.12	7.32	61.60	-
l-limonene	-	-	-	28.94
Citronellal	-	11.86	-	-
o-cymene	-	5.52	-	33.07
(+)-2-carene	-	0.52	-	-
Linalool	-	5.83	-	3.04
4-pentinal	-	1.34	-	-
Sabinene	-	5.00	-	9.44
Myrtenal	-	2.13	-	-
Campene	-	3.60	-	-
Citronellol	-	10.67	-	-
1,6-heptadiene	-	2.67	-	-
Gamma-terpinene	-	1.25	4.76	-
Para-cymene	12.77	-	-	-
2,5-octadiene	-	-	3.23	-
Alpha –copaene	-	-	-	6.62
Beta –cadinene	-	-	-	3.13
Beta –caryophyllen	-	-	-	4.14
Beta-myrcene	-	-	-	0.67
Tran-sabinene hydrate	-	-	-	2.09
Alpha-bergamotene	2.08	-	-	-
Gamma-campholenol	-	1.76	-	-
Delta-carene	-	1.26	-	-
1,2-pentadiene	-	1.87	-	-
1,4,6-octatriene	-	2.54	-	-
3,4-pentadienal	-	4.18	-	-
Unknown	16.03	31.46	30.37	8.99

4. ผลของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด และมะนาวต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus*

จากผลการศึกษากิจกรรมการยับยั้งเชื้อราข้างต้น พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ได้ดี ตามลำดับ จึงเลือกน้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดมาใช้ศึกษา โดยเตรียมน้ำมันหอมระเหยให้มีความเข้มข้นเท่ากับค่า MFC (1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร), MIC (0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และต่ำกว่าค่า MIC (0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose broth (PDB) พบอัตราการรอดชีวิตของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* โดยวิธี plate count โดยการเติมน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อ *A. flavus* ลดลงจาก 5.37 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 3.14 และ 3.61 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายในเวลา 3 ชั่วโมง และพบว่าที่ความเข้มข้น 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีอัตราการรอดชีวิตของเชื้อรา *A. flavus* ลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น และสามารถยับยั้งเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ที่ 24 ชั่วโมง (Figure 13.) ส่วนการเติมน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดที่ระดับความเข้มข้น 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเชื้อ *A. parasiticus* ลดลงจาก 5.36 และ 5.29 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 3.24 และ 3.82 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายในเวลา 3 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *A. parasiticus* ได้อย่างสมบูรณ์ที่ 20 ชั่วโมง (Figure 14.) และพบว่าการเติมน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 0.28 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าการเจริญของเชื้อราใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวมีศักยภาพในการทำลายเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ได้ ซึ่ง Moreira และคณะ (2005) กล่าวว่ากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหยจากพืชจะมีความจำเพาะกับเชื้อ Rasooli และ Razzaghi-Abyaneh (2004) ได้ศึกษาน้ำมันหอมระเหยจากไทม์ที่ความเข้มข้น 1:4 (MFC) พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. parasiticus* ได้อย่างสมบูรณ์ที่เวลา 2 ชั่วโมง ต่อมา Rasooli และคณะ (2006) ได้ศึกษาน้ำมันหอมระเหยจาก *Thymus eriocalyx* และ *Thymus x-porlock* พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก *Thymus eriocalyx* และ *Thymus x-porlock* ที่ความเข้มข้น 250 และ 500 พีพีเอ็ม ตามลำดับ มีผลต่อการตายของเชื้อรา *A. niger* คือสามารถยับยั้งการเจริญของสปอร์เชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ที่เวลา2 ชั่วโมง เช่นกัน

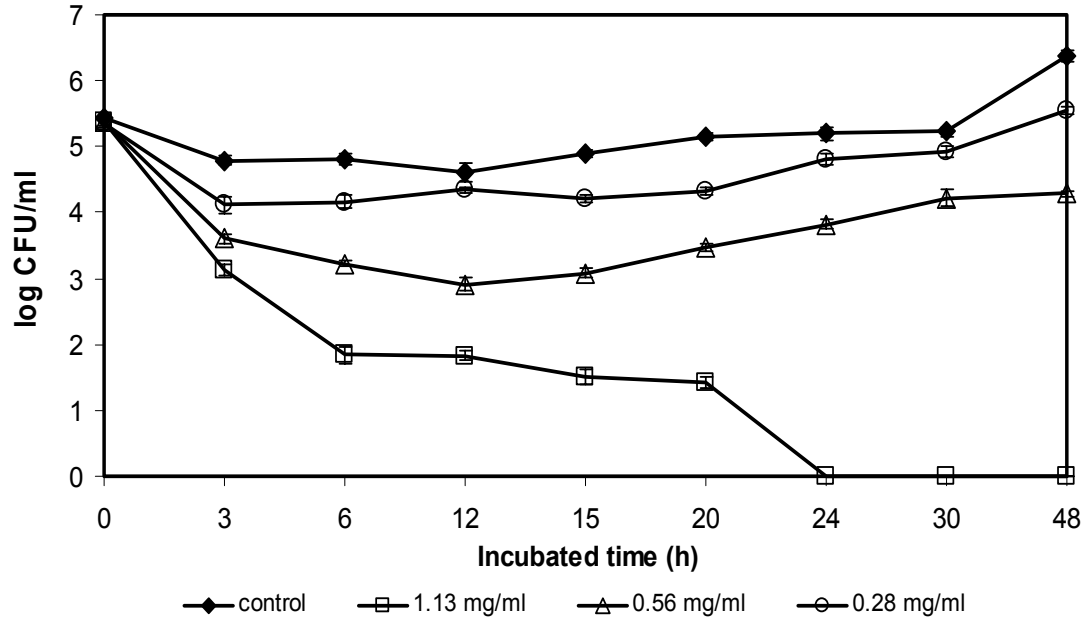


Figure13. Inhibitory effect of lime essential oil on *Aspergillus flavus* TISTR 3041 in PDB.

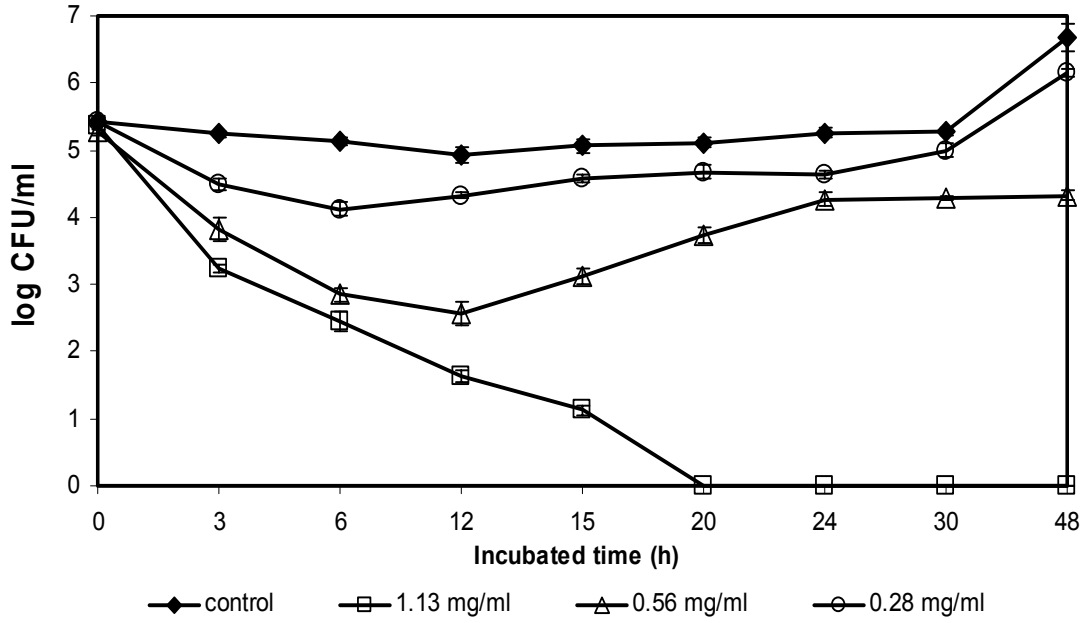


Figure14. Inhibitory effect of kaffir lime essential oil on *Aspergillus parasiticus* TISTR 3041 in PDB.

จากการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อ *A. parasiticus* และ *A. flavus* ตามลำดับ ในอาหาร YES ซึ่งเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบของ yeast extract และน้ำตาลซูโครส เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อรา ที่ระยะเวลา 7 วัน พบว่าการเจริญของเชื้อราขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่เติมลงไป โดยความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยสูงสามารถลดการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าความเข้มข้นต่ำ พบว่าการเติมน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.28, 0.56, 1.13 และ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบการเจริญของรา *A. parasiticus* ลดลงโดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเท่ากับ 489.33, 383.70, 227.33, 198.40 และ 49.67 มิลลิกรัม ตามลำดับ และมีปริมาณความเข้มข้นของแอฟลาทอกซินเท่ากับ 20.58, 10.72, 8.52, 4.85, และ 2.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Figure 15.) ส่วนการเติมน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.28, 0.56, 1.13 และ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความเข้มข้น 2.25 มิลลิลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และการสร้างสารแอฟลาทอกซินได้อย่างสมบูรณ์ส่วนความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยระดับอื่นๆ พบว่าการเจริญของรา *A. flavus* ลดลงตามระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อเท่ากับ 251.20, 194.40, 125.70, 102.22 และ 0.00 มิลลิกรัม ตามลำดับ และมีปริมาณแอฟลาทอกซินเท่ากับ 13.43, 12.44, 9.82, 6.92 และ 0.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Figure 16.) ซึ่งจากผลการทดลองนี้พบว่าต้องใช้ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยสูงกว่างานวิจัยอื่นๆ จึงสามารถยับยั้งเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ เช่น Sharma และ Tripathi (2008) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจาก *C. sinensis* ที่ความเข้มข้น 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. niger* ได้อย่างสมบูรณ์ ที่ระยะเวลา 7 วัน ส่วน Dikbas และคณะ (2008) ได้ศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจาก *Satureja hortensis* ต่อการเจริญของ *A. flavus* ในอาหารเหลวที่ระดับความเข้มข้น 6.25, 12.50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถลดการเจริญของเส้นใยได้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยสูงขึ้นพบว่าสามารถยับยั้งได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้นต่ำโดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบการเจริญของเชื้อราลดลงโดยมีน้ำหนักแห้ง 0.30 กรัม ขณะที่ความเข้มข้น 6.25 และ 12.50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 1.73 และ 1.76 กรัม ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองข้างต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB พบว่าน้ำมันหอมระเหยสามารถยับยั้งเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ ที่ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอาหาร YES ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะต่อการเจริญ และมีสารอาหารที่สมบูรณ์ มีผลทำให้เซลล์ของเชื้อราต้านทานต่อน้ำมันหอมระเหยมากขึ้น คือต้องใช้ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หรือสูงกว่า 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จึงสามารถยับยั้งเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ จากการทดลองเห็นได้ว่าการเจริญของเชื้อราจะสัมพันธ์กับการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อราด้วย

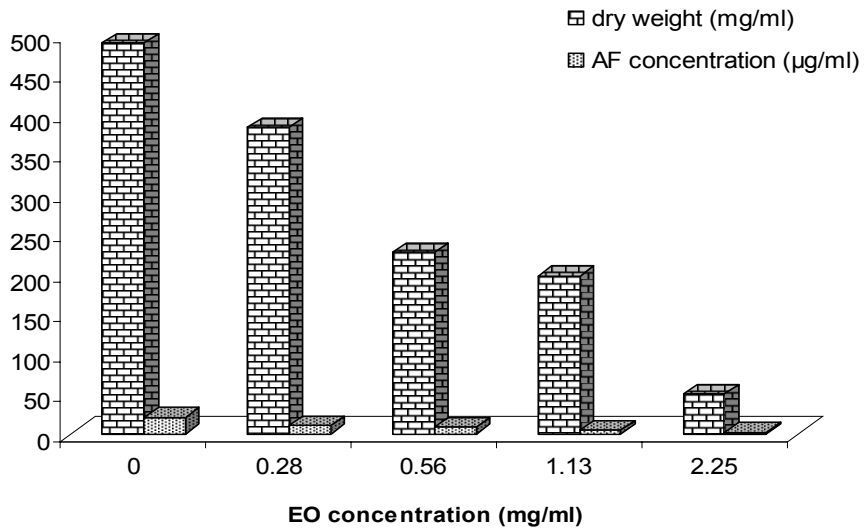


Figure 15. Effect of kaffir lime essential oil on *A. parasiticus* growth and aflatoxin production in YES medium.

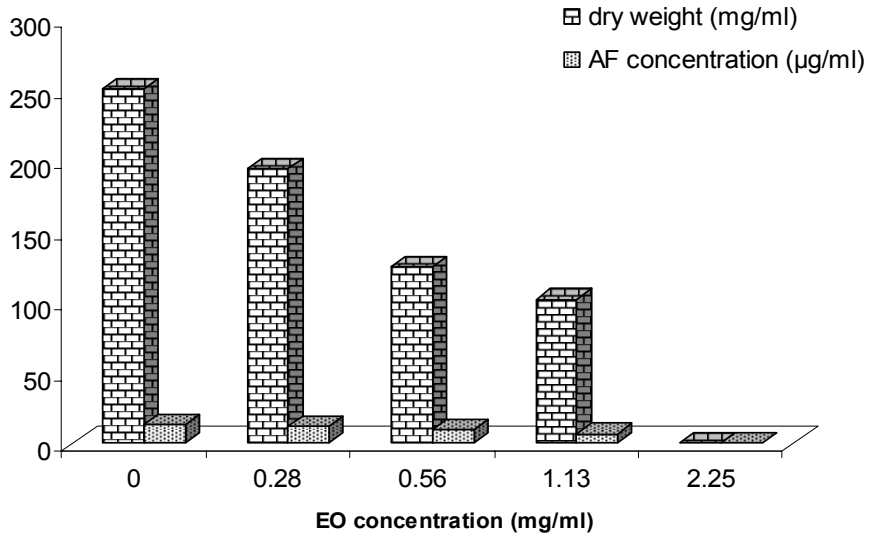
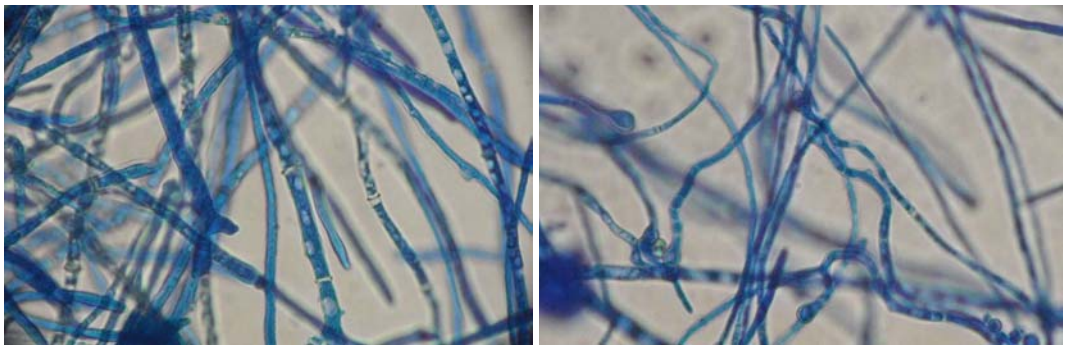


Figure 16. Effect of lime essential oil on *A. flavus* growth and aflatoxin production in YES medium.

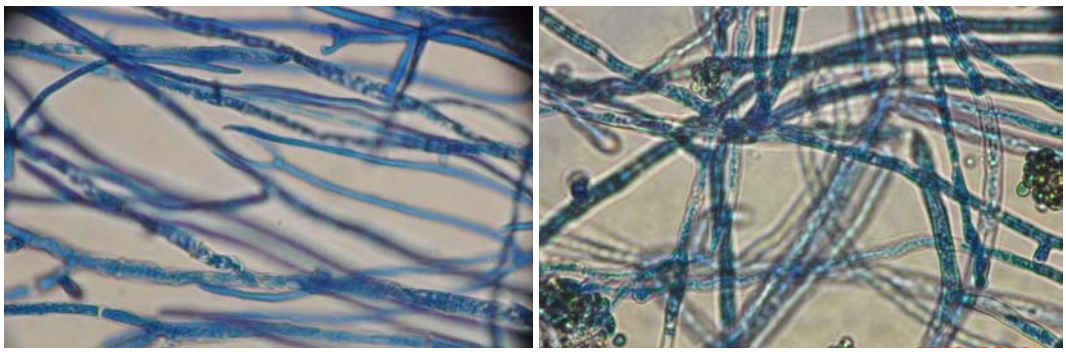
5. ผลของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด และมะนาวต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus*

ผลการศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากมะกรูดและมะนาวต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ตามลำดับ พบว่าหลังจากการเติมและไม่เติมน้ำมันหอมระเหยจะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ดังแสดงในFigure 17-18 ซึ่งแสดงลักษณะเส้นใย (mycelium) ของเชื้อราพบว่าไม่เติมน้ำมันหอมระเหยมีลักษณะเส้นใยของ *A. parasiticus* และ *A. flavus* มีรูปร่างเรียบเป็นปกติ ในขณะที่เส้นใยที่สัมผัสกับน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีรูปร่างของเส้นใยที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปมากนักแต่พบว่าโครงสร้างภายในเส้นใยมีลักษณะโปร่ง และมีขนาดเส้นใยที่ใหญ่กว่าเส้นใยราชุดที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย และพบว่าไม่มีการสร้างสปอร์ในขณะที่ชุดควบคุมพบมีการสร้างสปอร์ แสดงว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวมีผลต่อการเจริญของ *A. parasiticus* และ *A. flavus* ตามลำดับ



A **B**

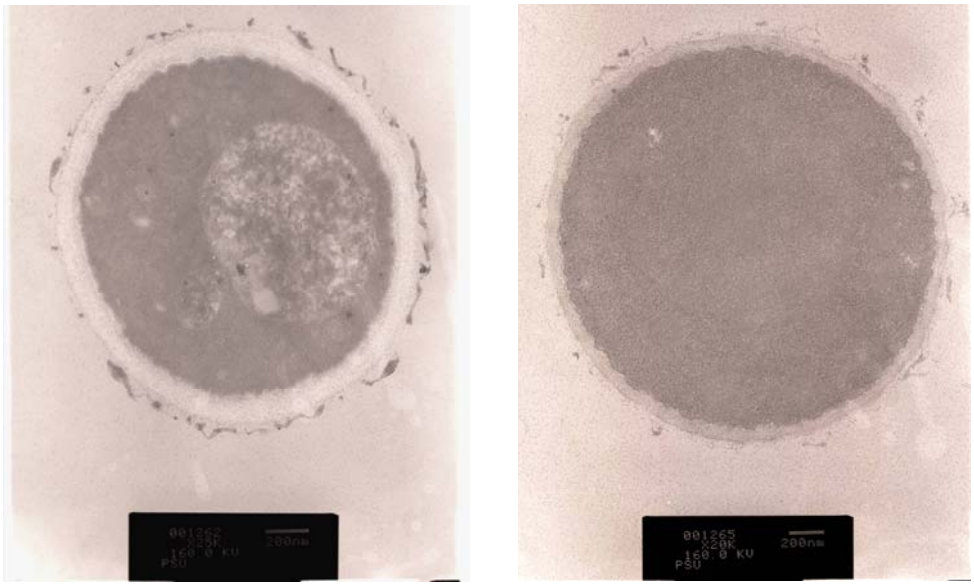
Figure 17. Microphotograph (400×) of *A. parasiticus* mycelium exposed to 0.56 mg/ml of kaffir lime essential oil (A) and control (B).



A **B**

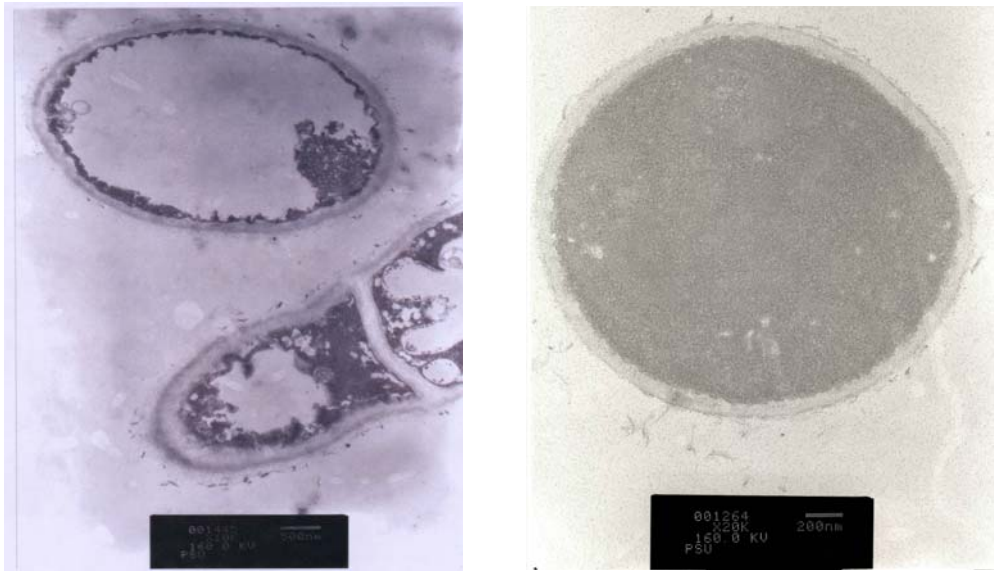
Figure 18. Microphotograph (400×) of *A. flavus* mycelium exposed to 0.56 mg/ml of lime essential oil (A) and control (B).

ผลการศึกษาภาพถ่ายจาก TEM ของ *A. parasiticus* หลังเติมน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและไม่เติมน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด ดังแสดงใน Figure 19-20 (A) และ (B) ตามลำดับ พื้นผิวผนังเซลล์ของ hyphae เกิดลักษณะที่ผิดปกติโดยสังเกตได้จากผนังเซลล์ที่มีลักษณะหนาขึ้น และมีลักษณะไม่เรียบ ภายในเซลล์มีลักษณะโปร่งกว่าเซลล์ชุดควบคุมแสดงว่าองค์ประกอบภายในเซลล์ถูกทำลาย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rasooli และ Owlia (2005) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ *A. parasiticus* เมื่อได้รับน้ำมันหอมระเหยจากต้นไทม์ที่ระดับความเข้มข้น 250 พีพีเอ็ม พบว่าผนังเซลล์ของ hyphae มีลักษณะไม่เรียบเนื่องจากเกิดรอยฉีกขาดและพบว่ามีการสร้างโคนิเดียลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และออกาแนลภายในเซลล์ถูกทำลาย ต่อมา Rasooli และคณะ (2006) รายงานว่าเชื้อรา *A. niger* เมื่อได้รับน้ำมันหอมระเหยจาก *Thymus eriocalyx* และ *Thymus x-purlock* ที่ระดับความเข้มข้น 125 และ 250 พีพีเอ็ม ตามลำดับ พบว่าเซลล์ของ *A. niger* มีผนังเซลล์หนาขึ้น ส่วนของไซโตพลาสซึมถูกทำลาย ซึ่งจากการศึกษาองค์ประกอบข้างต้นของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด และมะนาวพบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม monoterpenes hydrocarbon และ susquiterpenes hydrocarbon หลายชนิดรวมกัน ซึ่งสารกลุ่ม terpenes มีความสามารถในการทำลาย และย่อยสลายโครงสร้างของไขมันที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้ผนังเซลล์เกิดรูรั่วจึงทำให้น้ำมันหอมระเหยสามารถเข้าไปภายในเซลล์ได้ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์และโปรตีนต่างๆ ถูกทำลาย เกิดการรั่วไหลของไซโตพลาสซึม เซลล์แตก ส่งผลให้สารพวกโปรตีนและสารประกอบอื่นๆ ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์แพร่ผ่านออกมาภายนอก ไอออนภายในเซลล์ เช่น K^+ รั่วออกภายนอกทำให้น้ำมันหอมระเหย ที่มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อราก็สามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเซลล์ได้มากขึ้นหรือเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการซึมผ่านของสารได้ (Brehm-Stecher *et al*., 2003) นอกจากนี้การที่น้ำมันหอมระเหยเข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์ทำให้ค่าพีเอชภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงจะทำให้กระบวนการต่างๆ ในเซลล์ เช่น การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การสังเคราะห์โปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ผิดปกติ ทำให้เซลล์ตาย หรือการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ (Oussalah *et al*., 2006) ถึงแม้ว่ากลไกในการเกิดปฏิกิริยาของน้ำมันหอมระเหยยังไม่แน่ชัด แต่ก็เชื่อว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของผนังเซลล์เกิดการฉีกขาดทำให้เกิดการรั่วไหลของเอนไซม์และสารอาหารต่างๆ (Singh *et al*., 2003) เป็นสาเหตุที่ทำให้การเจริญของเชื้อราช้าลงหรือตายได้



A B

Figure 19. Transmission Electron Microscope (20000×) of *A. parasiticus* exposed to 0.56 mg/ml of kaffir lime essential oil (A) and control (B).



A B

Figure 20. Transmission Electron Microscope (20000×) of *A. flavus* exposed to 0.56 mg/ml of lime essential oil (A) and control (B).

6. ผลการศึกษาการใช้น้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูด และมะนาวในการควบคุมการเจริญและสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ในเมล็ดข้าวโพด

จากผลการศึกษาของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ตามลำดับ ในเมล็ดข้าวโพดที่อุณหภูมิห้อง พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ดังแสดงใน Figure 21-22 (A). โดยที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อราได้จนถึง 3 วัน ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งได้จนถึง 5 วัน ยกเว้นน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *A. flavus* ได้จนถึง 7 วัน น้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดที่ระดับความเข้มข้น 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อรา *A. parasiticus* ได้จนถึง 7 วัน และพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์จนถึง 28 วัน จากผลการทดลองเมื่อวัดปริมาณแอฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างขึ้นพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวทุกระดับความเข้มข้นสามารถลดการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินจากเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ได้ดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย ดังแสดงใน Figure 21-22 (B). พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดที่ระดับความเข้มข้น 25 และ 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้างแอฟลาทอกซินจาก *A. parasiticus* ได้จนถึง 3 และ 5 วัน ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้างแอฟลาทอกซินได้จนถึง 7 วัน ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการสร้างแอฟลาทอกซินจาก *A. flavus* ได้จนถึง 3 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 30 และ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งได้จนถึง 7 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งได้จนถึง 14 วัน ส่วนน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการสร้างแอฟลาทอกซินจากเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้ อย่างสมบูรณ์จนถึง 28 วัน

จากการทดลองของ Rasooli และ Owlia (2005) พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากต้นไทม์สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. parasiticus* และการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้อย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้น 250 พีพีเอ็ม และ Dikbas และคณะ (2005) ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากพืชตระกูล Agave ต่อการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารพิษ mycotoxin จากเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* สารสกัดจาก *Agave asperrima* และ *Agave steriata* มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีค่า MIC เท่ากับ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

และพบว่าเมื่อนำสารสกัดมาใช้ในเมล็ดข้าวโพดพบว่าค่า MIC ของสารสกัดต่อการยับยั้งเชื้อราเพิ่มสูงขึ้นกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีค่า MIC เท่ากับ 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรยับยั้ง *A. flavus* และ 42 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยับยั้ง *A. parasiticus* และพบว่าสารพิษแอฟลาทอกซินจะลดลงตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้น

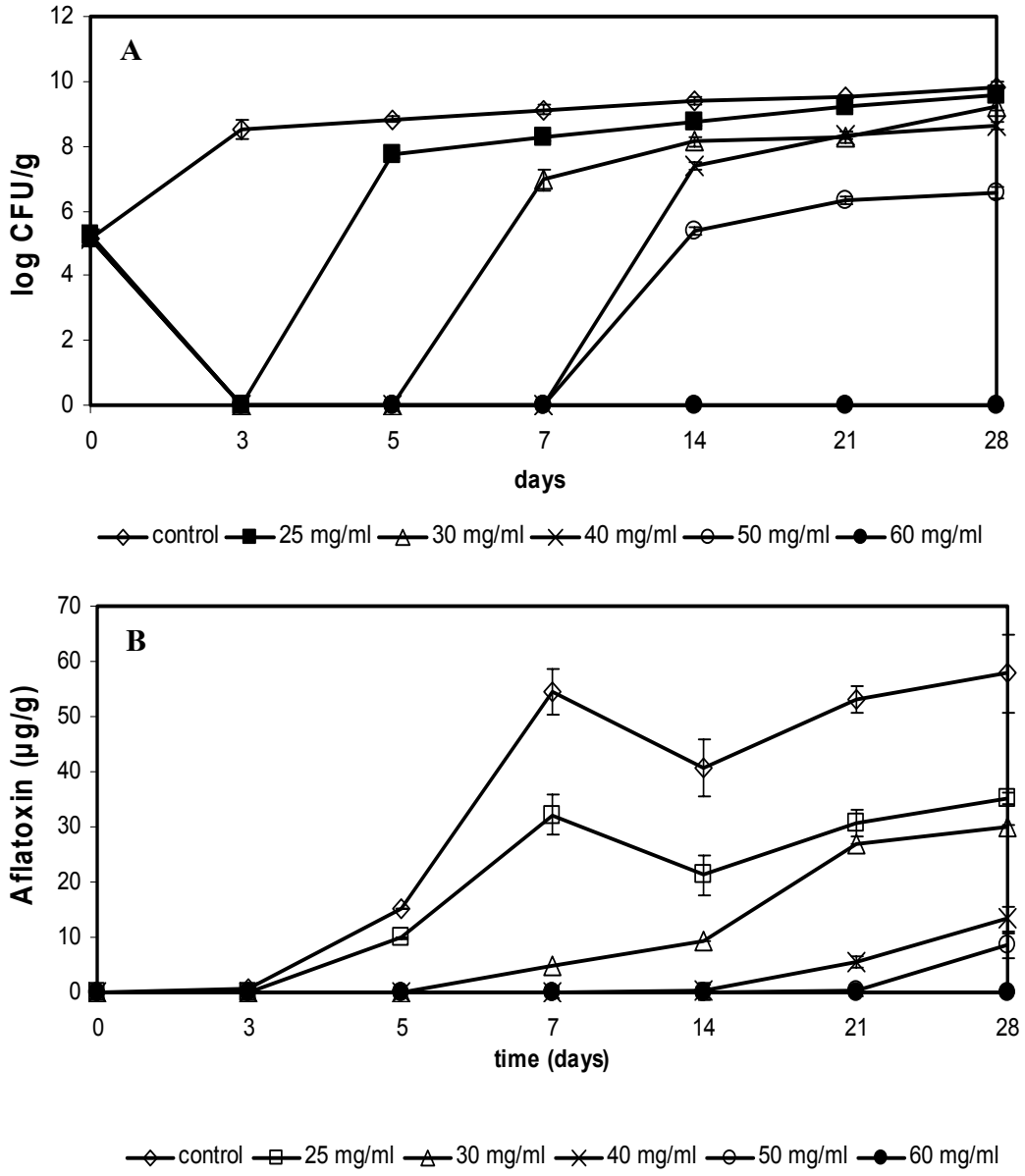


Figure 21. Effect of kaffir lime essential oil on growth (A) and aflatoxin production (B) by *A. parasiticus* in maize kernel stored at room temperature.

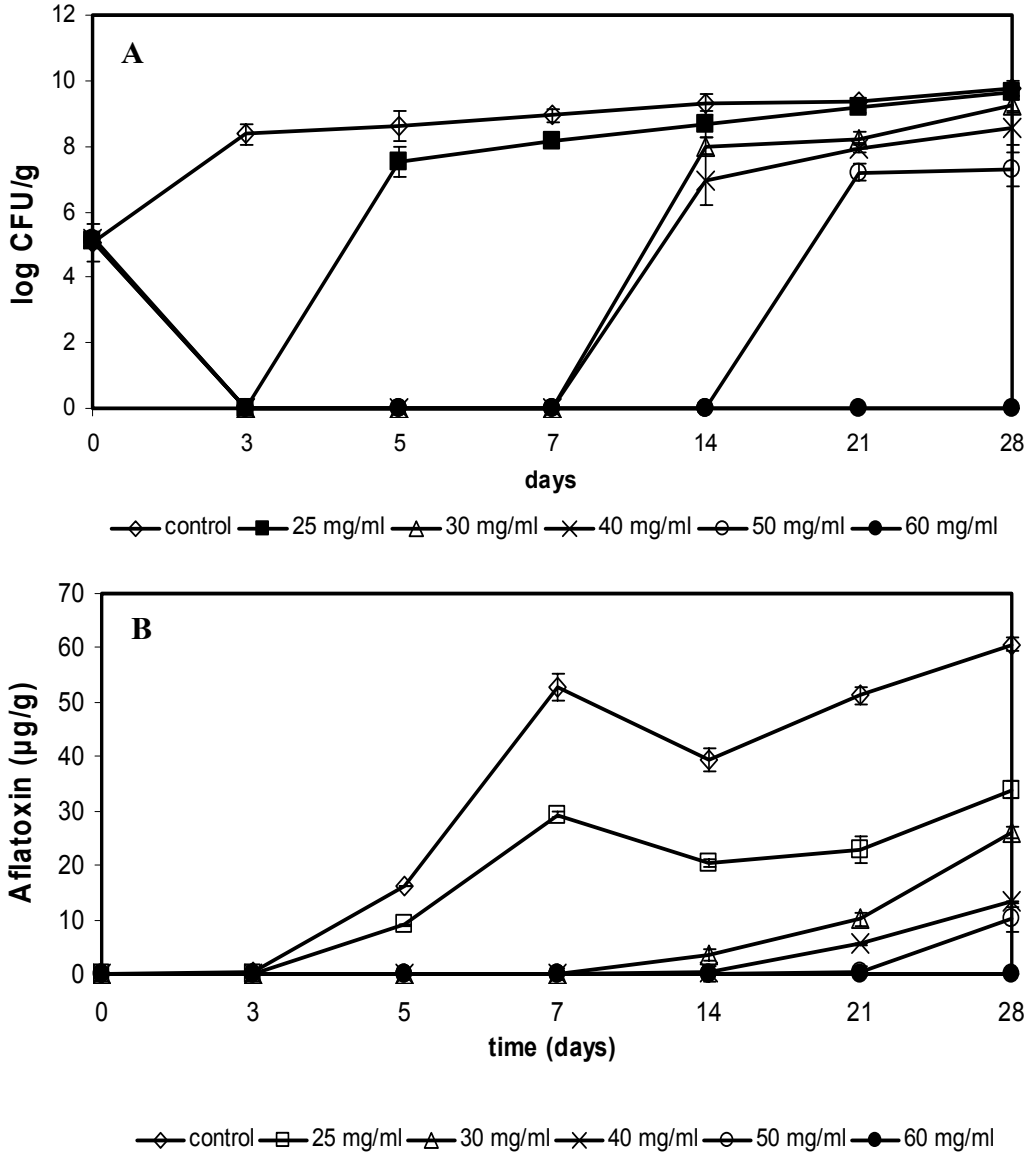


Figure 22. Effect of lime essential oil on growth (A) and aflatoxin production (B) by *A. flavus* in maize kernel stored at room temperature.

จากผลการศึกษาของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ตามลำดับ ในเมล็ดข้าวโพดที่อุณหภูมิห้องที่มีการควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไม่สามารถยับยั้งเชื้อราได้แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่ามีปริมาณใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่ไม่เติม

น้ำมันหอมระเหย โดยการใช้น้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิดได้ 3 วัน ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญได้ 5 วัน และความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิดได้จนถึง 7 วัน ส่วนที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งได้จนถึง 14 วัน ดังแสดงในFigure 23-24 (A).

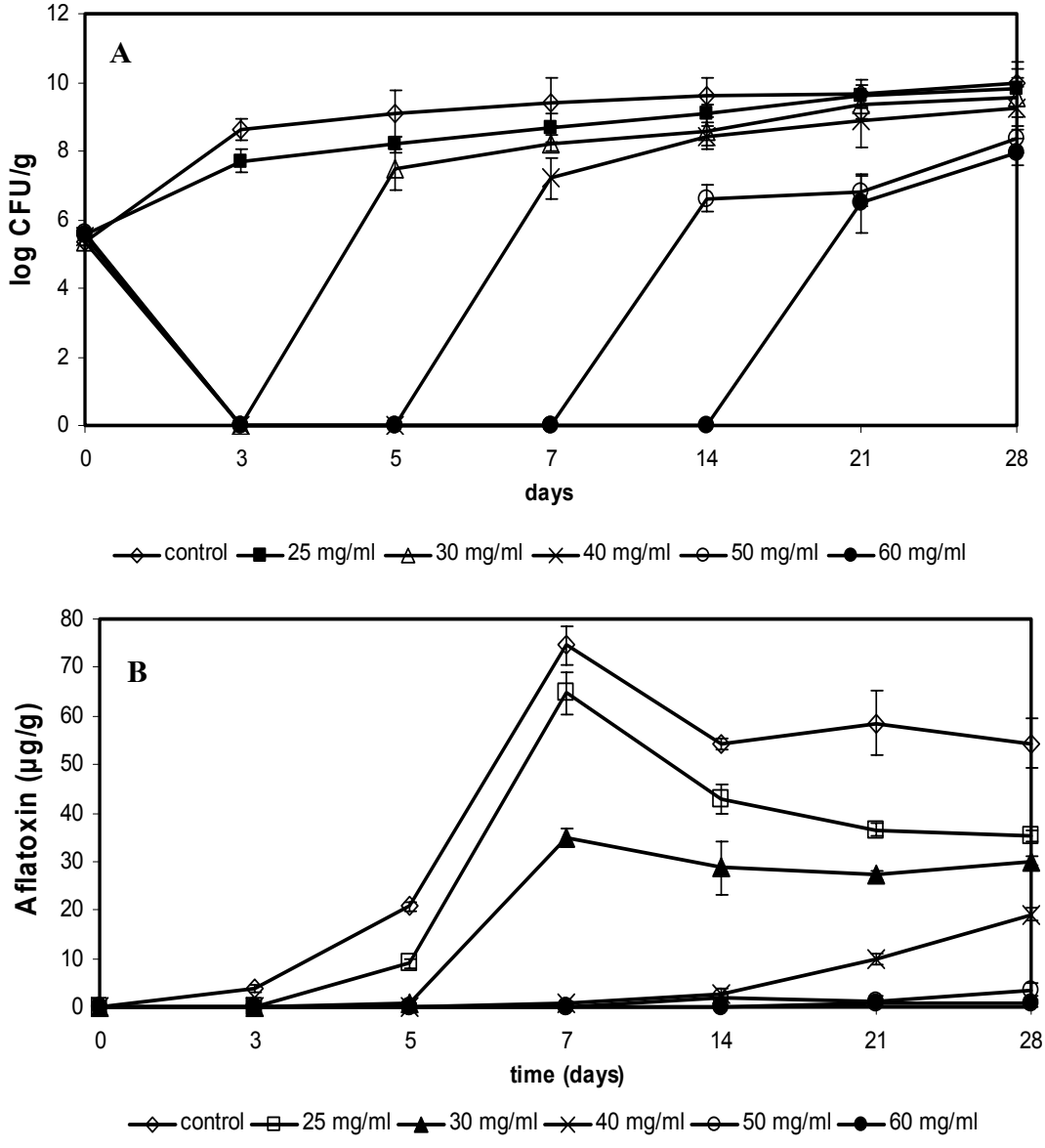


Figure 23. Effect of kaffir lime essential oil on growth (A) and aflatoxin production (B) by *A. parasiticus* in maize kernel stored at room temperature under 90% relative humidity.

เมื่อวัดปริมาณแอฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างขึ้นพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวทุกระดับความเข้มข้นสามารถลดการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้ดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย ซึ่งสามารถลดการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินจากเชื้อราทั้งสองชนิดได้ตามระดับความเข้มข้น น้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวทุกระดับความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งการสร้างแอฟลาทอกซินจากเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์ดังแสดงใน Figure 23-24 (B). จากผลการทดลองเมื่อเก็บในอุณหภูมิห้องที่มีการควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการเจริญของเชื้อราดีกว่าชุดที่ไม่ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ ทั้งนี้เนื่องจากความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา ทำให้เชื้อราเจริญอย่างรวดเร็ว ซึ่งสุพรรณ ปัญญาฟู (2540) พบว่าที่ความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปมีเชื้อราเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากระหว่างการเก็บรักษาข้าวญี่ปุ่น

จากการทดลองเป็นการศึกษาเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวสามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างแอฟลาทอกซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ YES ซึ่งเป็นอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* และในเมล็ดข้าวโพด พบว่าในเมล็ดข้าวโพดต้องใช้ความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยที่สูงกว่าในอาหารเหลวมากเนื่องจากมีหลายปัจจัยมาเกี่ยวข้อง เช่นผลจากปฏิกิริยาระหว่างองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยกับองค์ประกอบในเมล็ดข้าวโพด เช่นแป้งและไขมัน เป็นต้น น้ำมันหอมระเหยมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ละลายได้ในไขมันซึ่งมีผลต่อการลดกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของน้ำมันหอมระเหย เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยได้ละลายในส่วนที่เป็นไขมันของจุลินทรีย์ ทำให้กิจกรรมการยับยั้งในส่วนของชั้นน้ำลดลง นอกจากนี้ไขมันยังเป็นตัวปกป้องเซลล์จุลินทรีย์จากปฏิกิริยาของน้ำมันหอมระเหย (Menon and Garg, 2001; Gill *et al*., 2002) องค์ประกอบในอาหารจะมีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์มากหรือน้อยนั้นขึ้นกับปริมาณขององค์ประกอบในอาหารนั้นๆ และปริมาณจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ (Smith-Palmer *et al*., 2001) ซึ่งการนำน้ำมันหอมระเหยไปใช้จริงนั้นจะต้องคำนึงปัจจัยหลายปัจจัย เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยมีโครงสร้างที่ซับซ้อน มีคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยจะแปรผันกับฤดูกาลที่เก็บ และระเหยได้ง่ายเนื่องจากวิธีการสกัดด้วยไอน้ำซึ่งมีเพียงสารในกลุ่ม volatile compounds เท่านั้น ซึ่งจะต้องมีการศึกษาถึงคุณสมบัติของสารประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหยภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ใช้จริง รวมถึงกลิ่นของน้ำมันหอมระเหยที่ค่อนข้างมีกลิ่นแรง และอาจทำให้รสสัมผัสเปลี่ยนไปได้เมื่อใช้ที่ความเข้มข้นสูงๆ ทำให้อาจไม่เป็นที่ยอมรับ ซึ่งต้องศึกษาเพิ่มเติมในการลดปัญหาในเรื่องดังกล่าวให้มีความเหมาะสมกับสภาวะที่ใช้จริงและยอมรับได้เมื่อนำมาใช้เพื่อช่วยเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ต่างๆ

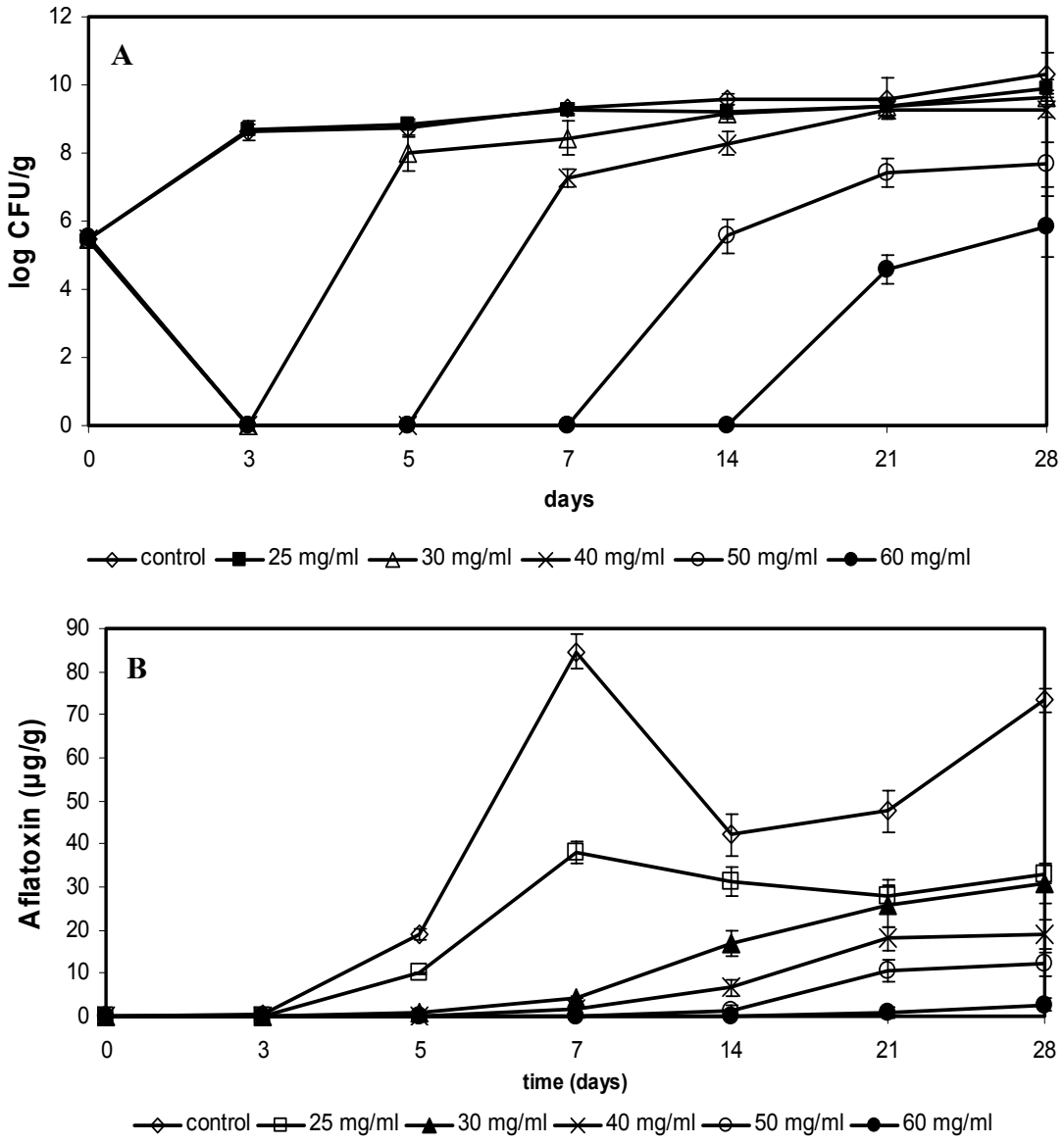


Figure 24. Effect of lime essential oil on growth (A) and aflatoxin production (B) by *A. flavus* in maize kernel stored at room temperature under 90% relative humidity.

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากการสกัดผิวส้ม 5 ชนิดด้วยเอธิลอะซิเตตและการกลั่นด้วยไอน้ำ พบว่าผิวมะกรูดจะให้เปอร์เซ็นต์ปริมาณสูงสุดจากสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยคือ 2.36 และ 0.77 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ตามลำดับ สารสกัดจากวิธีกลั่นด้วยไอน้ำจากผิวมะกรูด และมะนาวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *A flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. niger* และ *Penicillium* sp.ได้ดีกว่าสารสกัดเอธิลอะซิเตต น้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวยับยั้งเชื้อรา *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus* และ *A. niger* ที่ MIC เท่ากับ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำลายเชื้อราที่ค่า MFC เท่ากับ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ทำลาย *A. fumigatus* ที่ MFC เท่ากับ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่า *A. fumigatus* มีความไวต่อน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดมากกว่าเชื้อราสายพันธุ์อื่น ส่วนน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวยับยั้งเชื้อ *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. fumigatus* ที่ MIC เท่ากับ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำลายเชื้อราที่ค่า MFC เท่ากับ 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการวิเคราะห์หาองค์ประกอบเชิงคุณภาพของสารสกัดเอธิลอะซิเตตและน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดด้วย GC-MS พบว่าองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดประกอบไปด้วย citronellol (10.67%) limonene (7.32), linalool (5.83%) และ *o*-cymene (5.51%) และองค์ประกอบหลักของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวพบ limonene (69.11%) และ *p*-cymene (12.77%) ส่วนสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะกรูดพบว่ามีองค์ประกอบหลักเป็น *o*-cymene (33.07%), L-limonene (28.94%) และ sabinene (9.44%) สารสกัดเอธิลอะซิเตตจากมะนาวพบ limonene (61.60%) และ γ-terpinene (4.76%) เป็นองค์ประกอบหลัก

น้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวที่ความเข้มข้น 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดจำนวนเชื้อ *A. flavus* จาก 5.37 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 3.14 และ 3.61 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับภายในเวลา 3 ชั่วโมง ส่วนการเติมน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดที่ความเข้มข้น 1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดจำนวนเชื้อ *A. parasiticus* จาก 5.36 และ 5.29 log CFU ต่อมิลลิลิตร เป็น 3.24 และ 3.82 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ภายในเวลา 3 ชั่วโมง และพบว่าที่ความเข้มข้น1.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่ 24 และ 20 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

น้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดที่ความเข้มข้น 0, 0.28, 0.56, 1.13 และ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลต่อเจริญของ *A. parasiticus* พบการเจริญและปริมาณแอฟลาทอกซินลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นสูงขึ้นโดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเท่ากับ 489.33, 383.70, 227.33, 198.40 และ 49.67 มิลลิกรัม ตามลำดับ และมีปริมาณความเข้มข้นของแอฟลาทอกซินเท่ากับ 20.58, 10.72, 8.52, 4.85, และ 2.03 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ขณะที่การเติมน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.28, 0.56, 1.13 และ 2.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความเข้มข้น 2.25 มิลลิลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และการสร้างสารพิษได้อย่างสมบูรณ์ส่วนความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยระดับอื่นๆ พบว่าการเจริญของรา *A. flavus* ลดลงตามระดับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโดยมีน้ำหนักแห้งของเส้นใยเชื้อเท่ากับ 251.20, 194.40, 125.70, 102.22 และ 0.00 มิลลิกรัม ตามลำดับ และมีปริมาณแอฟลาทอกซินเท่ากับ 13.43, 12.44, 9.82, 6.92 และ 0.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ตามลำดับ ในเมล็ดข้าวโพดที่อุณหภูมิห้อง พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าความเข้มข้นต่ำ โดยที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งการเจริญ และการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* และ *A. flavus* ได้อย่างสมบูรณ์จนถึง 28 วัน ส่วนเมล็ดข้าวโพดที่เก็บในสภาวะอุณหภูมิห้องที่มีการควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ 90 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อราเจริญได้ดีกว่าชุดที่ไม่ควบคุมความชื้นสัมพัทธ์เมื่อวัดปริมาณแอฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างขึ้นพบว่าน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวทุกระดับความเข้มข้นสามารถลดการสร้างสารพิษแอฟลาทอกซินได้ดีกว่าชุดควบคุมที่ไม่เติมน้ำมันหอมระเหย ทั้งนี้เนื่องจากความชื้นสัมพัทธ์ 90เปอร์เซ็นต์ เหมาะต่อการเจริญของเชื้อรา ทำให้เชื้อราเจริญอย่างรวดเร็ว

ข้อเสนอแนะ

1. น้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดและมะนาวมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราได้ดี ควรนำไปทดสอบกับเชื้อราในกลุ่มอื่นๆ ด้วยนอกเหนือจากเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหาร

2. เนื่องจากน้ำมันหอมระเหยมีโครงสร้างที่ซับซ้อน ระเหยได้ง่าย ซึ่งจะต้องมีการศึกษาถึงคุณสมบัติของน้ำมันหอมระเหยภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ใช้จริงรวมถึงกลิ่นของน้ำมันหอมระเหยที่ค่อนข้างมีกลิ่นแรง และอาจทำให้รสสัมผัสเปลี่ยนไปได้เมื่อใช้ที่ความเข้มข้นสูงๆ ทำให้อาจไม่เป็นที่ยอมรับ ซึ่งต้องศึกษาเพิ่มเติมในการลดปัญหาในเรื่องดังกล่าว

3. ให้มีการพัฒนาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งให้เป็นสารเดี่ยวๆ

เอกสารอ้างอิง

กนกรัตน์ ป้องประทุม. 2540. การควบคุมการเจริญและการสร้างแอฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* 102566 ในเมล็ดข้าวโพดสารเคมีบางชนิด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

กวินดา ตั้งกิจวานิช, ขจรเกียรติ ศิริเชษฐ์ และวรพจน์ แก้วมะเริง. 2538. การตรวจหาปริมาณแอฟลาทอกซินในกระเทียม หัวหอม และกุ้งแห้งจากตลาดในเทศบาลขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น. ปัญหาพิเศษปัญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์. 2543. การแก้ปัญหาแอฟลาทอกซินในอาหารโคนมตามโครงการแก้ปัญหาแอฟลาทอกซินในอาหารและอาหารสัตว์แบบครบวงจร. กรมปศุสัตว์. กรุงเทพฯ.

เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2540. สารพิษจากเชื้อรา: อดีต ปัจจุบัน และอนาคต. สารพิษจากเชื้อรา: ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์. การประชุมวิชาการ 80 ปี แห่งการสถาปนาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. คณะสัตวแพทย์ศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 1-11.

คมสันต์ หุตะแพทย์. 2545. เครื่องสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยการกลั่น. ว. เกษตรธรรมชาติ10: 10-13.

ชนิกา เอี่ยมสุภาษิต และสมจินตนา ทุมแสน. 2542. การเกิดสารพิษแอฟลาทอกซินในถั่วลิสงและแนวทางแก้ไข. หน้า 12-13. ข่าวสารสถาบันวิจัยพืชไร่. มกราคม–มีนาคม.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2532. ผลของสมุนไพรบางชนิดต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราที่สร้างสารพิษแอฟลาทอกซิน. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 5: 33-39.

ทัศนีย์ จุฬามรกต และดวงจันทร์ สุประเสริฐ. 2540. สารพิษจากเชื้อราที่ตรวจพบในข้าวบาร์เลย์ที่จำหน่ายในประเทศไทย. แก่นเกษตร. 27: 124-128.

ธิราภา แสนเสนา และนพดล กิตติวราฤทธิ์. 2536. ฤทธิ์ต้านเชื้อและฤทธิ์ต้านการก่อกลายพันธุ์ของสกัดจากผิวผลพืชตระกูลส้ม. หน้า 1-5. คณะเภสัชศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล.

ธีรยุทธิ์ กลิ่นสุคนธ์ และชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว. 2524. แอฟลาทอกซินสารพิษจากเชื้อราที่ทำให้เกิดมะเร็งในตับ. ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

นงนุช วณิตย์ธนาคม. 2540. วิทยาเชื้อราการแพทย์. คณะแพทย์ศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ปริศนา สิริอาชา. 2534. แอฟลาทอกซินในข้าวโพด. เอกสารสัมมนาเรื่องวิธีตรวจสอบแอฟลาทอกซิน. 2 เมษายน 2534. กรมวิชาการเกษตร กระทรงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ.

ปริศนา เหมสุจิ. 2524. สารพิษจากเชื้อราในเมล็ดพืชอาหาร. การสัมมนาเรื่องวิทยาการหลังเก็บเกี่ยวของข้าว พืชไร่และพืชสวน ณ สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ บางเขน กรุงเทพฯ 19-20 พฤศจิกายน 2524. หน้า 80-93.

ปิยะ เฉลิมกลิ่น. 2541. รั้วกินได้. หน้า 18-20. โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช. กรุงเทพฯ.

พรรณกร อิ่มวิทยา. 2540. เชื้อราก่อโรคในคน. กรุงเทพฯ: สารมวลชนจำกัด.

มณีฉัตร นิกรพันธุ์. 2541. พริก. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

มนตรี แสนสุข. 2543. การปลูกส้มจุก. นิตยสารโลกเกษตร & อุตสาหกรรม 14:11-16.

รณภพ บรรเจิดเชิดชู. 2530. เชื้อราในโรงเก็บ สารแอฟลาทอกซิน และการควบคุมด้วยสารเคมีบนเมล็ดข้าวโพด. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลักษณ์กนก สินธุ์ประสพชัย พนม ไสยจิตร์ และละณี สุขถิ่นไทย. 2006. ความสัมพันธ์ของปริมาณแอฟลาทอกซินในอาหารโคต่อค่าที่ตรวจพบในน้ำนม. Thai-NIAH eJournal (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://www.dld.go.th/niah V1 N2. (16 สิงหาคม 2550).

วรนันท์ ศุภพิพัฒน์. 2538. อาหาร โภชนาการและสารพิษ. แสงการพิมพ์. กรุงเทพฯ.

วิริยา คณารักษ์. 2546. คุณภาพของน้ำมันหอมระเหยที่เพาะปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชเวท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. โอเอสพริ้นติ้งเฮ้าส์. กรุงเทพฯ.

วิไลวรรณ ธนโรจน์ประดิษฐ์. 2533. วิธีการยับยั้งการเกิดแอฟลาทอกซินในข้าวโพด. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ. 123: 6-8.

วันดี กฤษณพันธ์. 2539. สมุนไพรสารพัดประโยชน์. หน้า 139-140. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ.

วันวิสาข์ ศรีนวลไชย. 2547. การเตรียมและวิเคราะห์คุณภาพของน้ำมันจากผิวส้ม. ปัญหาพิเศษสาขาวิชาวิทยาศาสตรเภสัชกรรม. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ศรีรัตน์ กสิวงศ์. 2534. น้ำมันและน้ำมันหอมระเหยจากพืช. หน้า 17-21. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิริวรรณ ศรีสัจจะเลิศวาจา. 2539. สารต้านเชื้อราจากเปลือกส้มโอ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุกัญญา กองเงิน. 2540. แอฟลาทอกซินในถั่วลิสง. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

สุกัญญา จัตตุพรพงษ์. 2530. วัตถุดิบอาหารสัตว์ การใช้และการตรวจสอบคุณภาพ. ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ. นครปฐม.

สุดารัตน์ บุญจันทร์ และ อุษณีย์ เพชรสุรีย์. 2537. การศึกษาการปนเปื้อนของราและความสามารถในการสร้างอะฟลาทอกซินโดย *Aspergillus flavus* ที่แยกได้จากเครื่องเทศและสมุนไพร. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยบูรพา.

สุพรรณ ปัญญาฟู. 2540. อิทธิพลของความชื้นสัมพัทธ์ อุณหภูมิและการใช้สารเคมีควบคุมเชื้อราระหว่างการเก็บรักษาที่มีผลต่อคุณภาพเมล็ดพันธุ์ข้าวญี่ปุ่น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม และอาทิตย์ รังสีสันติวานนท์. 2546. การสกัดสารด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด. ว. ศูนย์บริการวิชาการ 11: 37-42.

สุมณฑา วัฒนสินธิ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุมลรัตน์ จันทะผล. 2549. ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดจากพืชสกุลส้ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุมาลัย ศรีกำไลทอง และ สุภัทรา มั่นสกุล. 2525. การศึกษาปริมาณแอฟลาทอกซินในน้ำมันพืชธรรมชาติและการกำจัดสารพิษ. สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ.

สิริวิภา สัจจพงษ์. 2541. ผลของน้ำมันหอมระเหยจากพืชในการป้องกันกำจัดโรคของพืชผัก. ว. เคหการเกษตร 22: 164 -166

อนงค์ บิณฑวิหค. 2543. ผลของสารพิษจากเชื้อราที่มีต่อคุณภาพอาหารสัตว์และอะฟลาท็อกซิน: การเกิดมะเร็งตับ. หน้า 149-157. กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์.

สุรัตน์วดี จิวะจินดา. 2545. น้ำมันหอมระเหย. ว. เกษตรธรรมชาติ. 10: 7-9.

อัจฉรา พัฒนเดช. 2543. เชื้อรา *Aspergillus* ที่สร้างแอฟลาทอกซินในพืชสมุนไพรตากแห้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อนงค์ บิณฑวิหค. 2546. สารพิษจากเชื้อรา: แอฟลาทอกซิน. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

อนุเทพ ภาสุระ. 2541. การศึกษาเชื้อราปนเปื้อนสายพันธุ์ที่สร้างสารแอฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลตากแห้ง และการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่ปนเปื้อนโดยใช้สารกันเสียบางชนิด. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 6: 11-21.

อัมรา ชินภูติ และประวัติ ตันบุญเอก. 2543. การวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารพิษแอฟลาทอกซินในผลิตผลทางการเกษตรโดยวิธี ELISA และวิธีการลดปริมาณสารพิษ. การประชุมวิชาการกองโรคพืชและจุลชีววิทยา. 8-10 มีนาคม 2543. โรงแรมลองบีช เพชรบุรี.

อรุณศรี วงศ์อุไร. 2542. อันตรายจากเชื้อราในถั่งลิสง. ข่าวสารโรคพืชและจุลชีววิทยา. 9: 5-7.

Agnihotri, K. V., Thappa, K. R., Meena, B., Kapahi, K. B., Saxena, K. R., Qazi, N. G., and Agarwal, G. S. 2004. Essential oil composition of aerial part of *Angelica glauca* growing wild in North-West Himalaya (India). J. Phytochemistry. 65: 2400-2413.

Aja Nwachukwu, J. and Emejuaiwe, S. O. 1994. Aflatoxin producing fungi associated with Nigerian maize. Environ. Toxicol. Water Qual. 9: 17-23.

Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. And Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. 4th ed. Jonh Wiley & Sons Inc. New York.

Al-Yahya, S. 1999. Change of fungal infection during wheat storage at different condition. J. Agric. Sci. 7: 531-545.

Awuah, P. K. C. and Kpodo, G. 1996. Biosynthesis of aflatoxin. Chem. Ind. 2: 55.

Aziz, N.H., Youssef, Y.A., El-Fouly, M.Z. and Moussa, L.A. 1998. Contamination of some common medicinal plant samples and spices by fungi and their mycotoxin. Bot. Bull. Acad. Sinica. 39: 279-285.

Betina, V. 1984. Mycotoxin production isolation separation and purification. Elsevier Science Publishers. Amsterdam. Netherlands.

Blanco, T. C., Stashenko, E. E., Combariza, M. Y., Matinez, J. R. 1995. Comparative study of Columbia citrus oils by high-resolution gas chromatography and gaschromatograph mass spectrometry. J. Chromatogr. 697: 501-513.

Brehm-Stecher, F. B. and Johnson, E. A. 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol bisabolol and apritone. Antimicrob. Agents. Chemother. 66: 3357-3360.

Bullerman. L. B. 2000. Mycotoxins: Classification. In Encyclopedia of food Microbiology. p. 1512-1520. bath: Academic Press.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. Int. J. Food Microbiol. 94: 223-253.

Caccioni, D. R. L., Guizzardi, M., Biondi, D. M., Renda, A. and Ruberto, G. 1998. Relationship between volatile component of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. Int. J. Food Microbiol. 43: 27–36.

Carson, C. F and Riley, T. V. 1998. Antimicrobial activity of the major component of the essential oils of *Melaleuca alterniforlia*. J. Appl. Bacteriol. 78: 264-269.

Ceigler, A. 1966. Microbial Detoxification of aflatoxin. Appl. Microbiol. 14: 934-939.

Chaisawadi, S., Thongbut, D., Kulamai, S., Methawiriyasilp, W. and Juntawong, P. 2005. Clean Production of freeze dried kaffir lime powder. 31st congress on Science and Technology, Nakhonratchasima, Thailand. 18-20 October 2005.

Charlie, M. L. and Watkinson, S. 1994. The fungi. Academic Press. London.

Cole, R. J. and Cox, R. H. 1981. Hanbook of toxic Fungal metabolites. Academic Press. New York.

Coppock, R. W. and Christian, R. G., 2007. Aflatoxins edited by Gupta, R. C. Veterinary Toxicology. Elsevier Inc.

Cox, D. S., Mann, M. C., Markham, L. J., Bell, C. H., Gustafson, E. J., Warmington, R. J. and Wyllie, G. S. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). J. Appl. Microbiol. 88: 170-175.

Criseo, G. 2001. Differentiation of aflatoxin producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* Group. Lett. Appl. Microbiol. 33: 291-295.

Dambolena, J. S., Lopez, A. G., Canepa, M. C., Theumer, M. G., Zygadlo, J. A. and Rubintien, H. R. 2008. Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B_1 biosynthesis. Toxicol. 51: 37-44.

Del-Rio, A. J., Fuster, D. M., Gomez, P., Porras, I., Lidon, G. A. and Ortuno, A. 2004. *Citrus limon* a source of flavonoids of pharmaceutical interest. Food Chem. 84: 457-461.

Dikbas, N., Kotan, R., Dadasoglu, F. and Sahin, F. 2008. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*, Int. J. Food Microbiol. 124: 179-182.

Dongyan, H., Wethua, Z. and Ruthua, H. 1998. Separation and determination of chemical constituents in the volatile oil of traditional Chinese crude drugs. J. Pharma. Biomed. Anal. 17: 1423-1426.

Dugo G., Verzera A., Stagno, S. I., Controneo A., Ficarra, R., 1993. On the genuineness of citrus essential oil. Part XLI. Italian bitter orange essential oil: composition and detection of contamination and addition oil of terpenes of sweet orange and lemon. Flavour. Frag. J. 8: 25-33.

Dutton, M. F. and Westlake, K. 1989. Occurrence of mycotoxins in cereals and animal feedstuffs in natal, South Africa. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68: 839-842.

Efunyoye, M. O. 1999. Growth and cellulolytic activity of certain aspergilli isolate from ancient wood. Afr. J. Mycol. Biotechnol. 7: 47-55.

Elamin, N. H., Abdel-Rahim, A. M. and Khalid, A. E. 1988. Aflatoxin contamination of groundnuts in Sudan. Mycopathologia. 104: 25-31.

El-Nezami, H. 2000. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B_1 from the chicken duodenum. J. Food Prot. 63: 549-552.

Fan, J. J. and Chen, J. H. 1999. Inhibition of aflatoxin producing fungi by welsh onion extract. J. Food Prot. 62: 414-417.

Fisher, K. and Phillips, C. 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer. Trends Food Sci. Technol. 19: 156-164.

Fungi. 2007. Available: http://www.catage.org.lb/en/themes/Sciences/LifeScience/General Biology /Microbiolgy/Fungi/Classification.html (22 April 2550).

Gangrad, S. K. 1991. In vitro antifungal effect of essential oils. Indian Perfumer. 35: 46-48.

Garaleni, F. 2001. Effect of trans-2-heaxenal on the growth of *Aspergillus flavus* in relation to its concentration, temperature and water activity. Lett. Appl. Microbiol. 33: 50-55.

Gaur, V. K. and Siradhana, B. S. 1989. Comparison of aflatoxin B_1 formation by *Aspergillus flavus* on bread and uncooked grains of maize. Indian Phytopatho. 42: 589-590.

Gill, A. O., Delaquis, P., Russo, P. and Holley, R. A. 2002. Evaluation of antilisterial action of Cilantro oil on vacuum packed ham. Int. J. Food Microbiol. 73: 83-92.

Glinsukon, T. 1983. Occerence of mycotoxin In Mycotoxin : Proceeding of the Regional Workshop on mycotoxin. Government of Thailand in cooperatiom with UNESCO. Mahidol University. Bangkok Thailand. March 23-26. p. 32-51.

Gonzalez, N. C., Sanchez, F., Quintero, A. and Usubillaga, A. 2002. Chemotaxonomic value of essential oil compounds in citrus species. International conference on medicinal and aromatic plants. Possibilities and limitations of medicinal aromatic plants production in the 21st century, Hungary, 30 April.

Goto. 1996. Aflatoxin and cytopiazonic production by a sclerobium-producing *Aspergillus tamarii* strain. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4036-4038.

Gourama, H. and Bellerman, L. B. 1995. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. J. Food Prot. 58: 1249-1256.

Gowda, N. K. S., Malathi, V. and Suganthi, U. R. 2004. Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus parasiticus* and aflatoxin production. Anim. Feed Sci. Technol. 116:281-291.

Guo, B. Z., Russin, J. S.,Cleveland, T. E., Brown, R. L. and Widstrom, N. W. 1995. Wax and cutin layer in maize kernels associated with resistance to aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. J. Food Protect. 58: 296-300.

Heathcote, J. G. 1984. Aflatoxin and related toxins. Mycotoxin production, isolation, separation and purification. Elsevier Science Publishers B.V. Netherlands.

Horn, B. W. and Wicklow, D. T. 1983. Factors Influencing the inhibition of aflatoxin production in corn by *Aspergillus niger*. Can. J. Microbiol. 29: 1087-1091.

Ismail, Y. S. 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and in activation by physical methods. Food Chem. 59: 57-67.

Jackson, P. E. and Groopman, J. D. 1999. Aflatoxin and liver cancer. Bailleres Best. Pract. Res. Clin Gastroenterol. 13: 545-555.

Jayaraman, P. and Kalyanasundaram, I. 1990. Natural aflatoxin B_1 in contaminated rice. J. Cereal Sci. 8: 269-274.

Kamkuan, W., Suteerapataranon, S. And Tovaranonte. 2005. Limonene in volatile oil extracted from some citrus peels. 31 st congress on science and technology of Thailand at Suranaree University of Technology. 18-20 October.

Krishnamurthy, Y. L. and Shashikala, J. 2006. Inhibition of aflatoxin B_1 production of *Aspergillus flavus* isolation from soybean seeds by certain natural plant products. Lett. Appl. Microbiol. 43: 469-474.

Kurtzman, C. P. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species relate to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tarmarii*. Antonie van Leeuw. 53: 147-158.

Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, F., Belletti, N., Guerzoni, E. M. and Gardini, F. 2004. Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally process edfruits. Trends Food Sci. Technol. 15: 201-208.

Lee, L. S. and Shau, D. B. 1981. Thin layer Chromatographic Analysis of Mycotoxin : A Review of Recent Literrature. J. Liq. Chromatogr. 4: 43-62.

Lota, M. L., Serra, D. D., Tomi, F., Casanova, J. 2000. Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. J. Biochem. Syst. Ecol. 28: 61-78.

L'Vova, L. S., Orlova, N. Y., Bystryakova, Z. K. Omel'chenko, M. D. and Remele, V. V. 1993. occurrence of toxigenic fungi and mycotoxin in various crop grains. Appl. Biochem. Microbiol. 29: 53-60.

Mabrouk, S. S. and El-Shayeb, N. M. A. 1980. Effect of Some Salt on aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Chem. Microbiol. Technol. Lebensm. 6: 183-185.

Mahmoud, A. L. E. 1994. Inhibition of growth and aflatoxin biosynthesis of *Aspergillus flavus* by extract of some Egyptain plants. Lett. Appl. Microbiol. 29: 334-336.

Manosroi, A., Abe, M. and Manosroi, J. 1999. Hair care : Fruitful pursuits an investigation into the effects of porcupine orange (*Citrus hystrix* DC.) extract in hair treatment. SPC .16: 13-17.

Matan, N. and Matan, N. 2007. Antifungal activity of anise oil, lime oil and tangerine oil against mold on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). Int. Biodeterior. Biodegrad. 62: 75-78.

Mishra, N. K. and Daradhiyar, S. K. 1991. Mold flora and aflatoxin contamination of stored and cooked samples of pearl millet in the Baharia tribal belt of Santhal Pargana Bihar India. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1223-1226.

Menon, V. K. and Garg, R. S. 2001. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. Food Microbiol. 18: 647-650.

Mondello, L., Casilli, A., Tranchida, P. Q., Cicero, L., Dugo, P. And Dogo, G. 2003. Comparison of fast and conventional GC analysis for citrus essential oils. J. Agric. Food Chem. 51: 5620-5606.

Montes-Belmont, R. and Carvajal, M. 1998. Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their component. J. Food Prot. 61: 616-619.

Moreira, R. M., Ponce, G. A., Del Valle, E. C. and Roura, I. S. 2005. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a fodborne pathogen. LWT Food Sci. Technol. 38: 565-570.

Moss, M. O. 1996. Mycotoxin. Mycol. Res. 100: 513-523.

Moubasher, A. H., Abdelhafex, S. I. I., Elhissy, F. T. and Hassan, S. M. K. 1980. Effect of temperature and moisture content on Egyptian peanut seed-borne fungi. Mycopathologia. 70: 49-54.

Nijs, M. D. and Notermans, S. H. W. 2000. Mycotoxin: Occurrence. In R.K. Robinson, C.A. Batt, P. D. (eds). Encyclopedia of Food Microbiology. p. 1520-1526. Bath: Academic Press.

Oussalah, M., Caillet, S. and Lacroix, M. 2006. Mechanism of action of Spainish oregano, Chinese cinnamon and Savory oil against cell membrane and wall of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 69: 1046-1055.

Paskar, K. L. 1993. Effect of spice essential oils on growth and aflatoxin B_1 production by *Aspergillus flavus*. Lett. Appl. Microbiol. 17: 49-51.

Paster, N. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants againt fungi attacking stored grain. J. Food Prot. 58: 81-85.

Pawar, V. C. and Thaker, V. S. 2006. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillua niger*. Mycoses. 49: 316-323.

Peterson, A. W. 2001. *Aspergillus bombycis* a new aflatoxigenic species and genetic vareation in its sibling species, *A. Nomius*. Mycologia. 93: 689-703.

Pinto, V. E. F., Vaamonde, G. Brizzio, S. B. and Apro, N. 1991. Aflatoxin production in soybean varieties grown in Argentina. J. Food Prot. 54: 542-545.

Pitt, J. I. 1989. Field Studied on *Aspergillus flavus* and aflatoxin in Australian groundnut. In Aflatoxin Contamination of Groundnuts. p. 223-236. ICRISAT. Patancheru. India.

Pitt, J. L. and Hocking, A.D. 1999. Fungi and Food spoilage. New York & Hall.

Pittel, A. 1998. Natural occurrence of mycotoxin in food and feeds an updated review. Rev. Med. Veter. 149: 479-492.

Pomeranz, Y. Meloan, C.E. 1994. Food analysis: Theory and Practice. 3rd ed. New York Chapman and Hall.

Ramakrisna, N. 1996. *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin B_1 formayion in barley grain during interaction with other fungi. Mycopathologia. 136: 53-63.

Rapper, K. B. and Fennell, D. J. 1997. The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wikins Company.

Rasooli, I., Bagher Rezaei, B. And Allameh, A. 2006. Growth of inhibition and morphology alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus Erioalyx* and *Thymus x-porlock.* Food Control. 17: 359-364.

Rasooli, I. and Razzaghi-Abyaneh, M. 2004. Inhibitory effect of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Food Control. 15: 479-483.

Rasooli, I. and Owlia, P. 2005. Chemopreventation by thyme oil of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. Phytochemistry. 66: 2851-2856.

Rippon, J. W. 1982. Medical mycology. p. 569-594. Philadelphia: W.B. Saunder Com.

Roberto, G. and Biondi, D. 1993. Profiles of essential oils of new *Citrus* hybride. Flavour. Frag J. 8: 179-184.

Rockland, L. B. 1960. Saturated salt Solutiion for Solutions for Static Control of Relative Humudity between 5 and 40 °C. Anal. Chem. 32: 1375.

Roy, P. S. 1996. Biology of Citrus. Cambridge University Press. England.

Saikia, D., Khanuja, S. P. S., Kahol, A. P., Gupta, S. C., Kumar, S. 2001. Comparative antifungal activity of essential oils and constituents from three distinct genotype of *Cymbopogen* spp. Curr Sci. 1264-1266.

Saner, D. B. and Burroughs, R. 1980. Fungal growth aflatoxin production and moisture equilibration in mixture of wet and dry corn. Phytopathology. 70: 506-512.

Selli, S., Cabaroglu, T. and Canbas, A. 2004. Volatile flavour components of orange juice obtained from the cv. Kozan of Turkey. J. Food Compos. Anal. 17: 789–796.

Selvaraj, Y., Venkateshwarlu, G., Shivashankara, S. K. and Roy, K. T. 2004. Ethylene and acetylene induced degreening on the composition of kagzi lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) peel oil. J. Essent. Oil Res. 16: 523–525.

Sharma, N. and Tripathi, A. 2008. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. Microbiol. Res. 163: 337-344.

Shin, S. 2003. Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with Ketoconazole or Amphotericin B. Arch. Pharm. Res. 26: 389-393.

Singh, A., Singh, K. R., Bhunia, K. A. and Singh, N. 2003. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. Lebensm. Wiss. U. Technol. 36: 787-794.

Sinha, K. K. 1993. The effect of clove and cinnamon oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. Lett. Appl. Microbiol. 16: 114-117.

Smiley, R. D. and Draughon, F. A. 2000. Prelimenary evidence that degradation of aflatoxin B_1 by *Flavobacterium aurantiacum* is enzymatic. J. Food Prot. 63: 315-318.

Smitasiri, Y. 1983. Effect of aflatoxin B_1 on plasma lipoprotein and enthocyte morphology in albino rats. Ph.D. Disseration. Chaing Mai University.

Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L. 2001. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. Food Microbiol. 18: 463-470.

Soliman, K. M. and Badeaa, R. I. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food Chem. Toxicol. 40: 1669-1675.

Sotheeswaran, S. and Doyle, M. 1998. Medicinal plants in the South Pacific. p. 47-49. WHO Regional Publication Western Pacific Philippin.

Stange, R. R., Midland, S. L., Sims, J. J. and Mccollum, T. G. 2002. Differential effects of citrus peel extracts on growth of *Penicillium digitatum, P. itaicum* and *P. expansum*. Physiol. Mol. Plant Path. 61: 303-311.

Statti, A. G., Conforti, F., Sacchetti, G., Muzzoll, M., Agrimonti, C. and Menichini, F. 2004. Chemical and biological diversity of bergamot (*Citrus bergamia*) in relation to environmental factors. Fitoterapia. 75: 212–216.

Souza, E. L. D., Stamford, T. L. M., Lima, E. D. O., Trajano, V. N. And Filho, J. M. B. 2005. Antimicrobial effectiveness of spice: an approach for use in food conservation system. Braz. Arch. Biol Technol. 48: 549-558.

Suttajit, M. and Pichitpaja, N. 1983. Effect of aflatoxin B_1 on erythropoiesis In Mycotoxin: Proceeding of the Region Workshop on mycotoxin. Government of Thailand in cooperation with UNESCO. Mahidol University. Bangkok. March 23-26. p. 303-310.

Suzuki, I. J. Dainuis, B. and Kilbuck, J. H. 1973. A modified method of aflatoxin determination in spice. J. Food Sci. 38: 949-950.

Tanaboripat, D. 1992. Effect of Sodium Chloride, Propionic Acid and Ammonium Hydroxide on growth of *Aspergillus flavus* on corn and aflatoxin production. Asean Food J. 7: 24-29.

Tassaneyakul, W., Razzazi-Fazeli, E. and Porasuphatana, S. 2004. Contamination of aflatoxins in herbal medicinal product in Thailand. Mycophathologia. 158: 239-244.

Tisserand, R. and Balacs, T. 1995. Essential oil safety a guide for health care professionals. Churchill Livingstone England.

Tiwar, R. 1983. Inhibition of growth and aflatoxin B_1 production of *Aspergillus parasiticus* by spice oils. J. Food Sci. Technol. 20: 131-132.

Torres, J. 1980. Morphological Changes in strains of *Aspergillus flavus* Link Ex Fries and *Aspergillus parasiticus* Spears Related with aflatoxin production. Mycopathologia. 72: 171-174.

Vekiari, S. A., Protopapadakis, E. E. and Argyriadou, N. G. 2004. Composition of the leaf and peel oils of *Citrus medical* L. “Diamante” from Crete. J. Essent. Oil Res. 16: 528–531.

Vekiari, S. A., Protopapadakis, E. E., Papadopoulou, P., Papanicolaou, D., Panou, C. and Vamvakias, M. 2002. Composition and seasonal variation of essential oil from leaf and peel of Cretan Lemon Variety. J. Agri. Food. Chem. 50: 147-153.

Ventura, M., Gomez, A., Anaya, I., Diaz, J., Broto. F., Agut, M. and Comellas, L. 2004. Determination of aflatoxins B_1, G_1, B_2 and G_2 in medicinal herbs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. 1048: 25-29.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J. and Perez-Alvarez, J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradise* L.) and orange (*Citrus senisis* L.) essential oils. Food Control. 19: 1130-1138.

WHO. 1979. Environmental Health Criteria: Mycotoxin. World health organization. Genevar.

Yadav, A. R., Chauhan, A. S., Rekha, M. N., Rao, L. J. M. and Ramteke, R. S. 2004. Flavour quality of dehydrated lime (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle). Food Chem. 85: 59–62.

Yamasaki, Y., Kunoh, H., Yamamoto, H. and Akimitsu, K. 2007. Biological role of monoterpene volatiles derived from rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush) in citrus defense. J. Gen. Plant. Pathol. 73:168-179.

Yine, M. C. and cheng, W.S. 1998. Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by some herbs and spices. J. Food Prot. 61: 123-125.

Zhen-Zhen, J. I. A. 1989. A review of the study on fungi and mycotoxin in foodstuffs in Beijing during the last 10 years. p. 135-143. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

1. การทดสอบหายาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่มฟอสเฟตและคาร์บาเมทในผิวส้มโดยใช้ GT-pesticide residual test kit

อุปกรณ์ชุดทดสอบ ประกอบด้วย

ก. อุปกรณ์ในชุดทดสอบ

- น้ำยาสกัด1 (ไดคลอโรมีเทน) 1 ขวด
- น้ำยาสกัด 2 (5 เปอร์เซ็นต์ เอทธานอล) 1 ขวด
- จีที 1 (เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอร์เรส) 1 ขวด
- จีที 2 (สารสื่อประสาท อะซิติลคลอรีน) 1 ขวด
- จีที 2.1 (ตัวทำละลาย) 1 ขวด
- จีที 3 (ไฮดรอกซีราไมด์ ตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา) 1 ขวด
- จีที 3.1 (ตัวทำละลาย) 1 ขวด
- จีที 4 (กรดไฮดรอคลอริก)1 ขวด
- จีที 5 (เฟอร์ริกคลอไรด์)1 ขวด

ข. อุปกรณ์อื่นที่จำเป็น

- ถาดน้ำอุ่น 1 ชุด
- เทอร์โมมิเตอร์ 1 อัน
- อุปกรณ์ระเหยตัวอย่าง 1 ชุด
- หลอดหยดพลาสติก 12 อัน
- หลอดหยดแก้ว 5 อัน
- หลอดทดลอง 20 อัน
- ขวดพลาสติก ขนาด 60 ซีซี. 5 ใบ
- ที่ตั้งหลอด 1 อัน
- คู่มือชุดทดสอบ 1 แผ่น

วิธีการทดสอบ

1. หั่นตัวอย่างให้ละเอียด
2. ตักตัวอย่างอาหาร ประมาณ 5 กรัม ใส่ในขวด (สูง 2 ขีด ของขวดพลาสติก)

3. เติมน้ำยาสกัด 1 จำนวน 5 ซีซี หรือพอท่วมตัวอย่าง ปิดฝาให้แน่น เขย่าแรงๆ วางทิ้งไว้ 10-15 นาที

4. ดูดน้ำยาสกัดจากข้อ 3 จำนวน 1 ซีซี ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำยาสกัด 2 จำนวน 1 ซีซี

5. นำไประเหยในถาดน้ำอุ่น จนน้ำยาสกัด 1 (ชั้นล่าง) ระเหยหมด

6. นำหลอดทดลองใหม่ 3 หลอด (อย่าลืมเขียนเบอร์ที่หลอด) มาเติมน้ำยาดังนี้ หลอดที่ 1 เติมน้ำยาสกัด 2 จำนวน 1 ขีด, หลอดที่ 2 เติมน้ำยาสกัด 2 จำนวน 1 ขีด
หลอดที่ 3 เติมน้ำยาสกัดตัวอย่างจากข้อ 5 จำนวน 1 ขีด

7. เติมน้ำยาจีที 1 จำนวน 2 ขีด ลงทุกหลอด ทิ้งไว้ 5-10 นาที

8. ขณะรอเวลาในข้อ 7 ให้เทจีที 2.1 ลงในจีที 2 เป็นน้ำยาผสมจีที 2 และเทจีที 3.1 ลงในจีที 3 เป็นน้ำยาผสมจีที 3

9. เติมน้ำยาผสมจีที 2 (จากข้อ 8) จำนวน 1.5 ขีด ลงในหลอดที่ 1 ส่วนหลอดที่ 2 และ 3 เติม 1 ขีด ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

10. เติมน้ำยาผสมจีที 3 (จากข้อ 8) จำนวน 4 ขีด ทุกหลอด

11. เติมจีที 4 จำนวน 2 ขีด ลงในทุกหลอด เขย่าให้เข้ากัน

12. เติมจีที 5 จำนวน 2 ขีด ลงในทุกหลอด เขย่าให้เข้ากัน สังเกตสีของทั้ง 3 หลอด แล้วอ่านผลนำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำ ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ส้มโอและส้มเช้งปอกเอาเฉพาะส่วนผิวเปลือก ส่วนส้มโชกุนปอกเอาส่วนเปลือกแล้วนำไปสกัดตามวิธีการข้อ 1.2.1-1.2.2 การทดสอบหายาฆ่าแมลงกลุ่มฟอสเฟตและคาร์บาเมตในผิวเปลือกพืชตระกูลส้มโดยใช้ GT-pesticide residual test kit (กองอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2549) มีวิธีการดังนี้ หั่นตัวอย่างเปลือกส้มให้ละเอียด ตักตัวอย่างเปลือกส้ม ประมาณ 5 กรัม ใส่ในขวดพลาสติก (สูง 2 ขีด ของขวดพลาสติก) เติมน้ำยาสกัด 1 จำนวน 5 ซีซี ปิดฝาให้แน่น เขย่าแรง ๆ วางทิ้งไว้ 10-15 นาที จากนั้นดูดน้ำยาสกัดเปลือกส้ม จำนวน 1 ซีซี ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำยาสกัด 2 จำนวน 1 ซีซี แล้วนำไประเหยในน้ำอุ่น จนน้ำยาสกัด 1 (ชั้นล่าง) ระเหยหมด นำหลอดทดลองใหม่ 3 หลอด มาเติมน้ำยาดังนี้

หลอดที่ 1 เติมน้ำยาสกัด 2
หลอดที่ 2 เติมน้ำยาสกัด 2
หลอดที่ 3 เติมน้ำยาสกัดตัวอย่างเปลือกส้ม

เติมน้ำยาจีที 1 จำนวน 2 ขีด ลงทุกหลอด ทิ้งไว้ 5-10 นาที จึงเติมน้ำยาผสมจีที 2 จำนวน 1.5 ขีด ลงในหลอดที่ 1 ส่วนหลอดที่ 2 และ 3 เติม 1 ขีด ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วเติมน้ำยาผสมจีที 3 จำนวน 4 ขีด ทุกหลอด จากนั้นเติมจีที 4 จำนวน 2 ขีด ลงในทุกหลอด เขย่าให้เข้ากัน และเติมจีที 5 จำนวน 2 ขีด ลงในทุกหลอด เขย่าให้เข้ากัน สังเกตสีของทั้ง 3 หลอด แล้วอ่านผลจากตาราง

Table 8. Results interpretation of pesticide test by GT-test kit.

สีสารละลายในหลอด	เกณฑ์การตัดสิน
1. หลอด 3 สีอ่อนกว่าหรือเท่ากับหลอดที่2	1. ไม่พบยาฆ่าแมลง
2. หลอด 3 สีอ่อนกว่าหลอด 1 แต่เข้มกว่าหลอดที่ 2	2. พบยาฆ่าแมลงอยู่ในเกณฑ์ปลอดภัย
3. หลอด 3 เท่ากับหรือเข้มกว่าหลอด 1	3. พบยาฆ่าแมลงในปริมาณมากเกินค่าความปลอดภัย

2. ขั้นตอนการเตรียมเซลล์ในการถ่ายภาพ TEM

2.1 การตรึงเซลล์ขั้นต้น (primary fixative) ด้วย 2.5 เปอร์เซ็นต์ กลูตารอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.2 ล้างเซลล์ใน 0.1 โมล phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2.3 การตรึงเซลล์ขั้นที่สอง (post fixative) ด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ ออสเมียมเตตรอกไซด์ (OsO_4) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

2.4 ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2.5 ย้อมสีขั้นต้นใน 2 เปอร์เซ็นต์ ยูรานิลอะซิเตต (uranyl acetate) เป็นเวลา 20 นาที

2.6 การดึงน้ำออก (dehydration) ทำเป็นขั้นตอนดังนี้

30 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

50 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

70 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

80 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

100 เปอร์เซ็นต์ เอธานอล 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

2.7 การแทรกซึม (infiltration) เป็นการนำสารตัวกลางเข้าสู่เซลล์ โดยใช้

โพรพอลีนออกไซด์ 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที

โพรพอลีนออกไซด์ : เอธานอล (1:1) เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

อีพอกซีเรซินบริสุทธิ์ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง

2.8 การใส่ตัวอย่าง (embedding) ลงในเบ้าหลอมแล้วหยดอีพอกซีเรซินบริสุทธิ์ ลงในแคปซูล ประมาณหนึ่งในสี่ แล้วไล่ฟองอากาศออก

2.9 ทำให้ตัวอย่างแข็งจับตัวกัน (polymerization) โดยนำตัวอย่างใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ค้างคืน

2.10 การตัดตัวอย่างโดยใช้อุลตราไมโครโทม (ultramicrotome ; ยี่ห้อ Drukker International ประเทศเนเธอร์แลนด์) ตัดแต่งตัวอย่างบนกริดทองแดงให้เป็นรูปพีระมิดขนาดประมาณ 0.5-1.0 ไมครอน หลังจากนั้นย้อมด้วยสีโทลูดีนบลู

2.11 การย้อมสีโดยแช่เซลล์ใน 5 เปอร์เซ็นต์ ยูรานิลอะซิเตตที่จำเพาะกับกรดนิวคลีอิกและลีดซิเตรดที่จำเพาะกับองค์ประกอบของเซลล์

2.12 ดูตัวอย่างโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบทรานสมิชชัน (TEM รุ่น JEM 2010, JEOL ประเทศญี่ปุ่น) ที่ 160 กิโลโวล (Ngapo *et al*., 1996)

3. วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 Potato Dextrose Agar มีส่วนประกอบคือ

Potato infusion	200	กรัมต่อลิตร
Dextrose	20	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร 39.0 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2 Potato Dextrose Broth มีส่วนประกอบคือ

Potato infusion	200	กรัมต่อลิตร
Dextrose	20	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร 24.0 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.3 YES medium broth มีส่วนประกอบคือ

Yeast extract	2.0	กรัม
Sucrose	15	กรัม
Distill water	100	มิลลิลิตร
pH	6.1-6.5	

วิธีการเตรียม

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปรับพีเอชให้ได้ 6.1-6.5

4. การคำนวณหาจำนวนเซลล์จุลินทรีย์เริ่มต้น

Aspergillus flavus TISTR 3041, *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276, *Aspergillus fumigatus* 3018, *Aspergillus niger* 6275 และ *Penicillium* sp. นับสปอร์ด้วย hemacytometer

ได้สปอร์เฉลี่ยต่อช่อง $\frac{117}{25} = 4.68$ เซลล์ต่อช่อง

ปริมาตรของช่องใหญ่ของ hemacytometer $= 0.2 \times 0.2 \times 0.2$ (มิลลิเมตร)^3

$= 4 \times 10^{-3}$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร

คิดเป็น 4×10^{-3} ลูกบาศก์มิลลิเมตร $\times \frac{1}{10^3}$ ลูกบาศก์เซนติเมตร $= 4 \times 10^{-6}$ ลูกบาศก์เซนติเมตร

$= 4 \times 10^{-6}$ มิลลิลิตร

ปริมาตร 4×10^{-6} มิลลิลิตร มีสปอร์ 27.04 เซลล์

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีสปอร์ $\frac{4.68}{4 \times 10^{-6}} = 1.17 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ค่าที่ได้ $\times$ dilution factor $= 1.17 \times 10^6 \times 10$

ปริมาณสปอร์เริ่มต้น $= 1.17 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

5. การตรวจหาปริมาณแอฟลาทอกซินด้วยชุดทดสอบ DOA-ELISA aflatoxin test kit

5.1 ชุดทดสอบ DOA-ELISA aflatoxin test kit ประกอบด้วย

5.1.1 Micro ELISA plate ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อสารแอฟลาทอกซินบี 1

5.1.2 AFB1-HPR Conjugate

5.1.3 Substrate A และ B

5.1.4 Conjugate buffer

5.1.5 Washing buffer (0.01M PBS+0.05% tweeb 80)

5.1.6 Stopping solution

5.2 สิ่งที่ต้องเตรียม

5.2.1 70% Methanol

5.2.2 เครื่องบด

5.2.3 เครื่องชั่ง

5.2.4 เครื่องเขย่า

5.2.5 เครื่องแก้วสำหรับกรอง

5.2.6 กระดาษกรองเบอร์ 4

5.2.7 ไมโครปิเปต

5.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้วิเคราะห์

5.3.1 การเตรียม washig buffer โดยนำ Washing buffer ในขวดมาเจือจางเป็น 0.01 M PBS-T โดยเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร สำหรับนำไปเจือจางสารสกัดตัวอย่าง และล้าง Micro ELISA plate เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

5.3.2 เตรียม Substrate solution ผสม Substrate A และ B ในอัตราส่วน 1:1

5.3.3 สารพิษมาตรฐาน

5.3.4 การเตรียมเอนไซม์คอนจูเกต โดยเติมคอนจูเกต บัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตรลงในหลอดเอนไซม์คอนจูเกต

5.4 การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์

5.4.1 ชั่งตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ปริมาณ 20 กรัม บดให้ละเอียดด้วยเครื่องบด ส่วนตัวอย่างที่เป็นของเหลวใช้ 20 มิลลิลิตร

5.4.2 เติม 70% methanol ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ลงฝนฟลาสก์จะได้อัตราส่วนของตัวอย่างต่อเมธานอลเป็น 1:5

5.4.5 ปิดปากฟลาสก์เขย่าที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

5.4.6 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วจึงกรองส่วนใสด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 เก็บเอาส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ซึ่งมีอัตราเจือจาง 1:5 ทำให้เจือจางเป็น 1:20 โดยใช้สารละลาย 0.01 M PBS-T ก่อนนำไปวิเคราะห์ (สารสกัดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร + สารละลาย 0.01 M PBS-T 3 มิลลิลิตร)

5.5 วิธีการวิเคราะห์

5.5.1 หยดสารพิษมาตรฐาน ระดับความเข้มข้นต่างๆ และตัวอย่างที่เจือจางแล้วประมาณ 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบที่เคลือบด้วยแอนติบอดีแอฟลาทอกซิน

5.5.2 หยดเอนไซม์คอนจูเกตที่เจือจางแล้วลงในหลุมทุกหลุมปริมาณ 50 ไมโครลิตร เขย่าเล็กน้อย บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมินาน 30 นาที

5.5.3 เทสารในหลุมทิ้ง และล้างหลุมด้วย Washing buffer โดยล้างอย่างน้อย 3 ครั้ง ซับและเคาะให้แห้ง

5.5.4 หยด Substrate ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จะเกิดปฏิกิริยาเป็นสีฟ้า ตามลำดับความเข้มข้นของสารพิษ ตัวอย่างที่มีสีฟ้าเข้มแสดงว่าไม่มีสารพิษ หรือมีน้อย ส่วนที่มีสีฟ้าจางและขาว แสดงว่ามีสารพิษอยู่สูง

5.5.6 หยุดปฏิกิริยาโดยเติม Stopping solution ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และอ่านความเข้มสีด้วย Microplate reader ที่ช่วงความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร

5.5.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ของสารพิษมาตรฐานมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน โดยลงในกระดาษ semi-logarichmic ให้ค่าดูดกลืนแสงเป็นแกน Y และค่าความเข้มข้นของสารพิษเป็นแกน X

ภาคผนวก ข

ผลการทดลอง

1. ผลการทดสอบหายาฆ่าแมลงตกค้างกลุ่มฟอสเฟตและคาร์บาเมทในผิวส้มโดยใช้ GT-test kit

Table 9. Contamination of organic phosphates and pesticides in citrus peel tested by GT-test kit.

Citrus cultivars	pesticide tested
Kaffir lime	Not detected
Lime	Not detected
Pomelo	Not detected
Acidless orange	Detected (lower than safety level)
Shogun	Detected (lower than safety level)

Table 10. Color of peels of citrus cultivars by Color meter: Hunter lab.

Citrus cultivars	Id -a*
Kaffir lime	-8.40±0.4
Lime	-9.21±0.29
Pomelo	-6.32±0.88
Acidless orange	-5.70±0.37
Shogun	-11.24±0.44

-a* light green color

Table 11. Production yields of ethyl acetate extracts and essential oils from peels of various citrus cultivars.

Citrus varieties	Types of extraction	
	ethyl acetate extract (%)	hydrodistillation (%)
Pomelo (*Citrus maxima* Merr)	1.91	0.20
Shogun (*Citrus reticulate* cv Shogun)	2.15	0.49
Acidless orange (*Citrus paradisi*)	1.08	0.15
Kaffir lime (*Citrus hystrix* DC)	2.36	0.77
Lime (*Citrus aurantifolia* Swingle)	1.53	0.45

2. การวิเคราะห์สารประกอบของน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะกรูดด้วยเทคนิค GC-MS

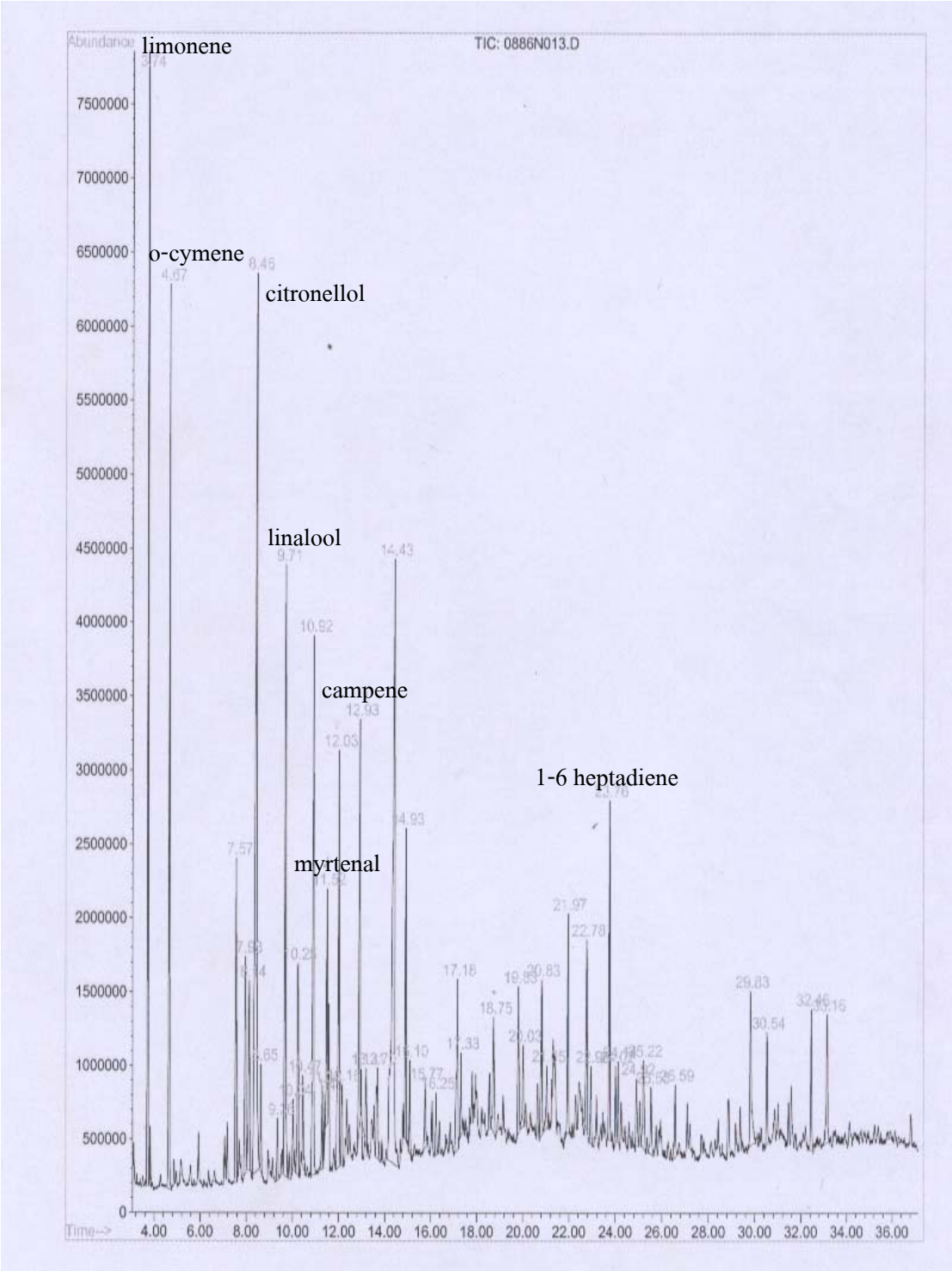


Figure 25 . GC chromatogram of essential oil from kaffir lime peel.

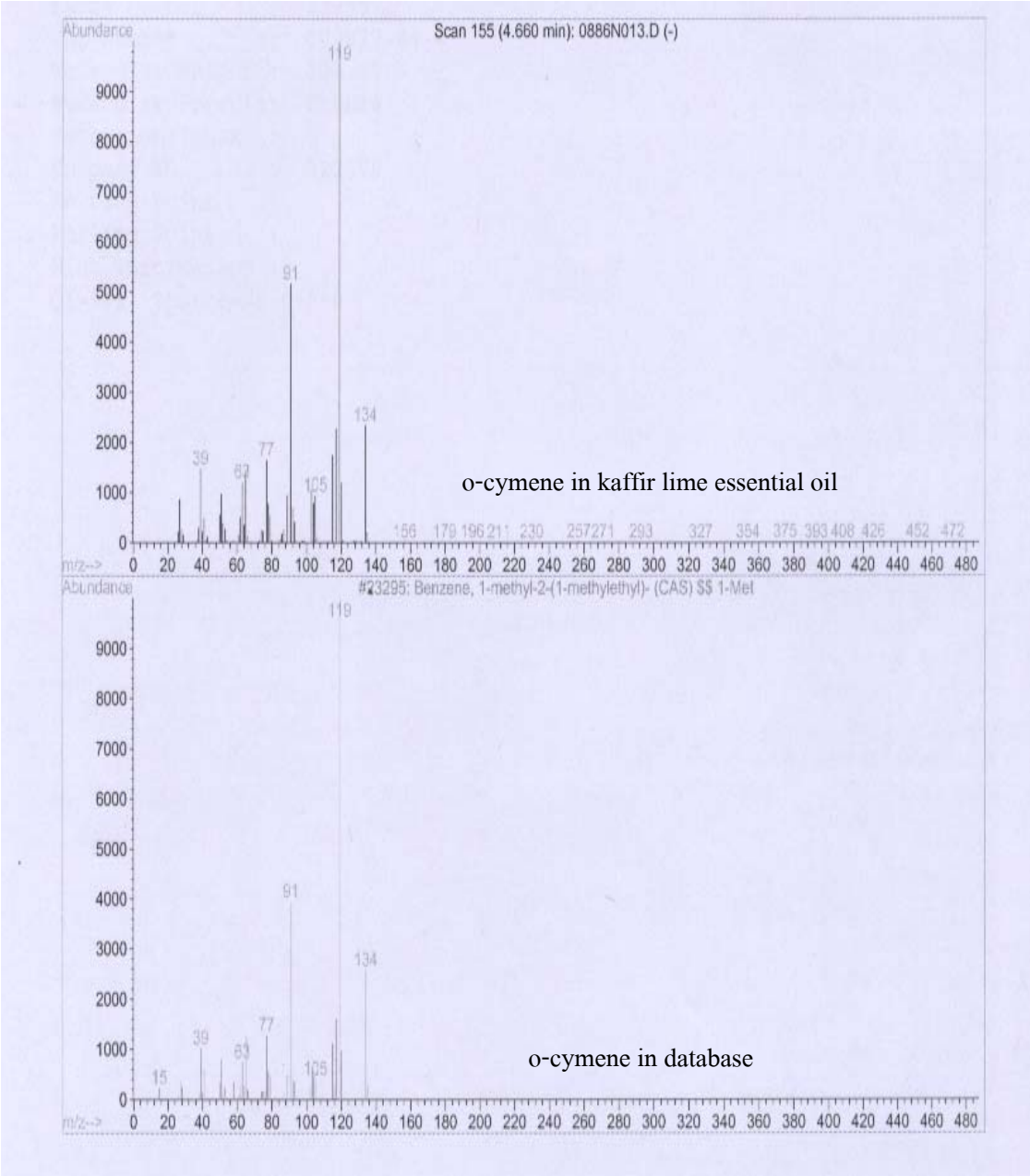


Figure 26. Mass spectrum comparison of o-cymene found in essential oil from kaffir lime peel with that in database.

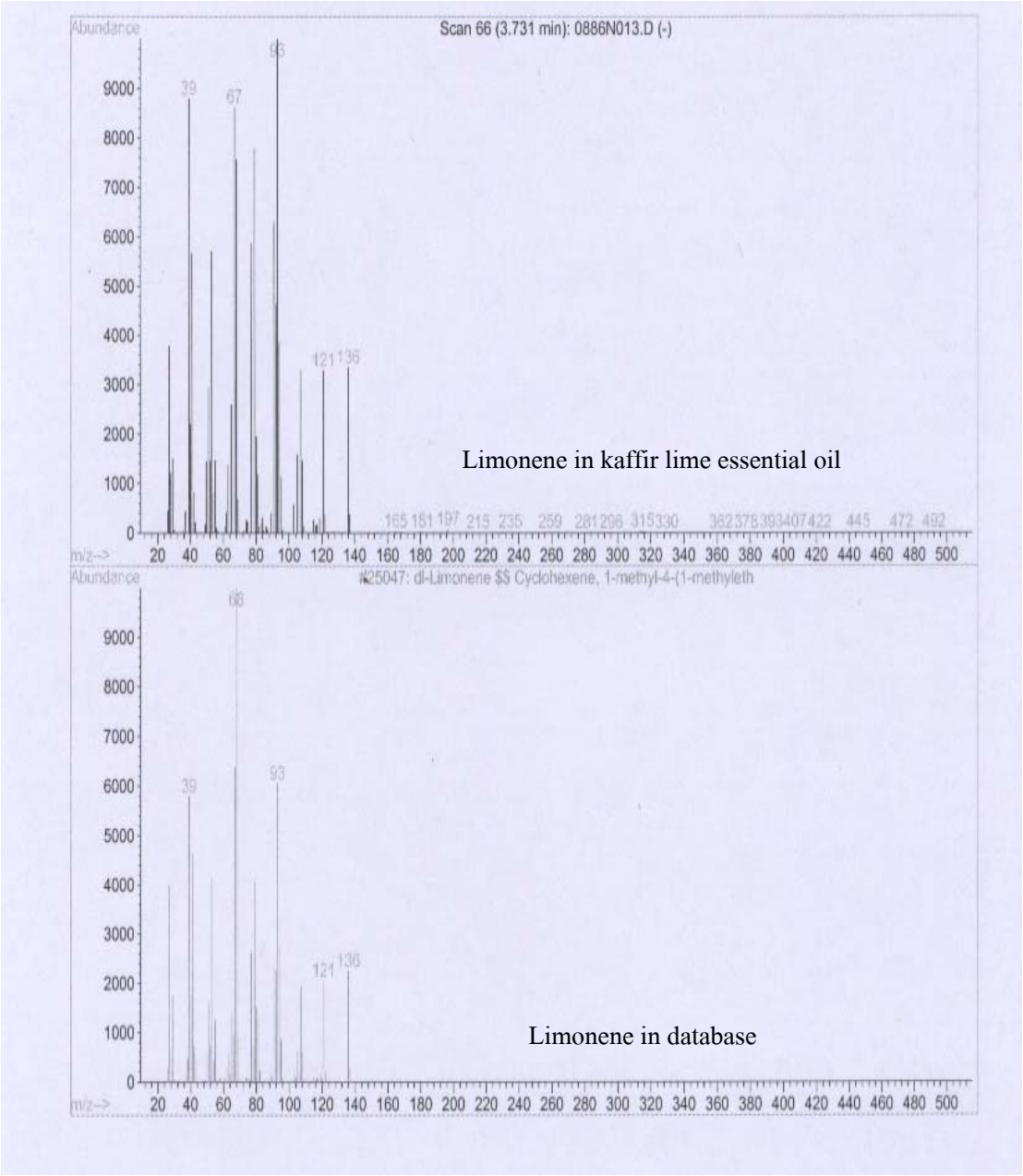


Figure 27. Mass spectrum comparison of limonene found in essential oil from kaffir lime peel with that in database.

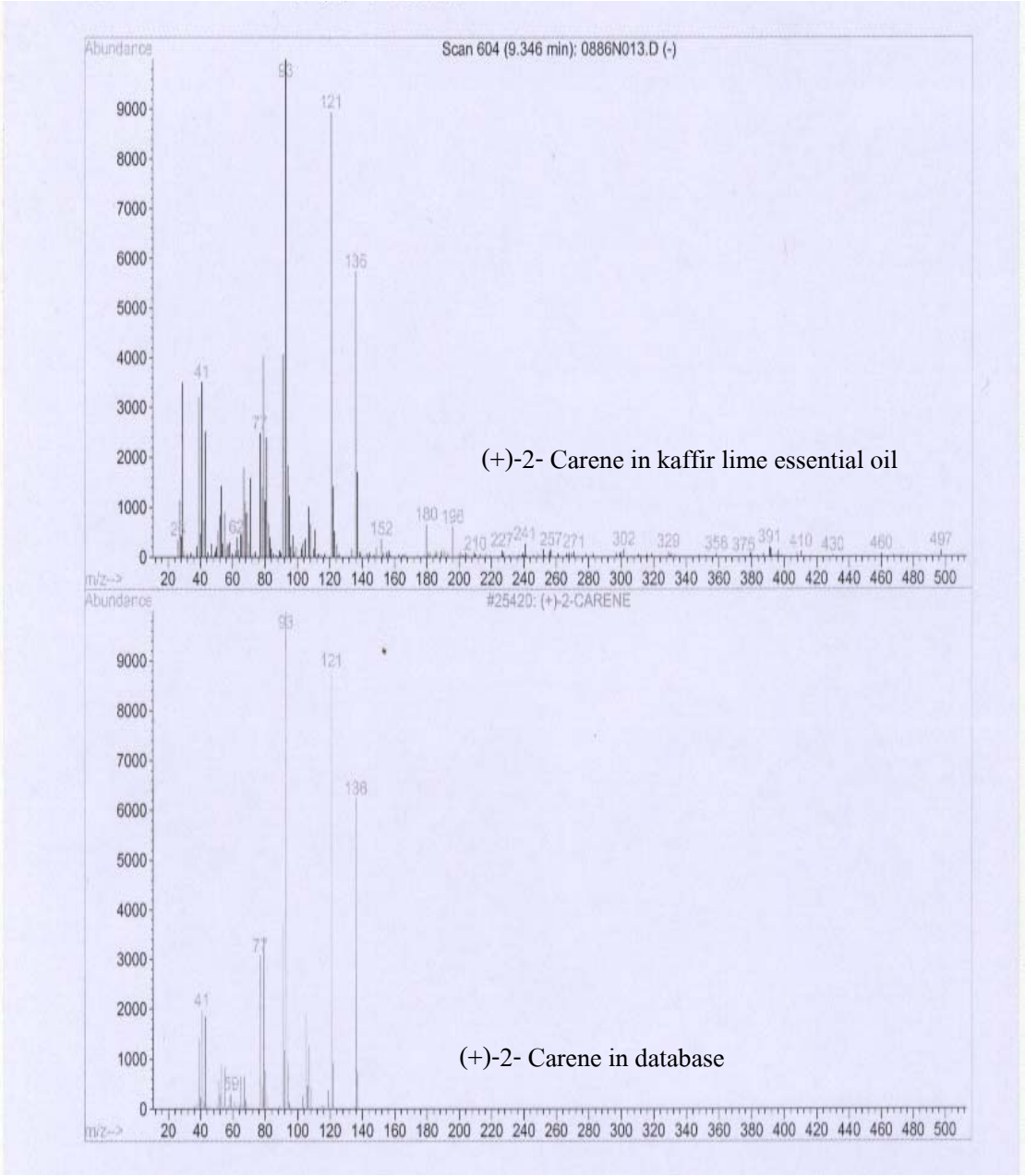


Figure 28. Mass spectrum comparison of (+)-2-carene found in essential oil from kaffir lime peel with that in database.

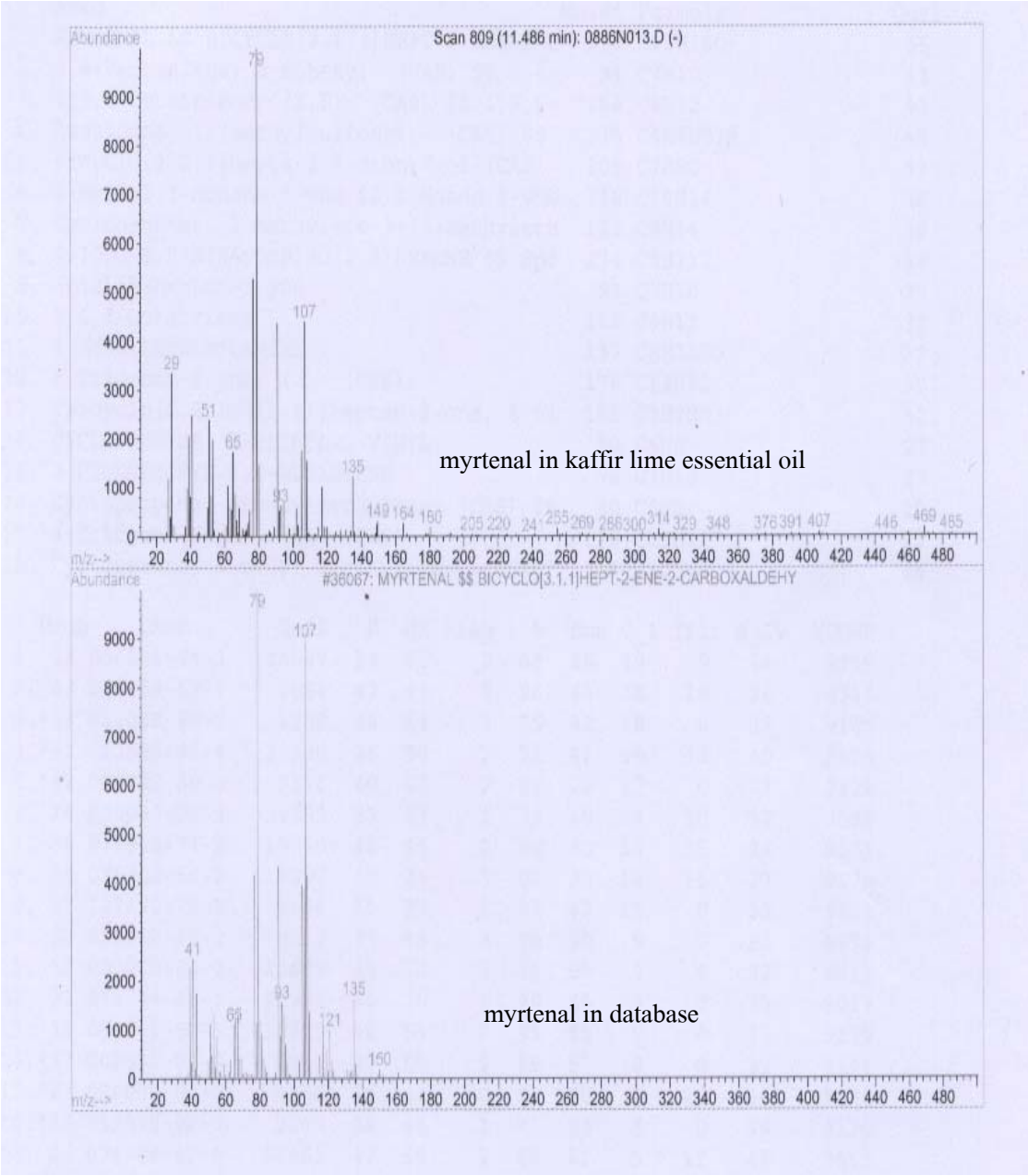


Figure 29. Mass spectrum comparison of myrtenal found in essential oil from kaffir lime peel with that in database.

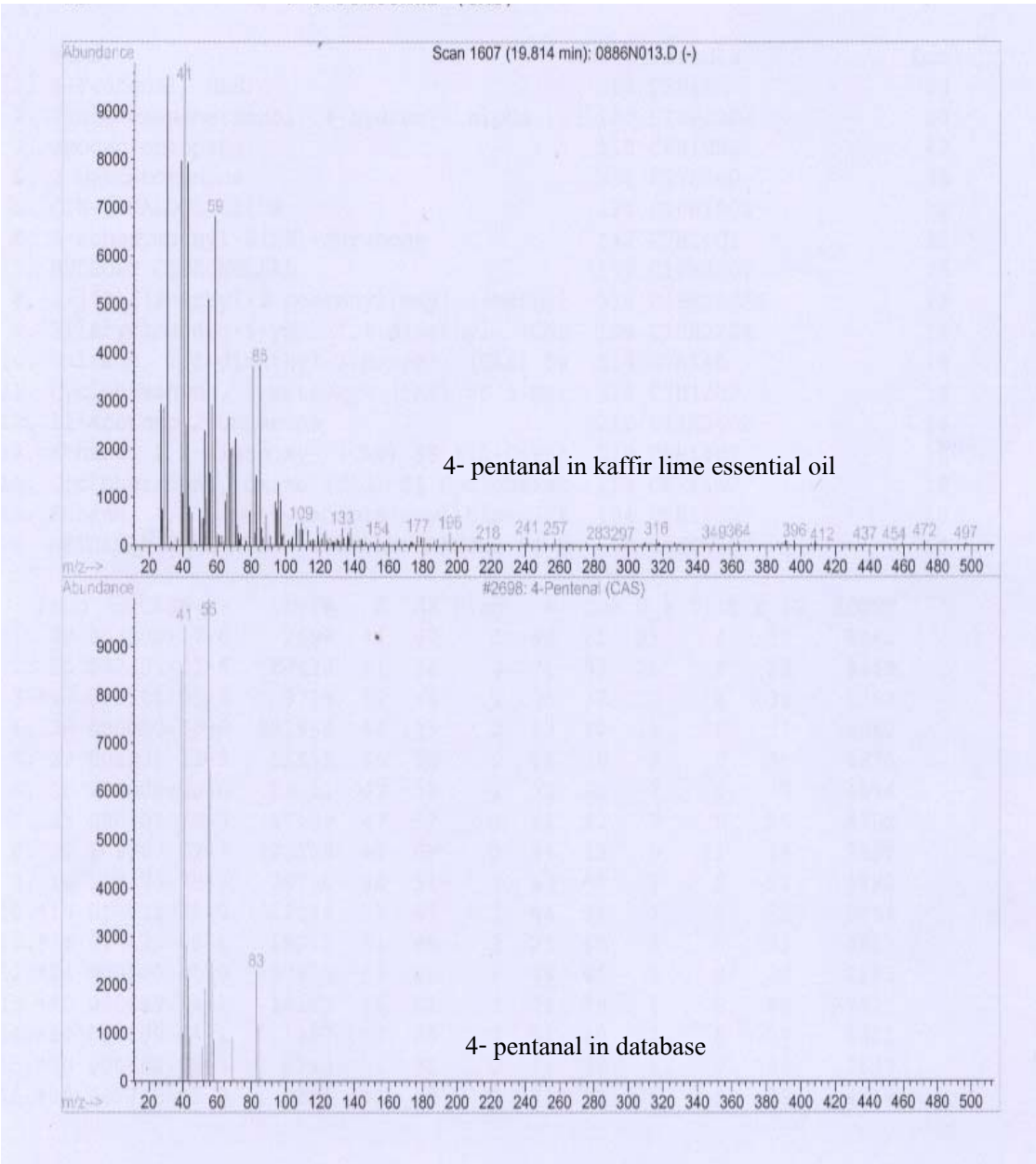


Figure 30. Mass spectrum comparison of 4-pentanal found in essential oil from kaffir lime peel with that in database.

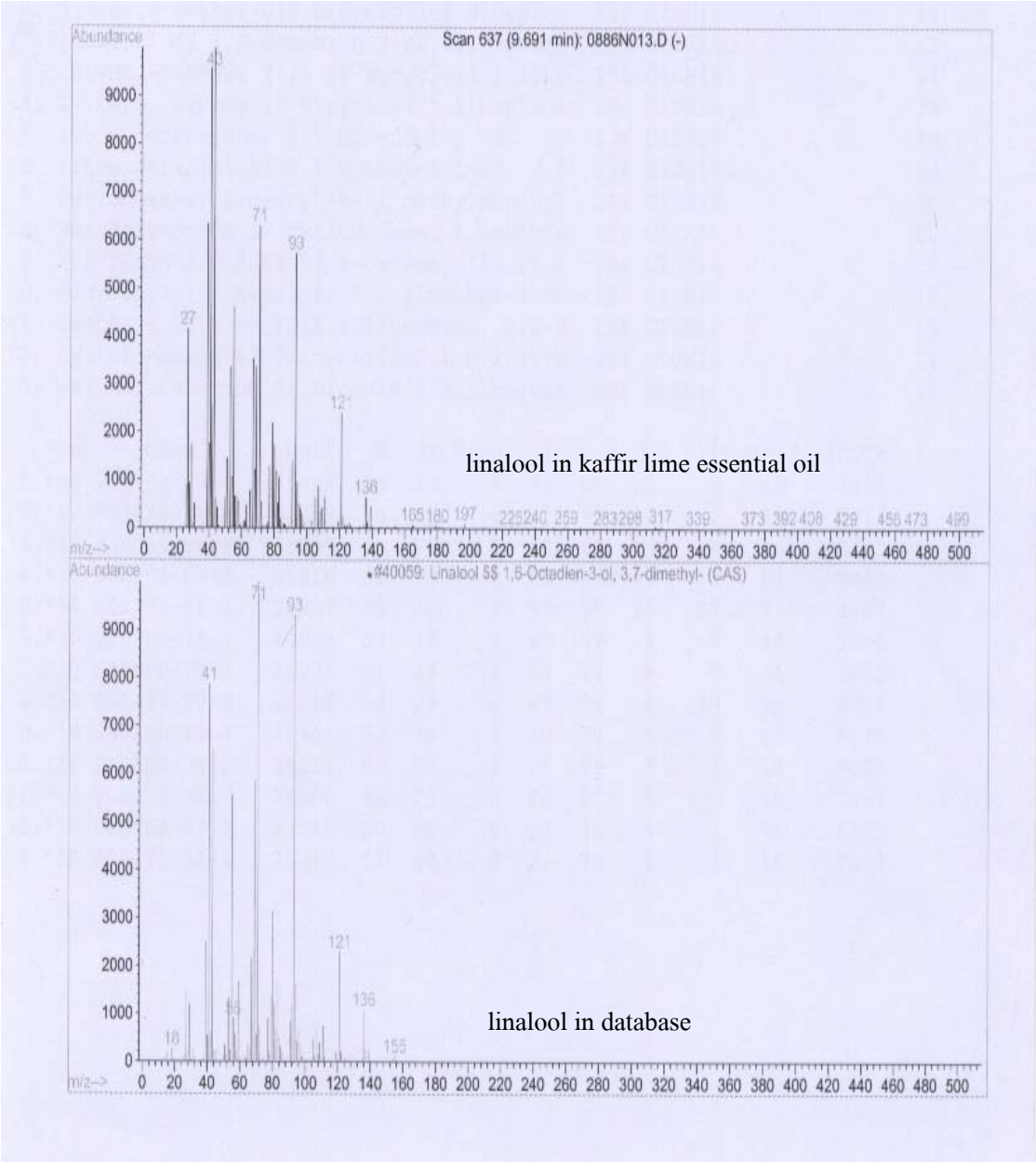


Figure 31. Mass spectrum comparison of linalool found in essential oil from kaffir lime peel with that in database.

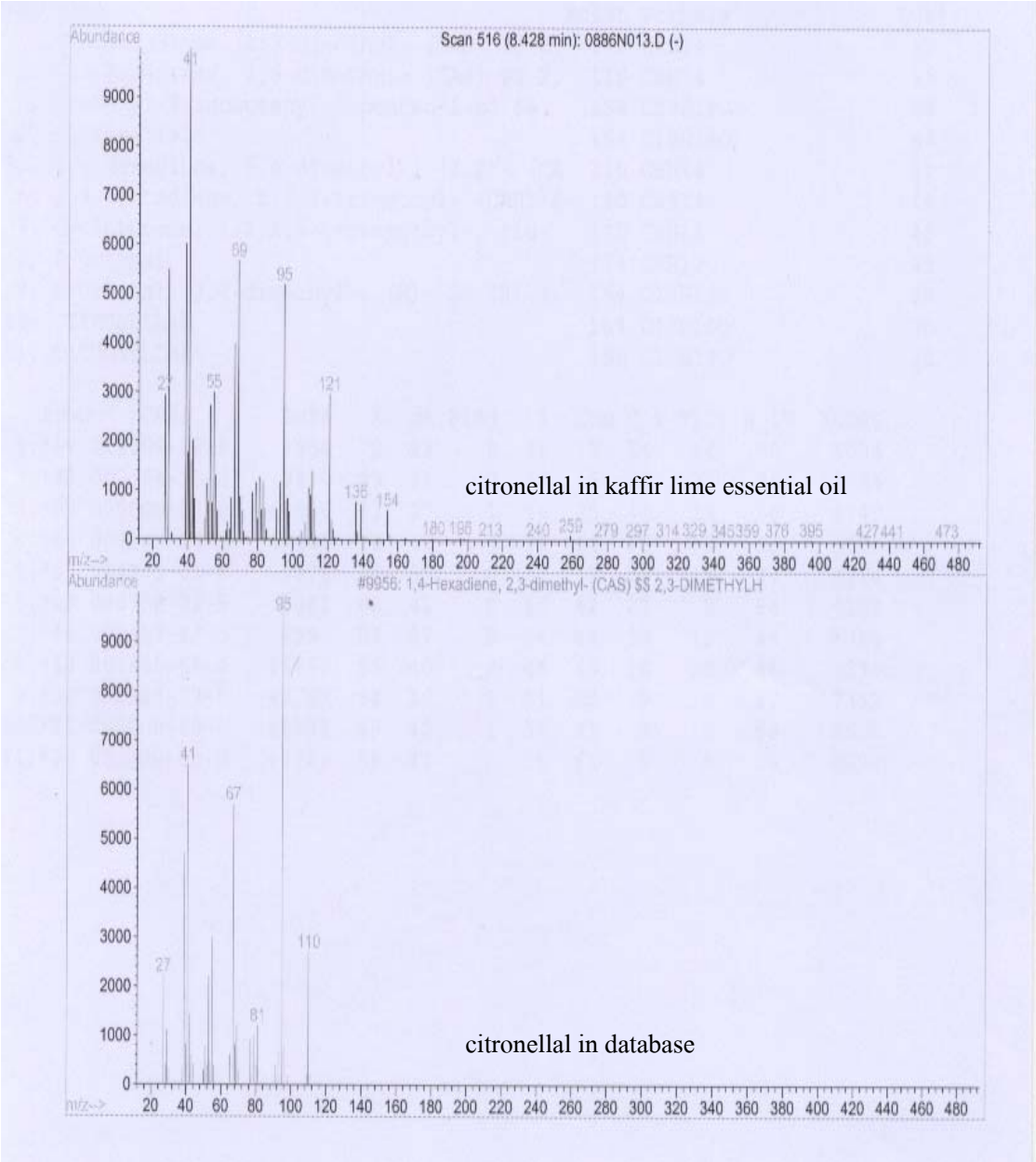


Figure 32. Mass spectrum comparison of citronellal found in essential oil from kaffir lime peel with that in database.

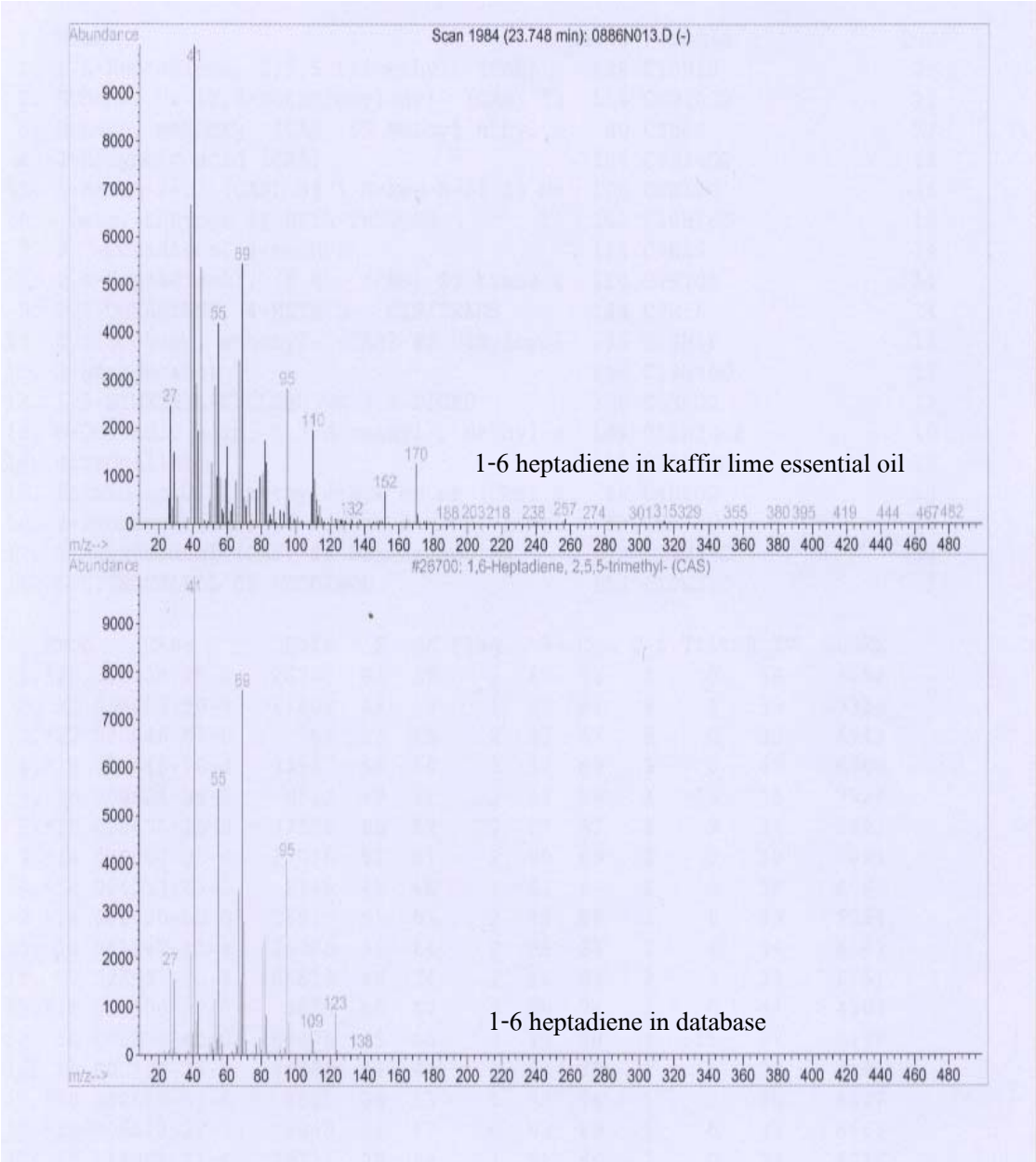


Figure 33. Mass spectrum comparison of 1-6 heptadiene found in essential oil from kaffir lime peel with that in database.

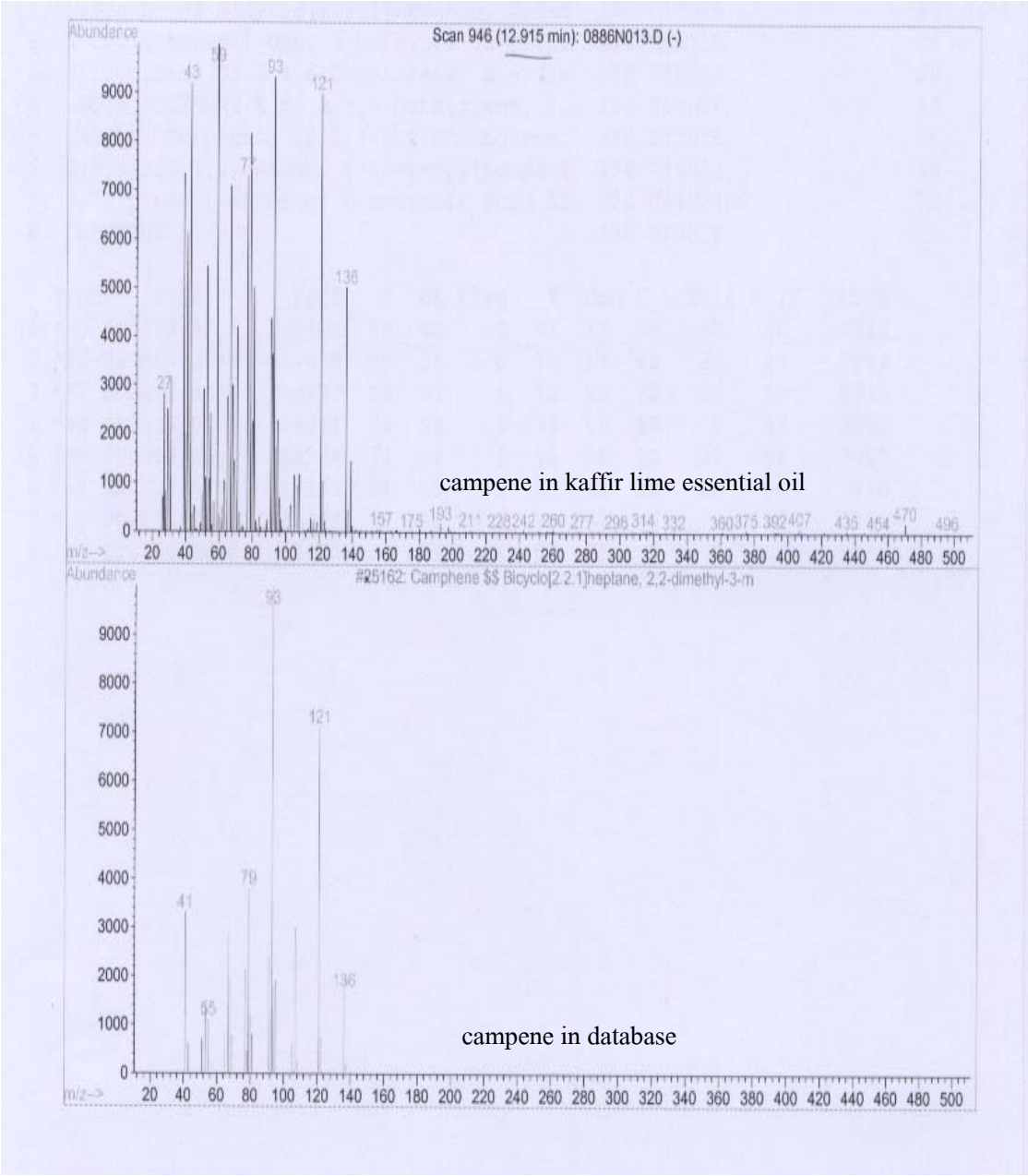


Figure 34. Mass spectrum comparison of campene found in essential oil from kaffir lime peel with that in database.

2. การวิเคราะห์สารประกอบในน้ำมันหอมระเหยจากผิวมะนาวโดยวิธี GC-MS

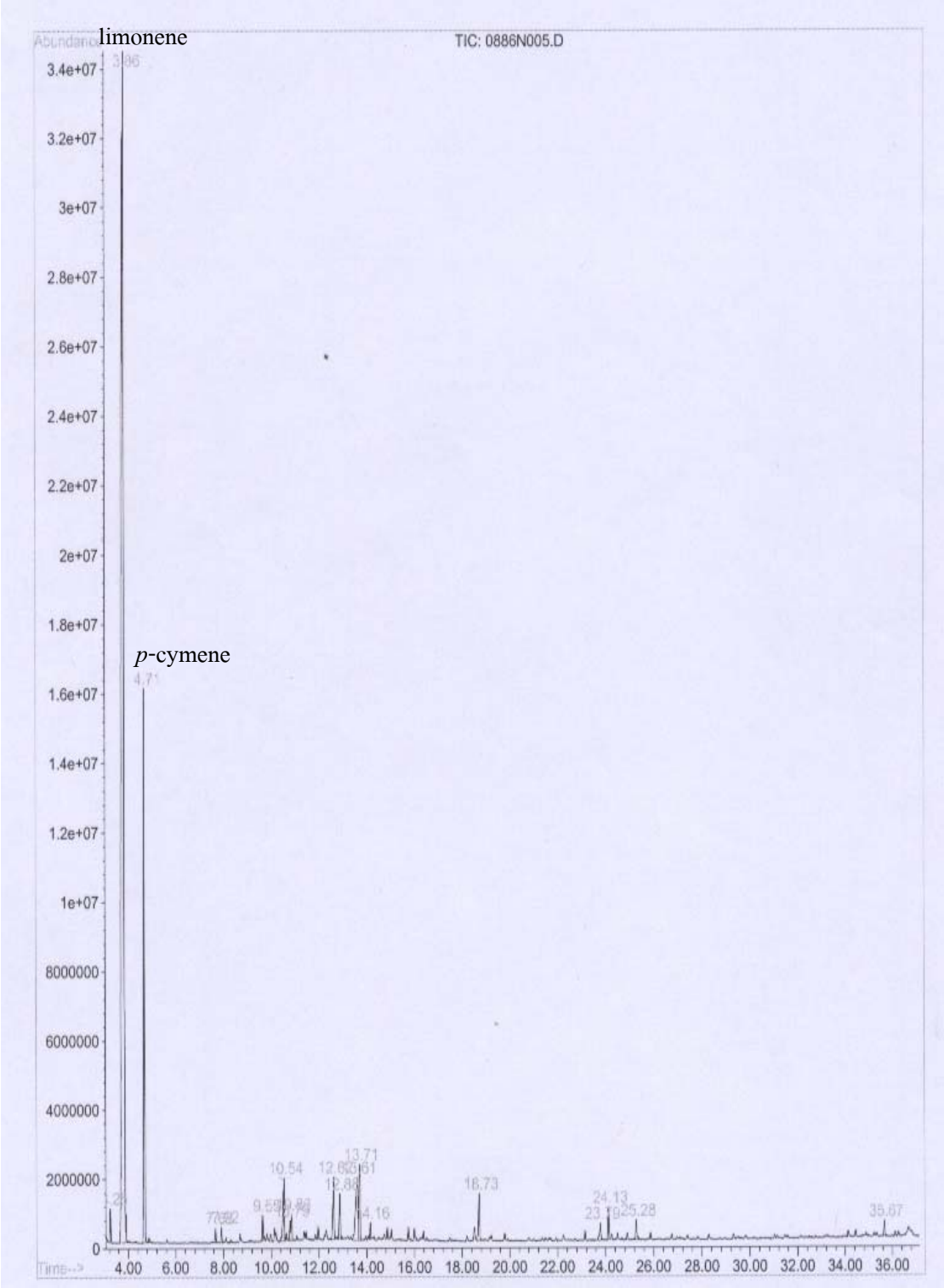


Figure 35 . GC chromatogram of of essential oil from lime peel.

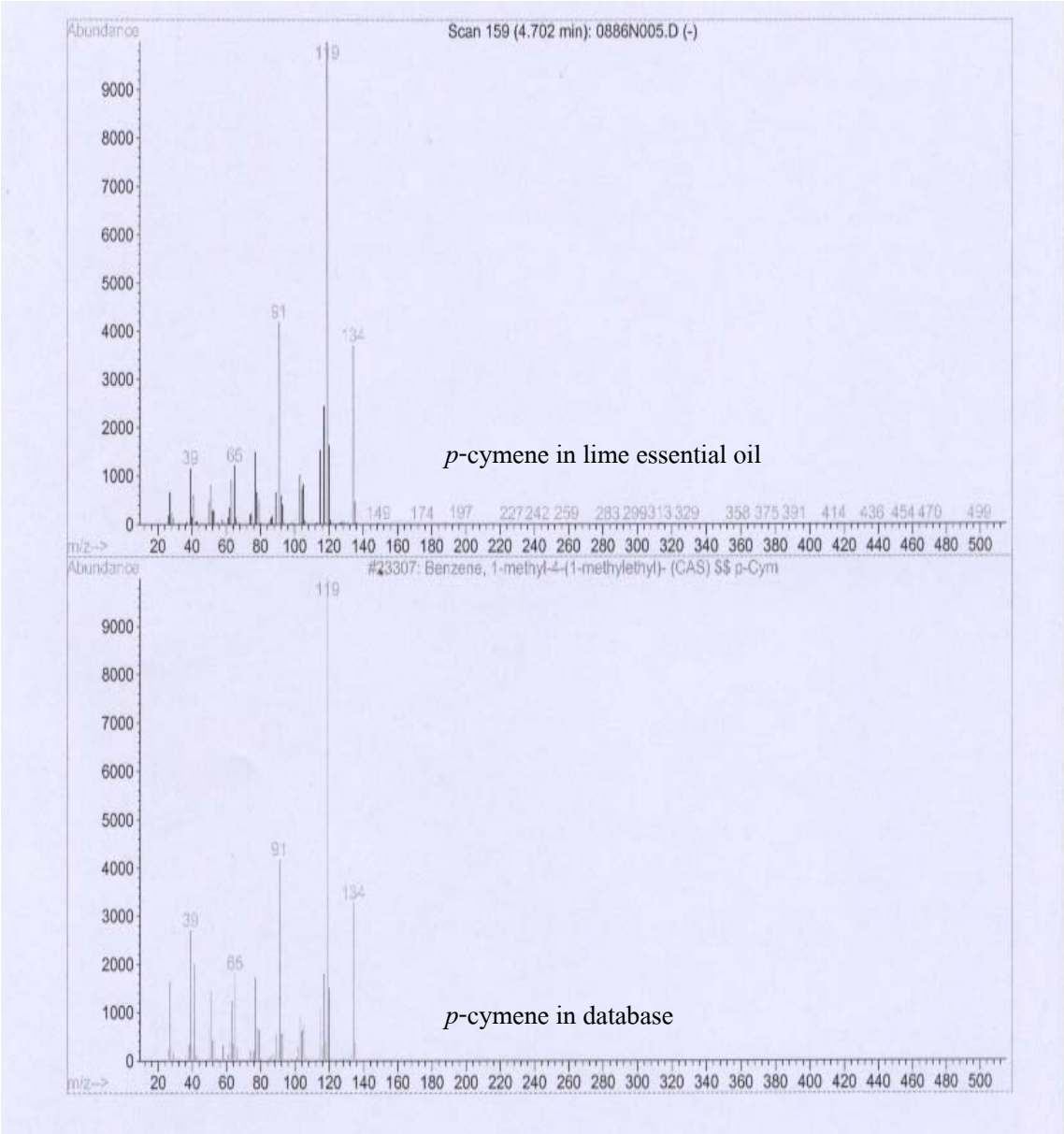


Figure 36. Mass spectrum comparison of *p*-cymene found in essential oil from lime peel with that in database.

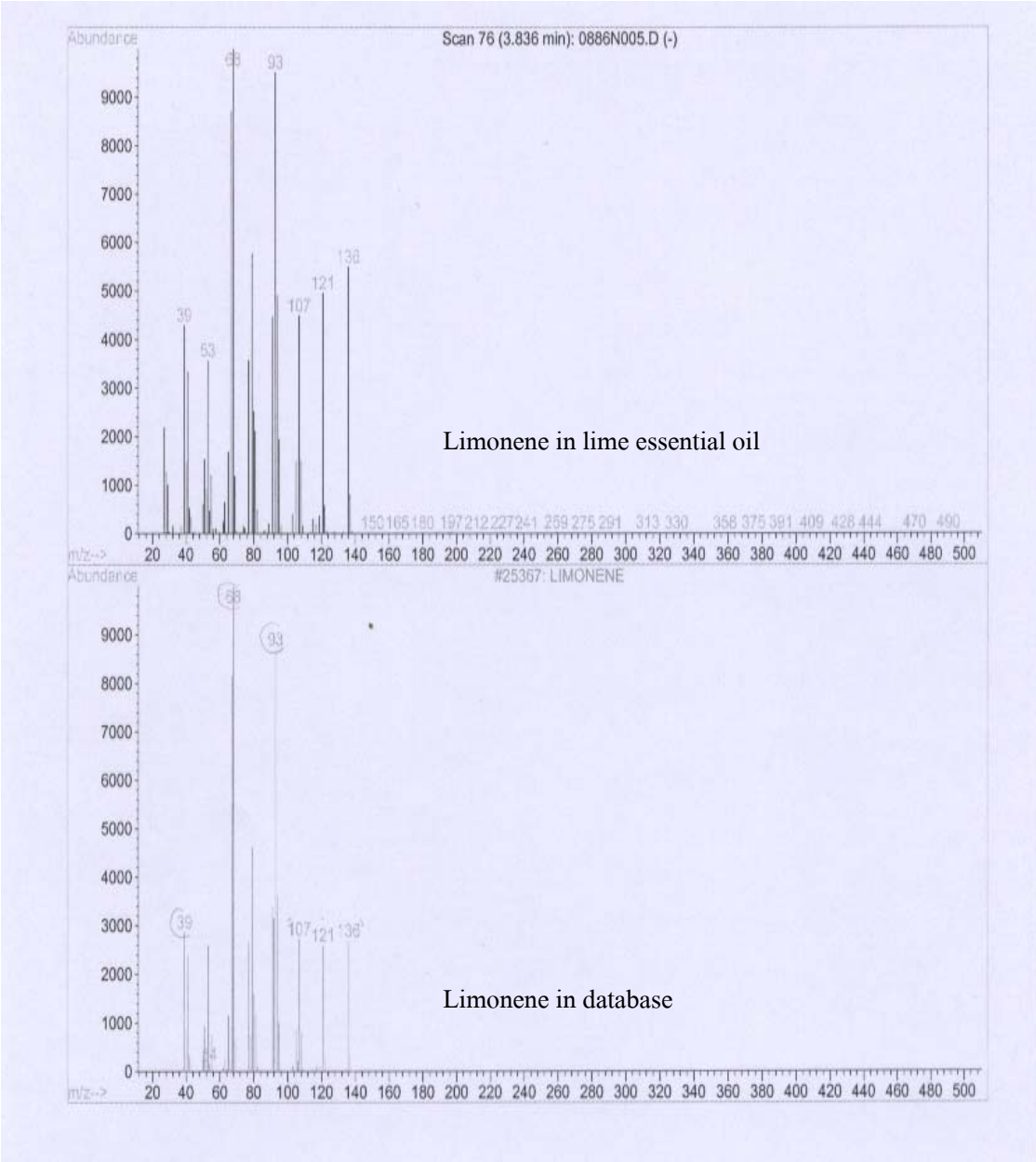


Figure 37. Mass spectrum comparison of limonene found in essential oil from lime peel with that in database.

3. การวิเคราะห์สารประกอบของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวมะนาวด้วยเทคนิค GC-MS

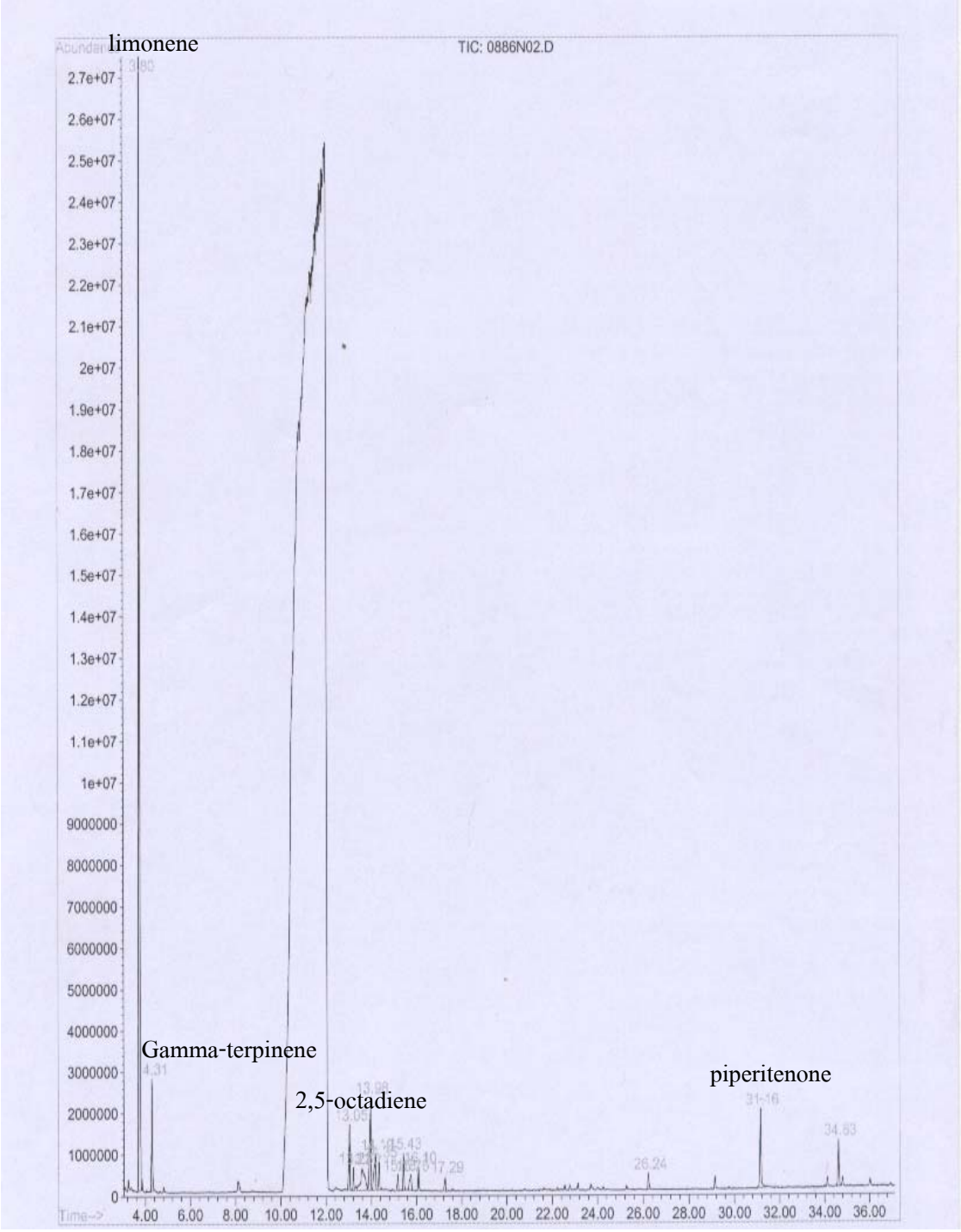


Figure 38 . GC chromatogram of ethyl acetate extract from lime peel.

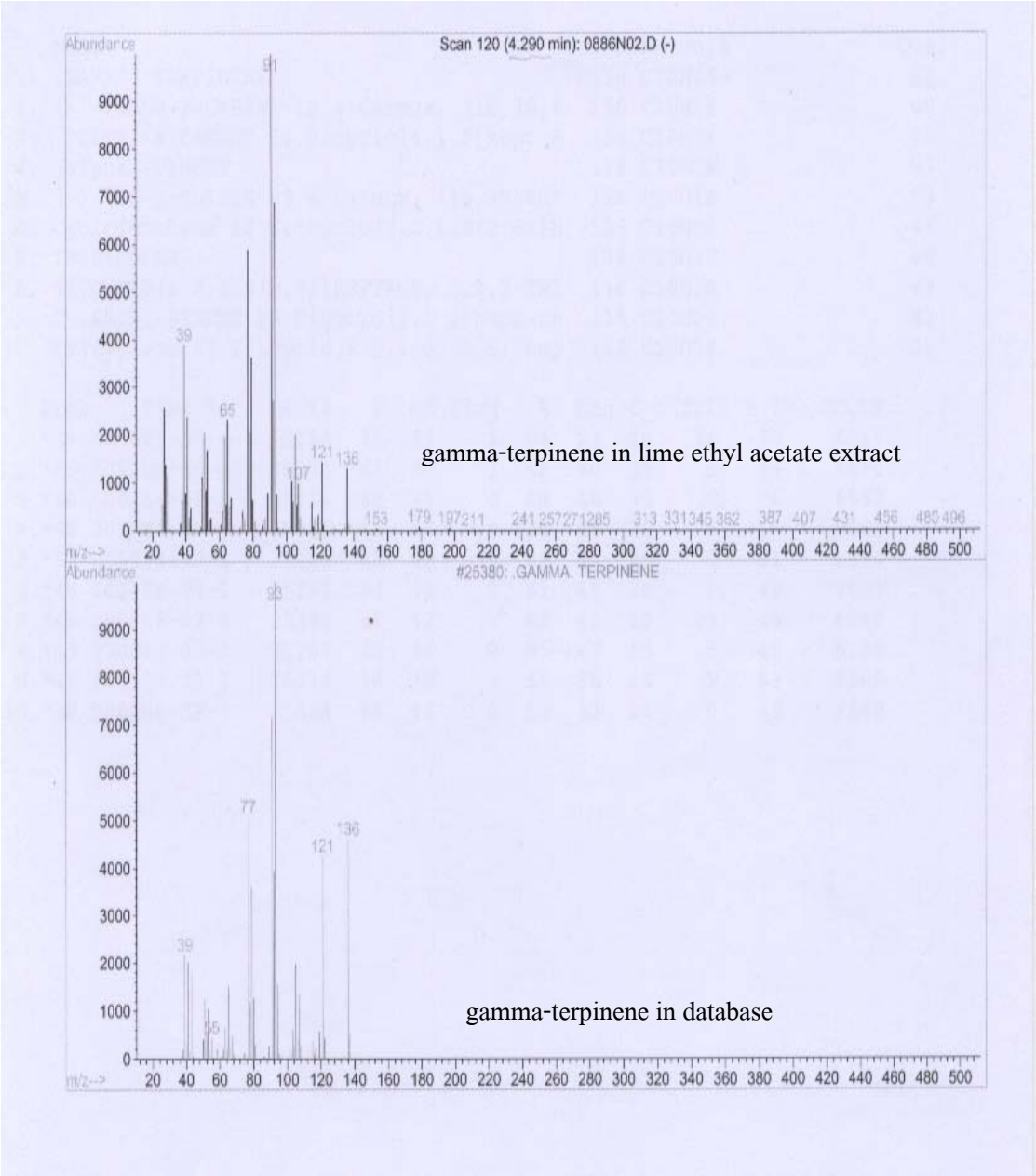


Figure 39. Mass spectrum comparison of gamma-terpinene found in ethyl acetate extract from lime peel with that in database.

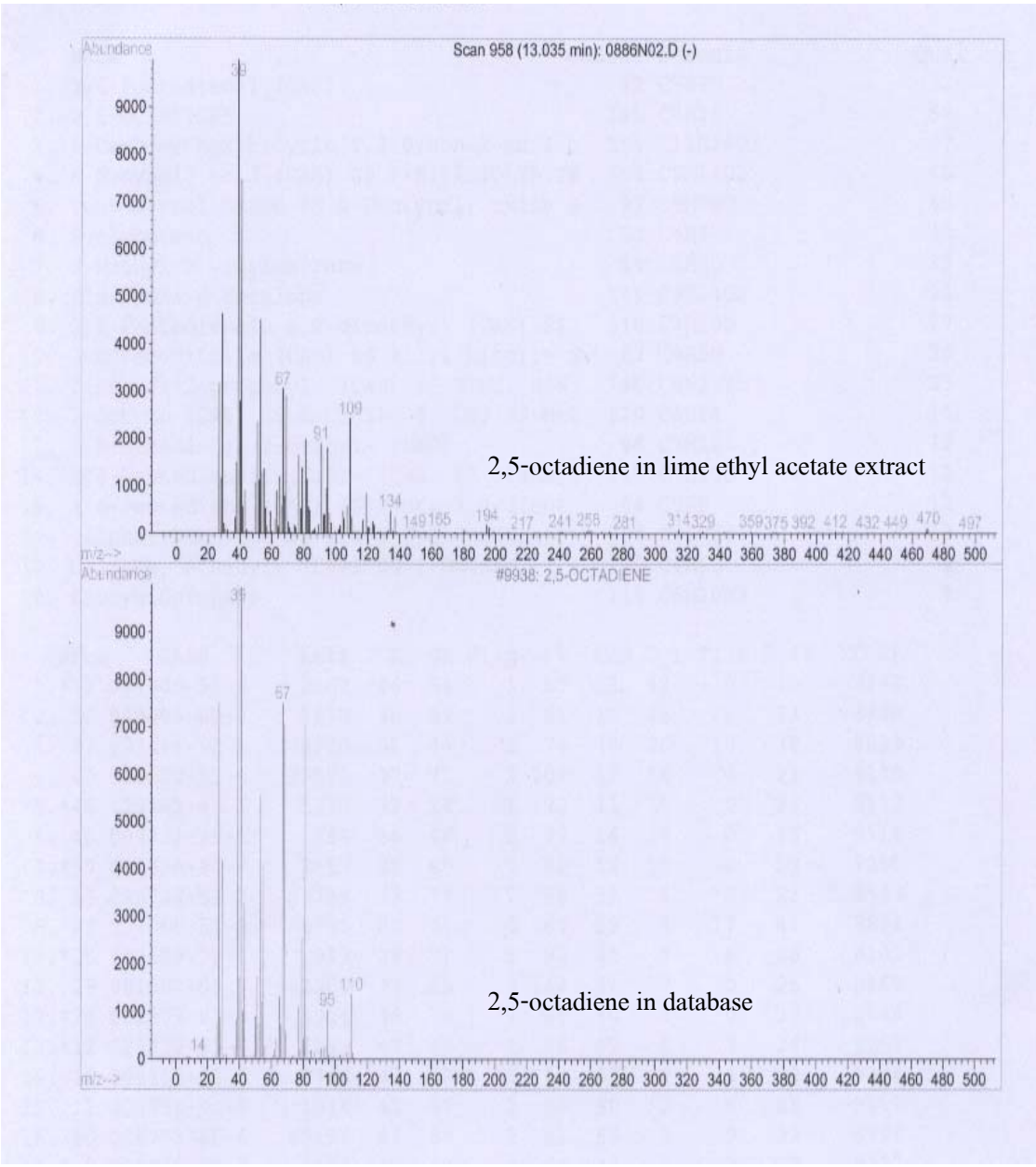


Figure 40. Mass spectrum comparison of 2,5-octadiene found in ethyl acetate extract from lime peel with that in database.

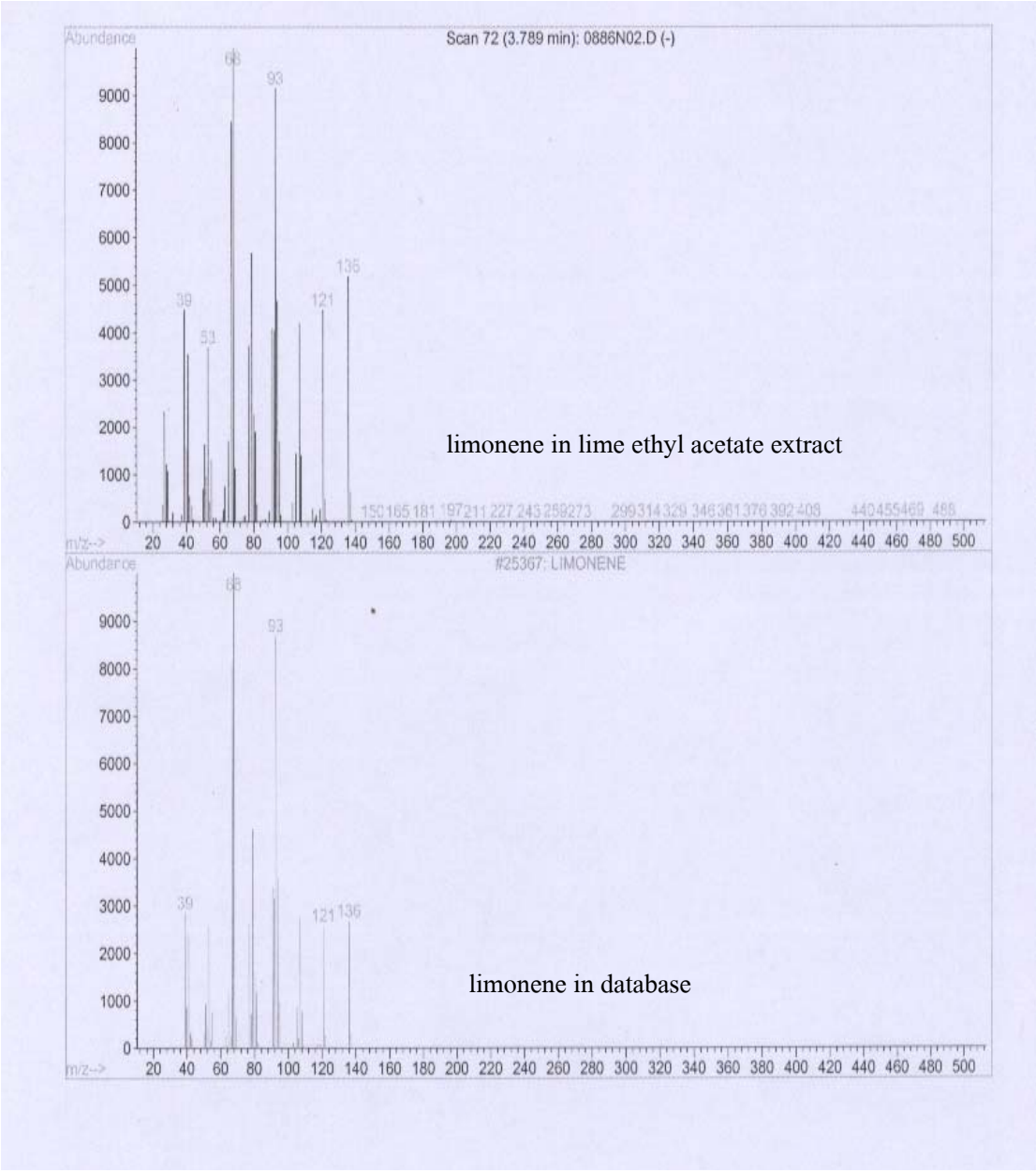


Figure 41. Mass spectrum comparison of limonene found in ethyl acetate extract from lime peel with that in database.

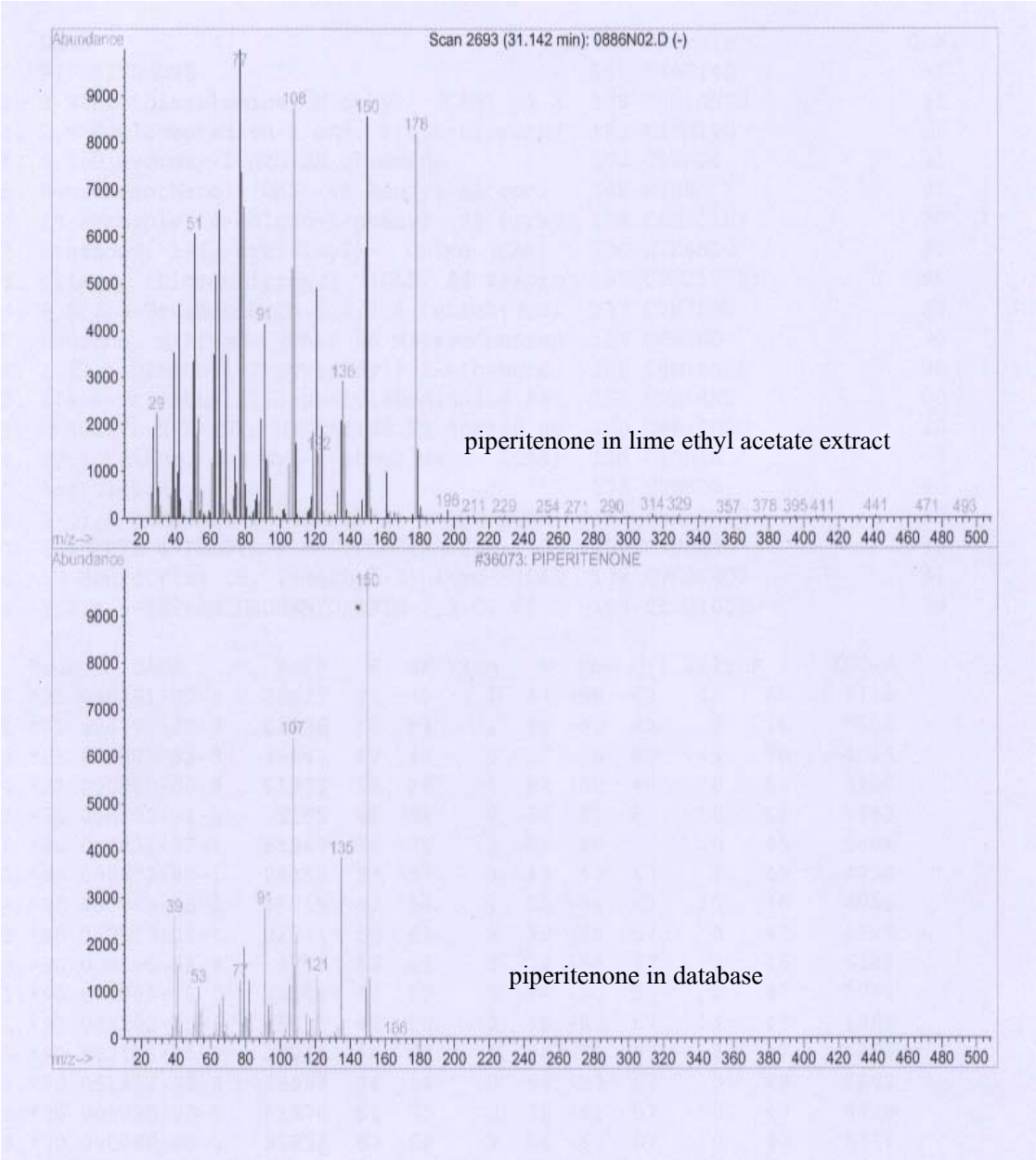


Figure 42. Mass spectrum comparison of piperitenone found in ethyl acetate extract from lime peel with that in database.

4. การวิเคราะห์สารประกอบของสารสกัดเอธิลอะซิเตตจากผิวกรูดด้วยเทคนิค GC-MS

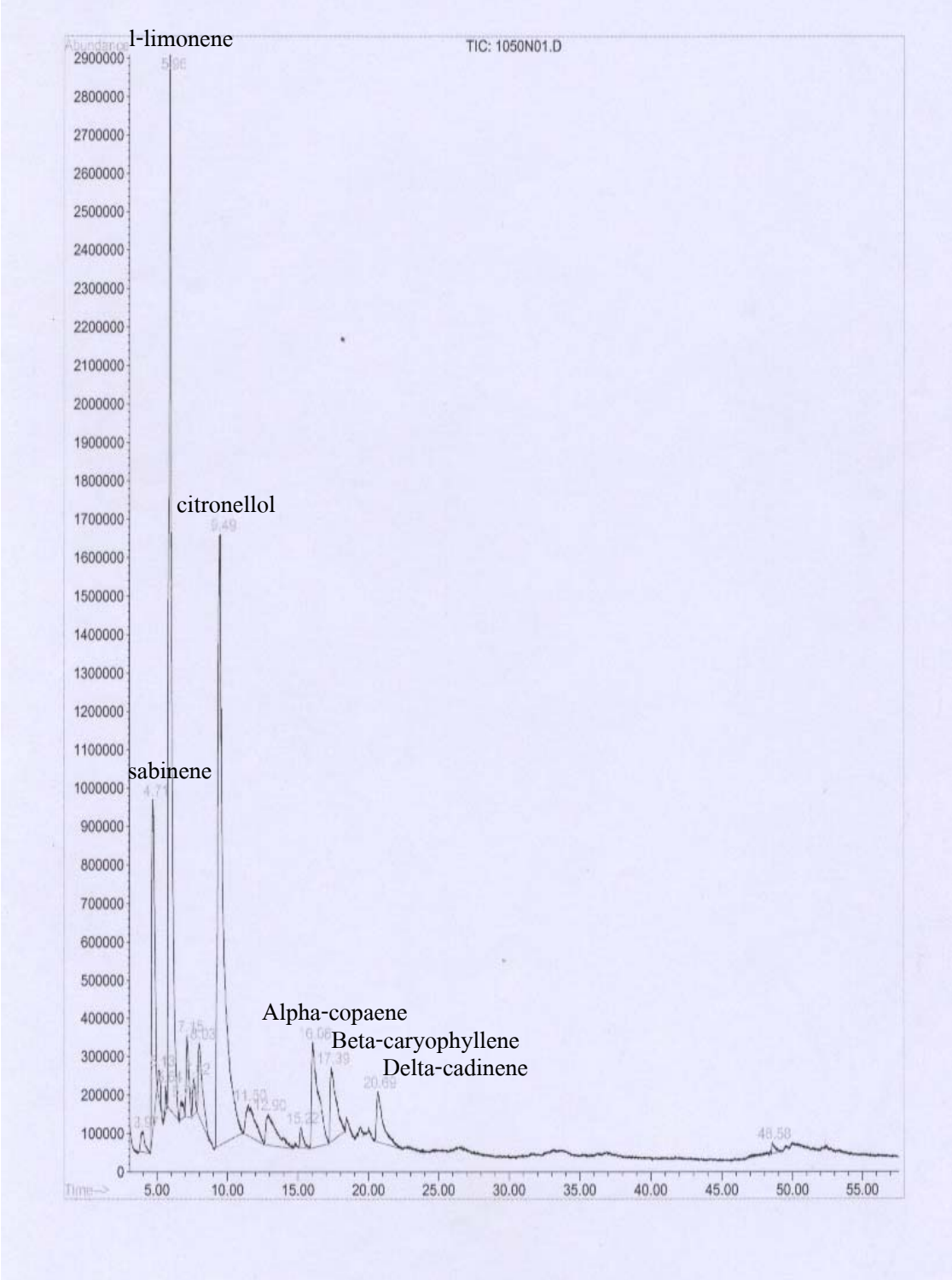


Figure 43 . GC chromatogram of ethyl acetate extract from kaffir lime peel.

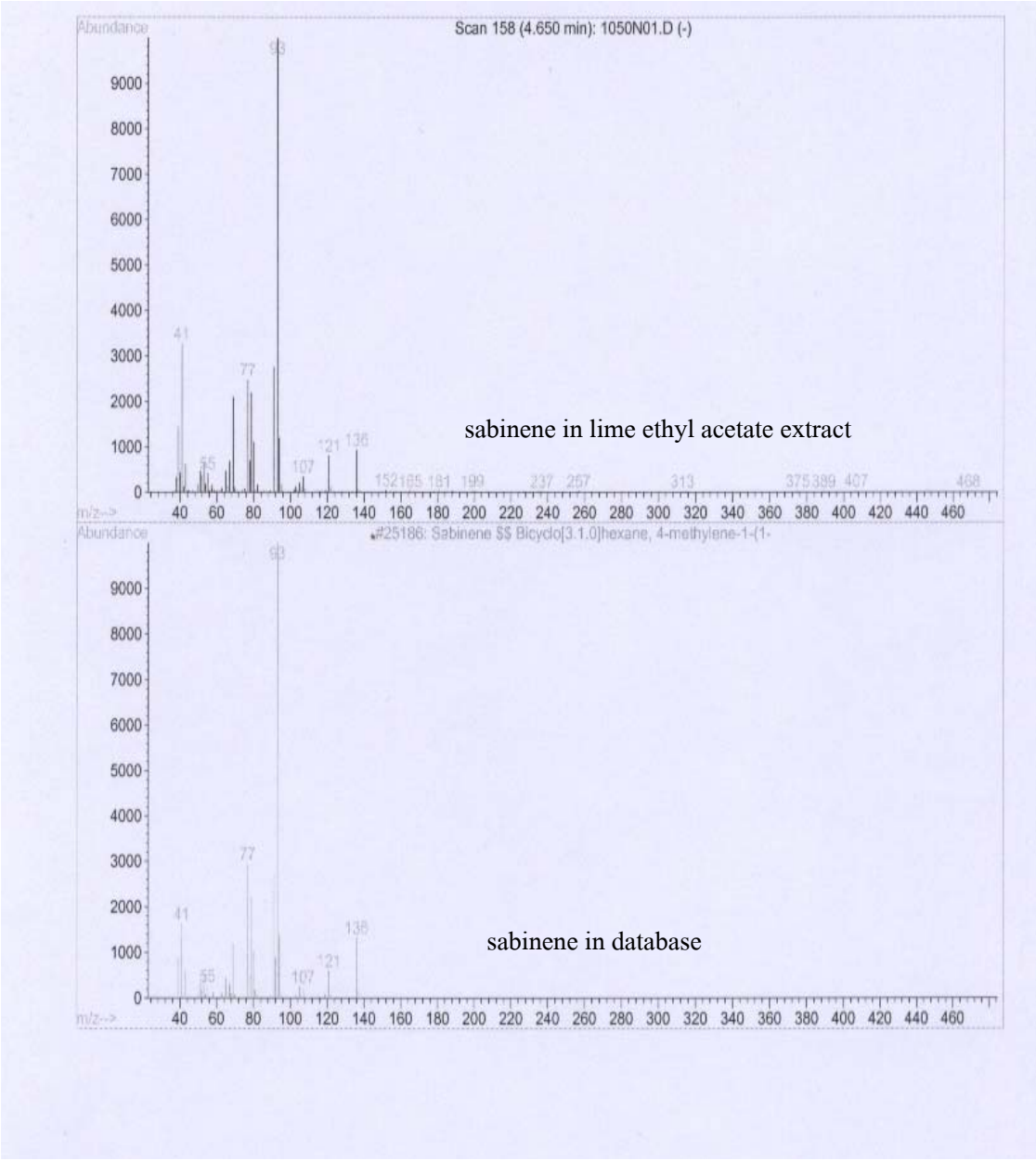


Figure 44. Mass spectrum comparison of sabinene found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database.

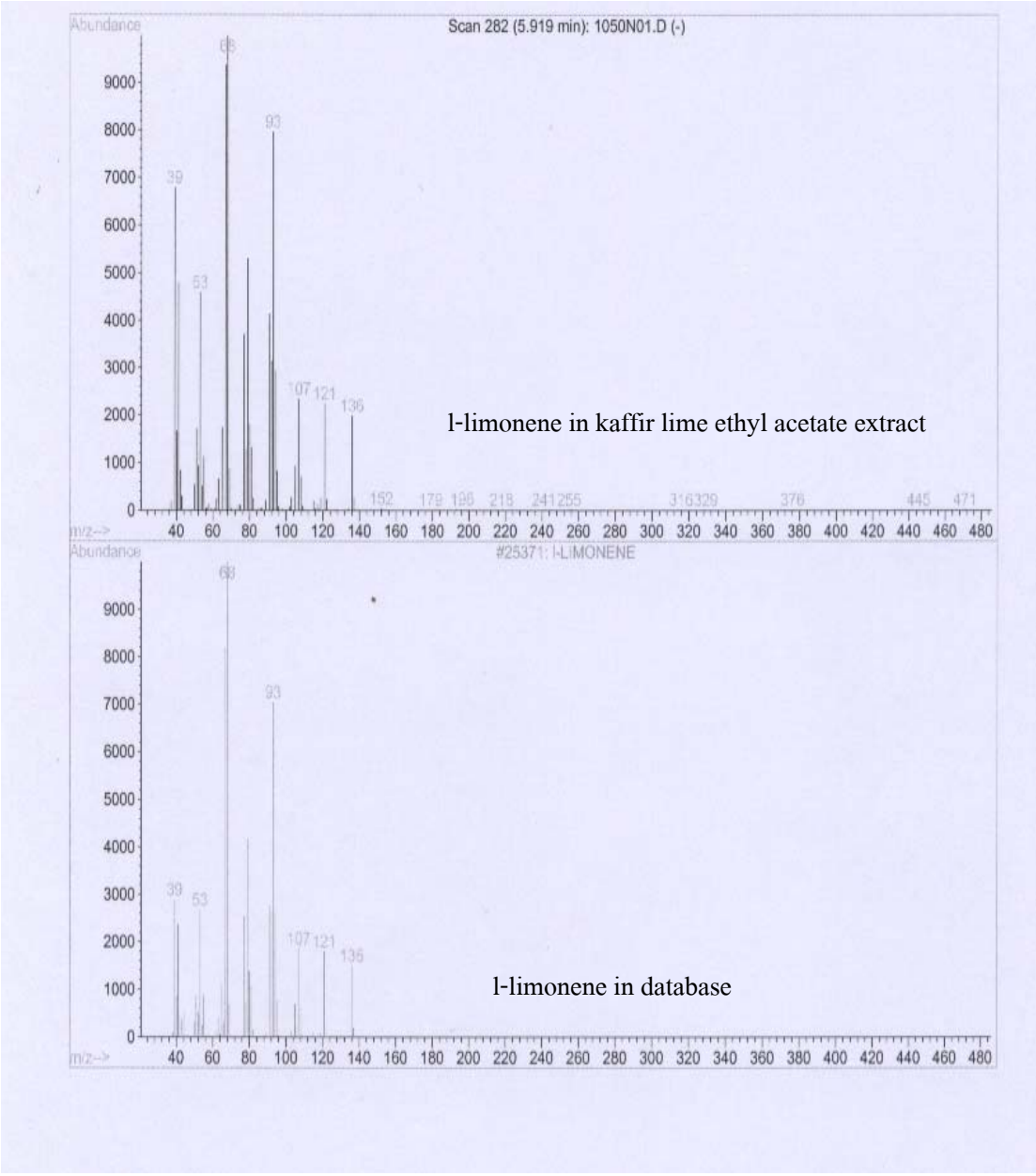


Figure 45. Mass spectrum comparison of l-limonene found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database.

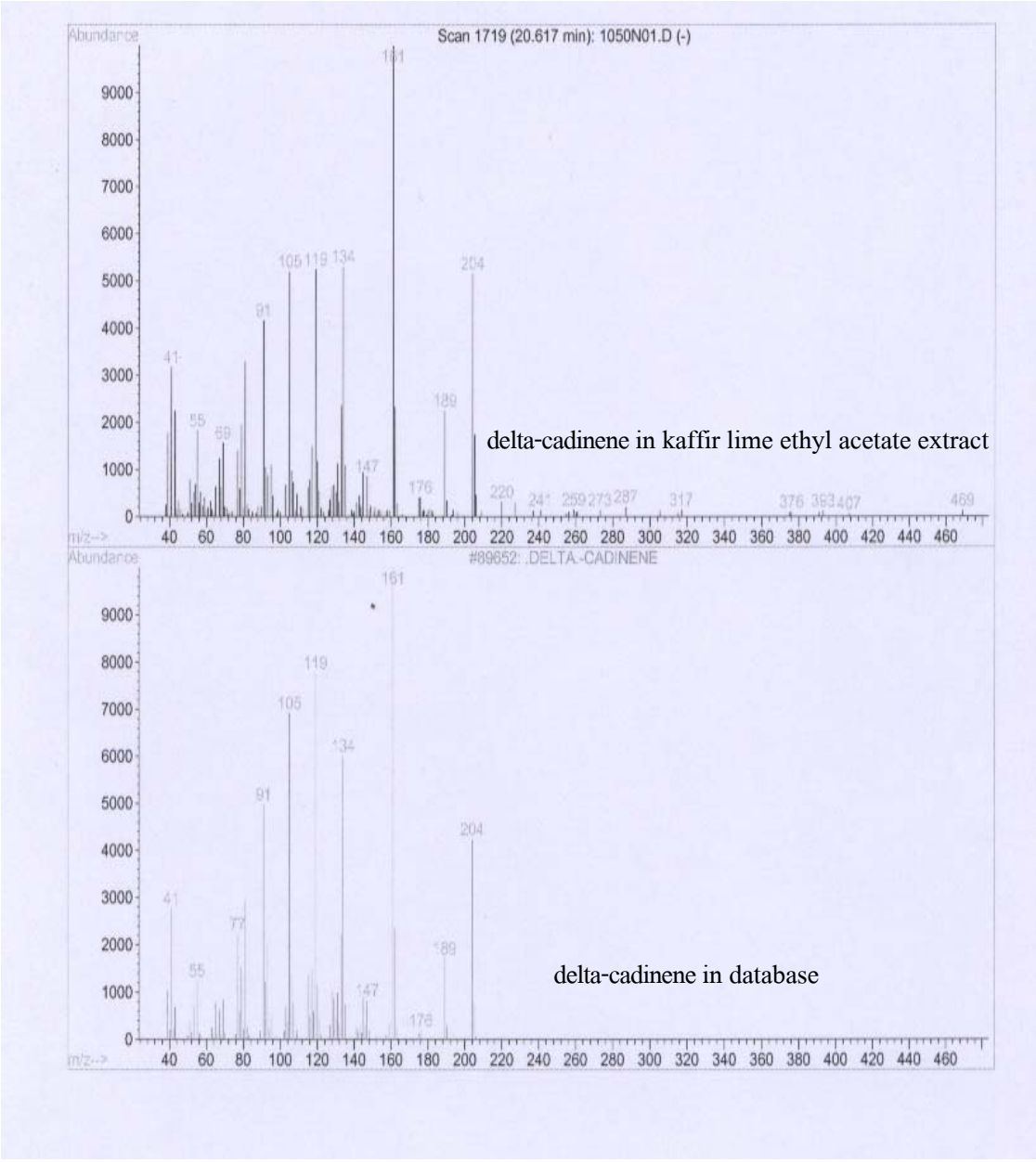


Figure 46. Mass spectrum comparison of delta-cadinene found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database.

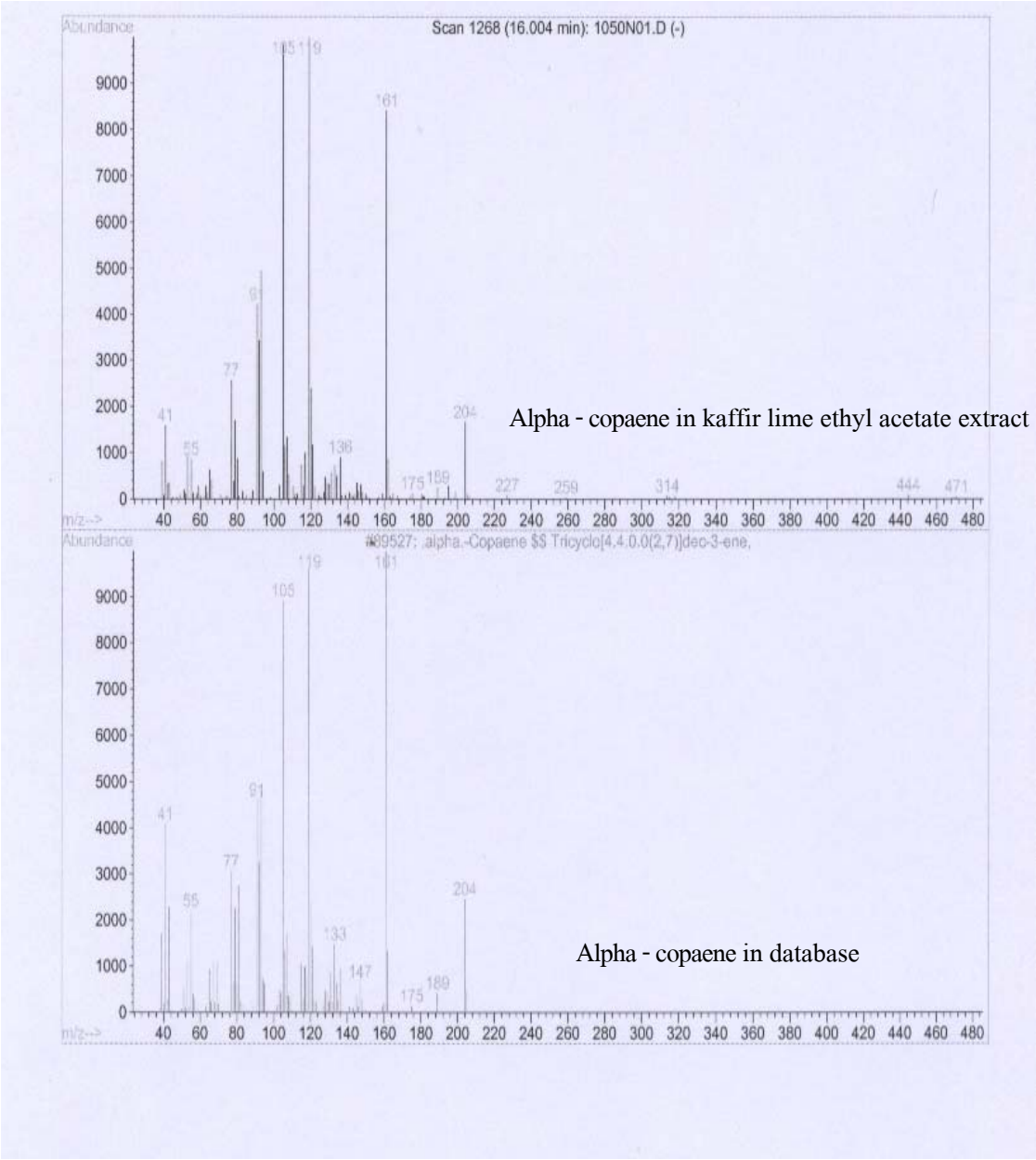


Figure 47. Mass spectrum comparison of alpha-copaene found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database.

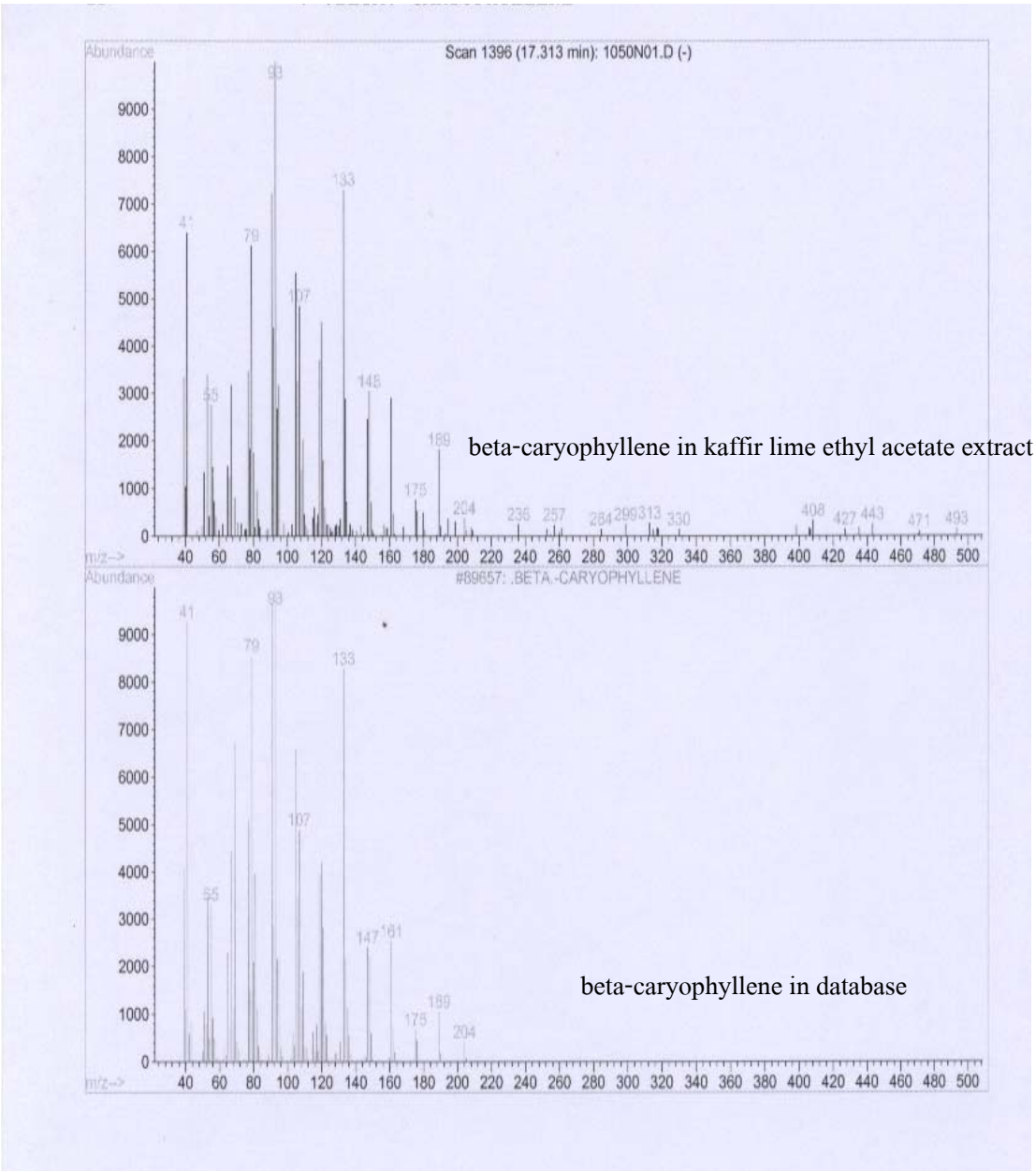


Figure 48. Mass spectrum comparison of beta-caryophyllen found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database.

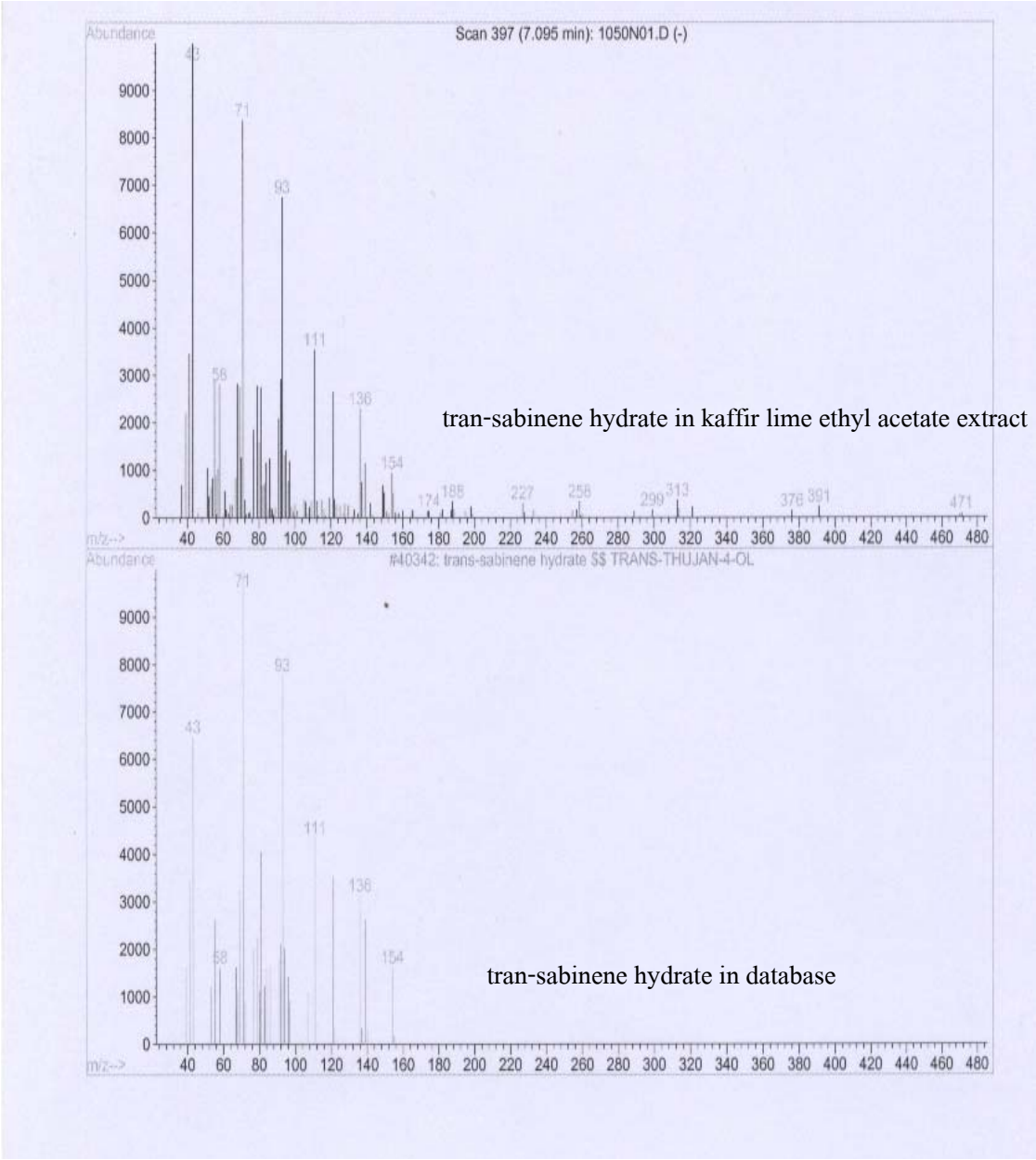


Figure 49. Mass spectrum comparison of tran-sabinene found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database.

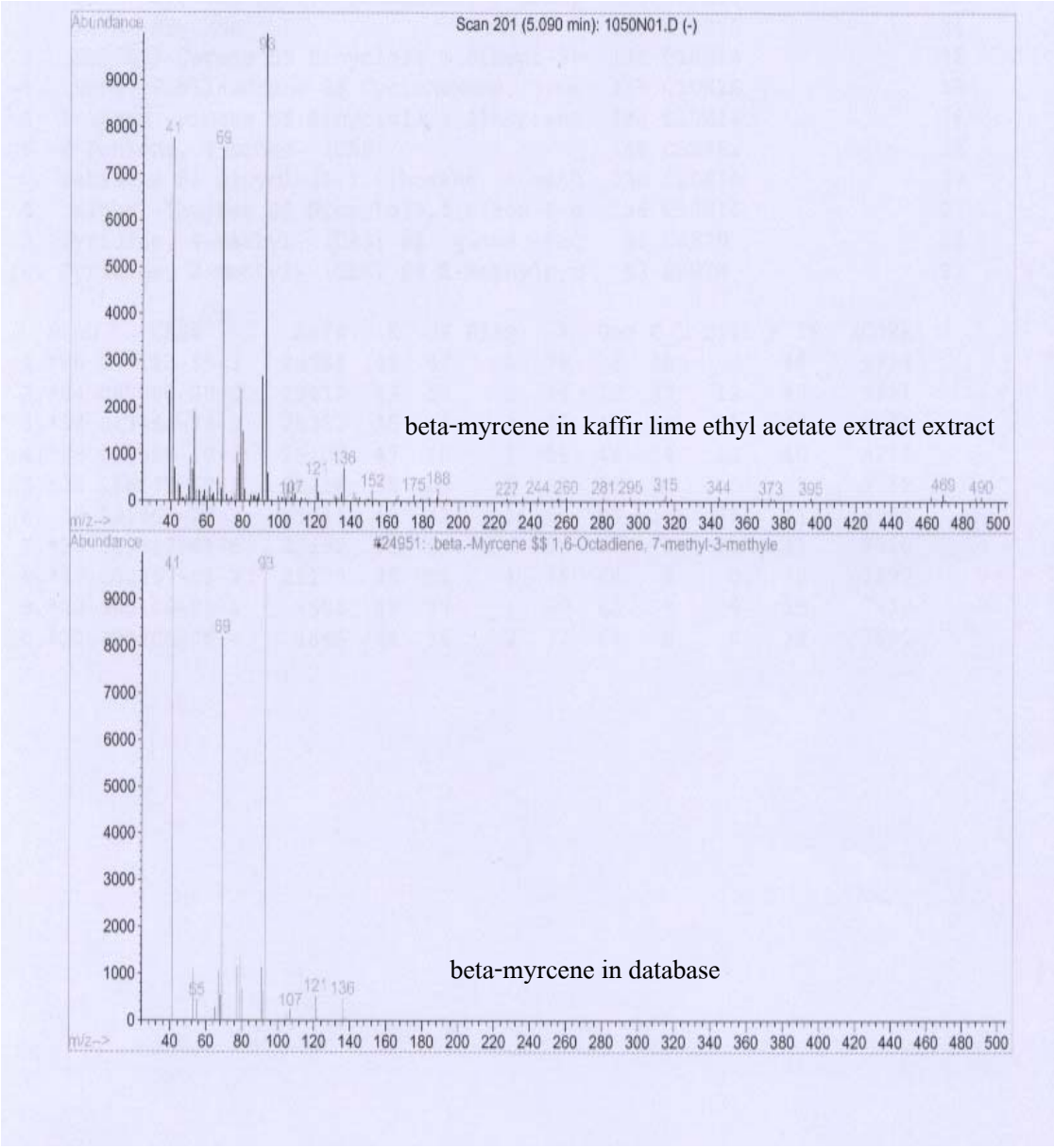


Figure 50. Mass spectrum comparison of beta-myrcene found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database.

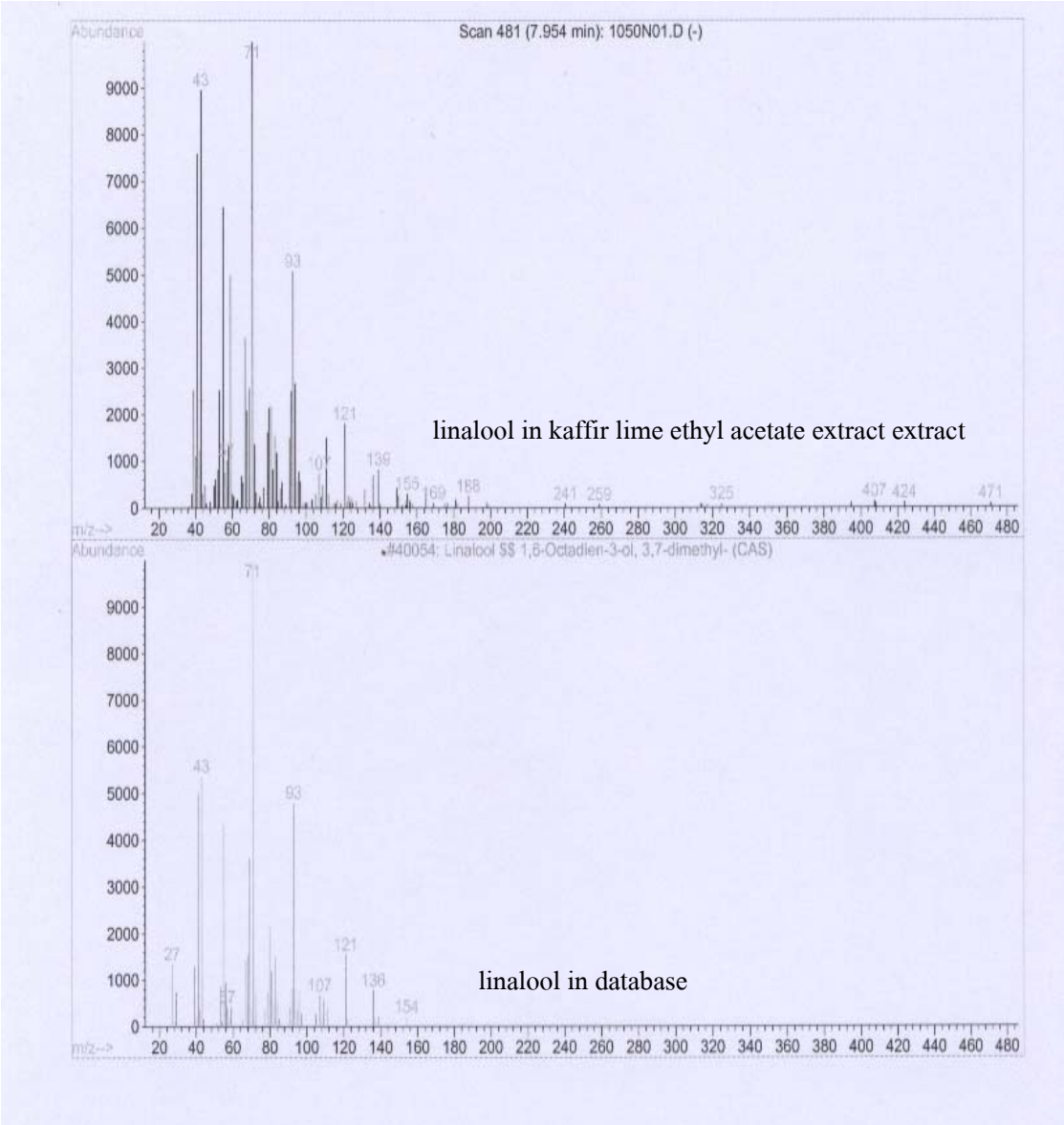


Figure 51. Mass spectrum comparison of linalool found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database.

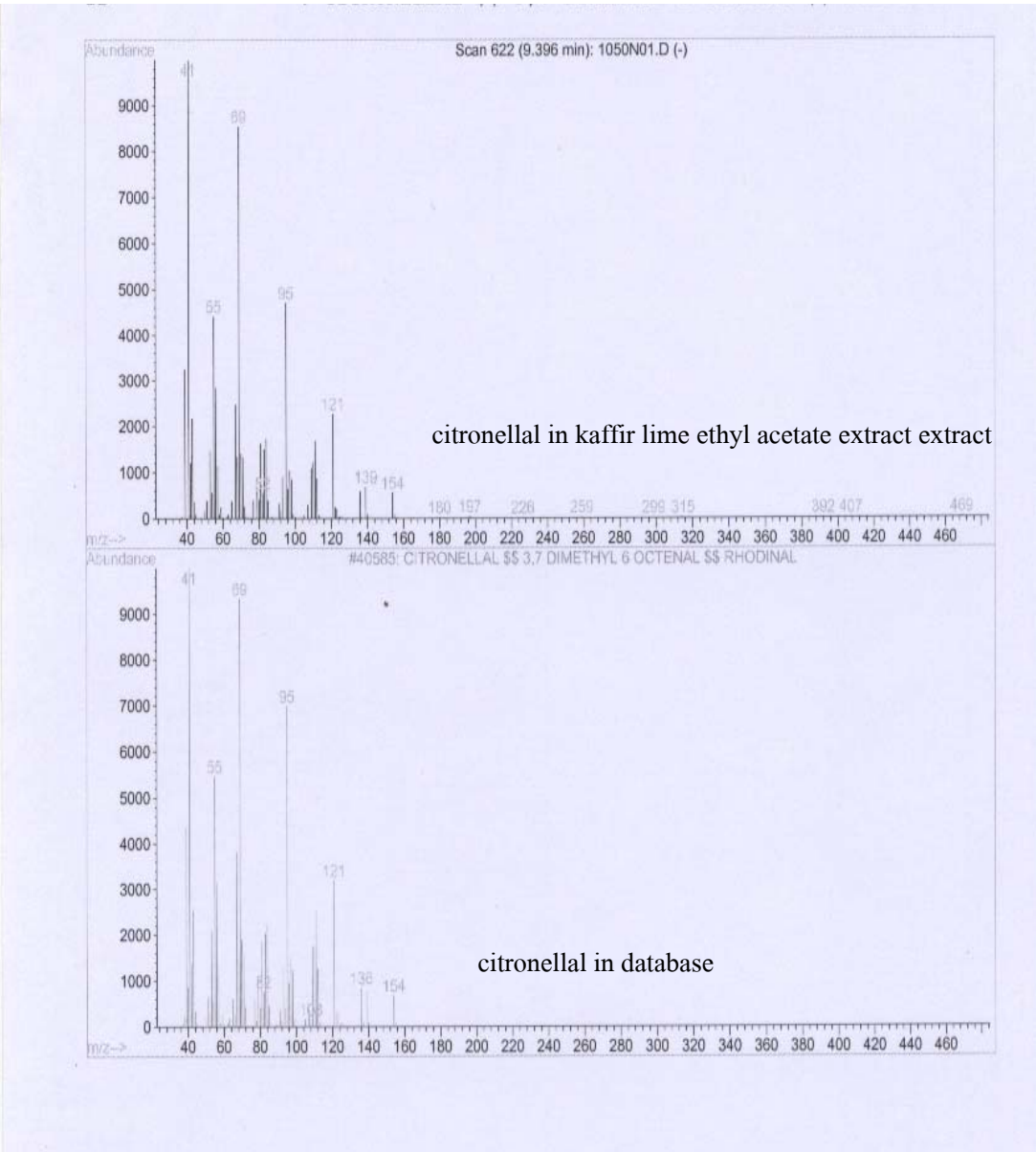
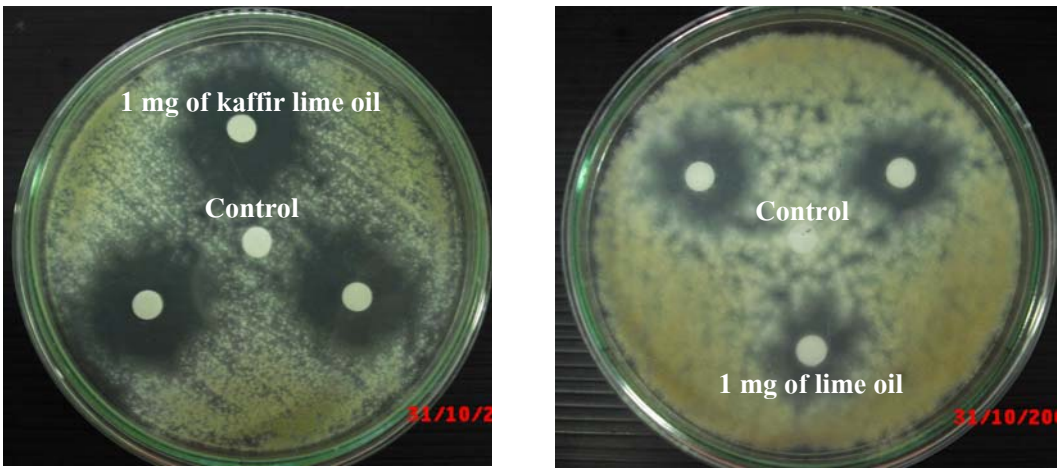


Figure 52. Mass spectrum comparison of citronellal found in ethyl acetate extract from kaffir lime peel with that in database.



A B

Figure 53. Inhibitory activity of kaffir lime oil against *Aspergillus parasiticus* (A) lime oil against *Aspergillus flavus* (B).

Table 12. Inhibitory activity of lime essential oil (0-1.13 mg/ml concentration) against *Aspergillus flavus* TISTR 3041 in PDB (log CFU/ml).

Time (h)	Survival counts (log CFU/ml)			
	0	0.28	0.56	1.13
0	5.42±0.05	5.42±0.06	5.29±0.08	5.36±0.05
3	5.24±0.05	4.50±0.09	3.81±0.17	3.23±0.06
6	5.14±0.06	4.11±0.10	2.84±0.11	2.44±0.15
12	4.92±0.12	4.32±0.05	2.55±0.18	1.64±0.09
15	5.06±0.10	4.57±0.06	3.12±0.11	1.12±0.07
20	5.11±0.08	4.67±0.10	3.74±0.11	0.00±0.00
24	5.25±0.08	4.63±0.06	4.27±0.10	0.00±0.00
30	5.26±0.06	4.99±0.10	4.29±0.04	0.00±0.00
48	6.67±0.20	6.15±0.06	4.32±0.06	0.00±0.00

Table 13. Inhibitory activity of kaffir lime essential oil (0-1.13 mg/ml concentration) against *Aspergillus parasiticus* TISTR 3041 in PDB (log CFU/ml).

Time (h)	Survival counts (log CFU/ml)			
	0	0.28	0.56	1.13
0	5.43±0.06	5.34±0.07	5.36±0.04	5.37±0.08
3	4.79±0.07	4.11±0.12	3.61±0.07	3.13±0.08
6	4.81±0.09	4.16±0.10	3.22±0.05	1.84±0.14
12	4.60±0.15	4.34±0.04	2.90±0.10	1.83±0.07
15	4.88±0.06	4.20±0.06	3.08±0.07	1.50±0.11
20	5.15±0.06	4.31±0.06	3.46±0.06	1.41±0.09
24	5.19±0.10	4.81±0.08	3.82±0.07	0.00±0.00
30	5.22±0.07	4.92±0.10	4.21±0.13	0.00±0.00
48	6.37±0.09	5.55±0.05	4.28±0.05	0.00±0.00

Table 14. Effect of lime and kaffir lime peel essential oils on growth and aflatoxin production of *A. flavus* and *A. parasiticus* in YES medium.

Citrus cultivars	Oil concentration (mg/ml)	*A. flavus*		*A. parasiticus*	
		mycelium dry weight (mg/ml)	AFB1 concentration (μg/ml)	mycelium dry weight (mg/ml)	AFB1 concentration (μg/ml)
lime peel	0	251.20±3.36	13.43±0.07	ND	ND
	0.28	194.40±0.35	12.44±0.41	ND	ND
	0.56	125.70±2.44	9.80±0.03	ND	ND
	1.13	102.21±5.66	6.92±0.09	ND	ND
	2.25	0.00±0.00	0.00±0.00	ND	ND
kaffir lime peel	0	ND	ND	489.33±3.79	20.58±0.63
	0.28	ND	ND	383.70±2.79	10.71±0.63
	0.56	ND	ND	227.33±2.08	8.51±0.43
	1.13	ND	ND	198.00±2.65	4.85±0.05
	2.25	ND	ND	49.66±1.53	2.02±0.06

Table 15. Effect of kaffir lime essential oil on growth of *A. parasiticus* in maize kernel stored at room temperature under 90% RH.

	Time (days)						
	0	3	5	7	14	21	28
EO concentration (mg/ml)	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g
0	5.33±0.07 ^{a}	8.62±0.31 ^{b}	9.08±0.69 ^{bc}	9.41±0.71 ^{de}	9.61±0.53 ^{f}	9.67±0.41 ^{f}	9.95±0.65 ^{g}
25	5.54±0.06 ^{a}	7.70±0.35 ^{b}	8.18±0.26 ^{b}	8.68±0.42 ^{c}	9.09±0.26 ^{c}	9.62±0.30 ^{c}	9.83±0.55 ^{d}
30	5.36±0.12 ^{a}	0.00±0.00 ^{b}	7.46±0.61 ^{c}	8.23±0.25 ^{c}	8.56±0.42 ^{d}	9.33±0.38 ^{d}	9.55±0.57 ^{d}
40	5.51±0.07 ^{a}	0.00±0.00 ^{b}	0.00±0.00 ^{b}	7.20±0.62 ^{c}	8.39±0.35 ^{d}	8.88±0.77 ^{e}	9.24±0.63 ^{e}
50	5.59±0.13 ^{a}	0.00±0.00 ^{b}	0.00±0.00 ^{b}	0.00±0.00 ^{b}	6.60±0.40 ^{a}	6.82±0.43 ^{b}	8.34±0.39 ^{b}
60	5.54±0.08 ^{a}	0.00±0.00 ^{b}	0.00±0.00 ^{b}	0.00±0.00 ^{b}	0.00±0.00 ^{b}	6.47±0.84 ^{c}	7.96±0.40 ^{d}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Table 16. Effect of kaffir lime essential oil on aflatoxin producion of *A. parasiticus* in maize kernel stored at room temperature under 90% RH .

	Time (days)						
	0	3	5	7	14	21	28
EO concentration (mg/ml)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)
0	0.00±0.00 [a]	3.75±0.78 [b]	20.67±1.04 [c]	74.64±3.97 [d]	54.20±1.18 [e]	58.57±6.67 [e]	54.29±6.67 [e]
25	0.00±0.00 [a]	0.18±0.17 [a]	9.00±0.87 [b]	64.78±4.41 [c]	42.88±2.90 [d]	36.50±1.41 [f]	35.34±1.17 [f]
30	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.58±0.02 [a]	34.82±1.88 [b]	28.64±5.44 [b]	27.24±0.99 [b]	30.13±0.98 [b]
40	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.88±0.35 [a]	2.79±1.14 [b]	9.77±1.17 [c]	19.13±1.23 [d]
50	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	1.85±0.78 [a]	1.13±1.19 [ab]	3.55±1.34 [c]
60	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.68±0.55 [b]	0.76±0.74 [b]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Table 17. Effect of lime essential oil on growth of *A. flavus* in maize kernel stored at room temperature under 90% RH.

	Time (days)						
	0	3	5	7	14	21	28
EO concentration (mg/ml)	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g
0	5.45±0.13 ^{a}	8.65±0.28 ^{b}	8.74±0.23 ^{bc}	9.32±0.17 ^{cd}	9.58±0.16 ^{d}	9.60±0.61 ^{d}	10.33±0.60 ^{e}
25	5.46±0.14 ^{a}	8.67±0.15 ^{b}	8.82±0.15 ^{b}	9.27±0.16 ^{c}	9.20±0.20 ^{c}	9.34±0.24 ^{c}	9.89±0.27 ^{d}
30	5.47±0.09 ^{a}	0.00±0.00 ^{b}	8.00±0.50 ^{c}	8.44±0.50 ^{c}	9.16±0.25 ^{d}	9.34±0.31 ^{d}	9.62±0.21 ^{d}
40	5.49±0.04 ^{a}	0.00±0.00 ^{b}	0.00±0.00 ^{b}	7.26±0.25 ^{c}	8.27±0.33 ^{d}	9.24±0.23 ^{e}	9.26±0.24 ^{e}
50	5.44±0.05 ^{a}	0.00±0.00 ^{b}	0.00±0.00 ^{b}	0.00±0.00 ^{b}	5.56±0.49 ^{a}	7.43±0.42 ^{c}	7.66±0.64 ^{c}
60	5.55±0.04 ^{a}	0.00±0.00 ^{b}	0.00±0.00 ^{b}	0.00±0.00 ^{b}	0.00±0.00 ^{b}	4.58±0.42 ^{c}	5.86±0.90 ^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Table 18. Effect of lime essential oil on aflatoxin production of *A. flavus* in maize kernel stored at room temperature under 90% RH.

	Time (days)						
	0	3	5	7	14	21	28
EO concentration (mg/ml)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)
0	0.00±0.00 ^{a}	0.62±0.05 ^{a}	18.93±1.15 ^{b}	84.66±4.09 ^{c}	42.04±4.91 ^{d}	47.68±4.87 ^{d}	73.40±2.82 ^{e}
25	0.00±0.00 ^{a}	0.18±0.02 ^{a}	10.05±0.18 ^{b}	37.99±2.41 ^{c}	31.20±3.40 ^{de}	27.76±3.77 ^{d}	32.82±2.17 ^{e}
30	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.90±0.07 ^{a}	4.32±0.20 ^{a}	17.01±2.95 ^{b}	25.66±4.78 ^{c}	30.70±4.63 ^{d}
40	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	1.50±0.96 ^{b}	6.71±1.92 ^{c}	18.09±2.70 ^{d}	19.10±3.30 ^{d}
50	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	1.39±0.98 ^{a}	10.52±2.54 ^{b}	12.05±2.77 ^{b}
60	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.87±1.17 ^{a}	2.57±1.48 ^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Table 19. Effect of kaffir lime essential oil on growth of *A. parasiticus* in maize kernel stored at room temperature.

	Time (days)						
	0	3	5	7	14	21	28
EO concentration (mg/ml)	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g
0	5.16±0.01 [a]	8.51±0.27 [b]	8.83±0.11 [c]	9.12±0.14 [c]	9.40±0.10 [d]	9.49±0.11 [d]	9.83±0.16 [e]
25	5.26±0.08 [a]	0.00±0.00 [b]	7.72±0.12 [c]	8.25±0.12 [d]	8.76±0.12 [e]	9.21±0.10 [f]	9.57±0.18 [g]
30	5.19±0.01 [a]	0.00±0.00 [b]	0.00±0.00 [b]	6.96±0.33 [c]	8.14±0.15 [d]	8.28±0.16 [d]	9.24±0.13 [e]
40	5.11±0.02 [a]	0.00±0.00 [b]	0.00±0.00 [b]	0.00±0.00 [b]	7.37±0.11 [c]	8.32±0.12 [d]	8.62±0.14 [e]
50	5.13±0.02 [a]	0.00±0.00 [b]	0.00±0.00 [b]	0.00±0.00 [b]	5.39±0.11 [c]	6.34±0.12 [d]	6.55±0.18 [e]
60	5.14±0.01 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Table 20. Effect of kaffir lime essential oil on aflatoxin production of *A. parasiticus* in maize kernel stored at room temperature.

	Time (days)						
	0	3	5	7	14	21	28
EO concentration (mg/ml)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)
0	0.00±0.00 ^{a}	0.53±0.12 ^{a}	15.17±0.15 ^{b}	54.53±4.17 ^{c}	40.71±0.53 ^{d}	53.07±2.32 ^{c}	57.81±6.99 ^{c}
25	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	9.96±0.16 ^{b}	32.23±3.46 ^{ce}	21.25±3.68 ^{d}	30.75±2.36 ^{c}	35.11±1.02 ^{e}
30	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	4.98±0.88 ^{b}	9.31±1.38 ^{c}	26.93±0.97 ^{d}	30.02±2.25 ^{e}
40	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.23±0.10 ^{b}	5.55±0.12 ^{c}	13.30±0.23 ^{d}
50	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.20±0.97 ^{a}	8.48±2.25 ^{b}
60	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}	0.00±0.00 ^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Table 21. Effect of lime essential oil on growth of *A. flavus* in maize kernel stored at room temperature.

	Time (days)						
	0	3	5	7	14	21	28
EO concentration (mg/ml)	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g	log CFU/g
0	5.06±0.57^{a}	8.36±0.32^{b}	8.61±0.45^{b}	8.93±0.21^{bc}	9.27±0.30^{cd}	9.34±0.15^{de}	9.74±0.24^{f}
25	5.09±0.09^{a}	0.00±0.00^{b}	7.52±0.46^{c}	8.16±0.14^{d}	8.65±0.39^{e}	9.19±0.20^{f}	9.66±0.15^{g}
30	5.20±0.01^{a}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	8.00±0.26^{c}	8.23±0.20^{c}	9.22±0.20^{d}
40	5.17±0.01^{a}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	6.97±0.75^{c}	7.95±0.15^{d}	8.55±0.51^{d}
50	5.12±0.02^{a}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	7.20±0.28^{c}	7.30±0.50^{c}
60	5.17±0.02^{a}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Table 22. Effect of lime essential oil on aflatoxin production of *A. flavus* in maize kernel stored at room temperature.

EO concentration (mg/ml)	Time (days)						
	0	3	5	7	14	21	28
	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)	AFB1(μg/g)
0	0.00±0.00 [a]	0.36±0.07 [a]	16.18±0.16 [b]	52.86±2.51 [c]	39.35±2.04 [d]	51.20±1.59 [c]	60.63±1.27 [e]
25	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	9.02±0.16 [b]	29.27±0.49 [c]	20.33±0.76 [d]	22.93±2.47 [e]	33.85±1.51 [f]
30	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	3.63±1.10 [b]	10.16±1.26 [c]	26.0±0.99 [d]
40	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.23±0.08 [a]	5.55±0.18 [b]	13.30±0.26 [c]
50	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.52±0.06 [a]	10.11±0.50 [b]
60	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]	0.00±0.00 [a]

หมายเหตุ ตัวอักษรที่ต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวเกศรินทร์ รามณี

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5011020002

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ผลิตกรรมชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนสถานวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และอาหารเพื่อสุขภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Rammanee, K. and Hongpattarakere, T. 2008. Antifungal activity of *Citrus* spp. peels extracts against food spoilage fungi. The 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology. October 14th-17th. Taksila Hotel, Mahasarakham, Thailand. p. 221-230.