



การปนเปื้อนของเชื้อราในถั่วลิสงและการควบคุม โดยใช้น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ

Fungal contamination in peanuts and control by spice essential oils

สุรีย์ นานาสมบัติ^{1*} นพพร กิตติศุภมงคล¹ นุชนาฏ หมั่นพลศรี¹ และปณิธาน กัณหา¹

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

*Corresponding Author, E-mail: snanasombat@gmail.com

บทคัดย่อ

ในการศึกษาการปนเปื้อนเชื้อราและยีสต์ในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสงชนิดละ 10 ตัวอย่าง โดยถั่วลิสงดิบและถั่วลิสงทอดทั้งเมล็ดผิวเคราะห์โดยวิธี direct plating ถั่วลิสงคั่วบดและถั่วลิสงตัดผิวเคราะห์โดยวิธี dilution plating ผลปรากฏว่าถั่วลิสงดิบมีการปนเปื้อนของเชื้อราสูง (ร้อยละ 86.2) ซึ่งมากกว่าการปนเปื้อนของเชื้อราในถั่วลิสงทอด (ร้อยละ 76.2) ส่วนถั่วลิสงคั่วบดและถั่วลิสงตัดผิวเคราะห์โดยวิธี direct plating พบเชื้อราและยีสต์ค่อนข้างน้อย (น้อยกว่า 10 ถึง 7.0×10^3 CFU ต่อกรัม) เชื้อราที่พบมากที่สุดที่ถั่วลิสงทั้ง 4 ชนิดคือ *Aspergillus* spp. รองลงมาเป็น *Rhizopus* spp. และ *Penicillium* spp. และได้หาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (minimum inhibitory concentration, MIC) ของน้ำมันกระวาน น้ำมันกานพลูและน้ำมันเทียนตาตักแตนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *A. ochraceus* TISTR 3557, *A. parasiticus* TISTR 3276, *A. terreus* TISTR 3109, *A. versicolor* TISTR 3460, *Alternaria alternata* TISTR 3282, *Penicillium citrinum* TISTR 3437 และ *A. flavus* PN-09 ที่แยกได้จากถั่วลิสงดิบ เชื้อราส่วนใหญ่ที่ทดสอบมีความไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันกานพลูมากที่สุด (ค่า MIC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ยกเว้น *A. versicolor* น้ำมันเทียนตาตักแตนมีประสิทธิภาพรองลงมาคือ ยับยั้งการเจริญของเชื้อราเกือบทุกชนิดได้ที่ค่า MIC เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นเชื้อรา *A. ochraceus* และ *A. versicolor* ที่ค่อนข้างต้านทาน ส่วนน้ำมันกระวานมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราทุกชนิดที่ทดสอบน้อยกว่า (ค่า MIC เท่ากับ 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นจึงได้นำน้ำมันกานพลูและน้ำมันเทียนตาตักแตนมาทดลองเคลือบที่ผาด้านในของจานเพาะเชื้อที่ใช้บรรจุถั่วลิสงเพื่อควบคุมการเจริญและการสร้างสาร อะฟลาทอกซินของ *A. flavus* TISTR 3041 และ *A. flavus* PN-09 ในถั่วลิสงดิบที่ปนเปื้อนเชื้อรานี้ร้อยละ 100 โดยได้ตรวจดูปริมาณการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสงหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ

30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 ครบ 7 วัน พบว่าการใช้น้ำมันกานพลูและน้ำมันเทียนตาตุ๊กแทนที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลทำให้การเจริญของเส้นใยเชื้อราที่ผิวของถั่วลิสงลดลงและมีแนวโน้มช่วยลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่สร้างโดย *A. flavus* ทั้งสองสายพันธุ์

ABSTRACT

In this study, peanut and peanut products (10 samples each) were analysed for fungal contamination. Percentage of fungal contamination in raw whole peanut and fried peanut samples was analysed by direct plating method, while total yeast and mold counts in ground roasted peanut and sweet peanut samples were analysed by dilution plating method. Raw whole peanut samples (86.2%) were highly contaminated with mold, but fried peanut samples (76.2%) had lower proportion of mold contamination. However, ground roasted and sweet peanut samples had low number of total yeast and mold counts (less than $10 - 7.0 \times 10^3$ CFU/g). The minimum inhibitory concentrations (MICs) of clove, dill and cardamom oils against *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *A. ochraceus* TISTR 3557, *A. parasiticus* TISTR 3276, *A. terreus* TISTR 3109, *A. versicolor* TISTR 3460, *Alternaria alternata* TISTR 3282, *Penicillium citrinum* TISTR 3437 and *A. flavus* PN-09 isolated from a raw whole peanut sample were determined. Most fungal species were sensitive to clove oil with the MIC of 1 mg/ml, except for *A. versicolor*. Dill oil, a less effective oil inhibited growth of most mold strains tested (4 mg/ml MIC), except for *A. ochraceus* and *A. versicolor*, more resistant strains. Cardamom oil was found to be a less effective oil for inhibition of all mold strains tested (16 mg/ml MIC). Therefore, clove and dill oils were selected for use in peanut packaging. Clove and dill oils (4 mg/ml) were applied by coating the inner surface lids of the petridishes containing peanut seeds. The peanut seeds (100%) were contaminated with *A. flavus* TISTR 3041 and *A. flavus* PN-09 spores. After 7-day storage at 30 °C, 75% relative humidity, the amount of fungal growth and aflatoxin content in the peanut seeds were determined. Clove and dill oils (4 mg/ml) caused decreasing of fungal growth and amount of aflatoxin produced by both strains of *A. flavus* in the peanut seeds.

คำสำคัญ: น้ำมันหอมระเหย ถั่วลิสง อะฟลาทอกซิน กระจวาน กานพลู เทียนตาตุ๊กแทน

Keywords: Essential oils, Peanut, Aflatoxin, Cardamom, Clove, Dill

บทนำ

ถั่วลิสงจัดอยู่ในวงศ์ Fabaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Arachis hypogaea* L. เป็นพืชที่ปลูกในประเทศต่างๆ ทั่วโลก ประเทศที่ปลูกถั่วลิสงมากที่สุดในโลก ได้แก่ ประเทศจีนและประเทศอินเดีย ตามด้วยประเทศสหรัฐอเมริกา เมล็ดถั่วลิสงมีคุณค่าทางอาหารสูง ในเมล็ดถั่วลิสงมีน้ำมันร้อยละ 40-60 โปรตีนร้อยละ 20-40 และคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 10-20 นอกจากนี้ยังอุดมไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุหลายชนิด เช่น วิตามินอี ไนอะซิน แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม สังกะสี ธาตุเหล็ก ไบโอฟลาวิน ไตรเอมีน และโพแทสเซียม ส่วนใหญ่นิยมนำถั่วลิสงมารับประทานโดยตรง ใช้ในอุตสาหกรรมขนมหวาน ใช้ในการสกัดน้ำมันสำหรับทำอาหาร และยังใช้เป็นวัตถุดิบหลักที่ให้โปรตีนในการผลิตอาหารสัตว์ จากประโยชน์ที่หลากหลายจึงทำให้ถั่วลิสงเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่ทำรายได้ทั้งในประเทศและระหว่างประเทศ (Pandey et al., 2012)

การปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อราพบได้ทั่วไปในถั่วลิสง สาเหตุหลักๆ มักมาจากการเก็บรักษาที่ไม่ถูกวิธีเช่น การเก็บในสภาวะที่มีความชื้นสูง เชื้อราหลายชนิดที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงส่วนมากเป็นเชื้อราในสกุล *Aspergillus* spp. เช่น *A. flavus* ที่พบในถั่วลิสงได้มากที่สุด (Shukla et al., 2009) ซึ่งเชื้อรา *A. flavus* จะสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินชนิด บี 1 บี 2 จี 1 และจี 2 โดยเฉพาะสารอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์ ซึ่งสารพิษชนิดนี้จะสะสมอยู่ภายในตับ ทำให้เกิดโรคมะเร็งตับและยังพบว่ามีส่วนในการทำลายระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนเช่น ไวรัสตับอักเสบบชนิดบีได้ (Ding et al., 2012)

น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศหลายชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา มีรายงานมากมายที่เกี่ยวข้องกับสมุนไพรมักกลิ่นหอมซึ่งมีสารประกอบบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้เช่น อบเชย กานพลู เทียนตาตักแตน ไทม์ กระวาน ใบพลู มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. ได้ (Matan et al., 2006; Soliman and Badeaa, 2002; Shukla et al., 2009) และน้ำมันหอมระเหยบางชนิดยังมีประสิทธิภาพดีกว่ายาฆ่าเชื้อราอีกด้วย (Kazemi et al., 2012) จากที่กล่าวมาข้างต้นจึงน่าสนใจที่จะนำน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ ได้แก่ กระวาน กานพลูและเทียนตาตักแตนมาศึกษาสมบัติการต้านเชื้อราและประยุกต์ใช้ในภาชนะบรรจุถั่วลิสงเพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อราและการสร้างอะฟลาทอกซิน

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราในถั่วลิสง

ถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสงที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ถั่วลิสงดิบ ถั่วลิสงทอดทั้งเมล็ด ถั่วลิสงคั่วบด และถั่วลิสงตัดชนิดละ 10 ตัวอย่าง โดยสุ่มตัวอย่างจากตลาดและห้างสรรพสินค้าในกรุงเทพมหานคร จากนั้นได้นำตัวอย่างถั่วลิสงทั้งหมดมาวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity, a_w) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่องวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (AquaLab Series 3TE, Decagon Devices, Inc, USA) และวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อราดังนี้

1.1 การวิเคราะห์หาเชื้อราที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงดิบและถั่วลิสงทอดทั้งเมล็ดโดยวิธี direct plating

การวิเคราะห์หาเชื้อราที่ปนเปื้อนในเมล็ดถั่วลิสงโดยวิธี direct plating ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Tournas et al. (2001) ทำได้โดย ชั่งตัวอย่างถั่วลิสง

50 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ปราศจากเชื้อ เติมสารละลาย โซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 300 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ เขย่าอย่างแรง 2 นาที เพื่อชะล้างผิว จากนั้นล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง นำตัวอย่างเมล็ดถั่วมาวางบนผิวหน้าอาหาร เลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ acidified Potato Dextrose Agar (a_w 0.99) (PDA, Difco Laboratories, USA) ซึ่งได้ที่ปรับค่า pH ให้ได้ 3.5 ด้วยสารละลายกรดทาร์ทริกความเข้มข้นร้อยละ 10) และ Dichloran 18% Glycerol Agar (DG18, a_w 0.955) โดยใช้ปากคีบที่ปลอดเชื้อคีบเมล็ดถั่ววางลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 เมล็ดต่อจาน แต่ละตัวอย่างทำ 50 เมล็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อราและ นับจำนวนเมล็ดถั่วที่มีเชื้อราขึ้น ถ้ายังไม่พบการเจริญของเชื้อรา บ่มต่อไปอีกประมาณ 48 ชั่วโมง คำนวณหาจำนวนเมล็ดที่มีเชื้อราปนเปื้อนคิดเป็นร้อยละของจำนวนเมล็ดถั่วที่ใช้ของแต่ละตัวอย่าง

1.2 การวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดในถั่วลิสงคั่วบดและถั่วลิสงตัดด้วยวิธี dilution plating

การวิเคราะห์หาจำนวนเชื้อราและยีสต์ทั้งหมดในถั่วลิสงคั่วบดและถั่วลิสงตัดด้วยวิธี dilution plating โดยดัดแปลงตามวิธีของ Tournas et al. (2001) ซึ่งทำได้โดยชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่ในถุงพลาสติกสำหรับตีปน จากนั้นเติมสารละลายเปปโตเนอความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปตีปนด้วยเครื่องตีปน (stomacher) เป็นเวลา 2 นาที เจือจางตัวอย่างต่อไปอีก 2 ระดับ ความเจือจาง ปิเปตตัวอย่างที่แต่ละระดับความเจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ acidified PDA และ DG-18 จากนั้นใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลที่ปลอดเชื้อเกลี่ยตัวอย่าง

ให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เมื่อบ่มครบเวลาแล้วยังไม่พบการเจริญของเชื้อ บ่มเชื้อต่ออีก 48 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนโคโลนีของเชื้อราและยีสต์ รายงานจำนวนเชื้อราและยีสต์ที่พบเป็นค่า CFU ต่อกรัม

1.3 การแยกเชื้อรา

ในการแยกเชื้อรา ขั้นแรกสังเกตสีของโคโลนี การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะเส้นใยที่เจริญบนอาหาร กลิ่น ลักษณะหยดน้ำที่เกิดขึ้นบนโคโลนี จากนั้นเชยสปอร์ของเชื้อราที่มีลักษณะแตกต่าง แต่ละลงบนผิวหน้าอาหาร PDA จำนวน 3 จุด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ทำการแยกเชื้อราซ้ำหลายครั้งจนกระทั่งได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ แล้วถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหาร PDA ที่มีผิวหน้าลาดเอียง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการจำแนกชนิด

1.4 การจำแนกชนิดของเชื้อรา

การจำแนกชนิดของเชื้อราที่แยกได้ทำตามวิธีการของ Samson et al. (2004) ซึ่งทำได้โดย 1) สังเกตกลุ่มของโคโลนีด้วยวิธี direct macroscopic โดยนำเชื้อราที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อมาตรวจดูด้วยกล้องสเตอริโอไมโครสโคป (stereomicroscope) เพื่อสังเกตลักษณะและสีของเส้นใย ลักษณะของสปอร์ และอับสปอร์ สี ขนาด รูปร่าง การจัดเรียงตัวของอับสปอร์ และอื่นๆ และ 2) สังเกตลักษณะโครงสร้างของเชื้อราด้วยวิธี direct microscopic ซึ่งทำได้โดยเชยเชื้อราที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อมาทำ wet mount บนสไลด์เพื่อสังเกตลักษณะโครงสร้างของเชื้อรารายได้กล้องจุลทรรศน์

2. การศึกษาผลของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

การศึกษานี้ได้หาความเข้มข้นต่ำสุดของ น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ 3 ชนิด ได้แก่ กระวาน (*Amomum krevanh* ส่วนที่นำมาใช้คือ ผล) กานพลู (*Syzygium aromaticum* ส่วนที่นำมาใช้คือ ดอก) และเทียนตาตั๊กแตน (*Anethum graveolens* ส่วนที่นำมาใช้คือ ผล) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ซึ่งมี รายละเอียดดังนี้

2.1 การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ

นำเครื่องเทศทั้ง 3 ชนิดมากลั่นโดยใช้ชุดกลั่น Clevenger's apparatus เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติม anhydrous sodium sulphate เพื่อขจัดน้ำที่มีอยู่ในน้ำมันหอมระเหยออกแล้วกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 เก็บน้ำมันหอมระเหยไว้ในขวดแก้วสีขาบลดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา

ทำการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus flavus* TISTR 3041, *Aspergillus ochraceus* TISTR 3557, *Aspergillus parasiticus* TISTR 3276, *Aspergillus terreus* TISTR 3109, *Aspergillus versicolor* TISTR 3460, *Alternaria alternata* TISTR 3282, *Penicillium citrinum* TISTR 3437 และ *Aspergillus flavus* ที่แยกได้จาก ถั่วลิสงดิบในขั้นตอนที่ 1 โดยนำหลอดอาหาร PDA slant ที่มีเชื้อราแต่ละชนิดเจริญอยู่อายุ 7 วัน มาเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่มีส่วนผสมของ tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ใช้หลอดเขี่ยเชื้อเขี่ยเส้นใยให้หลุดออกจากผิวหน้าอาหาร นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง ปลอดเชื้อ 3-4 ชั้นเพื่อกรองเอาเศษขุ่นและเส้นใยเชื้อราออก นำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้ไปปรับความเข้มข้นของสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

ที่มีส่วนผสมของ tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2.3 การเตรียมอาหารถั่วลิสงจำลอง (Peanut Agar Medium)

อาหารจำลองจากถั่วลิสงนี้เตรียมได้โดยชั่งมันฝรั่ง 200 กรัม เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนเดือดเป็นเวลา 25 นาที จากนั้นเติมถั่วลิสงป่น 50 กรัม ลงไปต้มอีก 5 นาที กรองเอาแต่น้ำ นำมาเติมน้ำ 15 กรัม น้ำตาลเดริคซ์โตส 15 กรัม ทำให้น้ำละลาย นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดัดแปลงจาก Joseph et al., (2005) และ Tournas et al., (2001)

2.4 การหาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศในการต้านการเจริญของเชื้อรา

ในการหาความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยทั้ง 3 ชนิดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา จำนวน 8 สายพันธุ์ดังกล่าว ทำโดยวิธี agar dilution ตามวิธีการของ Collin et al. (2001) ได้ดังนี้ ขั้นแรกเตรียม stock solution ของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulphoxide, DMSO) ความเข้มข้นร้อยละ 10 เพื่อเติมลงในอาหารถั่วลิสงจำลองโดยเติมให้มีความเข้มข้นสุดท้ายต่างกันจำนวน 15 ระดับความเข้มข้น (0.125 - 22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ซึ่งทำได้โดยเติม stock solution ของน้ำมันหอมระเหยและน้ำกลั่นลงในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปลอดเชื้อ โดยให้ปริมาตรของน้ำมันหอมระเหยที่แต่ละความเข้มข้นและปริมาตรน้ำกลั่นรวมกันได้ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมอาหารถั่วลิสงจำลองที่ยังหมอมเหลวอยู่ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 19 มิลลิลิตรลงไป ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัวและมีผิวหน้าแห้ง แล้วจึงหยดสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราชนิดต่างๆที่ได้เตรียมไว้ลงโดยตรงกลางของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

ต่อจาก จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยชุดควบคุมเชิงลบใช้น้ำกลั่นแทน น้ำมันหอมระเหย เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม ตรวจสอบการเจริญของเชื้อราที่เกิดขึ้นในงานเพาะเชื้อที่แต่ละความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหย ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยซึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์คือค่า minimum inhibitory concentration (MIC) เปรียบเทียบค่า MIC ที่ได้และคัดเลือกน้ำมันที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจำนวน 2 ชนิดเพื่อทำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. การประยุกต์ใช้น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศในการควบคุมการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของ *Aspergillus flavus* ในถั่วลิสง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกน้ำมันจากสมุนไพร 2 ชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา โดยนำมาประยุกต์ใช้ในภาชนะบรรจุถั่วลิสงดิบเพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อราและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดย *A. flavus* TISTR 3041 และ *A. flavus* PN-09 ที่แยกได้จากถั่วลิสง

3.1 การเตรียมถั่วลิสง

นำตัวอย่างถั่วลิสงดิบใส่ลงในบีกเกอร์ปราศจากเชื้อ เติมน้ำละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 300 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ แล้วเขย่าอย่างแรงเป็นเวลา 2 นาที เพื่อชะล้างผิวของตัวอย่างและล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้ออีก 2 ครั้ง

3.2 การเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา

การเตรียมสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรา *A. flavus* TISTR 3041 และ *A. flavus* ซึ่งเจริญอยู่บนอาหาร PDA ทำได้โดยใช้วิธีการเดียวกับข้อ 2.2

3.3 การควบคุมการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* ในเมล็ดถั่วลิสง

การทดลองนี้ทำตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Prakash et al. (2012) ซึ่งทำได้โดยนำถั่วลิสงส่วนที่ 1 และส่วนที่ 2 มาเติมสารแขวนลอยของสปอร์ *A. flavus* TISTR 3041 และ *A. flavus* ที่แยกได้จากถั่วลิสงตามลำดับ คลุกสปอร์ให้ทั่วทุกเมล็ด นำถั่วลิสงที่ปนเปื้อนด้วยสปอร์เชื้อราร้อยละ 100 นี้ไปวางลงในงานเพาะเชื้อเปล่าที่ปลอดเชื้อ ประมาณ 20 กรัม ต่อจาก จากนั้นหยดน้ำมันหอมระเหย (ที่คัดเลือกความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในภาชนะด้านใน (เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่หยดน้ำมัน) นำไม้พันสำลีที่ปลอดเชื้อเกลี่ยน้ำมันให้ทั่วผิวฝาดจากนั้นตัดส่วนของหัวไม้พันสำลีที่มีน้ำมันหอมระเหยติดอยู่ทิ้งไว้ในงานก่อนปิดฝา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาพควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เมื่อบ่มจนครบ 7 วัน ตรวจสอบปริมาณการเจริญของเส้นใยเชื้อราที่ผิวเมล็ดถั่วลิสงและนำเมล็ดถั่วมาตรวจสอบปริมาณอะฟลาทอกซินปี 1 ด้วยวิธี Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

3.4 การตรวจหาปริมาณสารอะฟลาทอกซินปี 1 โดยวิธี ELISA

การตรวจหาสารอะฟลาทอกซินปี 1 ในถั่วลิสงทั้งเมล็ดทำโดยใช้ชุดทดสอบ DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit ของกรมวิชาการเกษตร ซึ่งทำได้ดังนี้ นำตัวอย่าง 20 กรัม มาบดให้ละเอียดในถุงพลาสติกโพลีเอทิลีน จากนั้นนำตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วใส่ในขวดรูปชมพู่เติมน้ำละลายเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีเพื่อแยกส่วนที่ใส แล้วเอาเฉพาะส่วนที่ใสมากรองผ่าน

กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 (ส่วนที่กรองได้มีความเข้มข้นเป็น 1:5 เท่า) จากนั้นเปิดส่วนใสที่กรองได้ 1 มิลลิลิตรผสมกับ PBS-T ความเข้มข้น 0.01 M ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จะได้สารสกัดที่มีระดับความเจือจางเป็น 1:20 เท่า จากนั้นหยดอะฟลาทอกซินมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 5 ระดับ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุมทดสอบ/ความเข้มข้น และหยดสารสกัดตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 1:20 เท่า ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบที่เหลือ หยดเอนไซม์คอนจูเกต (AFB_1 -HRP conjugate) ที่เจือจางใน conjugate buffer แล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุมทดสอบตามลงไปทุกหลุม เขย่าเล็กน้อยแล้วนำไปไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20-30 นาที เมื่อครบเวลา เทสารในหลุมทดสอบทิ้ง แล้วล้างหลุมทดสอบด้วย washing buffer (PBS-T ความเข้มข้น 0.01 M) จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นหยดสารยับยั้งเอนไซม์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลุมทดสอบทุกหลุม นำไปไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-10 นาที จะเกิดปฏิกิริยาเป็นสีฟ้าสามารถอ่านผลเชิงคุณภาพได้ด้วยสายตาโดยเปรียบเทียบกับสีฟ้าของสารพิษมาตรฐาน ตัวอย่างที่มีสีฟ้าเข้มแสดงว่าไม่มีสารพิษหรือมีน้อย แต่ถ้าตัวอย่างมีสีฟ้าจางหรือขาวแสดงว่ามีสารพิษมาก จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 0.5 M ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาจะเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง นำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของสารพิษมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อนำไปใช้ในคำนวณหาปริมาณสารอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง ค่าที่คำนวณได้ต้องคูณด้วย 20 (dilution factor) จะได้เป็นค่าความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่างในหน่วย ppb (นาโนกรัมต่อกรัม)

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. การปนเปื้อนของเชื้อราในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสง

ถั่วลิสงดิบมีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อราค่อนข้างสูงโดยพบเชื้อราเจริญบนอาหาร DG18 มากกว่าบนอาหาร acidified PDA ปริมาณเชื้อราที่ปนเปื้อนเฉลี่ยที่พบบนอาหาร Acidified PDA และอาหาร DG18 คิดเป็นร้อยละ 48.6 และร้อยละ 86.2 ตามลำดับ สำหรับถั่วลิสงทอดพบการปนเปื้อนของเชื้อราเฉลี่ยในอาหาร Acidified PDA และ DG18 ใกล้เคียงกันคือ พบร้อยละ 70.8 และร้อยละ 76.2 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งจะเห็นว่า เมล็ดถั่วลิสงที่วางบนอาหาร DG18 มีเชื้อราเจริญมากกว่าบนอาหาร acidified PDA ทั้งนี้เป็นเพราะอาหาร DG18 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดค่า a_w (มีค่า a_w 0.955) เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อรา xerophilic mold ที่ปนเปื้อนในอาหารแห้ง เมื่อทำการแยกเชื้อราที่เจริญบนถั่วลิสงดิบและถั่วลิสงทอดแล้วนำมาจำแนกชนิด ผลปรากฏว่าพบเชื้อรา *Aspergillus* spp. มากที่สุด รองลงมาคือ *Rhizopus* spp. และ *Penicillium* spp. โดยพบ *Aspergillus* spp. บนถั่วลิสงคิดเป็นร้อยละ 50 และร้อยละ 68 ของเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดในอาหาร Acidified PDA และ DG18 ตามลำดับ จึงได้คัดเลือก *Aspergillus* 1 ไอโซเลตที่แยกได้จากถั่วลิสงดิบตัวอย่างที่ 9 และขึ้นบนอาหาร DG18 มาจำแนกชนิดถึงระดับ species พบว่าเป็นเชื้อรา *A. flavus* ส่วนในตัวอย่างถั่วลิสงทอดพบเชื้อรา *Aspergillus* spp. เป็นจำนวนร้อยละ 56.52 และร้อยละ 39.29 ของเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมดในอาหาร Acidified PDA และ DG18 ตามลำดับ

ส่วนปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อราในถั่วลันเตา คั่วบดและถั่วลันเตาสดเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี dilution plating พบว่าถั่วลันเตาคั่วบดส่วนใหญ่มีจำนวนเชื้อรา และยีสต์ทั้งหมดค่อนข้างน้อยโดยพบการเจริญของเชื้อราบนอาหาร acidified PDA จำนวนน้อยกว่า 10 ถึง 7.0×10^3 CFU ต่อกรัม และบนอาหาร DG18 พบจำนวนน้อยกว่า 10 ถึง 2.5×10^2 CFU ต่อกรัม ส่วนถั่วลันเตาสดมีปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อราบนอาหาร

acidified PDA จำนวน 5×10^1 ถึง 3.5×10^3 CFU ต่อกรัม และบนอาหาร DG18 พบจำนวนน้อยกว่า 10 ถึง 2.5×10^3 CFU ต่อกรัม พบว่าบางโคลนนี้เป็นยีสต์ โดยเฉพาะจากถั่วตัด และพบเชื้อรา *Aspergillus* spp. บ้างเล็กน้อย นอกจากนี้ยังได้วัดค่า a_w ของถั่วลันเตาคั่วบดและถั่วลันเตาสดพบว่า มีค่า a_w ค่อนข้างต่ำ (0.35 – 0.37) ส่วนถั่วลันเตาสดและถั่วลันเตาทอดมีค่า a_w สูงกว่า คือระหว่าง 0.56 – 0.61

ตารางที่ 1 การปนเปื้อนของเชื้อราในถั่วลันเตาสดและถั่วลันเตาทอดทั้งเมล็ด

ชนิดถั่ว	a_w ^a	การปนเปื้อน (ร้อยละ) ^a		เชื้อราที่แยกได้ (จำนวนไอโซเลต)	
		acidified PDA	DG18	acidified PDA	DG18
ถั่วลันเตาสด	0.61	48.6	86.2	<i>Aspergillus</i> (23) <i>Rhizopus</i> (16) <i>Penicillium</i> (6)	<i>Aspergillus</i> (17) <i>Rhizopus</i> (6) <i>Penicillium</i> (2)
ถั่วลันเตาทอด	0.56	70.8	76.2	<i>Aspergillus</i> (13) <i>Rhizopus</i> (7) <i>Penicillium</i> (3)	<i>Aspergillus</i> (11) <i>Rhizopus</i> (13) <i>Penicillium</i> (4)

^a ข้อมูลที่ได้รายงานไว้คือ ค่าเฉลี่ยของข้อมูล 10 ตัวอย่าง

a_w หมายถึงปริมาณน้ำอิสระของตัวอย่างวัดที่อุณหภูมิ 25°C

การที่พบเชื้อราปนเปื้อนมากในถั่วลันเตาสดชี้ให้เห็นถึงสภาวะการผลิที่ไม่ดีคาดว่าเป็นการปนเปื้อนในถั่วลันเตาจะมาจากเชื้อราในสภาพแวดล้อมหลังการเก็บเกี่ยว เช่น ในดิน อากาศ น้ำ และอื่นๆ นอกจากนี้อาจเป็นผลมาจากกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาที่ไม่เหมาะสม จึงทำให้ถั่วลันเตาและผลิตภัณฑ์จากถั่วลันเตาปนเปื้อนโดยเชื้อราได้ง่าย

2. สมบัติการต้านการเจริญของเชื้อราโดยน้ำมันกระวาน น้ำมันกานพลูและน้ำมันเทียนตาตักแตน

น้ำมันกานพลู สามารถออกฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อราทุกสายพันธุ์ได้ดีที่สุด เชื้อราเกือบทุกสายพันธุ์ไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันกานพลูมากที่สุด (ค่า MIC เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ยกเว้น

A. versicolor ค่อนข้างต้านทานต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันกานพลูมากกว่า (ค่า MIC เท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) น้ำมันหอมระเหยที่มีประสิทธิภาพรองลงมาได้แก่ น้ำมันเทียนตาตักแตน เชื้อรา *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. terreus*, *P. citrinum*, *Al. alternata* ค่อนข้างไวต่อการถูกยับยั้งโดยน้ำมันเทียนตาตักแตน (ค่า MIC 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มากกว่า *A. ochraceus* และ *A. versicolor* (ค่า MIC 6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เชื้อราทุกสายพันธุ์ค่อนข้างต้านทานต่อน้ำมันกระวาน (ค่า MIC 16 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ

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

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลงานวิจัยอื่นๆ เช่น Matan et al. (2011) พบว่าน้ำมันกานพลูยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิดได้ดีกว่าน้ำมันจากสมุนไพรชนิดอื่นเช่น *Mucor dimorphosporus*, *Penicillium* spp., *A. niger* และ *Rhizopus* spp. ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในน้ำมันกานพลูมีสารสำคัญหลายชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราได้ Omidbeygi et al. (2007) ได้รายงานไว้ในน้ำมันกานพลูมีสารสำคัญหลายชนิด โดยเฉพาะยูจีนอล (eugenol) ซึ่งพบมากถึงร้อยละ 63.37 ยูจีนอลมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา Komala et al. (2012) พบว่ายูจีนอล (8.025 ไมโครกรัมต่อกรัม) มีผลโดยตรงในการยับยั้งอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ผลิตโดย *A. flavus* ในข้าว

ฟางได้อย่างสมบูรณ์และ Karapinar (1990) พบว่ายูจีนอล (400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สามารถยับยั้งการเจริญของ *A. parasiticus* ได้อย่างสมบูรณ์

น้ำมันเทียนตาตุ๊กแทน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราออกจากน้ำมันกานพลู Singh et al. (2005) พบสารประกอบ 35 ชนิดในน้ำมันเทียนตาตุ๊กแทน โดยมีสารประกอบหลัก ได้แก่ carvone ร้อยละ 55.2 limonene ร้อยละ 16.6 dill apiole ร้อยละ 14.4 linalool ร้อยละ 3.7 turn-dihydro carvone ร้อยละ 2.8 และ cis-dihydro carvone ร้อยละ 2.6 นอกจากนี้ Tian et al. (2011) ยังพบว่าน้ำมันเทียนตาตุ๊กแทนมีสมบัติต้านการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. niger* และ *Al. alternata*

โดยสารสำคัญที่มีบทบาทในการยับยั้งเชื้อรา คือ carvone และเช่นเดียวกันในกระวานมีสารสำคัญหลายชนิด Sirat et al. (2001) ได้วิเคราะห์หาส่วนประกอบของน้ำมันกระวานโดยใช้ GC/MS พบว่าประกอบไปด้วย β -pinene ร้อยละ 15.9 fenchone ร้อยละ 14.9 trans-piano carvone ร้อยละ 10.9 myrtenol ร้อยละ 16.1 myrtenal ร้อยละ 12.7 และ 1,8-cineole ร้อยละ 12.7 สารสำคัญที่มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา คือ 1,8-cineole

3. ผลของน้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศในการควบคุมการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ในถั่วลิสง

จากการประยุกต์ใช้น้ำมันกานพลูและน้ำมันเทียนตาตักแทนในการควบคุมการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง พบว่า หลังจากเก็บรักษาครบ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *A. flavus* TISTR 3041 และ *A. flavus* PN-09 บนถั่วลิสงที่ใช้ น้ำมันทั้งสองชนิด (4 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร) เคลือบบนฝาด้านในของจานเพาะเชื้อที่ใช้เป็นภาชนะบรรจุ มีการเจริญที่น้อยกว่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วลิสงชุดควบคุม ถั่วลิสงชุดควบคุมทุกเมล็ดมีเส้นใยเชื้อราเจริญปกคลุมปริมาณมาก และยังพบการลดลงของการสร้างสารอะฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสงที่มีการใช้น้ำมันหอมระเหยทั้งสองชนิดเคลือบที่ฝาด้านในของภาชนะบรรจุ (ตารางที่ 3) ซึ่งชี้ให้เห็นว่า สารระเหยที่เป็นส่วนประกอบในน้ำมันทั้งสองชนิดอาจมีผลช่วยชะลอการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ทั้ง 2 สายพันธุ์ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Passone et al. (2012) ซึ่งได้ศึกษาผลของน้ำมันกานพลูต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหารจำลองจากถั่ว พบว่าการใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 500 ไมโครลิตรต่อลิตร ช่วยลดการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้มากกว่าร้อยละ

4 และช่วยเพิ่มระยะเวลาในช่วง lag phase ขึ้นร้อยละ 15 ในขณะที่การใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 1,500 ไมโครลิตรต่อลิตรสามารถยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus section flavi* หลายสายพันธุ์ได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้ Matan et al. (2006) รายงานว่าสารที่ระเหยได้ในน้ำมันผสมของน้ำมันกานพลูกับน้ำมันอบเชยปริมาตร 2,000 ไมโครลิตรที่จุ่มบนกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 6 ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*, *P. roqueforti*, *Mucor plumbeus*, *Eurotium* spp., *Debaryomyces hansenii* และ *Zygosaccharomyces rouxii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ และ Goñi et al. (2009) ได้ตรวจพบสารประกอบหลายชนิดในโอระเหยของน้ำมันกานพลู สารประกอบที่พบได้แก่ estragol ร้อยละ 0.2, thymol ร้อยละ 0.1, eugenol ร้อยละ 82, β -caryophyllene ร้อยละ 10, -humelene ร้อยละ 2.9, eugenol acetate ร้อยละ 0.5, δ -cadinene ร้อยละ 0.4 และ calamenene ร้อยละ 0.3 ของจำนวนไอออนทั้งหมดที่ได้จำแนกชนิดได้ Tajkarimi et al. (2010) ได้กล่าวว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์จากพืชส่งผลต่อเซลล์ของจุลินทรีย์ โดยกลไกการต้านจุลินทรีย์ที่ค่อนข้างหลากหลายได้แก่ การเข้าโจมตีพอสโพลีปิดสองชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์และอื่นๆ

การที่พบสารอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงที่ใช้ในการทดลองนี้ซึ่งมีค่า a_w เฉลี่ย 0.88 อาจเป็นเพราะ a_w ระดับนี้เป็นระดับที่เชื้อ *A. flavus* สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ ดังเช่น Passone et al., (2010) ได้รายงานว่าอะฟลาทอกซินที่ตรวจพบในถั่วลิสงซึ่งมีค่า a_w 0.84-0.94 มีปริมาณ 1.1-200.4 ppb และ Ellis et al. (1994) ได้รายงานว่าการเจริญของ *A. flavus* สูงสุดบนถั่วลิสงจะเกิดที่ a_w 0.97 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และมีออกซิเจนภายในบรรยากาศร้อยละ 10

หลังการเก็บรักษา 21 วัน ขณะที่การสร้างอะฟลาทอกซินสูงสุดเกิดขึ้นที่ a_w ต่ำกว่า ก็คือที่ระดับ a_w 0.94 ภายใต้อุณหภูมิการเก็บรักษาเดียวกัน แต่ในการทดลองนี้ การที่พบว่า การเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* ไม่สัมพันธ์กับปริมาณอะฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสงอาจเป็นเพราะความไม่สม่ำเสมอของการกระจายตัวของสปอร์เชื้อราเริ่มต้นบนเมล็ดถั่ว

ตารางที่ 3 ผลของน้ำมันกานพลูและน้ำมันเทียนตาตักแด้นต่อการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของ *Aspergillus flavus* ในเมล็ดถั่วลิสงที่เก็บที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 7 วัน

ชนิดน้ำมัน	<i>Aspergillus flavus</i> TISTR 3041		<i>Aspergillus flavus</i> PN-09	
	ปริมาณการเจริญ	aflatoxin ^a ± SD (ppb)	ปริมาณการเจริญ	aflatoxin ^a ± SD (ppb)
น้ำมันกานพลู (mg/ml)				
0	++++	0.48±0.08	++++	2.50±0.38
4	+	0.38±0.03	+	2.24±0.13
น้ำมันเทียนตาตักแด้น (mg/ml)				
0	++++	0.48±0.08	++++	2.50±0.50
4	+	0.34±0.05	++	1.12±0.16

+ หมายถึง มีการเจริญของเชื้อราน้อยมาก ++ หมายถึง มีการเจริญของเชื้อราค่อนข้างน้อย +++ หมายถึง มีการเจริญของเชื้อรามาก

^a ข้อมูลเฉลี่ยของผลการทดลอง 3 ซ้ำ

สรุปผลการวิจัย

ถั่วลิสงดิบทั้งเมล็ดที่นำมาตรวจสอบมีการปนเปื้อนของเชื้อราค่อนข้างสูงโดยเฉพาะ *Aspergillus* และเป็นไปได้ที่จะนำน้ำมันกานพลูและน้ำมันเทียนตาตักแด้นมาประยุกต์ใช้โดยเติมลงในบรรจุภัณฑ์สำหรับถั่วลิสงเพื่อควบคุมการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่ปนเปื้อน

เอกสารอ้างอิง

Collins, C.H., Lyne, P.M. and Grange, J.M. (2001). Collins and Lyne's Microbiological methods. New York, USA: Oxford University Press., Inc. pp. 178-205.

Ding, X., Li, P., Bai, Y. and Zhou, H. (2012). Aflatoxin B₁ in post-harvest peanuts and dietary risk in China. Food Contr. 23(1): 143-148.

Ellis, W.O., Smith, J.P., Simpson, B.K., Ramaswamy, H. and Doyon, G. (1994). Growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in peanuts stored under modified atmosphere packing (MAP) conditions. Int J Food Microbiol. 22(2-3): 173-187.

Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R. and Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. Food Chem. 116(4): 982-989.

Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. (2005). Modern Food Microbiology. New York: Springer Science+Business Media Inc. pp. 45-46.

Joseph, G.S., Jayaprakasha, G.K., Selvi, A.T., Jena, B.S. and Sakariah, K.K. (2005). Antiaflatoxigenic and antioxidant activities of *Garcinia*

- extracts. *Int J Food Microbiol.* 101(2): 153-160.
- Kazemi, M., Rostami, H. and Ameri, A. (2012). The study of compositions and antimicrobial properties of essential oil of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* on human pathogens. *Current Res Bacteriol.* 5(1): 1-12.
- Karapinar, M. (1990). Inhibitory effects of anethole and eugenol on the growth and toxin production of *Aspergillus parasiticus*. *Int J Food Microbiol.* 10(3-4): 193-199.
- Komala, V.V., Ratnavathi, C.V., Kumar, B.S.V. and Das, I.K. (2012). Inhibition of aflatoxin B₁ production by an antifungal component, eugenol in stored sorghum grains. *Food Contr.* 26(1): 139-146.
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A.J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V. and Parker, M. (2006). Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *Int J Food Microbiol.* 107(2): 180-185.
- Matan, N., Saengkrajang, W. and Matan, N. (2011). Antifungal activities of essential oils applied by dip-treatment on areca palm (*Areca catechu*) leaf sheath and persistence of their potency upon storage. *Int Biodeter Biodegr.* 65(1): 212-216.
- Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z. and Naghdibadi, H. (2007). Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Contr.* 18(12): 1518-1523.
- Pandey, M.K., Monyo, E., Ozias-Akins, P., Liang, X., Guimarães, P., Nigam, S.N., Upadhyaya, H.D., Janila, P., Zhang, X., Guo, B., Cook, D.R., Bertioli, D.J., Michelmore, R. and Varshney, R.K. (2012). Advances in *Archis* genomics for peanut improvement. *Biotechnol Adv.* 30(3): 639-651.
- Passone, M.A., Rosso, L.C., Ciancio, A. and Etcheverry, M. (2010). Detection and quantification of *Aspergillus* section *Flavi* spp. in stored peanuts by real-time PCR of *nor-1* gene, and effects of storage conditions on aflatoxin production. *Int. J Food Microbiol.* 138(3): 276-281.
- Passone, M.A., Girardi, N.S., Ferrand, C.A. and Etcheverry, M. (2012). *In vitro* evaluation of five essential oils as botanical fungitoxicants for the protection of stored peanuts from *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* contamination. *Int Biodeter Biodegr.* 70: 82-88.
- Prakash, B., Singh, P., Mishra, P.K. and Dubey, N.K. (2012). Safety assessment of *Zanthoxylum alatum* Roxb. essential oil, its antifungal, antiaflatoxin, antioxidant activity and efficacy as antimicrobial in preservation of *Piper nigrum* L. fruits. *Int J Food Microbiol.* 153(1-2): 183-191.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S. and Frisvad, J.C. (2004). Introduction to Food and Airborne Fungi. 7th ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. pp. 1-282.
- Shukla, R., Kumar, A., Singh, P. and Dubey, N.K. (2009). Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B₁ production. *Int J Food Microbiol.* 135(2): 165-170.
- Shukla, R., Singh, P., Prakash, B. and Dubey, N.K. (2012). Antifungal, aflatoxin inhibition and

- antioxidant activity of *Callistemon lanceolatus* (Sm.) sweet essential oil and its major component 1,8-cineole against fungal isolates from chickpea seeds. *Food Contr.* 25(1): 27-33.
- Singh, G., Maurya, S., de Lampasona, M.P. and Catalan, C. (2005). Chemical constituents, antimicrobial investigations, and antioxidative potentials of *Anethum graveolens* L. essential oil and acetone extract: part 52. *J Food Sci.* 70(4): M208-M215.
- Sirat, H.M., Hong, L.F. and Khaw, S.H. (2001). Chemical compositions of the essential oil of the fruits of *Amomum testaceum* Ridl. *J Essential Oil Res.* 13(2): 86-87.
- Soliman, K.M. and Badaea, R.I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol.* 40(11): 1669-1675.
- Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Contr.* 21(9): 1199-1218.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., Huang, B., He, J. and Wang, Y. (2011). *In vitro* and *in vivo* activity of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) against fungal spoilage of cherry tomatoes. *Food Contr.* 22(12): 1992-1999.
- Tournas, V., Stack, M.E., Mislivec, P.B., Koch, H.A. and Bandler, R. (2001). Yeasts, molds, and mycotoxins. In *Bacteriological Analytical Manual (BAM)*. Available from: www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071435.htm 16 January 2012

