Agricultural Sci. J. 44 : 3 (Suppl.) : 343-346 (2013) ว. วิทย. กษ. 44 : 3 (พิเศษ) : 343-346 (2556)

ผลยับยั้งของกรดอินทรีย์บางชนิดต่อการเจริญและการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* sp.

Inhibitory Effects of some Organic Acids on Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus* sp.

ธนภูมิ มณีบุญ[1] และ ชนัญญา ช่วยศรีนวล[1]
Thanapoom Maneeboon[1] and Chananya Chuaysrinule[1]

Abstract

The effect of acetic acid, benzoic acid, butyric acid, citric acid and propionic acid on growth and production of aflatoxin by *Aspergillus* sp. isolated from peanut were examined. A fungus was grown on PDA medium containing each organic acid (0%, 0.1%, 0.5% and 1%) at 30 °C. for 7 days. The result showed that acetic acid at 0.1 -1%, butyric acid at 0.1 -1% and benzoic acid at 1% completely inhibited mycelial growth and subsequent aflatoxin formation. Citric acid exhibited strong inhibition of aflatoxin production (70-100%) with moderate reduction of fungal growth (20-50%). Further, propionic acid strongly reduced aflatoxin formation (94-100%) without affecting fungal growth. These results suggest acetic acid, butyric acid and benzoic acid are highly effective in prevention of aflatoxin contamination in peanut.

Keywords: Organic acid, antifungal, aflatoxin, *Aspergillus* sp.

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาผลของกรดอะซิติก กรดเบนโซอิก กรดบิวทิริก กรดซิตริก และกรดโพรพิโอนิก ต่อการเจริญและการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ที่แยกได้จากถั่วลิสง โดยทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PDA ที่มีการเติมกรดอินทรีย์แต่ละชนิด ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.1, 0.5 และ 1 จากนั้นนำไปบ่ม ณ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่ากรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 0.1-1 กรดบิวทิริกความเข้มข้นร้อยละ 0.1-1 และกรดเบนโซอิกความเข้มข้นร้อยละ 1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ซึ่งนำไปสู่การยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซิน สำหรับกรดซิตริกพบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อได้ดีมาก (ร้อยละ 70-100) และยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ในระดับปานกลาง (ร้อยละ 20-50) ในขณะที่กรดโพรพิโอนิกมีประสิทธิภาพในการลดการสร้างสารอะฟลาทอกซินได้ดีมาก (ร้อยละ 94-100) แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ผลจากการทดลองนี้แสดงให้ว่ากรดอะซิติก กรดบิวทิริก และกรดเบนโซอิก มีประสิทธิภาพในการป้องกันการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงได้ในระดับดีมาก

คำสำคัญ: กรดอินทรีย์ การยับยั้งเชื้อรา อะฟลาทอกซิน *Aspergillus* sp,

คำนำ

อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) เป็นสารพิษจากเชื้อราที่มีฤทธิ์เป็นสารก่อมะเร็ง สร้างโดยเชื้อรา *Aspergillus* section *Flavi* ได้แก่ *A. flavus, A. parasiticus* และ *A. nomius* ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา คือ อุณหภูมิระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส และความชื้น (a_w) 0.90-0.99 (Paterson and Lima, 2010) การปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษในผลิตผลการเกษตรเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ขั้นตอนการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยวและการเก็บรักษา ส่งผลกระทบต่อผู้สุขภาพของผู้บริโภคและก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจไปทั่วโลก การจัดการปัญหาการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินในผลิตผลการเกษตรจึงมีความสำคัญโดยจะต้องดำเนินการตลอดทั้งห่วงโซ่การผลิต ได้แก่การเพาะปลูกตามวิธีการเกษตรที่ดี (Good agricultural practice: GAP) เพื่อให้ได้ผลิตผลที่มีคุณภาพลดโอกาสการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุ การใช้กระบวนการแปรรูปที่เหมาะสมในการลดปริมาณสารอะฟลาทอกซิน เช่น การล้างวัตถุดิบและการใช้ความร้อน เป็นต้น สำหรับการจัดการในส่วนของกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวสามารถทำได้โดยใช้สารยับยั้งเชื้อรา (mold inhibitor) เพื่อยับยั้งการเจริญและการเข้าทำลายของเชื้อราสาเหตุ โดยมีรายงานว่ากรดอินทรีย์หลายชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* ในผลิตผลการเกษตรและบางชนิดมีคุณสมบัติยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อราด้วยเช่นกัน อาทิเช่น กรดฟอร์มิก

[1] ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
[1] Scientific Equipment and Research Division, Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI), Kasetsart University, Bangkok, 10900

กรดโพรพิโอนิก กรดแลกติก กรดเบนโซอิก และกรดไขมันชนิดอิ่มตัว เป็นต้น (Shekhar *et al*., 2009) งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของกรดอินทรีย์ 5 ชนิด คือ กรดอะซิติก กรดเบนโซอิก กรดบิวทิริก กรดซิตริก และกรดโพรพิโอนิก ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *Aspergillus* sp. ในเบื้องต้นระดับห้องปฏิบัติการ

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. KUCL01 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างสารอะฟลาทอกซินบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่มีการเติมกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ กรดอะซิติก กรดเบนโซอิก กรดบิวทิริก กรดซิตริก และ กรดโพรพิโอนิก ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.1, 0.5 และ 1.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบการเจริญของเชื้อราโดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี สกัดสารอะฟลาทอกซินในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีการของ Gunterus *et al*. (2007) และวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างด้วยวิธี TLC-Densitometry (AOAC, 2000)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองพบว่า กรดอินทรีย์ทั้ง 5 ชนิด ที่ใช้ทดสอบมีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. KUCL01 โดยโคโลนีของเชื้อรามีขนาดลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Figure 1) ซึ่งประสิทธิภาพของการยับยั้งการเจริญและการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อทดสอบมีความผันแปรขึ้นกับชนิดและระดับความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ โดยเชื้อทดสอบมีความว่องไวต่อกรดอะซิติกและกรดบิวทิริกมากที่สุด คือ ที่ระดับความเข้มข้นที่ทำการทดสอบต่ำสุดร้อยละ 0.1 สามารถยับยั้งเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์โดยไม่พบการเจริญและการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา (Figure 2) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Pelaez *et al*. (2012) ที่พบว่ากรดอะซิติกสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* โดยกรดอะซิติกที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อส่งผลให้ค่า pH ภายในเซลล์ของเชื้อราลดต่ำลง เป็นผลให้ระยะ lag phase ของเชื้อรายาวนานขึ้น เช่นเดียวกับที่ Liu *et al*. (2008) รายงานว่ากรดบิวทิริกที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครโมล/ลิตร สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา *Alternaria solani* และ *Colletotrichum lagenarium* ได้ถึงร้อยละ 60 โดยกรดบิวทิริกซึ่งเป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัวจะแทรกเข้าไปในผนังเซลล์ของเชื้อรา ทำให้ผนังเซลล์เกิดความเสียหายและเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ (Avis and Bélanger, 2001) กรณีของการใช้กรดเบนโซอิก พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินได้ในระดับดีมากและยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ในระดับดี โดยความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สามารถลดการสร้างสารพิษของเชื้อทดสอบได้ถึงร้อยละ 79 แต่หากต้องการยับยั้งการเจริญของเชื้อราอย่างสมบูรณ์จะต้องเพิ่มความเข้มข้นของกรดเบนโซอิกเป็นร้อยละ 1 ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Thanaboripat *et al*. (1996) ที่รายงานว่ากรดเบนโซอิกความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างอะฟลาทอกซินมากกว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. flavus* สำหรับกรดซิตริกและกรดโพรพิโอนิก พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินได้ในระดับดีมาก คือ ปริมาณสารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้นมีค่าลดลงร้อยละ 70-100 และ 94 – 100 ตามลำดับ แต่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ในระดับปานกลาง โดยค่าร้อยละการยับยั้งการเจริญสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 51 และ 18 เมื่อเชื้อราเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกรดซิตริกและกรดโพรพิโอนิกตามลำดับที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Gowda *et al*. (2004) ที่พบว่ากรดซิตริกและกรดโพรพิโอนิก (ความเข้มข้นร้อยละ 0.5-1) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อร *A. parasiticus* ได้ดีมาก คือ มีปริมาณลดลงมากกว่าร้อยละ 90 รวมทั้งพบว่ากรดซิตริกมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ในระดับปานกลาง (ลดลงร้อยละ 36-64) แต่อย่างไรก็ตามเชื้อรา *A. parasiticus* ที่ใช้ในการทดสอบมีความว่องไวต่อกรดโพรพิโอนิก โดยที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.1-0.5 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้อย่างสมบูรณ์

สรุป

กรดอะซิติกและกรดบิวทิริกมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. KUCL01 ได้ดีที่สุด โดยที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ทำการทดสอบ คือร้อยละ 0.1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus* sp. KUCL01 ได้อย่างสมบูรณ์

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัย

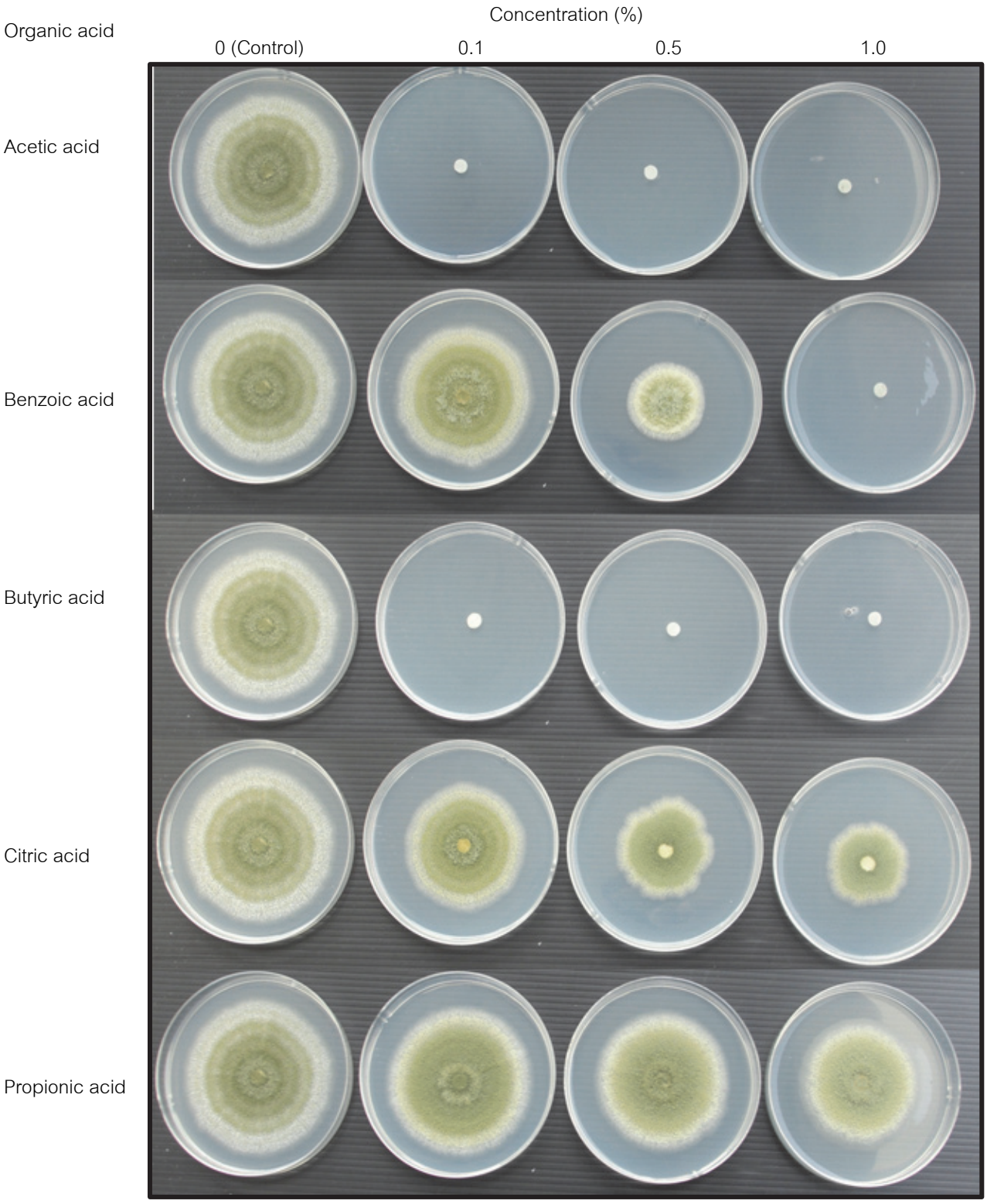

Figure 1 Mycelial growth of *Aspergillus* sp. KUCL01 on PDA medium supplemented with various organic acids at 4 concentrations (0, 0.1, 0.5 and 1.0%) after 7 days

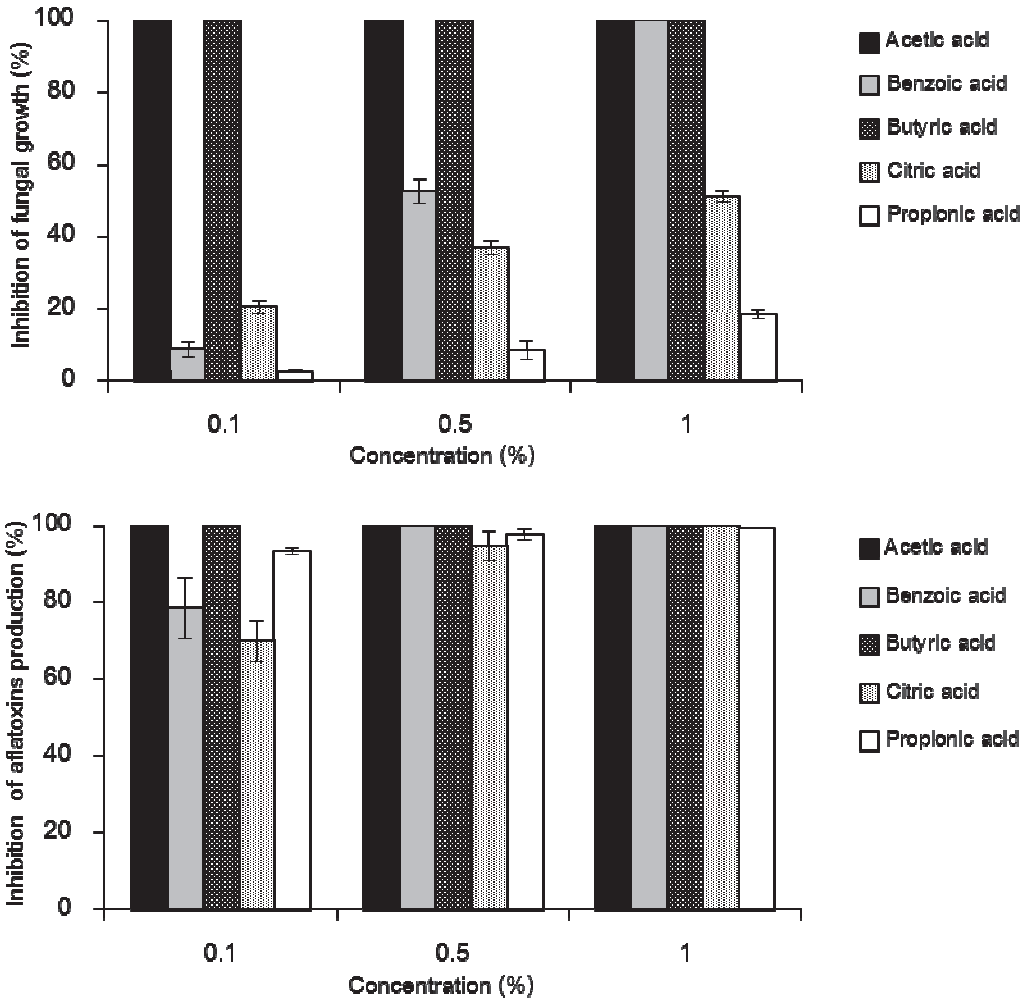

Figure 2 Effect of various organic acids at 3 concentrations (0.1, 0.5 and 1.0%) on colony growth and aflatoxins production of *Aspergillus* sp. KUCL01 after 7 days

เอกสารอ้างอิง

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.

Avis, T.J. and R. P. Bélanger. 2001. Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. Appl. Environ. Microbiol. 67:956-960.

Gowda, N. K. S., V. Malathi and R. U. Suganthi. 2004. Effect of some chemical and herbal compounds on growth of *Aspergillus arasiticus* and aflatoxin production. Anim. Feed Science Technol. 116(3): 281-291.

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

Liu, S., W. Ruan, J. Li, H. Xu, J. Wang, Y. Gao and J. Wang. 2008. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. Mycopathologia 166:93–102.

Paterson, R. R. M. and N. Lima. 2010. How will climate change affect mycotoxins in food? Food Res. Int. 43: 1902-1914.

Pelaez, A. M. L., C. A. S. Catano , E. A, Q. Yepes, R. R. G. Villarroel, G.L.D. Antoni and L. Giannuzzi. 2012. Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. Food Control 24 (1-2): 177-183.

Shekhar, M., S. Singh, A. A. A. Khan and S. Kumar. 2009. Efficacy of inorganic salts and organic acids against colony growth of *Aspergillus flavus* and their use to control aflatoxin level in post harvest maize. Internet J. Food Safety. 11: 4-10

Thanaboripat, D., T. Premsri, N. Punbusayakul and O. Sukchareon. 1996. Effects of food preservatives on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in liquid medium. ASEAN Food J. 11(2):61-64.