ผลของก๊าซเอทิลีนต่อการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่แยกได้จากถั่วลิสง

Effect of Ethylene Gas on Aflatoxin Production of *Aspergillus* spp. Isolated from Peanut

ธนภูมิ มณีบุญ[1] สุวรรณา กลัดพันธุ์[1] วราภา มหากาญจนกุล[2] ชนัญญา ช่วยศรีนวล[1] และ ธีรนุต ร่มโพธิ์ภักดิ์[3]

Thanapoom Maneeboon[1], Suwanna Kladpan[1], Warapa Mahakarnchanakul[2], Chananya Chuaysrinule[1] and Teeranud Romphophak[3]

Abstract

The samples of peanuts randomly collected from Western Thailand were found contaminated with AFs (aflatoxins) about 90%. The isolated *Aspergillus* spp. from peanuts were tested on capability of AFs production. The isolates that produced high amount of AFs in the range of 7,802 to 11,621 μg/kg were selected to treat with C_2H_4 (ethylene) at concentrations of 2.5 ppm and 4.5 ppm for 24 hours in a closed system. The amount of AFs in PDA medium was determined by TLC-densitometry. The results showed that using the ethylene at 2.5 ppm could inhibit growth and production of AFs approximately 4 to 7%. While the higher concentration at 4.5 ppm gave lower effect on the fungal growth reduction and AFs production.

Keywords: aflatoxins, ethylene gas, *Aspergillus* spp.

บทคัดย่อ

ทำการสุ่มตัวอย่างถั่วลิสงจากภาคตะวันตกของประเทศไทยพบการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซิน ประมาณร้อยละ 90 และได้นำเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่แยกได้จากตัวอย่างถั่วลิสงมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารอะฟลาทอกซิน ได้เลือกเชื้อราไอโซเลทที่ผลิตอะฟลาทอกซินสูงในช่วง 7,802-11,621 ไมโครกรัม/กิโลกรัม มาทดสอบกับก๊าซเอทิลีนที่ระดับความเข้มข้น 2.5 และ 4.5 พีพีเอ็ม ในระบบปิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยตรวจสอบปริมาณอะฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธี TLC-densitometry ผลปรากฏว่า การใช้ก๊าซเอทิลีนความเข้มข้น 2.5 พีพีเอ็ม ให้ค่าการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินอยู่ในช่วงร้อยละ 0-36.9 และให้ค่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อราอยู่ในช่วงร้อยละ 4-7 ขณะที่การใช้ก๊าซเอทิลีนความเข้มข้นสูง 4.5 พีพีเอ็ม ให้ค่าในการยับยั้งการเจริญน้อยกว่าซึ่งส่งผลต่อการกระตุ้นให้เชื้อราสร้างสารอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้นอีกด้วย

คำสำคัญ: อะฟลาทอกซิน ก๊าซเอทิลีน *Aspergillus* spp.

[1] ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900

[1] Scientific Equipment and Research Division, Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI), Kasetsart University, Bangkok, 10900

[2] ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900

[2] Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok, 10900

[3] ศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

[3] Postharvest Technology Center, Research and Development Institute at Kamphaengsaen, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, NakhonPathom, 73140

คำนำ

อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่สร้างขึ้นโดยเชื้อรา *Aspergillus* spp. โดยเฉพาะใน section *Flavi* ได้แก่ *A.flavus, A. parasiticus* และ *A. nomius* (Cotty and Cardwell, 1999) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง อะฟลาทอกซินที่พบในธรรมชาติมี 4 ชนิด คือ B1, B2, G1 และ G2 แต่ชนิด B1 ก่อความรุนแรงมากที่สุด (Ioannou *et al*., 1999) จากปัญหาการปนเปื้อนในผลิตผลและผลิตภัณฑ์แปรรูปจากถั่วลิสง ข้าวโพด พริกแห้ง ข้าวกล้อง พริกป่น และน้ำมันปาล์ม เป็นต้น นอกจากนี้สารพิษอะฟลาทอกซินที่เกิดขึ้นในวัตถุดิบ เช่น ถั่วลิสง และข้าวโพด ยังเป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนในอาหารสัตว์และถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหาร ทั้งยังมีโอกาสเปลี่ยนโครงสร้างไปจากเดิม และสร้างสารพิษที่ก่อให้เกิดอันตรายมากขึ้น เช่น การเปลี่ยนจากสารอะฟลาทอกซิน B1 ไปเป็นชนิด M1 และ M2 ซึ่งพบการปนเปื้อนในน้ำนม และผลิตภัณฑ์จากนม (Chen *et al*., 2005)

การศึกษาการลดปริมาณการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในผลิตผลการเกษตร และผลิตภัณฑ์ โดยการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP โดยให้ข้อเสนอในการแก้ไขที่ส่งผลระยะยาว อย่างไรก็ตามผลการศึกษากระบวนการที่โรงงานทั่วไปนำไปใช้ลดอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง ได้แก่ การคัดเลือกด้วยมือ ซึ่งยังมีโอกาสพบอะฟลาทอกซินในถั่วที่ผ่านการคัดเสร็จแล้ว (Choudhary and Kumari, 2010) ดังนั้นการจัดการผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยวของถั่วลิสงที่มีการผลิตได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทยนี้สมควรได้รับการศึกษาเพื่อหาวิธีการยับยั้งการเกิดเชื้อรา และการลดสารพิษอะฟลาทอกซินภายใต้สภาพบรรยากาศที่มีความเหมาะสม งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาประสิทธิภาพของการควบคุมปริมาณเอทิลีน ในสภาพระบบปิดในการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากถั่วลิสง

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บตัวอย่างถั่วลิสงที่จำหน่ายในเขตจังหวัดนครปฐม และจังหวัดราชบุรี ในช่วงเดือนมกราคม และมิถุนายน พ.ศ. 2554 รวมจำนวน 177 ตัวอย่าง ตรวจสอบปริมาณอะฟลาทอกซินด้วยชุดตรวจสอบ DOA (Chinaphuti *et al*. 2009) นับจำนวนจุลินทรีย์ และแยกเชื้อราด้วยวิธี Dilution plating method ทดสอบความสามารถในการสร้างอะฟลาทอกซินตามวิธีการของ Gunterus *et al*. (2007) โดยวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างด้วยวิธี TLC-Densitometry (AOAC, 2000) คัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์ที่สร้างอะฟลาทอกซินได้สูงสุดมาเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำจานเพาะเชื้อไปบ่มในถังพลาสติก รมก๊าซเอทิลีนที่ความเข้มข้น 0, 2.5 และ 4.5 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในที่มืด จากนั้นนำจานเพาะเชื้อราไปบ่มต่อที่สภาพแวดล้อมปกติในที่มืด จนครบ 168 ชั่วโมง วัดการเจริญ และการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสุ่มตัวอย่างถั่วลิสงและการคัดแยกเชื้อราที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน

จากตัวอย่างถั่วลิงที่สุ่มเก็บจากจังหวัดนครปฐม และจังหวัดราชบุรี ในปี พ.ศ. 2554 จำนวนทั้งหมด 177 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน 158 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 89.3 (Table 1) โดยตัวอย่างร้อยละ 28.2 มีค่าการปนเปื้อนเกินมาตรฐานที่ 20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และมีตัวอย่างร้อยละ 56.5 ที่ปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* section *Flavi* โดยสามารถแยกเชื้อรา *Aspergillus* section *Flavi* ซึ่งโคโลนีมีสีเขียวหรือเขียวอมเหลือง (Frisvad *et al*., 2005) ได้ทั้งหมด 149 ไอโซเลท โดยความสามารถในการสร้างอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ ของเชื้อราที่แยกได้แสดงดัง Figure 1

Table 1 Incidence of aflatoxins in peanut samples collected from Nakhon Pathom and Ratchaburi provinces of Thailand in 2011

Sample	No. of sample	No. of positive	Percentage of positive	Average of positive (µg/kg)	Median of positive (µg/kg)	Range of positive (µg/kg)
January						
Nakhon Pathom	33	26	78.8	23.1	4.4	0.5-125.4
Ratchaburi	60	51	85.0	35.9	33.2	0.5-120.3
Total	93	77	82.8	31.6	18.3	0.5-125.4
June						
Nakhon Pathom	30	27	90	6.0	5.4	1.5-15.9
Ratchaburi	54	54	100	20.4	5.9	0.4-139.3
Total	84	81	96.4	15.6	15.6	0.4-139.3

สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อรา *Aspergillus* section *Flavi* ที่แยกได้จากตัวอย่างถั่วลิสงตามความสามารถในการสร้างสารอะฟลาทอกซิน ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ สายพันธุ์ที่ไม่สร้างสารอะฟลาทอกซิน (Non-aflatoxigenic strain) ร้อยละ 28.2 และสายพันธุ์ที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน (Aflatoxigenic strain) ร้อยละ 71.8 ซึ่งกลุ่มนี้สามารถแบ่งย่อยได้เป็นกลุ่มที่สร้างอะฟลาทอกซิน B (Type B) ร้อยละ 80.4 และกลุ่มที่สร้างอะฟลาทอกซิน B และ G (Type BG) ร้อยละ 19.6 โดยได้คัดเลือกเชื้อราไอโซเลทที่สร้างสารพิษ ได้สูงสุด 2 อันดับแรกของ Type B ได้แก่ ไอโซเลท KUCL078 และ KUCL 158 และ Type BG ได้แก่ ไอโซเลท KUCL034 และ KUCL119 เพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

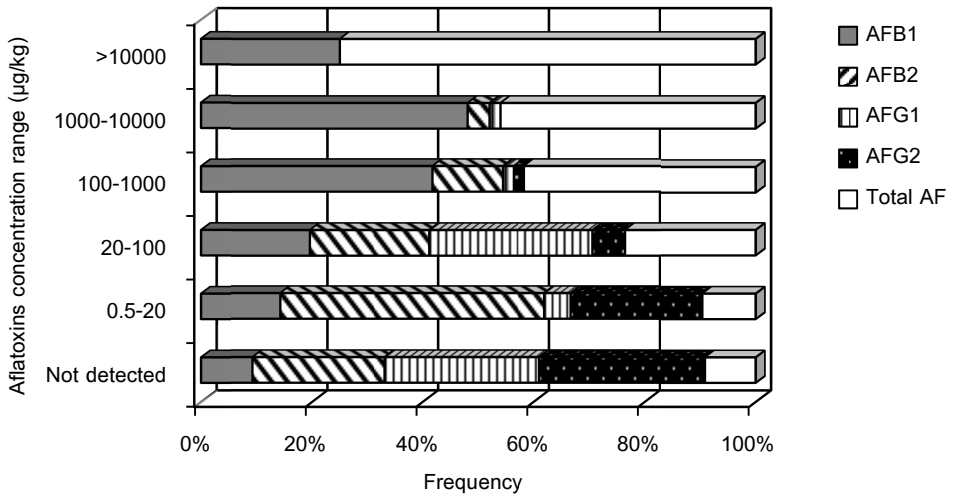

Figure 1 Production of AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 by *Aspergillus* section *Flavi* isolated form peanut samples.

2. ผลของการรมก๊าซเอทิลีนต่อการเจริญและสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อราสายพันธุ์ที่คัดเลือก

ผลการทดลองพบว่า การรมด้วยก๊าซเอทิลีน 2.5 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งการเจริญ (Figure 2A) และการสร้างสารพิษของเชื้อรา (Figure 2B) ได้ดีโดยเชื้อราแต่ละสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อก๊าซเอทิลีนแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Roze *et al*. (2004) ที่พบว่าการใช้ก๊าซที่ระดับความเข้มข้น 2 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อ *Aspergillus* ที่เจริญบนเมล็ดถั่วลิสงได้ดีถึง 5 เท่า แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นก๊าซเอทิลีนเป็น 4.5 พีพีเอ็ม ยังคงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ แต่ด้อยกว่าการใช้ก๊าซเอทิลีน 2.5 พีพีเอ็ม ในขณะที่ปริมาณอะฟลาทอกซินที่เชื้อสร้างขึ้นกลับเพิ่มขึ้นมากกว่าทั้งการทดลองในชุดควบคุม และที่ความเข้มข้น 2.5 พีพีเอ็ม ในทุกไอโซเลทเมื่อเปรียบเทียบผลกับผลการทดลองของ Guntereus *et al*. (2007) ที่พบว่าการเพิ่มปริมาณก๊าซเอทิลีนจาก 2 พีพีเอ็ม เป็น 100 พีพีเอ็ม ไม่ได้ส่งผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซิน และการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* ที่เจริญบนเมล็ดถั่วลิสงเพิ่มขึ้นแต่อย่างใดซึ่งมีข้อแตกต่างอยู่บ้าง แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ของการใช้ก๊าซเอทีลีนในปริมาณที่เหมาะสมสำหรับควบคุมการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์ที่สร้างสารพิษที่แยกได้จากถั่วลิสงในประเทศไทย

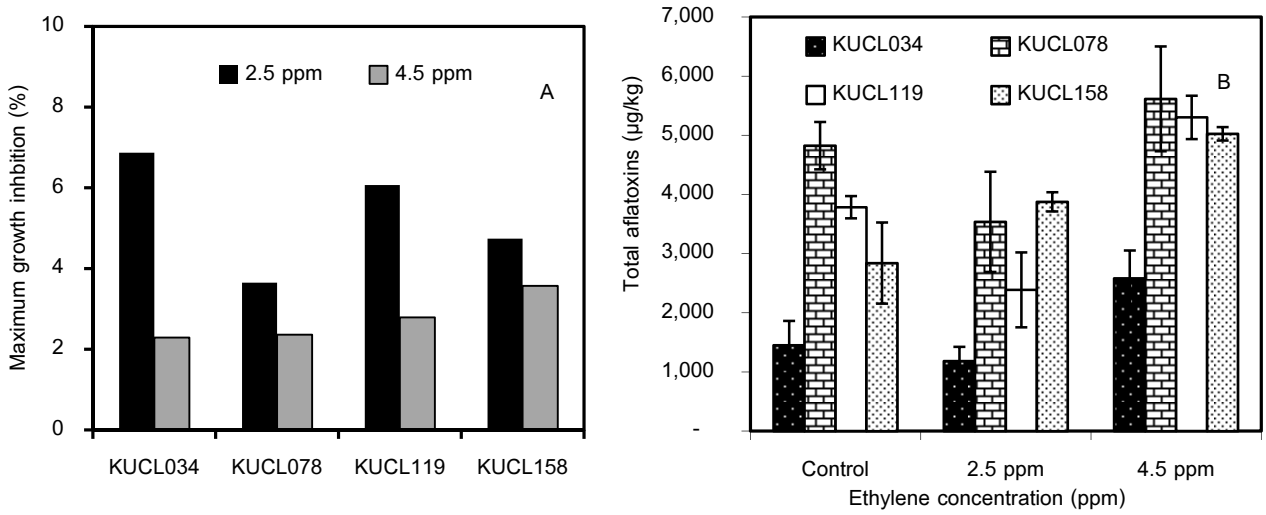

Figure 2 Effect of ethylene on growth (A) and on aflatoxins production (B) of selected *Aspergillus* strains

สรุป

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงสถานการณ์ความเสี่ยงของสารพิษอะฟลาทอกซิน และเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์ที่สร้างสารอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในตัวอย่างถั่วลิสงที่จำหน่ายในภาคตะวันตกของประเทศไทยอยู่ในระดับสูงถึง ร้อยละ 90 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าการรมก๊าซเอทีลีนในระดับความเข้มข้น 2.5 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งการเจริญ และการสร้างสารพิษของเชื้อรา *Aspergillus* ในสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ซึ่งจะเป็นแนวทางในการศึกษา เพื่อหาสภาพที่เหมาะสมของวิธีการรมก๊าซเอทิลีนให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดในการวิจัยขั้นต่อไป

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากสถาบันวิจัย และพัฒนาแห่ง มก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

AOAC Official Method 971.24. 2000. AOAC Official Method 971.24: Aflatoxins in coconut, copra, and copra meal. Natural Toxinschapter 49 (pp. 14-15). Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th edition, volume I, AOAC International, Gaithersburg, Maryland 20877-2417, USA.

Chinaphuti, A., C. Trikarunasuward and S. Aukkasarakul. 2009. DOA-Aflatoxin ELISA test kit. 22 p.

Chen, H.Y., W.J. Li and K.Y. Peng. 2005. Determination of aflatoxin M1 in milk and milk powder using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 8474-8480.

Choudhary, A.K. and P. Kumari. 2010. Management of mycotoxin contamination in pre harvest and post harvest crops: present status and future prospects. Journal of Phytology 2(7): 37-52.

Cotty, P.J. and K.F. Cardwell. 1999. Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. Applied and Environmental Microbiology 65: 2264–2266.

Frisvad, J.C., P. Skouboe and R.A. Samson. 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. *nov*. System. Applied Microbiology and Biotechnology 28: 442–453.

Gunterus, A., L.V. Roze, R. Beaudry and J.E. Linz. 2007. Ethylene inhibits aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* grown on peanuts. Food Microbiology 24: 658-663.

Ioannou, E., M. Aletrari, E. Christou, A. Hadjioannou-Ralli, A. Koliou and D. Akkelidou. 1999. Surveillance and control of aflatoxins B1, B2, G1, G2 and M1 in foodstuffs in the Republic of Cyprus: 1992-1996. Journal of the Association of Official Analytical Chemists. Int. 82: 883-892.

Roze, L.V., A.M. Calvo, A. Gunterus, R. Beaudry, M. Kall and J.E. Linz. 2004. Ethylene modulates development and toxin biosynthesis in *Aspergillus* possibly via an ethylene sensor-mediated signaling pathway. Journal of Food Protection 67: 438–447.