Agricultural Sci. J. 44 : 3 (Suppl.) : 273-276 (2013) ว. วิทย. กษ. 44 : 3 (พิเศษ) : 273-276 (2556)

การเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินภายใต้สภาพที่มีก๊าซ CO_2 ของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่แยกได้จากถั่วลิสง

Growth and Aflatoxins Production Under CO_2 Enrichment of *Aspergillus* spp. Isolated from Peanut

ธนภูมิ มณีบุญ[1] ชนัญญา ช่วยศรีนวล[1] เจริญ ขุนพรม[2] และ ธีรนุต ร่มโพธิ์ภักดี[2]

Thanapoom Maneeboon[1], Chananya Chuaysrinule[1], Charoen Kunprom[2] and Teeranud Romphophak[2]

Abstract

The objective of this study was to determine the effect of controlled atmosphere storage with CO_2 on growth and aflatoxins production of *Aspergillus* spp. isolated from peanut. Four isolates of aflatoxigenic *Aspergillus* grown on PDA plates were incubated under CO_2 enrichment conditions (0%, 10% and 20%) for 24 h and then were stored at room temperature in the dark for 5 days. Results showed that atmospheric containing CO_2 with 10% or 20 % effectively reduced aflatoxins production without strong growth inhibition. Degree of inhibitions varied depending on the fungus isolate. Aflatoxins production and fungal growth were reduced by 9.9- 99.2 % and 1.5 -14.7%, respectively. In addition, the inhibitory effect of CO_2treatment persisted for 5 days after the exposure to CO_2 enrichment.

Keywords: Growth and aflatoxins production, CO_2 enrichment, *Aspergillus* spp.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการใช้สภาพบรรยากาศดัดแปรด้วยก๊าซ CO_2 ต่อการเจริญและการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่แยกได้จากถั่วลิสง โดยทำการทดสอบกับเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์ที่สร้างอะฟลาทอกซินจำนวน 4 ไอโซเลท ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด PDA นำไปบ่มในสภาวะที่มีก๊าซ CO_2 (ความเข้มข้นร้อยละ 0, 10 และ 20) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่ม ณ อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 5 วัน พบว่า การใช้สภาพบรรยากาศดัดแปรด้วยก๊าซ CO_2 ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 20 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อราได้สูงแต่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ต่ำ โดยประสิทธิภาพของการยับยั้งมีความผันแปรตามสายพันธุ์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลท โดยเชื้อทดสอบมีการสร้างอะฟลาทอกซินและการเจริญลดลงอยู่ในช่วงร้อยละ 9.9 - 99.2 และ 1.5 -14.7 ตามลำดับ นอกจากนี้ก๊าซ CO_2 ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่อเนื่องไปอีกอย่างน้อย 5 วัน

คำสำคัญ: การเจริญและการสร้างสารอะฟลาทอกซิน สภาพบรรยากาศดัดแปรด้วยก๊าซ CO_2 *Aspergillus* spp.

คำนำ

สารพิษอะฟลาทอกซินเป็นสารเมแทบอไลท์ที่สร้างโดยเชื้อรา *Aspergillus* โดยฉพาะ *A. flavus* และ *A. parasiticus* (Cotty and Cardwell, 1999) พบการปนเปื้อนในผลิตผลการเกษตร เช่น ถั่วลิสง ข้าว พริก ข้าวโพด และเครื่องเทศ เป็นต้น รวมทั้งผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปจากผลิตผลการเกษตรเหล่านี้ สารพิษอะฟลาทอกซินที่พบในธรรมชาติมีอยู่ 4 ชนิด คือ AFB_1, AFB_2, AFG_1 และ AFG_2 ซึ่ง AFB_1 มีความเป็นพิษสูงสุด โดยมีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อกลายพันธุ์ (IARC, 1993)

การใช้สภาพบรรยากาศดัดแปร (Modified atmosphere) เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อราเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการยืดอายุการเก็บรักษาในผลิตผลการเกษตรและอาหาร เนื่องจากก๊าซ CO_2 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ CO_2 เพียงชนิดเดียวหรือร่วมกับก๊าซชนิดอื่น (Guynot *et al*., 2003) จากรายงานการศึกษาของ Halouat and Debevere (1997) พบว่าภายใต้สภาวะที่ก๊าซ CO_2 ความเข้มข้นสูง ช่วยป้องกันการงอกของสปอร์และการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *A. niger*, *Euratium amsterodami*, *Penicillium chrysogenum* และ *Fusarium oxysporum* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุของการเน่าเสียในลูกพรุน งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้สภาพบรรยากาศดัดแปรก๊าซ CO_2 ในการ

[1] ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

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

[2] ศูนย์เทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สถาบันวิจัยและพัฒนา กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

[2] Postharvest Technology Center, Research and Development Institute at Kamphaengsaen, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus, Nakhon Pathom, 73140

ควบคุมการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากถั่วลิสง โดยทำการศึกษาเบื้องต้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อหาแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้กับการจัดการปัญหาการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงภายหลังการเก็บเกี่ยว

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* spp. สายพันธุ์ที่สร้างสารอะฟลาทอกซินที่แยกได้จากตัวอย่างถั่วลิสง จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ KUCL034, KUCL078, KUCL119 และ KUCL 158 (ธนภูมิ และคณะ, 2555) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด PDA เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเข้าตู้ CO_2 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 88-92 ให้มีก๊าซ CO_2 ความเข้มข้นร้อยละ 0, 10 และ 20 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และบ่มต่อ ณ อุณหภูมิห้อง ในที่มืด จนครบ 5 วัน วัดการเจริญของเชื้อราโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง และวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี TLC-Densitometry (AOAC, 2000)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลของการรมก๊าซ CO_2 ต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus*

เชื้อราทดสอบ *Aspergillus* ทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีการรมก๊าซ CO_2 ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 20 แต่การเจริญลดลงอยู่ในช่วงระหว่างร้อยละ 1.5 - 14.71 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ก๊าซ CO_2 ความเข้มข้นร้อยละ 0) (Figure 1A) ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อรา โดยเชื้อรา *Aspergillus* ไอโซเลท KUCL158 มีการเจริญลดลงมากที่สุดร้อยละ 10.37 เมื่อผ่านการรมก๊าซ CO_2 ความเข้มข้นร้อยละ 10 ส่วนเชื้อรา *Aspergillus* ไอโซเลท KUCL078 มีการเจริญลดลงมากที่สุดร้อยละ 14.71 เมื่อผ่านการรมก๊าซ CO_2 ความเข้มข้นร้อยละ 20 ในขณะที่ไม่พบการยับยั้งการเจริญในเชื้อรา *Aspergillus* ไอโซเลท KUCL119 ที่ระยะเวลาดังกล่าว แต่เมื่อนำจานเพาะเชื้อราที่ผ่านการรมก๊าซมาเก็บรักษา ณ อุณหภูมิห้องอีกเป็นเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อทดสอบไอโซเลท KUCL119 มีการเจริญลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม รวมทั้งเชื้อทดสอบไอโซเลทอื่นเช่นเดียวกัน (Figure 1B)

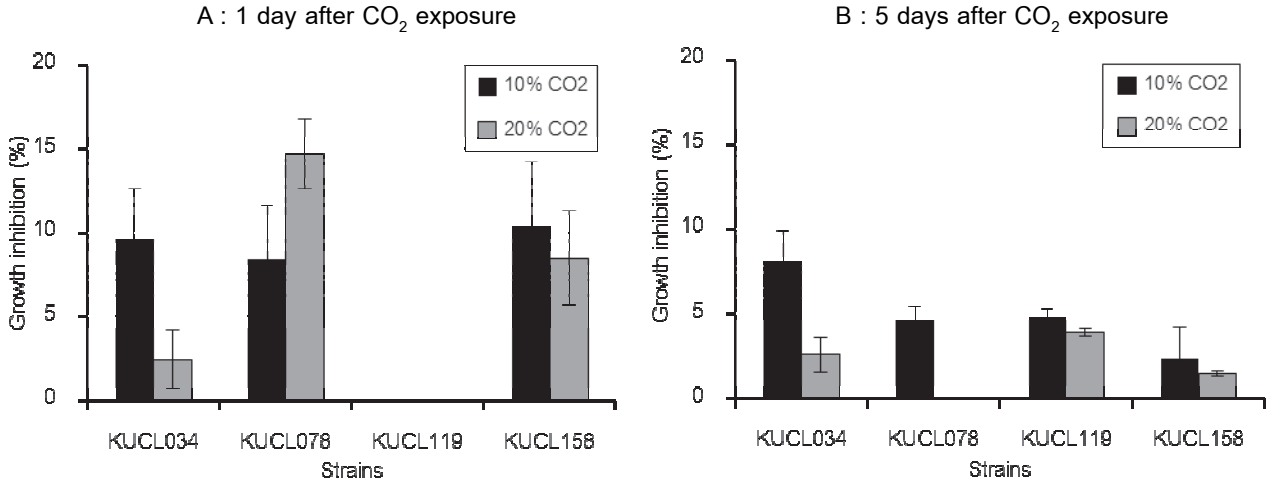

Figure 1 Effect of CO_2 enrichment on in vitro growth of 4 isolates of *Aspergillus*

2. ผลของการรมก๊าซ CO_2 ต่อการสร้างสารอะลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus*

การสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* ที่ผ่านการรมด้วยก๊าซ CO_2 พบว่ามีความผันแปรขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อรา โดยการใช้ก๊าซ CO_2 ความเข้มข้นร้อยละ 10 นั้นมีประสิทธิภาพเพียงพอในการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อราทดสอบได้ ซึ่งภายหลังการรมก๊าซ CO_2 เชื้อราทดสอบส่วนใหญ่ ยกเว้นเชื้อรา *Aspergillus* ไอโซเลท KUCL158 มีการสร้างสารอะฟลาทอกซินลดลงมากกว่าร้อยละ 64 (Figure 2A) โดยเชื้อทดสอบที่พบว่ามีการสร้างสารอะฟลาทอกซินลดลงมากกว่าร้อยละ 95 มีจำนวน 2 ไอโซเลท คือ KUCL034 (ร้อยละ 99.2) และ KUCL078 (ร้อยละ 95.7) ทั้งนี้ปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่เชื้อรา *Aspergillus* ไอโซเลท KUCL034 KUCL078 KUCL 119 และ KUCL 158 สร้างเมื่อเจริญภายใต้สภาวะปกติมีค่า 129.6, 328, 68.3 และ 8.7 พีพีบี ตามลำดับ และเมื่อนำจานเพาะเชื้อราที่ผ่านการรมก๊าซที่บ่มต่อ ณ

อุณหภูมิห้องอีกเป็นเวลา 5 วัน มาวิเคราะห์ปริมาณสารอะฟลาทอกซิน พบว่าการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท ยังคงมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อราที่ไม่ได้ผ่านการรมก๊าซ CO_2 ที่มีการสร้างสารอะฟลาทอกซินความเข้มข้น 821.8, 1,092.5, 120 และ 643.9 พีพีบี ตามลำดับ (Figure 2B)

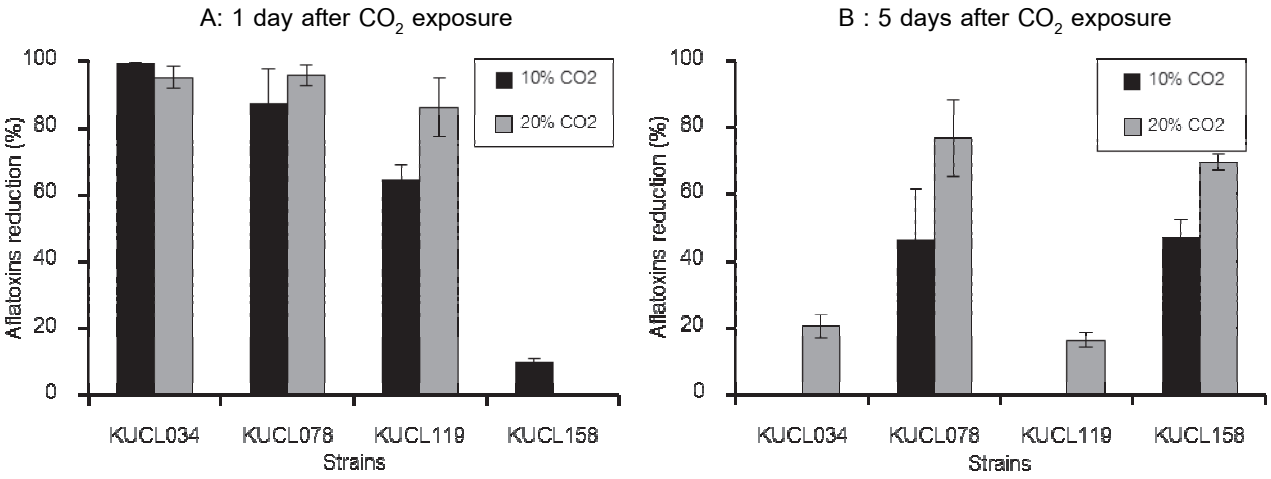

Figure 2 Effect of CO_2 enrichment on aflatoxins production by 4 isolates of *Aspergillus*

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการใช้สภาพบรรยากาศดัดแปรด้วยก๊าซ CO_2 สามารถยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ในระดับปานกลาง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Taniwaki *et al*. (2001) ที่รายงานว่าเชื้อรา *A. flavus* ที่เจริญบนชีส เมื่ออยู่ในสภาพบรรยากาศที่มีก๊าซ CO_2 ความเข้มข้นร้อยละ 20 เชื้อรามีการสร้างสารอะฟลาทอกซินลดลงถึง 1,000 เท่า แต่มีการเจริญลดลงประมาณร้อยละ 47 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Giorni *et al*. (2008) ที่ได้รายงานว่า เชื้อรา *A. flavus* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวโพดภายใต้บรรยากาศที่มีก๊าซ CO_2 ความเข้มข้นร้อยละ 25 และ 50 มีการสร้างสารอะฟลาทอกซินลดลงร้อยละ 74 และ 98 ตามลำดับ ในขณะมีการเจริญของเชื้อราลดลงร้อยละ 30-35 จะเห็นได้ว่าการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์สารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งเป็นกระบวนการที่ต้องใช้ก๊าซ O_2 สามารถทำได้โดยการเพิ่มปริมาณก๊าซ CO_2 ในบรรยากาศ แต่เชื้อราจะสามารถเจริญได้ในสภาวะดังกล่าว เนื่องจากยังคงมีก๊าซ O_2 อยู่ในระบบ หากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจะต้องทำการเพิ่มปริมาณก๊าซ CO_2 ควบคู่กับการลดปริมาณก๊าซ O_2 ให้มีความเข้มข้นไม่เกินร้อยละ 0.14 (Ellis *et al*., 1993) ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อรา *Penicillium roqueforti* สามารถเจริญภายใต้สภาพบรรยากาศที่มีก๊าซ CO_2 ความเข้มข้นร้อยละ 80 หากมีก๊าซ O_2 ความเข้มข้นอย่างน้อยร้อยละ 4 อยู่ในระบบ (Megan and Aldred, 2007)

สรุป

วิธีการควบคุมเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างถั่วลิสง ด้วยการรมด้วยก๊าซ CO_2 ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อราได้ในระดับดีมาก แต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ในระดับปานกลาง โดยมีฤทธิ์ยับยั้งต่อเนื่องอีกไปอย่างน้อย 5 วันภายหลังการรมก๊าซ แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำวิธีการนี้ไปใช้กับการควบคุมเชื้อราสาเหตุของการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินในผลิตผลการเกษตร แต่ทั้งนี้ยังคงต้องทำการทดสอบในตัวอย่างถั่วลิสงจริง รวมทั้งศึกษาผลของปัจจัยร่วม เช่น ความเข้มข้นของก๊าซ O_2 ค่า water activity (a_w) และอุณหภูมิ เป็นต้น

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนวิจัยจาก สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

ธนภูมิ มณีบุญ, สุวรรณา กลัดพันธุ์, วราภา มหากาญจนกุล, ชนัญญา ช่วยศรีนวล และ ธีรนุต ร่มโพธิ์ภักดิ์. 2555. ผลของก๊าซเอทิลีนต่อการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* spp.ที่แยกได้จากถั่วลิสง.วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 43(3พิเศษ): 637-640.

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

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

Ellis, W. O., J. P. Smith, B. K. Simpson, S. Khanizadeh and J. H. Oldham. 1993. Control of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* under modified atmosphere packaging (MAP) conditions. Food Microbiol. 10 (1): 9–21.

Giorni, P., P. Battilani, A. Pietri and N. Magan. 2008. Effect of a_w and CO_2 level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. Int. J. Food Microbiol. 122 (1-2): 109-113.

Guynot, M. E., S. Marín, V. Sanchis and A.J. Ramos. 2003. Modified atmosphere packaging for prevention of mold spoilage of bakery products with different pH and water activity levels. J. Food Prot. 66 (10): 1864–1872.

Halouat, A. E. and J. M. Debever. 1997. Effect of water activity, modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of moulds isolated from prunes. Int. J. Food Microbiol. 35(1): 41-48.

IARC. 1993. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines, and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 56. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 571 p.

Megan, N. and D. Aldred. 2007. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. Int. J. Food Microbiol. 119: 131-139.

Taniwaki, M. H., A. D. Hocking, J. I. Pitt and G. H. Fleet. 2001. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. Int. J. Food Microbiol. 68 (1-2): 125–133.