Agricultural Sci. J. 44 : 3 (Suppl.) : 303-306 (2013) ว. วิทย. กษ. 44 : 3 (พิเศษ) : 303-306 (2556)

ความสามารถของเชื้อราสร้างสารพิษออคราทอกซิน เอ แยกจากข้าวกล้องของไทย

Potential of Ochratoxin A Producing-fungi Isolated from Thai Brown Rice

สุดารัตน์ เขาแก่ง[1] ชนัญญา ช่วยศรีนวล[2] ธนภูมิ มณีบุญ[2]พรรณรพี เอี่ยมทวีเจริญ[1] และวราภา มหากาญจนกุล[1]
Sudarut Kaokaeng[1], Chananya Chuaysrinule[2],Thanapoom Maneeboon[2], Panrapee Iamtaweejaloen[1]and Warapa Mahakarnchanakul[1]

Abstract

Ochratoxin A (OTA) is one of the significant mycotoxins, this toxin can cause nephrotoxicity in animal and man. Several species of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. produced OTA and found contamination in many agricultural products including rice. Many research has been reported that maize nut cereal including rice was contaminated with these species and expected to find this mycotoxin, OTA. The objective of this research was to investigate the potential of ochratoxin A-producing fungi isolated from Thai brown rice, collected from 20 provinces in the central and northeast regions of Thailand in 2011. The fungus was isolated from brown rice by malt extract agar at 30ºC and ochratoxin was determined by thin layer chromatography (TLC) method. Among 80 isolates, of 25 were capable to produce OTA (31.25%) and all of isolates were identified as *Aspergillus* spp. Comparing the relative ratio of these isolates with standard *A. ochraceus* TISTR 3557, 7 isolates produced high concentration of OTA (0.1-0.5 unit), while 10 and 8 isolates produced OTA at medium and low concentration (<0.009 - <0.1unit). In conclusion, OTA producing-fungi, isolated from Thai brown rice, had a different potential to produce OTA. Thus data could assist to assess the risk of OTA in rice in order to evaluate the safety situation of Thai brown rice for local consumption in Thailand.

Keywords: Ochratoxin A, Thai brown rice, *Aspergillus* spp.

บทคัดย่อ

ออคราทอกซิน เอ (Ochratoxin A) เป็นสารพิษเชื้อราที่เป็นพิษต่อไตสร้างจากเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp.ในผลิตผลทางการเกษตรเช่น ข้าวที่รายงานว่าการปนเปื้อนเชื้อรากลุ่มนี้และพบสารพิษจากเชื้อราดังกล่าว วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อตรวจหาเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษออคราทอกซิน เอ จากตัวอย่างข้าวกล้อง จำนวน 20 จังหวัดจากภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในช่วงปี 2554 แยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร Malt extract agar (MEA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษออคราทอกซิน เอ ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) พบว่า 80 ไอโซเลตที่แยกได้เป็นสายพันธุ์ *Aspergillus* spp. ทั้งหมด และมีความสามารถสร้างออคราทอกซิน เอ ได้ 25 ไอโซเลต หรือร้อยละ 31.25 พบไอโซเลตที่ผลิตสารพิษได้สูง คือให้ค่าความสัมพันธ์ของสัดส่วนความเข้มข้นของออคราทอกซิน เอ สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการสร้างสารพิษจากเชื้อรามาตรฐาน *A. ochraceus* TISTR 3557 ตั้งแต่ 0.1 – 0.5 หน่วย จำนวน 7 สายพันธุ์ ส่วนไอโซเลตที่ผลิตสารพิษได้ปานกลางและน้อย (<0.009 - < 0.1) จำนวน 10 และ 8 สายพันธุ์ตามลำดับ สรุปได้ว่ามีเชื้อราที่สร้างสารพิษออคราทอกซิน เอ ในข้าวกล้องไทยและมีความสามารถในการสร้างปริมาณสารพิษที่แตกต่างกัน ข้อมูลดังกล่าวเป็นประโยชน์ในการประเมินความเสี่ยงของออคราทอกซิน เอ เพื่อทำให้ทราบสถานการณ์ความปลอดภัยของข้าวกล้องที่ใช้บริโภคของประเทศไทยต่อไป

คำสำคัญ: ออคราทอกซิน เอ ข้าวกล้องไทย *Aspergillus* spp.

[1] ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900
[1]Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Bangkok 10900
[2] งานสารพิษ ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมก.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ 10900
[2] Mycotoxin Unit,Scientific Equipment and Research Division KURDI,Kasetsart University,Bangkhen Campus,Bangkok 10900

คำนำ

ออคราทอกซิน เป็นสารพิษที่เป็นผลผลิตทุติยภูมิของเชื้อรา *Aspergillus ochraceus* และ *Penicillium verrucosum* รวมทั้งบางสายพันธุ์ของเชื้อรา *Aspergillus* spp. (Khoury and Atoui, 2010) ในผลิตผลทางการเกษตรมักพบการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราหลายชนิดซึ่งการปนเปื้อนนี้ขึ้นกับปัจจัยแวดล้อมหลายอย่างเช่น สภาพภูมิอากาศ การจัดการระหว่างการเพาะปลูก การจัดการหลังการเก็บเกี่ยว สภาพการเก็บรักษาวัตถุการเกษตรเหล่านั้น ออคราทอกซินเป็นสารพิษที่ทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับไตทั้งในมนุษย์และสัตว์ทดลอง ในอาหารต่างๆ เช่น ข้าวโพด ถั่ว และธัญชาติรวมถึงข้าวกล้อง พบปริมาณการปนเปื้อนตั้งแต่ 5 ppb เชื้อราสามารถเจริญได้ในเมล็ดข้าวที่มีความชื้นสูงขึ้นจากการเก็บรักษาไม่ถูกต้องหรือการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวที่ไม่ดีพอ ในเมล็ดธัญพืชมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นอาหารสำหรับเชื้อรา จึงส่งเสริมให้มีการเจริญและมีโอกาสสร้างสารพิษได้ดี ส่งผลกระทบต่อสุขภาพคนและสัตว์ทั้งแบบเรื้อรังหรือแบบเฉียบพลัน ค่ากำหนดให้มีได้ในอาหารตามที่มาตรฐานนานาชาติยอมรับมีค่าต่ำมากเช่นที่ 5 ppb ในข้าว (JECFA, 2001) แสดงถึงความเป็นพิษต่อมนุษย์และสัตว์สูง ดังนั้นปัญหาการปนเปื้อนสารพิษเชื้อราชนิดนี้ถือได้ว่าเป็นปัญหาสำคัญต่อความปลอดภัยของอาหาร ส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคโดยตรงและยังส่งผลกระทบในแง่เศรษฐกิจการส่งออกอีกด้วย วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อจำแนกเชื้อรา ตรวจหาความสามารถของเชื้อราในการสร้างสารพิษออคราทอกซินเอ และแบ่งกลุ่มการสร้างสารพิษในปริมาณที่แตกต่างกันจากตัวอย่างข้าวกล้องจำนวน 20 จังหวัดจากภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในช่วงปี 2554

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกเชื้อรา *Aspergillus* spp.

เก็บตัวอย่างข้าวกล้อง 40 ตัวอย่างจาก 20 จังหวัดของภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือในช่วงปี 2554 โดยเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DG18 และ DRBC เป็นเวลา 5-7 วัน แยกเชื้อราต้องสงสัยว่าจะเป็น *Aspergillus* spp. ลงบนอาหาร PDA โดยสังเกตจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำเชื้อราที่เลือกมาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บไว้ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar แบบผิวเอียง

การทดสอบความสามารถในการสร้างสารพิษออคราทอกซิน เอ ด้วยวิธี Agar plug method (Filtenberg et al., 1983)

เพาะเชื้อรา *Aspergillus* spp. ลงบนอาหาร Malt extract agar (MEA) ไอโซเลตละ 2 จาน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 14 วัน เจาะชิ้นวุ้นตรงกลางโคโลนีใส่ลงในหลอดทดลอง นำไปชั่งน้ำหนักเติมสารละลายเอธานอล-กรดฟอร์มิค (25:1) 5 มิลลิลิตรเขย่าโดยใช้ Vortex mixture 5 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ปิเปตสารละลายที่กรองได้ 2 มิลลิลิตรลงในขวดสีชาขนาด 4 มิลลิลิตร เป่าด้วยแก๊สไนโตรเจนจนแห้งละลายกลับโดยใช้สารละลายเบนซีน-กรดอะซิติค (99:1) 200 ไมโครลิตร เรียกว่าสารสกัดเพื่อนำไปวิเคราะห์ออคราทอกซิน เอ

การวิเคราะห์ปริมาณสารพิษออคราทอกซิน เอ ด้วยวิธี TLC-densitometry (ห้องปฏิบัติการสารพิษเชื้อรา, 2549)

อบแผ่นทีแอลซีประสิทธิภาพสูง 105 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมงแล้วชะ (predevelop) โดยใช้สารละลายคลอโรฟอร์ม-เมธานอล (1:1) ให้เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนไป 80 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้ในตู้ระเหย เมื่อเพลทแห้งสามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้ทันทีแต่หากยังไม่ใช้ทันทีให้นำไปเก็บในเดซิกเคเตอร์ที่อุณหภูมิ 30 °C นำสารสกัดปริมาณ 20 ไมโครลิตร จุดลงบนแผ่นทีแอลซีประสิทธิภาพสูงด้วยออโตแซมเปลอร์ชะ (develop) โดยใช้สารละลายโทลูอีน-เอธิลอะซิเตต-กรดฟอร์มิค (6:3:1) ให้เฟสเคลื่อนที่เคลื่อนไป 70 มิลลิเมตรอ่านค่าด้วยเดนสิโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 333 นาโนเมตร โดยใช้หลอดปรอทเป็นแหล่งกำเนิดแสง และยืนยันผลด้วยสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (Camag TLC scanner 3) ที่ความยาวคลื่น 200-500 นาโนเมตร โดยใช้ฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence) เป็นแหล่งกำเนิดแสงเปรียบเทียบสารละลายมาตรฐานออคราทอกซิน เอ ที่ความเข้มข้น 2.5, 7.5, 10.25, 17.5 และ 22.5 นาโนกรัมตามลำดับ

ผล

การแยกจุลินทรีย์และการคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

จากตัวอย่างข้าวกล้องทั้งหมด 40 ตัวอย่าง เพื่อนำมาแยกเชื้อได้เชื้อ *Aspergillus* จำนวน 80 ไอโซเลต พบข้าวจำนวน 25 ตัวอย่างที่ปนเปื้อน *Aspergillus* spp.และไอโซเลตมีความสามารถในการสร้างออคราทอกซิน เอ ได้จำนวน 25 ไอโซเลต หรือร้อยละ 31.25 โดยตัวอย่างของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ที่แยกได้แสดงใน Figure 1

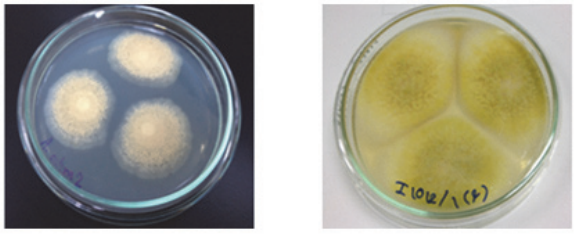

Figure1 Colony morphologies of species assigned to *Aspergillus* spp. grown on MEA incubate at 30 °C for 7 days

การทดสอบความสามารถในการสร้างออคราทอกซิน เอ ของเชื้อรา

พบว่าสารสกัดจากตัวอย่างแสดงแถบสีฟ้าอมเขียวเช่นเดียวกับสารมาตรฐานออคราทอกซิน เอ ซึ่งมี Rf = 0.5 ในขั้นตอนนี้สรุปได้ว่าตัวอย่างเชื้อรา *Aspergillus* ไอโซเลตนั้นสามารถผลิตออคราทอกซิน เอ (สิทธิพร, 2549) จากนั้นนำไปหาค่าความเข้มข้นโดยใช้เดนสิโตมิเตอร์ยืนยันผลด้วยการวัดที่ความยาวคลื่น 200-500 นาโนเมตร แสดงแถบเรืองแสงใน Figure 2 คำนวณให้ปริมาณออคราทอกซิน เอ เฉลี่ยความเข้มข้นที่ระดับต่างๆ ใน Table 1 ดังนี้คือ เชื้อรามาตรฐาน *A. ochraceus* TISTR 3557 มีปริมาณเฉลี่ยความเข้มข้นของออคราทอกซิน เอ ในระดับที่สูงคือ 842.79 นาโนกรัม/กรัม เชื้อราที่มีปริมาณเฉลี่ยความเข้มข้นของออคราทอกซิน เอ ในระดับที่สูง 2 สายพันธุ์อยู่ในช่วง236.21 – 400.41 นาโนกรัม/กรัม เชื้อราที่มีปริมาณเฉลี่ยความเข้มข้นของออคราทอกซิน เอ ในระดับปานกลาง 4 สายพันธุ์อยู่ในช่วง103.68 – 144.00 นาโนกรัม/กรัม เชื้อราที่มีปริมาณเฉลี่ยความเข้มข้นของออคราทอกซิน เอ ในระดับต่ำ 13 สายพันธุ์อยู่ในช่วง 6.15 – 81.20 นาโนกรัม/กรัม และเชื้อราที่มีปริมาณเฉลี่ยความเข้มข้นของออคราทอกซิน เอ ในระดับต่ำมาก 5 สายพันธุ์อยู่ในช่วง 1.26 – 5.01นาโนกรัม/กรัม ตามลำดับ

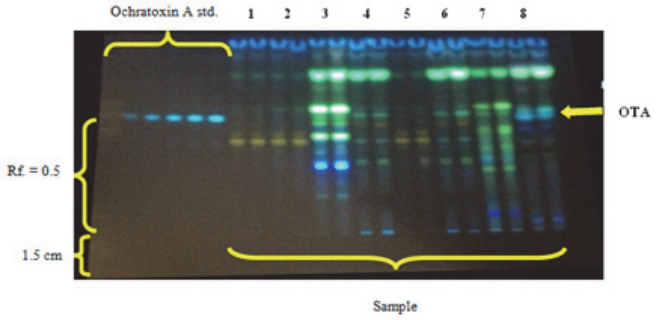

Figure 2 Bands of fluorescence Ochratoxin A (OTA) under UV

Table 1 Average concentration of Ochratoxin A (OTA) in agar (ng/g) extracted from each isolate of Aspergillus ochraceus cultured on MEA.

Type	source	average OTA concentration(ng/g)	Ability of OTA production	relative ratio OTA isolates/OTA std
A. ochraceus (standard) (TISTR 3557)	-	842.79	+++++	-
Isolate P16111	Sakon Nakhon	400.41	++++	0.47
Isolate I1012/1	Chai Nat	236.21	++++	0.28
Isolate P10331/1	Khon Kaen	144.00	+++	0.17
Isolate K6723	Phitsanulok	138.00	+++	0.16
Isolate K6822	Phitsanulok	116.38	+++	0.13
Isolate 2277	Ubon Ratchathani	103.68	+++	0.12

+++++ = excellent (>400), ++++ = good (≥200-400), +++ = medium (≥100-200)

A. ochraceus ไอโซเลตที่ให้ค่าความสัมพันธ์ของสัดส่วนความเข้มข้นของออคราทอกซิน เอ สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรามาตรฐาน *A. ochraceus* TISTR 3557 ตั้งแต่ 0.1 – 0.5 มีจำนวน 7 สายพันธุ์ มีความสามารถผลิตสารพิษได้ปานกลางและน้อย (<0.009 - < 0.1) จำนวน 10 และ 8 สายพันธุ์ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure3

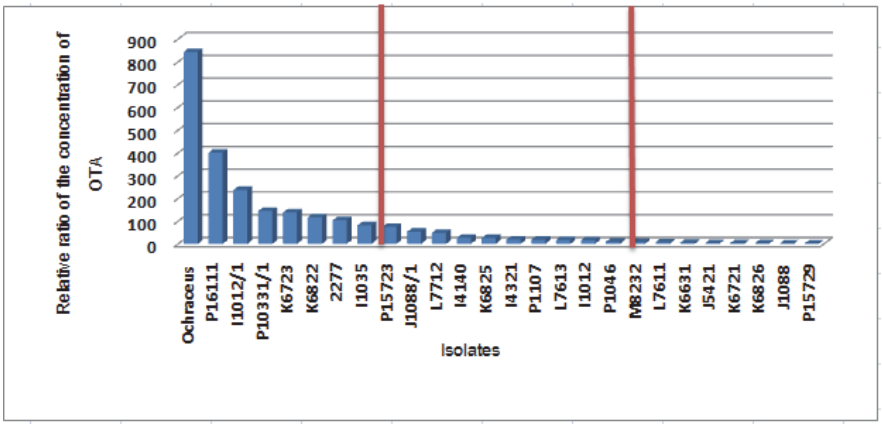

Figure 3 Relative ratio of the concentration of Ochratoxin A (OTA)

วิจารณ์ผล

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงปัญหาการปนเปื้อนสารพิษเชื้อราออคราทอกซิน เอ ซึ่งเมื่อตรวจสอบเชื้อราจากข้าวกล้องทั้งหมด 40 ตัวอย่างที่สุ่มเก็บจากภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย จำนวน 20 จังหวัดในช่วงปี 2554 แยกได้เชื้อ *Aspergillus* spp.ทั้งหมด 80 ไอโซเลต โดยเป็นสายพันธุ์ที่สร้างออคราทอกซิน เอ 25 ไอโซเลตหรือร้อยละ 31.25 ซึ่งเชื้อราที่ผลิตสารพิษออคราทอกซิน เอ มีโคโลนีสีเขียวอมเหลืองและสีดำ (จิราภรณ์ และคณะ, 2549) สรุปได้ว่ามีเชื้อราที่สร้างสารพิษออคราทอกซิน เอ ในข้าวกล้องไทยและมีความสามารถในการสร้างสารพิษในปริมาณที่แตกต่างกัน เป็นปัญหาสำคัญต่อความปลอดภัยของอาหารส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคโดยตรงและยังส่งผลกระทบในแง่เศรษฐกิจการส่งออก ข้อมูลดังกล่าวเป็นประโยชน์ในการประเมินความเสี่ยงของออคราทอกซิน เอ เพื่อทำให้ทราบสถานการณ์ความปลอดภัยของข้าวกล้องที่ใช้บริโภคของประเทศไทยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

จิราภรณ์ สิริสัณห์, K. Sato, สิทธิพร ชมพูรัตน์ม, สุวรรณา กลัดพันธุ์ และวราภา มหากาญจนกุล. 2549. การตรวจวิเคราะห์โอคราทอกซินในข้าวโพด. รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 44. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ห้องปฏิบัติการสารพิษเชื้อรา. 2549. การวิเคราะห์สารพิษเชื้อราด้วย HPLC และ TLC.*ใน* เอกสารประกอบการอบรมเรื่องการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราตามระบบคุณภาพ ISO/IEC 17025. 15-18 พฤษภาคม 2549. สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สิทธิพร ชมพูรัตน์. 2549. การประเมินออคราทอกซินเอในกาแฟดิบและกาแฟคั่วจำหน่ายในประเทศโดยอิมมูโนแอฟฟินิตีคอลัมน์คลีนอัพร่วมกับโครมาโทกราฟีผิวบาง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Filtenberg, O., J.C. Frisvad JC and J.A. Svendsen. 1983. Simple screening methods for mold producing intracelleular mycotoxins. Applied Environmental Microbiology 45(3): 581–585.

JECFA. 2001. JECFA Evaluations-Ochratoxin A. Joint WHO/Codex Expert Committee on Food Additives. (Online). Available: www.Inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47j04.htm

Khoury. A and A. Atoui. 2010. Ochratoxin A:General Overview and Actual Molecular Status. J. Toxins. 2: 461-493.