การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินโดยสารออกฤทธิ์จากกระเทียม

Inhibition of *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin Reduction by Active Compound in Garlic

บุญญวดี จิระวุฒิ[1/] เนตรา สมบูรณ์แก้ว[1/] สุพี วนศิรากุล[1/]

อัฉราพร ศรีจุดานุ[1/] อมรา ชินภูติ[1/]

Boonyawadee Chirawut[1/] Nettra Somboonkaew[1/] Suphi Wanasirakul[1/]

Atcharaporn Srijudanu[1/] Amara Chinaphuti[1/]

ABSTRACT

Aflatoxins are toxic metabolites produced by Aspergillus flavus which are highly toxic compounds and can cause liver cancer and impaired immune function. These toxins can be found in a wide range of food commodities especially in groundnut, dry chilli and chilli powder. This research was to focus on the effect of garlic juice on preventing and reducing aflatoxin B1 (AFB1) in chilli powder. The results showed that garlic juice at higher concentrations of 2.5 and 5.0% completely inhibited spore germination and repressed the growth of *A. flavus,* respectively. Afterward, garlic juice at different concentrations was applied to chilli powder to detoxify AFB1 contamination. The juice at 100 and 75% could reduce the AFB1 content in chilli powder by 73.67 and 69.71%, respectively. The results indicate that garlic juice can decrease *A. flavus* growth and reduce the production and amount of AFB1 in vitro and in vivo. Allicin was TLC detected as a major compound in juice, powder and extracts of garlic in this study with Rf value of 0.812 the same as allicin standard.

Key-words: aflatoxin, allicin, *Aspergillus flavus*, garlic juice

[1/] กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900

[1/] Postharvest and Processing Research and Development Division, Department of Agriculture. Chatuchak. Bangkok 10900

บทคัดย่อ

แอฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่สร้างโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* เป็นสารพิษที่มีอันตรายร้ายแรง เพราะเป็นสารก่อมะเร็ง สารแอฟลาทอกซินสามารถพบได้ทั่วไปในผลิตผลเกษตร เช่น ถั่วลิสง พริกแห้ง พริกป่น เป็นต้น งานวิจัยนี้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำคั้นกระเทียมในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และลดการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินในพริกป่น พบว่า น้ำคั้นกระเทียม ความเข้มข้น 5% ขึ้นไป มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และน้ำคั้นกระเทียมความเข้มข้น 2.5% ขึ้นไป สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ได้สมบูรณ์ เมื่อนำกระเทียมผง น้ำคั้นกระเทียม และสารสกัดหยาบจากกระเทียมสดมาทำการแยกสารสำคัญบนแผ่น TLC พบว่า สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ คือ สารอัลลิซิน (allicin) ซึ่งแสดงค่า Rf = 0.812 ตรงกับสารอัลลิซินมาตรฐานเมื่อนำพริกป่นมาคลุกกับน้ำคั้นกระเทียม ความเข้มข้น 100 และ 75% พบว่า สามารถลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนอยู่ในพริกป่นได้ 73.67 และ 69.71 %

คำหลัก: น้ำคั้น กระเทียม สารอัลลิซิน แอฟลาทอกซิน *Aspergillus flavus*

คำนำ

Aspergillus flavus เป็นเชื้อราที่สร้างสารแอฟลาทอกซิน เป็นสารก่อมะเร็งที่มีพิษร้ายแรง ปัจจุบัน IARC (International Association Research Cancer) ได้จัดให้สารแอฟลาทอกซินเป็นสารก่อมะเร็ง Class I (IARC,1993) เชื้อรา *A. flavus* มักพบปนเปื้อนและสร้างสารพิษในเมล็ดธัญพืช พืชน้ำมันชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ข้าวโพด ถั่วลิสง พริก เครื่องเทศ สมุนไพร และผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ใช้วัตถุดิบจากผลิตผลเกษตรที่มีเชื้อรา *A. flavus* ปนเปื้อนอยู่ก่อน (อมราและคณะ, 2547) เชื้อรา *A. flavus* และสารแอฟลาทอกซินเป็นปัญหาสำคัญเพราะเกี่ยวข้องกับสุขภาพของมนุษย์และสัตว์โดยตรง และยังเป็นปัญหาการกีดกันทางการค้าอีกด้วย

ผลิตผลเกษตรที่เป็นอาหาร และมีการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินมากที่สุดในประเทศได้แก่ ถั่วลิสง พริกแห้ง และพริกป่น (อมราและคณะ 2547) ปริมาณการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินในอาหารที่กระทรวงสาธารณสุขประกาศฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 อนุญาตให้มีสารแอฟลาทอกซินในอาหารได้ไม่เกิน 20 μg/kg หรือ 20 ng/ml (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2539) พริกป่นเป็นผลิตภัรฑ์ที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้นของสารแอลฟลาทอกซินสูง เช่นเดียวกับถั่วลิสงป่น และคนไทยนิยมบริโภคมาก ดังนั้นวิธีการป้องกันกำจัดสารพิษนี้จะต้องเป็นวิธีการที่ปลอดภัยกับผู้บริโภคด้วย หลักการประเมินการเลือกใช้วิธีการลดปริมาณสารพิษควรต้องพิจารณาด้วยว่าเป็นวิธีที่สามารถทำลายลดความเป็นพิษ หรือทำให้สารพิษหมดไป และที่สำคัญวิธีการนั้นต้องสามารถทำลายสปอร์ของเชื้อราได้ด้วย (Park,1993) เพื่อลดการใช้สารเคมี การนำสารสกัดจากพืชมาใช้ในการป้องกัน

กำจัดเชื้อราและสารแอฟลาทอกซินจึงเป็นทางเลือกหนึ่งโดย Chinaphuti and Aukkasarakul (2007) พบว่าสารสกัดจากกระเทียมและกานพลูสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 100% แต่สารสกัดกานพลูไม่สามารถทำลายสารแอฟลาทอกซินได้โดยตรงขณะที่สารสกัดกระเทียม กระเพรา โหระพา และข่า สามารถยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินได้ 80-90% ในขณะที่สารสกัดกระเทียมสามารถทำลายสารแอฟลาทอกซินโดยตรงได้ถึง 95.1%

กระเทียม (*Allium sativum*) จัดอยู่ในวงศ์ Amaryllidaccae (เต็ม, 2557) เป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่ประชาชนนิยมบริโภคกันเป็นเวลาช้านาน ส่วนของกระเทียมที่นำมาใช้บริโภค คือ ส่วนหัว (Bulb) โดยใช้เป็นทั้งอาหารและยารักษาโรค มีรายงานว่า กระเทียมสามารถป้องกันโรคหัวใจ ลดไขมันในเส้นเลือด รักษาโรคกลากเกลื้อน และโรคมะเร็งได้ (Reader's Digest, 1990, University of Maryland Medical Center, 2011, Rivlin, 2001) นอกจากนี้ยังมีการทดลองทางคลินิก พบว่าคนไข้ที่ได้รับน้ำมันหอมระเหยจากกระเทียม 0.25 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. เป็นเวลา 10 เดือน สามารถลดปริมาณ Cholesterol ลงอย่างชัดเจน และสารที่มีฤทธิ์ในการลด Cholesterol คือสาร allicin (เพ็ญนภา และพรทิพย์, 2545) ในหัวกระเทียมสดมีส่วนประกอบน้ำมันหอมระเหยอยู่ประมาณ 0.1-0.4 % และมีสารสำคัญกลุ่มซัลเฟอร์อยู่หลายชนิด เช่น alliin, allicin, diallyl disulfides และ methyl n-propyl ซึ่ง allicin จะสร้างขึ้นเมื่อกระเทียมสดได้รับการบดทุบ หรือเคี้ยว ในขณะเดียวกันก็จะเกิดสารตัวอื่น ๆ ด้วย ได้แก่ ajoene และ vinyldithiins ได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางเกี่ยวกับสาร allicin ในกระเทียมที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราหลายชนิด รวมทั้ง *A. flavus* (Bilgrami *et al*., 1992, Sandosskumar *et al*., 2007) และ *A. niger* (Irhin and Korukluoglu, 2007) ซึ่งเป็นเชื้อราที่สร้างสารพิษ ในการทดลองนี้จึงได้นำน้ำคั้นกระเทียมซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่หาง่าย และมาทดสอบประสิทธิภาพ ในการควบคุมเชื้อรา *A. flavus* และลดการปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินในพริกป่น ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ประชาชนนิยมบริโภค และเป็นอาหารที่เสี่ยงต่อการเกิดสารแอฟลาทอกซินได้ง่าย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำคั้นกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus*

1.1 ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำคั้นกระเทียมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus*

นำกระเทียมสดมาบดให้ละเอียดคั้นน้ำแล้วเจือจางด้วยน้ำให้น้ำกระเทียมมีความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5% แล้วนำมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ในอัตราส่วน 9:1 (อาหารเลี้ยงเชื้อ: น้ำคั้นกระเทียม) เมื่อผสมเรียบร้อยแล้วความเข้มข้นของน้ำกระเทียมที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA คือ 10.00, 5.00, 2.50 และ 1.25 % ตามลำดับ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ไม่ใส่น้ำคั้นกระเทียมเป็นกรรมวิธีควบคุม นำกระดาษ

กรองที่ตัดเป็นวงกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. นึ่งฆ่าเชื้อจุ่มสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *A. flavus* (สายพันธุ์ A39 ของกรมวิชาการเกษตร) วางตรงกลางผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) เปรียบเทียบ 5 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ

บันทึกผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* ในวันที่ 2, 3 และ 4

1.2 ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำคั้นกระเทียมต่อการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. flavus*

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมน้ำคั้นกระเทียมความเข้มข้นเช่นเดียวกับข้อ 1.1 ใส่ในสไลด์หลุม (depress slide) ปริมาณ 100 µl หยดสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ของเชื้อรา *A. flavus* ปริมาณ 20 µl ลงในสไลด์หลุม แล้วนำมาวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีความชื้น บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) เปรียบเทียบ 5 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำ

บันทึกลักษณะการงอกของสปอร์ของเชื้อรา และตรวจนับ %การงอกของสปอร์เชื้อรา*A. flavus* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุก 6 ชม.

2. ศึกษาสารออกฤทธิ์ของกระเทียมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus*

2.1 การเตรียมตัวอย่างกระเทียมสำหรับทดสอบ

ตัวอย่างกระเทียม 3 รูปแบบ และสารมาตรฐานอัลลิซิน (allicin) คือ

1. กระเทียมผงที่ได้จากการนำน้ำคั้นกระเทียมไปเข้าเครื่องทำแห้งเยือกแข็งบดให้เป็นผงละเอียด นำมาละลายน้ำความเข้มข้น 10% (W/V)

2. น้ำคั้นกระเทียมสดเจือจางด้วยน้ำกลั่นความเข้มข้นเป็น 75%

3. สารสกัดหยาบจากกระเทียมสด โดยนำกระเทียมสดมาบด 50 ก. แช่ด้วยเอธานอลปริมาตร 100 มล. แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง นำสารที่ได้ไประเหยด้วยเครื่อง Rotary evaporator

4. สารมาตรฐานอัลลิซิน ความเข้มข้น 1 มก./มล.

2.2 การเตรียมแผ่น TLC (Thin Layer Chromatography)

นำแผ่น TLC aluminum sheets ขนาด 20X20 ซม. (Silica gel 60 F254) มากำหนดจุดด้านหน้าของแผ่น TLC ระยะห่างระหว่างจุด 1.5 ซม. จำนวน 8 จุด เพื่อหยดสารทดสอบ ส่วนด้านหลังแผ่น TLC จะทำการขีดเส้นตรงจนสุดแผ่น TLC โดยขีดเส้นห่างจากจุดที่กำหนดด้านหน้าข้างละ 0.25 ซม. และขีดเส้นตัดขวางขนาด 0.5 ซม. ตั้งแต่จุดล่างสุดไปถึงปลายบนแผ่น TLC

2.3 การหยดตัวอย่างกระเทียม

นำตัวอย่างที่เตรียมทั้ง 4 แบบ (จากข้อ 2.1) มาหยดลงบนแผ่น TLC ด้านหน้าตามจุดที่เตรียมไว้ (ข้อ 2.2) โดยแต่ละตัวอย่างหยด 2 จุด คือ ปริมาณ 5 และ 10 µl ปล่อยให้สารระเหยจนแห้งนำแผ่น TLC ไปใส่ในโถแก้วที่มีสารตัวพา

(mobile phase) คือ hexane : isopropanol = 3:1 (v/v) เมื่อสารละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงจุดที่กำหนดด้านปลายแผ่น นำแผ่น TLC ออกจากโถแก้ว ทิ้งไว้จนสารละลายระเหยไปหมด

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดกระเทียม

นำแผ่น TLC มาตัดตามรอยที่ขีดเส้นแต่ละเส้น ใน 1 เส้นตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5 x 0.5 ซม. ได้ชิ้นส่วน TLC จำนวน 32 ชิ้นต่อจุด (ตัวอย่างกระเทียมที่ทดสอบ) นำชิ้นส่วน TLC ไปวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีสปอร์แขวนลอย ของเชื้อรา *A. flavus* ผสมอยู่ โดยวางด้านที่เป็น silica ควั่ำบนอาหาร จำนวน 4 ชิ้น/จานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม.

บันทึกผล ชิ้น TLC ที่เกิดบริเวณใสรอบๆ (clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และแปลผลตามค่า Rf

3. ศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำคั้นกระเทียมในการลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินในพริกป่นและระยะเวลาในการเก็บรักษา

พริกป่นก่อนทำการทดลองนำมาตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินโดยสุ่มตัวอย่าง ๆ ละ 100 ก. จำนวน 20 ซ้ำ พบว่า มีปริมาณการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน 78.30 ng/ml ซึ่งสูงเกินกว่ามาตรฐานที่ประเทศไทยกำหนด (20 ng/ml) หลังจากนั้นนำพริกป่น 30 กก. คลุกให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วแบ่งออกเป็น 5 ส่วน ๆ ละ 6 กก. นำพริกป่นใส่ในเครื่องกวนแล้วค่อย ๆ เติมน้ำคั้นกระเทียมความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 300 มล./กก. ลงไปกวนให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำพริกป่นที่คลุกน้ำคั้นกระเทียมมาผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำพริกป่นที่ผ่านกรรมวิธีต่าง ๆ บรรจุในถุง Polyethylene (PE) ปริมาณ 100 ก./ถุง ใส่ในตะกร้าพลาสติกเก็บที่อุณหภูมิห้อง สุ่มตัวอย่างพริกป่นของทุกกรรมวิธีหลังการเก็บรักษา เป็นเวลา 5, 10 และ 15 วัน วิเคราะห์การปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์เปรียบเทียบ 5 กรรมวิธี คือ น้ำคั้นกระเทียม ความเข้มข้น 4 ระดับ 100, 75, 50 และ 25% และไม่ใส่น้ำคั้นกระเทียม (กรรมวิธีควบคุม) จำนวน 5 ซ้ำ

วิธีวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารแอฟลาทอกซินบี1 โดยวิธี ELISA (ชุดตรวจสอบ DOA Aflatoxin ELISA Test Kit)

1. นำพริกป่นตัวอย่างละ 20 ก. ใส่ใน flask ขนาด 250 มล. เติมสารเมทธานอล 70% ลงในขวดแก้วที่ใส่ตัวอย่าง ปริมาณ 100 มล./ขวดแก้ว (อัตราส่วน 1:5) ปิดปากขวดด้วยจุกยางแล้วนำขวดแก้วไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราความเร็ว 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ให้ตกตะกอน แล้วนำส่วนที่ใสมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ส่วนที่กรองได้นำไปเจือจางด้วย 0.01 M phosphate buffer ให้เป็นอัตราส่วน 1:20 (ตัวอย่างที่เจือจางเป็น 1:20 แล้ว นำไปวิเคราะห์ได้ทันที)

2. การวิเคราะห์สารแอฟลาทอกซินจาก

สารสกัดมีขั้นตอนดังนี้

2.1 หยดสารพิษมาตรฐานปริมาณ 50 µl ลงในหลุมทดสอบ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 0, 0.2, 0.5, 1 และ 2 ng/ml จำนวน 2 แถว แล้วหยดสารสกัดที่เตรียมไว้ในปริมาณ 50 µl ลงในหลุมทดสอบ

2.2 หยด enzyme conjugate (Aflatoxin B1-HRP conjugate) ปริมาณ 50 µl ลงในทุกหลุมแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที

2.3 เทสารในหลุมทดสอบทิ้ง แล้วล้างหลุมทดสอบด้วย PBS-T (0.01 M phosphate buffer saline 0.5% tween 20 pH 7.2) 3 ครั้ง

2.4 หยด substrate (tetramethyl benzidine) ปริมาณ 100 µl ลงในทุกหลุม บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที ปฏิกิริยาจะเกิดเป็นสีฟ้า

2.5 หยด stopping solution ปริมาณ 100 µl ปฏิกิริยาจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

2.6 นำหลุมทดสอบไปอ่านความเข้มของสี และปริมาณสาร Aflatoxin B1 ด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader (Sunrise, Tecan) ที่ความยาวคลื่น 450 nm แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณเป็นปริมาณสารพิษมีหน่วยเป็น ng/ml

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำคั้นกระเทียมต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus*

1.1 ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

ทดสอบการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมน้ำคั้นกระเทียม ความเข้มข้น 10.00 5.00 2.50 และ 1.25 % บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 3 และ 4 วัน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมน้ำคั้นกระเทียมทุกความเข้มข้น ไม่มีการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ในวันที่ 2, 3 และ 4 เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (กรรมวิธีควบคุม) พบการเจริญของเชื้อรามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ในวันที่ 2, 3 และ 4 เท่ากับ 2.5, 3.8 และ 5.2 ซม. ตามลำดับ (Table 1, Figure 1) แสดงว่า น้ำคั้นกระเทียมทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 100 % สอดคล้องกับการทดลองของ Bilgrami *et al*., (1992) ที่รายงานว่าสารสกัดกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* ได้ 61.94% แต่จากการทดลองนี้หลังจากการบ่มเชื้อ เป็นเวลา 3 วัน พบเชื้อราสีเขียวเกิดขึ้นกระจายทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมน้ำคั้นกระเทียม ความเข้มข้น 1.25 % และในวันที่ 4 ปริมาณเชื้อราเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อราที่ผสมน้ำคั้นกระเทียม ความเข้มข้น 2.5 % เริ่มมีเชื้อราเกิดขึ้นในลักษณะเดียวกัน เมื่อนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ พบว่า เป็นเชื้อรา *Penicillium* sp. สาเหตุที่พบเชื้อรา *Penicillium* sp. อาจเนื่องมาจากมีการปนเปื้อนของเชื้อราติดมากับหัวกระเทียม เช่นเดียวกับรายงานของ Jepson (2011) กล่าวว่า เชื้อรา *Penicillium hirsultum* เป็นเชื้อราที่พบโดยทั่วไปบนหัวกระเทียม ในช่วงเวลาเก็บเกี่ยวและเก็บรักษา และสอดคล้องกับ

Table 1 Efficacy of fresh garlic juice to inhibit *Aspergillus flavus* growth *on* potato dextrose agar (PDA) after 2, 3 and 4 days of incubation

Treatment		colony diameter (cm) [1/]		
		2 days	3 days	4 days
Fresh garlic juice	10.00 %	0.00 a	0.00 a	0.00 a
Fresh garlic juice	5.00 %	0.00 a	0.00 a	0.00 a
Fresh garlic juice	2.50 %	0.00 a	0.00 a	0.00 a
Fresh garlic juice	1.25 %	0.00 a	0.00 a	0.00 a
PDA (control)		2.50 b	3.80 b	5.20 b
F-test		**	**	**
CV (%)		7.07	4.65	3.40

[1/] Means in the same column ,followed by the common letter(s) are not significantly different at 99 % level by DMRT

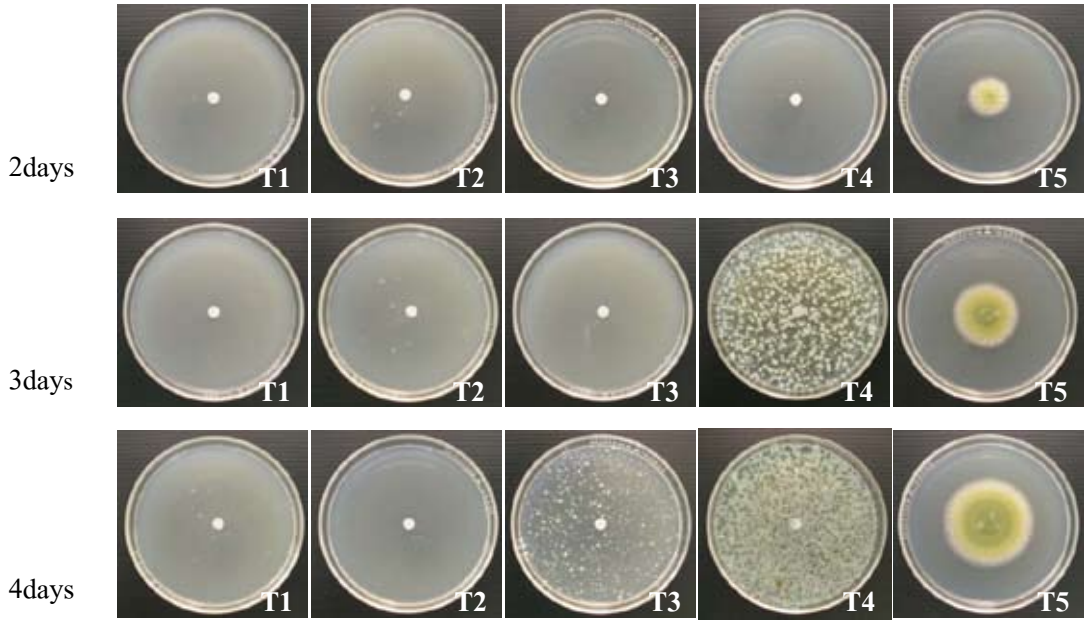

Figure 1 Growth of *Aspergillus flavus* on PDA containing various concentration of fresh garlic Juice with the ratio 1: 9 (garlic juice : PDA) at 2, 3 and 4 days after incubation at room temperature

T1) Fresh garlic juice 10.00% T2) Fresh garlic juice 5.00%

T3) Fresh garlic juice 2.50% T4) Fresh garlic juice 1.25%

T5) Control

การทดลอง ของ Daniel *et al.* (2015) สปอร์ของเชื้อรา *P. expansum* สามารถงอกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมสารสกัดกระเทียมที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 2.5% เมื่อความเข้มข้นของสารสกัดกระเทียมสูงขึ้น สปอร์ของเชื้อรา *P. expansum* ไม่สามารถงอกได้

1.2 ทดสอบการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา

ทดสอบการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. flavus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผสมน้ำคั้นกระเทียม ความเข้มข้น 10.00 5.00 2.50 และ 1.25% พบว่าสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* ของกรรมวิธีควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA) เริ่มงอก 21.6% หลังบ่มไว้ 6 ชม. หลังจากนั้นสปอร์ของเชื้อรางอกเพิ่มขึ้น เจริญเป็นเส้นใยยาวขึ้นเมื่อระยะเวลานานขึ้น และพบการสร้าง conidial head หลังบ่ม เป็นเวลา 24 ชม. ส่วนสปอร์ของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีน้ำคั้นกระเทียมผสมหลังการบ่มไว้ 12 ชม. ยังไม่พบการงอกของสปอร์เชื้อรา เมื่อเวลา 18 ชม. สปอร์ของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมน้ำคั้นกระเทียม 1.25% เริ่มงอก 3.4% ส่วนสปอร์ที่ยังไม่งอก มีการขยายขนาดของสปอร์ใหญ่ขึ้น และเมื่อเวลา 24 ชม. มีการงอกของสปอร์เพิ่มขึ้น 44.00% ส่วนความเข้มข้นของน้ำคั้นกระเทียม 2.50, 5.00 และ 10.00% ไม่พบการงอกของสปอร์ แสดงว่าความเข้มข้นของน้ำคั้นกระเทียมตั้งแต่ 2.5% ขึ้นไป มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *A. flavus* ได้สมบูรณ์ ลักษณะของสปอร์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Table 2, Figure 2) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Daniel *et al.* (2015) ทดสอบสารสกัดกระเทียมที่สกัดด้วยเอทานอลกับเชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *P. expansum* หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 °ซ. เป็นเวลา 3 วัน พบว่า สารสกัดกระเทียม ความเข้มข้น 5-80% สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *B. cinerea* และ *P. expansum* ได้สมบูรณ์ ยกเว้นสารสกัดกระเทียมความเข้มข้นที่ต่ำกว่า 2.5% สปอร์ของเชื้อราทั้งสองชนิดนี้สามารถงอกได้

2. ศึกษาสารออกฤทธิ์ในกระเทียมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus*

นำตัวอย่างกระเทียม 3 รูปแบบ คือ สารละลายกระเทียมผง น้ำคั้นกระเทียมสด และสารสกัดหยาบจากกระเทียมสด มาแยกสารสำคัญบนแผ่น TLC พบว่า แผ่น TLC ชิ้นที่ 7 และ 8 เกิดบริเวณยับยั้ง (clear zone) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และมีค่า Rf = 0.812 และ 0.781 ส่วนแผ่น TLC ของสารมาตรฐานอัลลิซิน (allicin) ชิ้นที่ 6 และ 7 เกิดบริเวณยับยั้ง เมื่อนำมาคำนวณค่า Rf = 0.843 และ 0.812 ซึ่งบริเวณยับยั้งของตัวอย่างกระเทียมทั้ง 3 รูปแบบ มีตำแหน่งเดียวกับสารมาตรฐานอัลลิซิน คือ ค่า Rf = 0.812 (Figure 3, Figure 4) อัลลิซินเป็นสารในกลุ่ม thiosulfinate มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วย (Harris *et al.*, 2001) สารอัลลิซินเป็นพิษต่อเซลล์ของเชื้อราสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Alternaria*

Table 2 Efficacy of fresh garlic juice for inhibition of spore germination of *Aspergillus flavus* on potato dextrose agar (PDA) after 6, 12, 18 and 24 hours of incubation

Treatment	spore germination (%) [1/]			
	6 h	12 h	18 h	24 h
Fresh garlic juice 10.00 %	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
Fresh garlic juice 5.00 %	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
Fresh garlic juice 2.50 %	0.00 a	0.00 a	0.00 a	0.00 a
Fresh garlic juice 1.25 %	0.00 a	0.00 a	3.40 b	44.00 b
PDA (control)	21.60 b	90.00 b	100 c	100 c
F-test	**	**	**	**
CV (%)	17.32	8.34	2.47	5.49

[1/] Means in the same column, followed by the common letter(s) are not significantly different at 99% level by DMRT

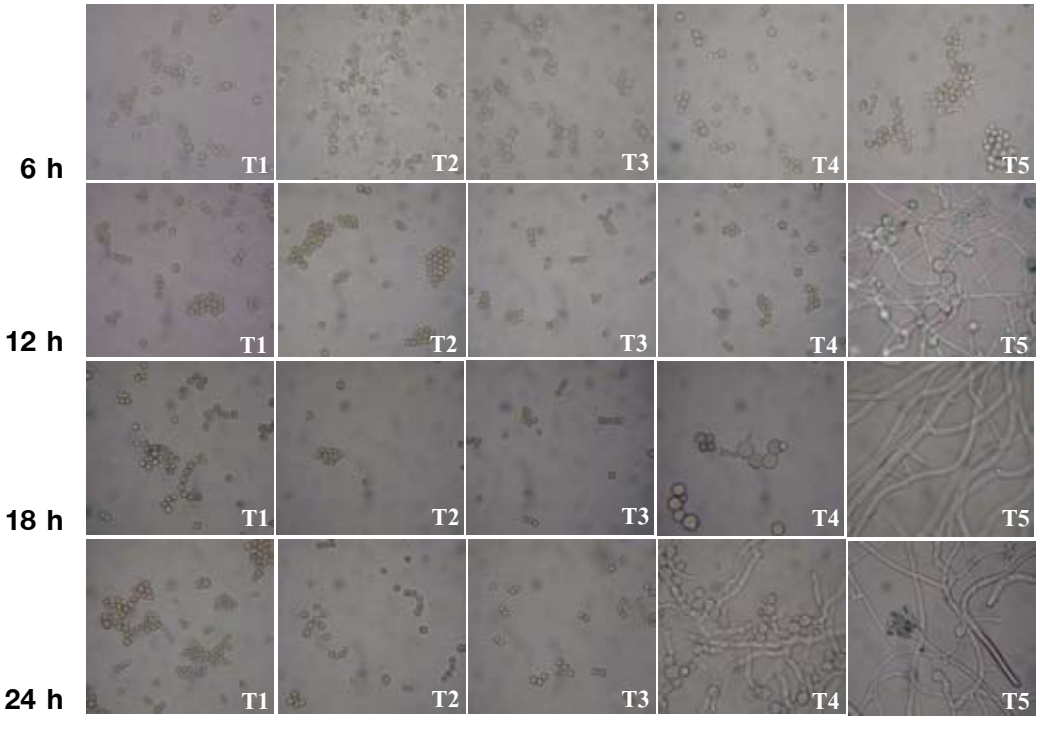

Figure 2 Spore germination of *Aspergillus flavus* on PDA containing various concentration of fresh garlic juice with the ratio 9:1 (PDA: garlic juice) after 24 hours incubation on depress slide at room temperature

T1) Fresh garlic juice 10.00% T2) Fresh garlic juice 5.00%
T3) Fresh garlic juice 2.50% T4) Fresh garlic juice 1.25%
T5) Control

1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7	7	7
8	8	8	8	8	8	8	8
9	9	9	9	9	9	9	9
10	10	10	10	10	10	10	10
11	11	11	11	11	11	11	11
12	12	12	12	12	12	12	12
13	13	13	13	13	13	13	13
14	14	14	14	14	14	14	14
15	15	15	15	15	15	15	15
16	16	16	16	16	16	16	16
17	17	17	17	17	17	17	17
18	18	18	18	18	18	18	18
19	19	19	19	19	19	19	19
20	20	20	20	20	20	20	20
31	31	31	31	31	31	31	31
32	32	32	32	32	32	32	32

Rf=0.812

Rf=0.7811

1 2 3 4 5 6 7 8

Figure 3. Simulated TLC plate of spotting tested sample and the Rf position of active compound

Lane 1 Garlic powder solution 5 μl

Lane 2 Garlic powder solution 10 μl

Lane 3 Fresh Garlic juice 5 μl

Lane 4 Fresh Garlic juice 10 μl

Lane 5 Garlic extract 5 μl

Lane 6 Garlic extract 10 μl

Lane 7 AllicinStandard 5 μl

Lane 8 AllicinStandard 10 μl

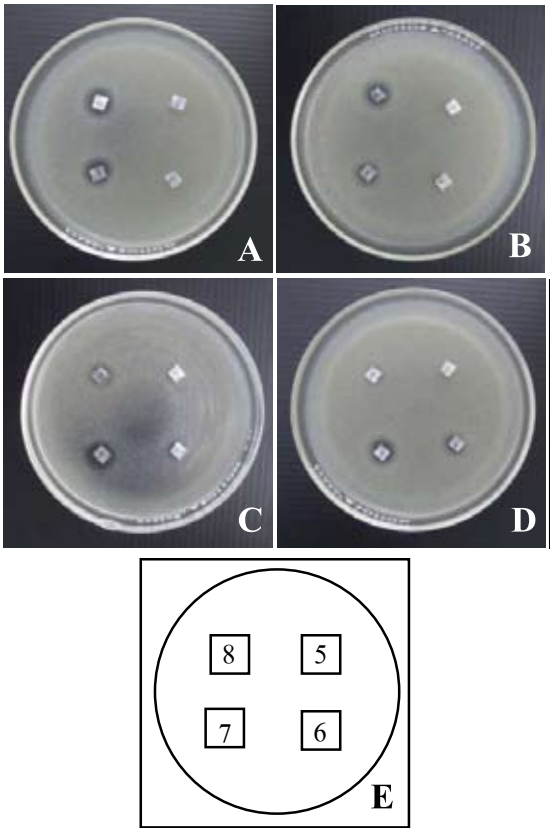

Figure 4 Clear zone surrounding the pieces of TLC indicating the inhibition of *Aspergillus flavus* growth by active compound (allicin) in garlic

A) TLC pieces of Garlic powder solution

B) TLC pieces of fresh garlic juice

C) TLC pieces of garlic extract

D) TLC pieces of allicin standard

E) the positions of the piece of TLC in a tested plate

brassisicola Botrytis cinerea Magnaporthe grisea และ *Phytophthora infestans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ และลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *M. grisea* ในต้นข้าว และ ลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *P. infestans* ในมันฝรั่ง (Curtis *et al*., 2004)

3. ศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำคั้นกระเทียมในการลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินในพริกป่นและระยะเวลาในการเก็บรักษา

ประสิทธิภาพของน้ำคั้นกระเทียมที่ระดับความเข้มข้น 100, 75, 50 และ 25% นำมาคลุกกับพริกป่นที่มีการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน พบว่า น้ำคั้นกระเทียม ความเข้มข้น 100 และ 75% มีประสิทธิภาพสูง หลังจากเก็บรักษาพริกป่นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ตรวจพบปริมาณของสารแอฟลาทอกซินในพริกป่น 24.06 และ 27.68 ng/ml (Table 3) สามารถลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในพริกป่นได้ 73.67 และ 69.71% (Figure 5) เมื่อเปรียบเทียบกับพริกป่นที่ไม่ได้คลุกกับน้ำคั้นกระเทียม (กรรมวิธีควบคุม) ที่มีปริมาณสารแอฟลาทอกซิน 91.38 ng/ml สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sandosskumar *et al.* (2007) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* ในอาหารที่ผสมสารสกัดกระเทียมไม่พบการสร้างสารแอฟลาทอกซิน อย่างไรก็ตามพริกป่นที่คลุกน้ำคั้นกระเทียมความเข้มข้น 25% จะลดปริมาณสารพิษลงได้น้อย (17.03 %) เมื่อเทียบกับกรรมวิธีอื่น ๆ นอกจากนี้ ยังพบว่าถ้าเก็บไว้เกิน 15 วัน พริกป่นจะมีเชื้อราชนิดอื่นปนเปื้อน ไม่สามารถบริโภคได้ ทั้งนี้เนื่องจากน้ำคั้นกระเทียมความเข้มข้น 25% เมื่อนำมาใช้คลุกกับพริกป่นอัตรา 300 มล./กก. เมื่อความเข้มข้นของน้ำคั้นกระเทียมต่ำ ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราลดลง เชื้อราที่ปนเปื้อนมากับพริกป่นสามารถเจริญต่อไปได้ ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสม และมีประสิทธิภาพของน้ำคั้นกระเทียม ในการลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินในพริกป่น คือ 75 % ขึ้นไป

Table 3 Amount of aflatoxin B1 in treated chili powder with different concentration of garlic juice after 5, 10 and 15 days of storage

concetration of garlic juice	amount of aatoxin (ng/ml) [1/]			
	5 days	10 days	15 days	average
Garlic juice conc 100 %	24.06 a	26.78 a	22.66 a	24.50
Garlic juice conc 75 %	27.68 a	34.14 a	22.52 a	28.11
Garlic juice conc 50 %	56.46 b	65.92 b	40.92 b	54.43
Garlic juice conc 25 %	75.82 c	77.02 b	54.12 c	68.99
Garlic juice conc 0 % (control)	91.38 d	75.08 b	63.92 c	76.79
F-test	**	**	**	
CV (%)	16.0	6.5	25.0	

[1/] Means in the same column ,followed by the common letter(s) are not significantly different at 99 % level by DMRT

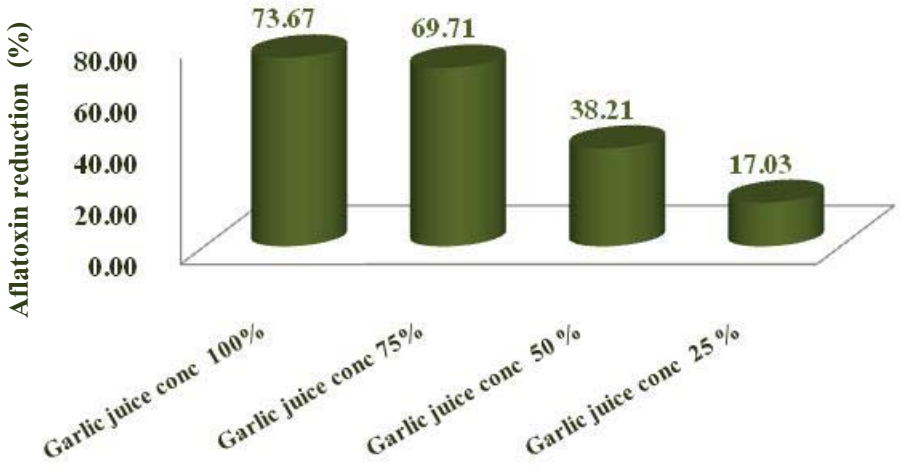

Figure 5 Percentage of aflatoxin reduction from control of treated chilli powder with garlic juice atdifferent concentrations (determination at 5 days after treated)

สรุปผลการทดลอง

1. น้ำคั้นกระเทียม ความเข้มข้น 5% ขึ้นไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และน้ำคั้นกระเทียมความเข้มข้น 10.00, 5.00 และ 2.50% สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *A. Flavus* ได้สมบูรณ์ หลังจากบ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม.

2. สารออกฤทธิ์ในกระเทียมผง น้ำคั้นกระเทียม และสารสกัดหยาบจากกระเทียมสด ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* คือ สารอัลลิซิน

3. น้ำคั้นกระเทียม ความเข้มข้น 100 และ 75% นำมาคลุกกับพริกป่นที่มีการปนเปื้อนสารแอฟลาทอกซิน ในอัตราน้ำคั้นกระเทียม 300 มล. ต่อ พริกป่น 1 กก. สามารถลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนอยู่ในพริกป่นได้ 73.67 และ 69.71% หลังจากเก็บรักษา เป็นเวลา 5 วัน

เอกสารอ้างอิง

เต็ม สมิตินันทน์. 2557. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. สำนักงาน หอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. 828 หน้า.

เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ และ พรทิพย์ เติมวิเศษ. 2545. อาหารคือยารักษาโรค. *ภูมิปัญญาไทย ปีที่ 11* ฉบับ 4 (มกราคม-กุมภาพันธ์) 4 หน้า.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. 2539. *พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522*. รวบรวมโดย กองสารวัตร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข 534 หน้า.

อมรา ชินภูติ ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ อรุณศรี วงษ์อุไร รัตตา สุทธยาคม วิชชุดา รัตนากาญจน์ และจิรากร โกศัยเสวี. 2547.

โครงการทดสอบประสิทธิภาพชุดตรวจสอบสารแอฟลาทอกซินสำเร็จรูป เพื่อขยายผลการใช้งานสู่เกษตรกรและผู้ประกอบการส่งออก.หน้า 209-220 *ในผลงานโครงการวิจัยระดับดีที่ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนสนับสนุนงานวิจัยด้านการเกษตร ประจำปี 2547* กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Bilgrami K.S., K.K. Sinha and A.K. Sinha. 1992. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by eugenol and onion and garlic extracts. *Indian J. Med. Res.* 96:171-175

Chinaphuti, A. and S. Aukkasarakul. 2007. Selection of common edible herbs which inhibit Aflatoxin production or Fungal Growth. Pages 225-230 *In. Proceeding of International Symposium of Mycotoxicology "New Strategies for Mycotoxin Research in Asia*.

Curtis, H., U. Noll, J. Stormann, A.J. Slusarenko. 2004. Broad-spectrum activity of the volatile phytoznticipin allicin in extracts of gallic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiol. Mol. Plant Pathol* 65 : 79-89.

Daniel, C.K., C. L. Lennox and F. A. Vries. 2015. In-vitro effects of garlic extracts on pathogenic fungi *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Neofabraea alba*. *South African Journal of Science* 111:1-8.

Harris, J. C., S. L.Cottrel., S. Plummer and D. Lloyd. 2001. Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Appl. Microbiol. Biotech-nol.* 57 : 282-286

IARC. 1993. Aflatoxin pp 245-396, In: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Volume 56. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

Irkin R. and M. Korukluoglu. 2007. Control of *Aspergilllus niger* with garlic, onion and leek extracts. *Journal of Biotechnology* Vol. 6(4). pp. 384-387

Jepson, S.B. 2011. Penicillium on stored garlic (Blue mold) http://www.science oregonstat. edu/bpp/Plant__Clinic/ Garlic/Penicilliu, pdf 15/9/2013

Park, D.L. 1993. Controlling aflatoxin in food and feed. *Food Technology*. 47:92-96.

Reader's Digest. 1990. Magic and

Medicine of Plants. The Reader's Digest Association, Inc. Pleasantville, New York Montreal. 194 pp.

Rivlin R.S. 2001. Historical perspective on the use of Garlic. *Journal of Nutrition*. 131: 951-954

Sandosskuma, R., M.Karthikeyan., S. Mathiyazhagan., M. Mohankumar., G. Chandrasekar and R. Velazhahan. 2007. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and detoxification of aflatoxin B1 by the medicinal plant zimmu ZalliunsativumL.xAlliumcepa L.). World. journal of *Microbiology and Biotechnology.* Vol.23 No.7 pp.1007-1014

University of Maryland Medical Center. 2011. Garlic. http://www.umm.edu/altmed/articles/garlic- 000245.htm. 11/9/2013