สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การกำจัดสารพิษแอฟฟลาทอกซิน โดยแบคทีเรียในโยเกิร์ต

นางสาวกิตติมา ไกรทีรพรรณ
นายชดินทร์ ชัชนงษ์ศักดิ์
นางสาวสินีนาฏ ศรีสนั่น

2/ม.
D674 D
6125745
เลขหมู่ 25๙
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2536

Detoxification of aflatoxin by bacteria in yogurt

Miss Kittima Kraipeerapun

Mr. Chadin Pattanaphongsak

Miss Sineenat Srisanan

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1993

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การทำลายสารพิษแอฟฟลาทอกซินโดยใช้แบคทีเรียในโยเกิร์ต	
โดย	นางสาวกิตติมา	ไกรฟีรพรรณ
	นายชดินทร์	พัฒนพงษ์ศักดิ์
	นางสาวสินีนาฏ	ศรีสนั่น
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.ดุษณี	ธนะบริพัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์สุรีย์	นานาสมบัติ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

_____ หัวหน้าภาค
(ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม)
คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

_____ ประธานกรรมการ
(ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม)

_____ กรรมการ
(รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

_____ กรรมการ
(อาจารย์สุรีย์ นานาสมบัติ)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การทำลายสารพิษแอฟฟลาทอกซิน โดยแบคทีเรียในยเกิร์ต
นักศึกษา	นางสาว กิตติมา ไกรฟีรพรรณ
	นาย ชดินทร์ พัฒนพงษ์ศักดิ์
	นางสาว สินีนาฎ ศรีสนั่น
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์สุรีย์ นานาสมบัติ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2536

บทคัดย่อ

การทำลายสารพิษแอฟฟลาทอกซินมีหลายวิธี ซึ่งปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่ถูกทำลายขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของแต่ละวิธีที่ใช้ การทำลายสารพิษแอฟฟลาทอกซินโดยใช้ Streptococcus lactis TISTR 457 พบว่า S. lactis สามารถทำลายสารพิษแอฟฟลาทอกซินของ Aspergillus flavus 102566 ได้ดีที่สุดเมื่อเริ่มเลี้ยง A. flavus ก่อน S. lactis เป็นเวลา 3 วันใน Lablemco tryptone broth medium โดย S. lactis สามารถลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน G_1 จาก 89.40 เป็น 26.33 พีพีเอ็ม และลดปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1 จาก 22.57 เป็น 4.32 พีพีเอ็ม เมื่อนำ S. lactis จากการศึกษาในขั้นต้นมาเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียใน commercial yogurt ในด้านความสามารถในการลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 พบว่า S. lactis สามารถลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินจาก 50 เป็น 33.70 พีพีเอ็ม ซึ่งสามารถลดได้ดีกว่า ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียใน commercial yogurtสามารถลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินB_1 จาก 50 เป็น 37.25 พีพีเอ็ม ซึ่งความสามารถในการลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1ของ S. lactis และแบคทีเรียในcommercial yogurt จะแปรผันตามระยะเวลาบ่ม

Special Project Titel	:	Detoxification of aflatoxin by bacteria in yogurt
Name	:	Miss Kittima Kraipeerapun
Name	:	Mr Chadin Pattanapongsak
Name	:	Miss Sineenat Srisanan
Special Project Advisor	:	Dr. Dusanee Thanaboripat
Special project Co.advisor	:	Miss Suree Nanasombat
Department	:	Applied Biology
Academic year	:	1993

A B S T R A C T

There are various methods for detoxification of aflatoxin and the ability for aflatoxin detoxification depends on the efficiency of each method . From this study , it was found that the detoxification of aflatoxin by Streptococcus lactis TISTR 457 is very efficient when Aspergillus flavus 102566 was inoculated before S. lactis for 3 days . S. lactis could reduce aflatoxin G_1 and B_1 from 89.4 to 26.33 ppmand from 22.57 to 4.32 ppm respectively. When S. lactis from previous study to compare the efficeincy for aflatoxin B_1 detoxification with bacteria in commercial yogurt , it was found that S. lactis could reduce aflatoxin B_1 from 50 to 33.7 ppm whereas bacteria in commercial yogurt could reduce aflatoxin B_1 to 37.25 ppm.The efficiency of detoxification of aflatoxin B_1 by S. lactis and bacteria in commercial yogurt was varied by storage time.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความร่วมมือช่วยเหลือ และ สนับสนุนจากหลาย ๆ ฝ่ายดังนี้

ขอกราบพระคุณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยที่ได้กรุณาเอื้อเฟื้อเชื้อจุลินทรีย์ ที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนคำแนะนำวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

ขอกราบพระคุณ รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้กรุณาให้คำแนะนำการทำโครงงานพิเศษตลอดจนแนวทางการแก้ไขปัญหา

ขอกราบพระคุณหัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ตลอดจนอาจารย์ทุก ๆ ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ให้

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ทุกคน ที่มีส่วนร่วมให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ

ท้ายสุดนี้ขอกราบพระคุณ บิดามารดาของผู้จัดทำ ผู้ได้เกื้อหนุนปัจจัยต่าง ๆ ในการทำโครงงานพิเศษ และให้กำลังใจในการแก้ไขปัญหาต่อผู้จัดทำตลอดมา

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย		ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญตาราง		ง
สารบัญรูป		จ
บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง	5
2.1	ประวัติแอฟฟลาทอกซิน	5
2.2	โครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของแอฟฟลาทอกซิน	6
2.3	แหล่งที่พบแอฟฟลาทอกซิน	10
2.4	ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน	12
2.5	การสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซิน	15
2.6	การเกิดพิษของแอฟฟลาทอกซิน	19
2.7	นมเปรี้ยว	23
2.8	กระบวนการหมักกรดแลกติก	24
2.9	รียเกิร์ต	29
บทที่ 3	การดำเนินงานวิจัย	31
	อุปกรณ์และสารเคมี	31
	วิธีการทดลอง	33
บทที่ 4	ผลการทดลองและวิจารณ์	35
บทที่ 5	สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	46
ภาคผนวก ก		
	การเตรียม Spore suspension	53
	การเตรียม Cell suspension	53

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 2-1	คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของแอฟฟลาทอกซินและอนุพันธ์	10
ตารางที่ 2-2	ปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่พบจากอาหารชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย	12
ตารางที่ 4-1	ค่าพีเอชและปริมาณแอฟฟลาทอกซินของ A. flavus 102566 ในอาหารเหลว	36
ตารางที่ 4-2	ผลแสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณแอฟฟลาทอกซินของ A. flavus เมื่อเลี้ยง A. flavus พร้อมกับ S. lactis เป็นเวลา 7 วัน	38
ตารางที่ 4-3	ผลแสดงพีเอชและปริมาณแอฟฟลาทอกซินในอาหารเหลวเมื่อเริ่มเลี้ยง A. flavus ก่อน S. lactis เป็นเวลา 3 วัน	39
ตารางที่ 4-4	ผลแสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณแอฟฟลาทอกซินของ A. flavus เมื่อเลี้ยง S. lactis ก่อน A. flavus เป็นเวลา 3 วัน	40
ตารางที่ 4-5	ผลแสดงการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดและปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่เหลืออยู่	43
ตารางที่ 4-6	ผลแสดงการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดและปริมาณแอฟฟลาทอกซิน	44
ตารางที่ 5-1	แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณแอฟฟลาทอกซิน G_1	46
ตารางที่ 5-2	แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1	47
ตารางที่ 5-3	การเปรียบเทียบสารพิษแอฟฟลาทอกซิน G_1 ในอาหารเหลว	48
ตารางที่ 5-4	การเปรียบเทียบสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 ในอาหารเหลว	49
ตารางที่ 5-5	แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1	51
ตารางที่ 5-6	การเปรียบเทียบหัวเชื้อ	51

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 2-1	สูตรโครงสร้างของแอฟฟลาทอกซินและอนุพันธ์	9
รูปที่ 2-2	กระบวนการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซิน B_1 และสารที่เกี่ยวข้อง	15
รูปที่ 2-3	วิถีทางกระบวนการสังเคราะห์ secondary metabolites	16
รูปที่ 2-4	กระบวนการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซิน B_1 จาก Sterigmatocystin	17
รูปที่ 2-5	การสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซิน B_1	18
รูปที่ 2-6	กลไกทางชีวเคมีของแอฟฟลาทอกซินต่อความผิดปกติทางพันธุกรรม	21
รูปที่ 2-7	กระบวนการหมักกรดแลกติกจากกลูโคสโดย Leuconostoc mesenteroides	26
รูปที่ 4-1	ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน G_1 ของ A. flavus ที่วิเคราะห์ได้ในสภาวะต่างๆ	41
รูปที่ 4-2	ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1 ของ A. flavus ที่วิเคราะห์ได้ในสภาวะต่างๆ	42
รูปที่ 4-3	ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1 ที่วิเคราะห์ได้จากยีสต์	45

ภาคผนวก ข

รูปที่ 1	Stock Culture ของ S. lactis และ A. flavus	57
รูปที่ 2	เครื่องวัดพีเอช	57
รูปที่ 3	เครื่องเขย่า	58
รูปที่ 4	การสกัดสารพิษแอฟฟลาทอกซินในกรวยแยกโดยใช้คลอโรฟอร์ม	59
รูปที่ 5	ตู้บ่มอุณหภูมิต่ำ	60
รูปที่ 6	การกรองยีสต์ออกจากคลอโรฟอร์ม	61
รูปที่ 7	เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ	61
รูปที่ 8	การกรองโดยใช้ Sep-pak	62
รูปที่ 9	High Pressure Liquid Chromatography รุ่น LC - 6AD	62

บทที่ 1

บทนำ

"แอฟฟลาทอกซิน" สารก่อมะเร็งที่เป็นที่รู้จักกันทั่วไป เป็น secondary metabolite ที่สร้างขึ้นโดยเชื้อราพวก A. flavus , A. parasiticus และ A. nomius สามารถพบได้ในถั่วลิสงและพืชพวกข้าว เนื่องจากเชื้อรากลุ่มนี้สามารถเจริญบนถั่วลิสงและพืชพวกข้าวได้ ซึ่งในปศุสัตว์วัวนม ก็จะให้พืชพวกนี้เป็นอาหารสัตว์ด้วย เมื่อวัวได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนแอฟฟลาทอกซิน บี1 แล้ว เมตาบอลิซึมภายในร่างกายวัวจะเปลี่ยนแอฟฟลาทอกซิน บี 1 ให้กลายเป็นแอฟฟลาทอกซิน M_1 ซึ่งจะออกมากับนมวัว ซึ่งแอฟฟลาทอกซิน M_1 นี้มีความเป็นพิษใกล้เคียงกับของแอฟฟลาทอกซิน B_1 จึงทำให้นมที่มีการปนเปื้อนแอฟฟลาทอกซิน M_1 เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เนื่องจากมีผลทำให้เกิดมะเร็งกับตับและปอด จะเห็นได้ว่าสารพิษแอฟฟลาทอกซิน เป็นสารพิษที่มีอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ จึงมีการศึกษาค้นคว้ากันมาก การวิจัยส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปที่การป้องกันและต่อต้านการเกิดสารพิษแอฟฟลาทอกซินในอาหารและผลิตผลทางการเกษตรอื่น ๆ

Magella และ Hafez (1984) ได้ศึกษาถึงการใช้รูเมนในการทำลายสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 โดยพบว่ากรดที่เกิดขึ้นสามารถเปลี่ยนสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 ไปเป็น hydroxydihydroaflatoxin B_1 ได้ และเมื่อให้สารนี้แก่ลูกไก่เป็นเวลา 7 วัน พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่ารูเมนที่มีการปนเปื้อนสารพิษแอฟฟลาทอกซินจะไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์

รูเมน คือ นมเปรี้ยวชนิดหนึ่งเป็นผลิตภัณฑ์นมที่เกิดขึ้นจากการเติมจุลินทรีย์ลงไป มักอยู่ในรูปแข็งตัวหรือกึ่งเหลว โดยน้ำนมจะเกิดมีรสเปรี้ยว และตกตะกอนภายใต้อิทธิพลของจุลินทรีย์ที่ลงไปในน้ำนม การเปลี่ยนน้ำตาลแล็กโทสเป็นกรดแลกติกนี้มีผลต่อการรักษาน้ำนมไปในตัว เพราะการเกิดกรดทำให้น้ำนมมีความเป็นกรดสูงขึ้น จุลินทรีย์ที่จะทำให้น้ำนมเสื่อมคุณภาพไม่สามารถเจริญได้ จึงสามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวไว้ได้นานขึ้น

เชื้อจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตรูเมนมี 2 ชนิด คือ Streptococcus

thermophilus และ Lactobacillus bulgaricus ซึ่งแบคทีเรียพวกนี้เจริญที่อุณหภูมิสูงได้ อุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญคือ ระหว่าง 40 - 45 ซ โดย L. bulgaricus และ S. thermophilus จะมีปฏิกิริยาเกี่ยวข้องกันในลักษณะร่วมมือกัน (protoco-operation) มากกว่าจะเป็นแบบภาวะอยู่ร่วมกัน (symbiosis) S. thermophilus จะถูกกระตุ้นให้เจริญเนื่องจากได้รับกรดอมิโนอิสระและเพปไทด์ที่ L. bulgaricus ย่อยได้จากโปรตีนในน้ำนมและ L. bulgaricus จะถูกกระตุ้นให้ผลิตกรดโดยสารประกอบที่สร้างขึ้นโดย S. thermophilus ในสภาพที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำหรือไม่มีออกซิเจน สารประกอบที่สร้างขึ้นนี้คือ กรดฟอร์มิก นอกจากนี้คาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยออกมาโดย S. thermophilus ก็มีผลช่วยในการเจริญของ L. bulgaricus ด้วย

จากรายงานของ Wiseman และ Marth (1985) และ El. Gendy และ Marth (1980) นั้นพบว่า S. lactis นั้นจะต่อต้านแอฟฟลาทอกซินที่ผลิตโดย A. flavas โดยกรดที่ S. lactis ผลิตขึ้นเอง โดยจะผลิตกรดในช่วงต้นๆของ logarithmic phase ของตัวมันเองและจะมีผลยับยั้งมากที่สุดช่วง ต้นๆ stationary phase

Coallier - Ascah และ Idziak (1985) ได้ทดลองนำเชื้อแบคทีเรีย S. lactis ซึ่งเป็น starter ของการทำเนยแข็งและนมเปรี้ยว มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใส่เชื้อรา A. flavas พบว่ามีผลทำให้เชื้อราสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินน้อยลงหรือไม่มีการสร้างเลย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาถึงการเจริญร่วมกันระหว่าง A. flavas และ S. lactis และการลดปริมาณแอฟฟลาทอกซินโดยเชื้อจุลินทรีย์ในโยเกิร์ต โดยการเพาะเลี้ยง A. flavas ร่วมกันกับ lactic acid bacteria นั้นจะใช้S. lactis เป็นตัวแทนของ lactic acid bacteria โดยทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารเหลว แล้วทำการวัด pH และปริมาณของแอฟฟลาทอกซินทุกๆวันเป็นเวลา 7 วันเพื่อที่จะได้ทราบถึงผลของ S. lactis ต่อการผลิตแอฟฟลาทอกซินของ A. flavas ว่ามีผลเกี่ยวข้องกันอย่างไร ส่วนในการศึกษาการลดแอฟฟลาทอกซินโดยเชื้อจุลินทรีย์ในโยเกิร์ตนั้นทำโดยเติมแอฟฟลาทอกซินซึ่งเราทราบความเข้มข้นและปริมาณลงไปในโยเกิร์ตที่เตรียมไว้

แล้วนำไปบ่มจากนั้นเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ว่าสารพิษแอฟฟลาทอกซินลดลงหรือไม่ จากนั้นจึงนำผลที่ได้ทั้งหมดมาเปรียบเทียบกัน ซึ่งทำให้เราทราบถึงความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในโยเกิร์ต และสามารถใช้ประโยชน์จากนมที่มีการปนเปื้อนสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินของเชื้อ Aspergillus flavus 102566
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ Streptococcus lactis TISTR 457 ที่มีต่อการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินของเชื้อ A. flavus
3. เพื่อศึกษาการทำลายสารพิษแอฟฟลาทอกซินโดยใช้แบคทีเรียในโยเกิร์ต

ขอบเขตการทดลอง

การศึกษาโครงงานพิเศษในหัวข้อนี้ เป็นการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการลดสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อ A. flavus 102566โดยเชื้อ S. lactis TISTR 457 ในอาหารเหลว Lablemco tryptone broth medium จากการนั้นจึงศึกษาต่อถึงผลของจุลินทรีย์ในโยเกิร์ตซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับ S. lactis ในการลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน โดยการเติมสารละลายมาตราฐานแอฟฟลาทอกซิน(Sigma chemical company No.A-1022) ลงในโยเกิร์ต หลังจากการสกัดสารพิษแอฟฟลาทอกซินแล้ว จึงนำสารพิษแอฟฟลาทอกซินมาตรวจดูชนิดและปริมาณของสารพิษโดยใช้ HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) เพื่อวิเคราะห์ผลว่าสามารถทำลายสารพิษแอฟฟลาทอกซินได้หรือไม่ การศึกษานี้เป็นการเปรียบเทียบโดยใช้หัวเชื้อโยเกิร์ตจากท้องตลาด (commercial yogurt) ซึ่งไม่ทราบปริมาณและชนิดที่แน่นอน ซึ่งน่าจะศึกษาต่อไปถึงปริมาณและชนิดของหัวเชื้อโยเกิร์ต ซึ่งให้ลักษณะที่ดีและเป็นผลที่น่าพอใจ

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทักษะในการวางแผนการทดลอง ตลอดจนประสบการณ์ในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการทดลอง

2. เพื่อจะได้ทราบว่า S. lactis มีผลต่อปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่ผลิตโดยเชื้อ A. flavus

3. เพื่อทราบถึงประสิทธิภาพในการทำลายสารพิษแอฟฟลาทอกซินของโยเกิร์ต

4. เพื่อสามารถรับประทานโยเกิร์ตได้อย่างปลอดภัย

5. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาต่อถึงสิ่งที่มีผลกระทบต่อสารพิษแอฟฟลาทอกซินและผลที่เกิดขึ้น

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักเกณฑ์ที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประวัติของแอฟฟลาทอกซิน

ประวัติศาสตร์ของแอฟฟลาทอกซินได้เริ่มต้นขึ้นในปี 1960 เมื่อมีการเกิดโรคระบาดชนิดหนึ่งที่ไม่ทราบสาเหตุในฟาร์มไก่งวงที่ประเทศอังกฤษ พบว่าไก่งวงจำนวนเป็นแสน ๆ ตัว มีอาการอ่อนเพลีย ป่วยและล้มตายลง จึงตั้งชื่อโรคนี้อย่างกว้าง ๆ ว่า Turkey-X disease (Blount,1961 และ Goldblatt,1969) หลังจากนั้นไม่นานก็มีโรคระบาดชนิดเดียวกันเกิดขึ้นกับเป็ดและไก่ฟ้าในประเทศเคนยาและโรคระบาดในปลาเทราท์ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา จากการค้นคว้าหาสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคนี้ในประเทศอังกฤษพบว่าโรค Turkey-X disease นี้เกี่ยวโยงโดยตรงต่ออาหารสัตว์ที่ประเทศอังกฤษสั่งซื้อมาจากประเทศบราซิล และอาหารสัตว์เหล่านั้นประกอบด้วยถั่วลิสงเป็นสำคัญคาดว่าถั่วลิสงน่าจะเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดพิษร้ายแรงต่อสัตว์ปีก ภายหลังจากการนำเอาถั่วลิสงเหล่านั้นมาเลี้ยงกับเป็ดทดลองแล้ว ปรากฏว่าเกิดอาการเป็นพิษ เช่นเดียวกับเป็ด และไก่งวงในระยะที่มีโรคระบาดกล่าวคือมีอาการซึม เบื่ออาหาร ปีกตก คอตก ขาอ่อน เพลีย และตายในที่สุด ผลจากการตรวจทางพยาธิวิทยาของอวัยวะต่าง ๆ พบว่า ตับเป็นอวัยวะที่ถูกทำลายมากที่สุด ต่อมาในปีเดียวกันนั่นเอง Sargeant และคณะ(1961) ได้ทำการสกัดแยก และทำให้สารพิษบริสุทธิ์จากถั่วลิสงที่นำมาจากประเทศบราซิล พบว่าเชื้อราที่ขึ้นบนถั่วลิสงคือ Aspergillus flavus ซึ่งสามารถสร้างสารพิษได้เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น สารพิษที่ถูกสร้างขึ้น เป็นชนิดเดียวกับที่พบจากส่วนสกัดของถั่วลิสงที่เป็นพิษ ดังนั้นสารที่ได้จากเชื้อรานี้จึงถูกเรียกว่า แอฟฟลาทอกซิน (aflatoxin) ตามชื่อเชื้อราที่สร้างขึ้นนั่นเอง

2.2 โครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของแอฟฟลาทอกซิน

แอฟฟลาทอกซินเป็นsecondary metabolite ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อรา ซึ่งเป็นกลุ่มสารเคมี พวก bis-furanocoumarin แอฟฟลาทอกซิน ที่พบอยู่โดยทั่วไปจะเป็น แอฟฟลาทอกซิน B_1 และ G_1 ตามลำดับ แต่ก็มี แอฟฟลาทอกซิน อีกหลายชนิดในปริมาณเล็กน้อย

แอฟฟลาทอกซิน ที่พบอยู่ในปัจจุบันมี 12 ชนิดคือ B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, M_2 , B_{2a} , G_{2a} , P_1 , GM_1 , R_0 (aflatoxicol) และ B_3 (parasiticol) แต่ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารทั่วไปมีเพียงชนิด B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M_1, M_2 , B_{2a} และ G_{2a}

เมื่อสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 เข้าไปสู่ร่างกายแล้ว ส่วนใหญ่จะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมี โดยอาศัยกลุ่มเอนไซม์ที่เรียกว่า "drug-metabolizing enzyme" ใน endoplasmic reticulum ของเซลล์ตับได้ผลิตผลเป็น แอฟฟลาทอกซิน ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ M_1 , P_1 , B_{2a} และ R_0 (aflatoxicol)

แอฟฟลาทอกซิน B_2 และ G_2 เป็น dihydroderivative ของ aflatoxin B_1 และ G_1 แอฟฟลาทอกซิน M_1(4-hydroaflatoxin B_1) และ M_2 เป็น hydroxylate metabolite ของแอฟฟลาทอกซิน B_1 และ B_2 แอฟฟลาทอกซิน M_1 และ M_2 พบในนมหรือปัสสาวะของสัตว์ที่ได้รับ แอฟฟลาทอกซิน B_1 และ B_2 เข้าไป แอฟฟลาทอกซิน B_{2a} และ G_{2a} เกิดจาก hydration ของ แอฟฟลาทอกซิน B_2 และ G_2 เช่น เมื่อทำปฏิกิริยากับ trifluoroacetic acid พบในอาหารทั่วไปในปริมาณที่ต่ำ แอฟฟลาทอกซิน B_1 และ B_2 มีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่สำคัญคือ จะเรืองแสงสีน้ำเงิน (blue fluorescent) เมื่ออยู่ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ในช่วงคลื่น 256-365 นาโนเมตร ส่วน แอฟฟลาทอกซิน G_1 และ G_2 จะเรืองแสงสีเขียวแกมเหลือง (yellowish-green fluorescent) ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตในช่วงคลื่นเดียวกัน (HARTLEY,1963) ความเข้มของแสงที่เรืองเป็นสัดส่วนโดยตรง กับ ปริมาณของสารพิษ แอฟฟลาทอกซิน การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของสารนี้ จะทำให้คุณสมบัติในการเรืองแสงลดลงหรือหมดลงได้ คุณสมบัติการเรืองแสงนี้ถูกนำไปเป็นวิธีการวัดปริมาณ และทดสอบ แอฟฟลาทอกซิน ได้อย่างถูกต้องและรวดเร็วมาก

โดยทั่วไป Aspergillus flavus จะสร้างเฉพาะแอฟฟลาทอกซิน B ในขณะที่ Aspergillus parasiticus จะสร้างทั้งแอฟฟลาทอกซิน B และ G (Davis และ Diener,1978)

แอฟฟลาทอกซินละลายในน้ำและสารที่มีขั้วอื่นๆได้เล็กน้อยละลายได้ดีในคลอโรฟอร์ม เบนซิน และอะซิโตน แต่ไม่ละลายในอีเทอร์ และปิโตรเลียมอีเทอร์ ทนทานต่อความร้อนได้สูง ความร้อนจากกระบวนการหุงต้ม หรือการอบนึ่งฆ่าเชื้อโรคไม่สามารถทำลายสารพิษของแอฟฟลาทอกซิน แต่อาจลดความเป็นพิษได้บ้าง Coomes และคณะ (1966) พบว่าการอบนึ่งฆ่าเชื้อโรค (151 ปอนด์/ตร.นิ้ว,120 ซ) ตัวอย่างถั่วลิสงที่มีแอฟฟลาทอกซิน 7000 กรัมต่อกก. เป็นเวลา 4 ชม. สามารถลดระดับความเป็นพิษเหลือ 350 กรัมต่อกก.Mann และคณะ (1967) พบว่าแอฟฟลาทอกซิน จะลดลง 80% ภายใต้อุณหภูมิ 100 ซ เป็นเวลา 2 ชม.ในถั่วลิสงที่มีความชื้น 20% Lee และคณะ (1969)รายงานว่าแอฟฟลาทอกซิน B_1 80% และ G_1 60% จะถูกทำลายเมื่อบ่มถั่วลิสงที่ 150 ซ เป็นเวลา 30 นาที

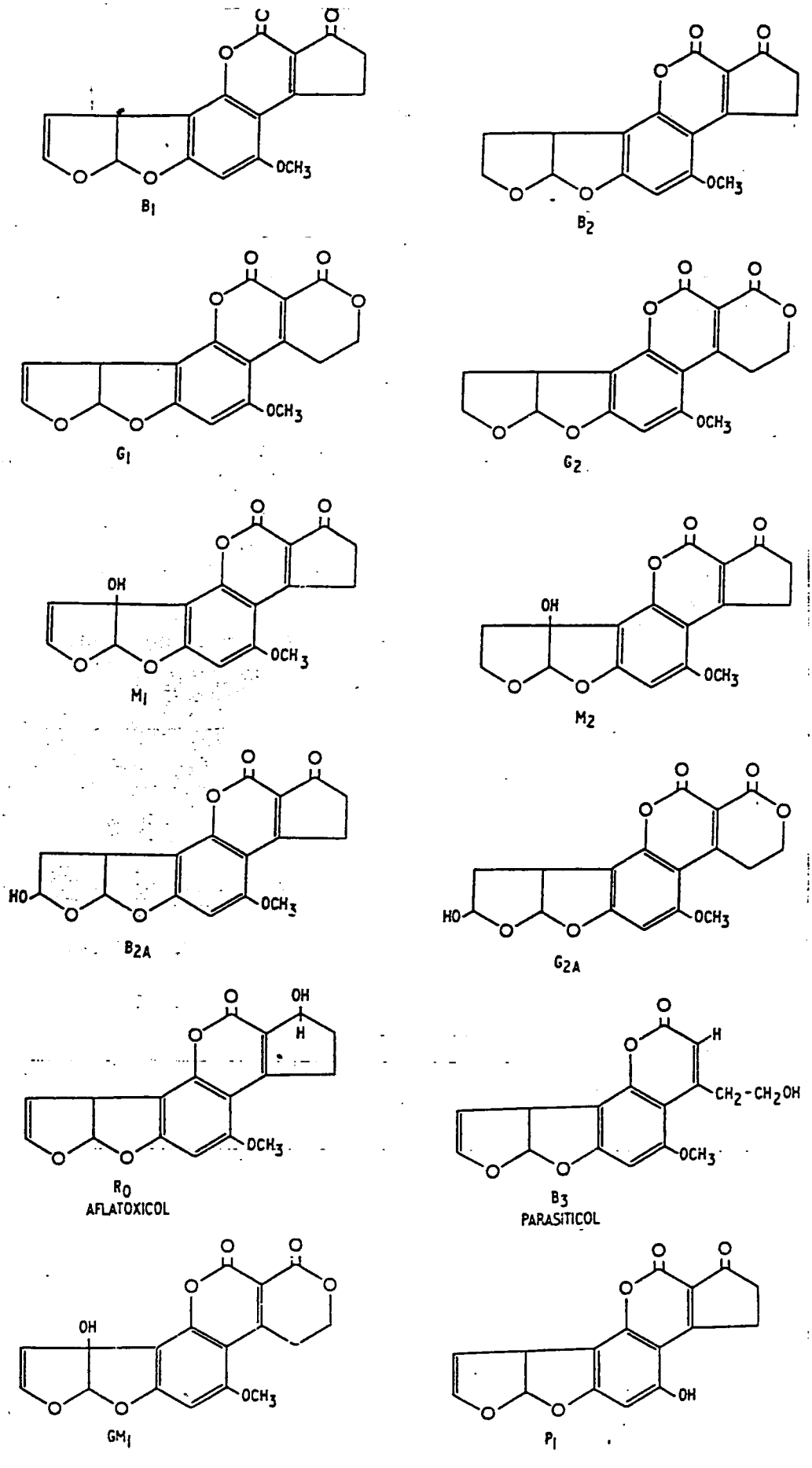
แอฟฟลาทอกซิน จะไม่ทนต่อสารเคมีดังต่อไปนี้ คือ ไฮโปคลอไรท์ , แอมโมเนียต่างแก่ และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ Treger และ Stoloff (1967) ได้ทำการทดลองถึงการทำลาย แอฟฟลาทอกซิน โดยใช้สารเคมีที่สามารถออกซิไดส์ (oxidizing agents) ซึ่งได้แก่ benzoyl peroxide , osmium tetraoxide และ ไอโอดีน เป็นต้น สารเคมีเหล่านี้จะทำลายแอฟฟลาทอกซิน B_1 และ G_1 แต่ไม่ทำลาย B_2 และ G_2 นอกจากนี้ยังมี โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต ($KMnO_4$) โซเดียมโบเรท ($NaBO_3$) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์กับโซเดียมโบไรท์ (3% H_2O_2 :$NaBO_2$, 1:1โดยน้ำหนัก) สามารถทำลายแอฟฟลาทอกซิน ทั้ง 4 ชนิดได้ แต่ก็เป็นที่น่าสังเกตว่าสารเคมีเหล่านี้จะมีประโยชน์ในการทำลาย แอฟฟลาทอกซิน ชนิดต่าง ๆ ที่ปะปนอยู่บนเครื่องแก้วหรือเครื่องใช้อื่น ๆ ในห้องปฏิบัติการมากกว่าอาหารพวกเมล็ดพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่ง 5% โซเดียมไฮโปคลอไรท์ ซึ่งนิยมใช้ในการทำลาย แอฟฟลาทอกซิน ในห้องปฏิบัติการ (Feuell, 1966a)

Feuell(1966a)พบว่าแอฟฟลาทอกซินจะเสื่อมสลายได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตแต่รังสีแกมมา 2.5 เมกกะแรดไม่สามารถทำลายสารพิษนี้ได้ ในสภาวะด่าง lactone ring ของแอฟฟลาทอกซินจะแตกออกจากกัน แต่ก็อาจกลับคืนสู่โครงสร้างเดิมได้อีก ถ้าสภาวะ

กลายเป็นกรดหรือกลางอีก ดังนั้นการใช้สภาวะอย่างใดอย่างหนึ่งทางเคมี หรือฟิสิกส์ จึงไม่เพียงพอที่จะทำลายแอฟฟลาทอกซินได้หมดสิ้น (ไมตรี ,2531)

Ciegler และคณะ (1966) ได้พบว่ามีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถทำลาย แอฟฟลาทอกซินได้ ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย Flavobacterium auranticum และ Streptococcus lactis โดยพบว่า Flavobacterium auranticum สามารถกำจัดแอฟฟลาทอกซินในอาหารเหลวได้ จากการทดลองที่ใช้น้ำนม 50 มล. น้ำมันข้าวโพด 50 มล. และ เนยถั่วลิสง 50 กรัม ซึ่งมีแอฟฟลาทอกซิน B_1 ปะปนอยู่ในปริมาณ 500,700 กรัมต่ออาหาร 1 กก. ตามลำดับ แล้วใส่เชื้อ F. auranticum ลงไปจำนวน $2.0*10^{13}$ เซลล์ พบว่าแอฟฟลาทอกซิน ถูกทำลายหมดไปภายในเวลา 3 ชั่วโมง Mabrouk และคณะ(1988) พบว่าสาหร่ายทะเลบางชนิด เช่น Sargassum despiense , Turbinaria decurense, Dilophus ligulatus และ Padina pavonia มีผลทำให้เชื้อราสร้างแอฟฟลาทอกซินได้น้อยลง

สำหรับสูตรโครงสร้างของ aflatoxin ชนิดต่าง ๆ ได้แสดงไว้ดังรูปที่ 2-1 ส่วนคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของ aflatoxin และอนุพันธ์ จะแสดงไว้ในตารางที่ 2-1



รูปที่ 2-1 สูตรโครงสร้างของแอฟฟลาทอกซินและอนุพันธ์ (Hartley และคณะ,1963)

ตารางที่ 2-1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของแอฟฟลาทอกซินและอนุพันธ์

Aflatoxin	Molecular formula	Molecular weight	Melting point	ultraviolet adsorption (362–363nm)	Fluorescence emission
B_1	$C_{17}H_{12}O_6$	312	268-269	21,800	425
B_2	$C_{17}H_{14}O_6$	314	286-289	23,400	425
G_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328	244-246	16,100	450
G_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330	237-240	21,000	450
M_1	$C_{17}H_{12}O_7$	328	299	19,000 (357nm)	425
M_2	$C_{17}H_{14}O_7$	330	293	-	-
B_{2a}	$C_{17}H_{14}O_7$	330	240	20,400	-
G_{2a}	$C_{17}H_{14}O_8$	346	190	18,000	-
R_0	$C_{17}H_{16}O_6$	314	230-234	14,000	425
B_3	$C_{16}H_{14}O_6$	302	233-234	9,700	-
GM_1	$C_{17}H_{12}O_8$	344	276	12,000 (358nm)	-
P_1	$C_{16}H_{10}O_6$	298	>320	14,900 (342nm)	-

2.3 แหล่งที่พบแอฟฟลาทอกซิน

สารพิษแอฟฟลาทอกซินสามารถตรวจพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั่ว ๆ ไป ซึ่งเป็นที่ที่เชื้อรา สามารถสร้างสารพิษ แอฟฟลาทอกซิน เจริญเติบโตได้ แต่แหล่งที่สนใจกันมากคือ อาหาร อาหารที่พบ แอฟฟลาทอกซิน มากที่สุดได้แก่ ถั่วต่าง ๆ ข้าวต่าง ๆ ข้าวโพด ในปัจจุบัน

แอฟฟลาทอกซิน นอกจากจะทำให้เกิดมะเร็งกับคน และสัตว์แล้ว ยังมีผลต่อเศรษฐกิจของประเทศอีกด้วย อาหารสัตว์หลายชนิดในเมืองไทยมีสารพิษชนิดนี้อยู่เป็นจำนวนมาก เช่น ถั่วลิสง กากถั่วลิสง ข้าวโพด จากการสำรวจสารพิษที่จังหวัดเชียงใหม่ พบว่า อาหารประเภทถั่วลิสงมีแอฟฟลาทอกซินอยู่ถึง 80% โดยเป็นชนิด B_1 75-653 พีพีเอ็ม และ B_2 4-161 พีพีเอ็ม Glinsukol และคณะ (1976)ได้ทำการตรวจเชื้อราที่ขึ้นอยู่บนอาหารในประเทศไทย พบว่าถั่วลิสงมีเชื้อราพวก Aspergillus sp. ขึ้นอยู่มาก และพบว่า A. flavus และ A. parasiticus สามารถสร้างแอฟฟลาทอกซิน B_1 ,B_2, G_1 และ G_2 ส่วน A. flavus var. columnaris สร้างได้เฉพาะแอฟฟลาทอกซิน B_2 เท่านั้น แอฟฟลาทอกซินที่เชื้อราสร้างขึ้นทั้งชนิด และปริมาณ จะแตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อรา แต่ทั้งนี้พบว่า A. flavus และ A. parasiticus สามารถสร้างแอฟฟลาทอกซินได้มากกว่าเชื้อราชนิดอื่น แต่ A. flavus บางสายพันธุ์ก็ไม่สามารถสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ ดังนั้นบางครั้งอาจพบเชื้อรา A. flavus เจริญบนอาหาร แต่ไม่พบแอฟฟลาทอกซินบนเปื้อนอยู่เลย

ในประเทศไทยพบว่า 80 % ของเชื้อรา A.flavus สามารถสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ Shank และคณะ (1972) ได้ทำการสำรวจปริมาณแอฟฟลาทอกซินจากอาหารชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้ผลดังตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 ปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่พบจากอาหารชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย

ชนิดของอาหาร	จำนวนอาหารที่มีแอฟฟลาทอกซิน (เปอร์เซนต์)	ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน (พีพีเอ็ม)	
		ค่าเฉลี่ย	ค่าสูงสุด
ถั่วลิสง	49	1,530	12,256
ข้าวโพด	35	400	2,730
พริกแห้ง	11	125	966
กุ้งแห้ง	5	166	772
ถั่วเขียว	5	16	112
งา	3	1	10
หอม,กระเทียม	3	67	60
ข้าวชนิดต่าง ๆ	2	20	98

จากตารางพบว่าปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารแต่ละชนิดนั้นจะแตกต่างกันออกไป อย่างไรก็ดี พอจะสรุปได้ว่าถั่วลิสงจัดเป็นแหล่งอาหารที่ถูกปนเปื้อนด้วยแอฟฟลาทอกซินในระดับที่สูงที่สุด สำหรับข้าวโพด ซึ่งถือว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญก็มีแอฟฟลาทอกซินอยู่ในเกณฑ์ปานกลาง ด้วยเหตุนี้อาจกล่าวได้ว่า ถั่วลิสงเป็นแหล่งอาหารที่มีเชื้อราที่สร้าง แอฟฟลาทอกซิน ได้เจริญได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกจำนวนไม่น้อยที่ตรวจพบว่ามีแอฟฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากถั่วลิสง อาทิ ถั่วลิสงคั่วบน น้ำมันพืช และ อาหารสัตว์ที่มีถั่วลิสง กากถั่วลิสง รวมไปถึงข้าวโพด ถั่วเหลือง ข้าวฟ่าง เป็นส่วนประกอบด้วย เป็นต้น

2.4 <u>ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซิน</u>

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินมีอยู่หลายชนิดด้วยกัน ได้แก่

1.<u>ชนิดของเชื้อรา</u> ถึงแม้ว่า <u>A. flavus</u> และ <u>A. parasiticus</u>

จะเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ แต่ปรากฏว่ามีบางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างแอฟฟลาทอกซิน เช่น A. flavus columnaris ATCC 44310 ที่ใช้ในการหมักซีอิ๊ว พบว่าไม่สร้าง แอฟฟลาทอกซิน (Kaen, 1984) หรือ A. flavus สายพันธุ์ PEVV 52+ ก็ไม่สร้างแอฟฟลาทอกซิน (Hesseltine, 1976) และเชื้อราบางสายพันธุ์จะสร้างเฉพาะแอฟฟลาทอกซิน B_1 แต่ไม่สร้างแอฟฟลาทอกซิน G_1 นอกจากนี้ Torres และคณะ (1980)ได้พบว่าความสามารถในการสร้างแอฟฟลาทอกซินของเชื้อราจะลดน้อยลงเมื่อมีการถ่ายเชื้อ(subculture)บ่อย ๆ

2. ปริมาณออกซิเจน เชื้อราส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญรวมทั้งเชื้อราที่สร้างแอฟฟลาทอกซินด้วย และ แอฟฟลาทอกซิน จะถูกสร้างได้ดีในบรรยากาศที่มีออกซิเจน ในบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 100% จะไม่มีการสร้าง แอฟฟลาทอกซินเลย (Landers, 1967) แต่ถ้าหากว่า ในบรรยากาศที่มีทั้งคาร์บอนไดออกไซด์ และกรดฟอร์มิก พบว่าแอฟฟลาทอกซินจะถูกสร้างขึ้นในปริมาณเล็กน้อย(Clevstrom et.al, 1983)

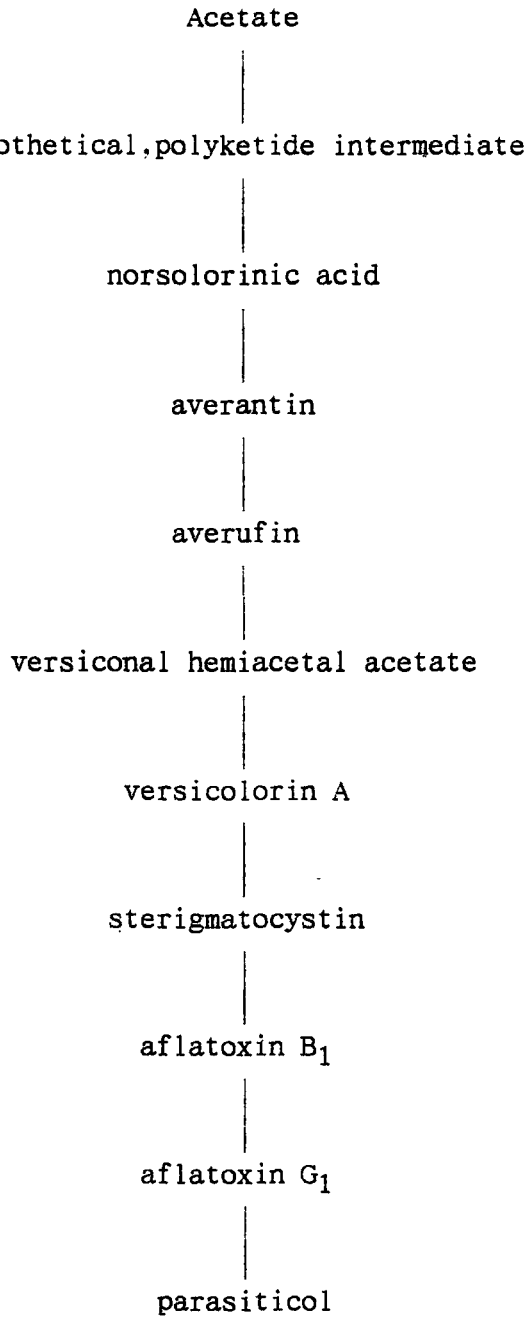
3. ความชื้น ความชื้นก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อรา และการสร้างแอฟฟลาทอกซินด้วย เชื้อราจะสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ดีในอาหารที่มีความชื้นประมาณ 28-31% (Chang and Markakis, 1981) Diner และ Davis(1969) พบว่า เชื้อราที่เจริญบนเมล็ดธัญพืชที่มีความชื้น 15% และ ความชื้นสัมพัทธ์ 50% จะมีการสร้างแอฟฟลาทอกซินน้อยมาก และในอาหารที่มีความชื้น 8-10% ความชื้นสัมพัทธ์ 83 % จะไม่มีการสร้างแอฟฟลาทอกซินเลย

4. อุณหภูมิ อุณหภูมิเฉลี่ยที่เชื้อราจะสร้างแอฟฟลาทอกซิน ได้ดีคือระหว่าง 20-35 ซ เชื้อราจะไม่สร้างแอฟฟลาทอกซิน ที่อุณหภูมิน้อยกว่า 7.5 ซ หรือมากกว่า 40 ซ (Schindler, 1977) Llewellyn และคณะ (1980) พบว่าที่อุณหหภูมิต่ำจะมีการสร้างแอฟฟลาทอกซินจี 1 และ จี2 ได้ดีกว่าบี 1 Diner and Davis (1966)พบว่าเชื้อ A. flavus สามารถสร้าง aflatoxin ได้ดีที่อุณหภูมิ 25 ซ ในขณะที่อุณหภูมิซึ่งเหมาะต่อการสร้างแอฟฟลาทอกซินของเชื้อรา A. parasiticus นั้นอยู่ในช่วง25-30 ซ

5. ธาตุอาหารชนิดต่าง ๆ เชื้อราที่ขึ้นอยู่บนอาหารชนิดต่าง ๆ กันจะให้ปริมาณของแอฟฟลาทอกซินที่ถูกสร้างขึ้นแตกต่างกันออกไป เนื่องมาจากว่า ธาตุอาหารที่มีอยู่ในอาหารเหล่านั้นแตกต่างกัน เช่นพบว่าน้ำตาลซูโครสช่วยให้เชื้อราสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ดี

กว่าน้ำตาลชนิดอื่น ๆ สังกะสีเป็นเกลือแร่ที่ช่วยทำให้เชื้อราสร้างแอฟฟลาทอกซินได้ดีในขณะที่แบเรียม (Ba) เป็นตัวยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซิน นอกจากนี้ยังพบว่าวาเนเดียม (V) และโมลิบดีนัม (Mo) มีผลการยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซินอีกด้วย (Rabie et. al,1981) เกลือและกระเทียมก็มีผลยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซินได้เช่นกัน โดยพบว่าถ้ามีเกลือในปริมาณ 15% จะไม่มีการสร้างแอฟฟลาทอกซินเลย และความเข้มข้นของน้ำสกัดกระเทียมในปริมาณ 0.83-1.3 มก./ลิตร จะยับยั้งการเจริญของเชื้อราและการสร้างแอฟฟลาทอกซิน(ปริมณฑ์ และสุภร, 2520) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากรากชะเอม ขิง หญ้าเจ้าชู้ ต้นสายน้ำผึ้ง อบเชย หัวแครอท และคาเฟอิน มีผลในการยับยั้งการสร้างแอฟฟลาทอกซินด้วย (El-Shayeb and Mabrouk ,1984 ; Bahk and Marth, 1983 ; Batt et.al,1980 ; Lenovich,1981)

6. <u>การใช้สารเคมีต่าง ๆ</u> พบว่าสารเคมีที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา (fungistatic) และยาฆ่าแมลงต่าง ๆ (insecticide) ได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการป้องกันการเจริญของเชื้อรา และการลุกคามของแมลงของพืชในทุ่งหญ้า สารพวกนี้มีผลต่อการสร้างแอฟฟลาทอกซิน จากผลการทดลองพบว่า สารโพรพิโอนิคซึ่งเป็นสารเคมีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ในการป้องกันการเจริญของเชื้อรา ถ้านำมาใช้อย่างไม่ถูกต้องจะทำให้เกิดการสร้างแอฟฟลาทอกซินมากขึ้น (Al-Hilli and Smith ,1979) เช่นเดียวกับกรดซอร์บิก 0.05% จะช่วยชะลอการเจริญของเชื้อรา และทำให้การสร้างแอฟฟลาทอกซินลดน้อยลงด้วย ในขณะที่กรดซอร์บิก 0.025% จะกระตุ้นให้มีการสร้างแอฟฟลาทอกซินเพิ่มมากขึ้น (Gareis et.al,1984) สำหรับยาฆ่าแมลงพวกไดคลอรวส์ (dichlorvos, dimethyl 2,2-dichlorovinyl phsophate)ได้มีการทดลองพบว่าไดคลอรวส์ ปริมาณ 20 ไมโครกรัม/มล. สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษ แอฟฟลาทอกซินได้ (Yao and Hsieh ,1974)

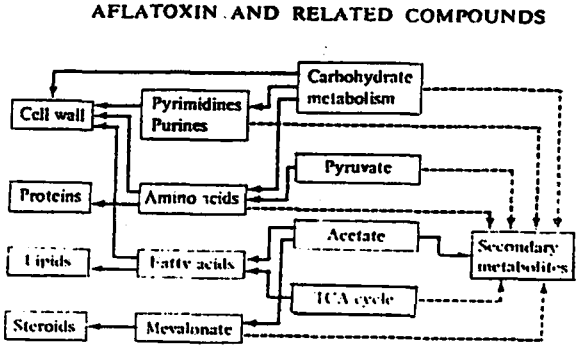


รูปที่ 2-2 กระบวนการสังเคราะห์ aflatoxin B_1 และสารที่เกี่ยวข้อง

2.5 การสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซิน

กระบวนการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซิน B_1 และสารที่เกี่ยวข้องแสดงดังรูปที่ 2-2 การสังเคราะห์ secondary metabolite ในเชื้อราจะมีแหล่งของสารตั้งต้นจาก primary metabolites โดยเฉพาะไขมันและโปรตีน (Bu"lock,1975;

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 2-3 วิถีทางกระบวนการสังเคราะห์ secondary metabolites

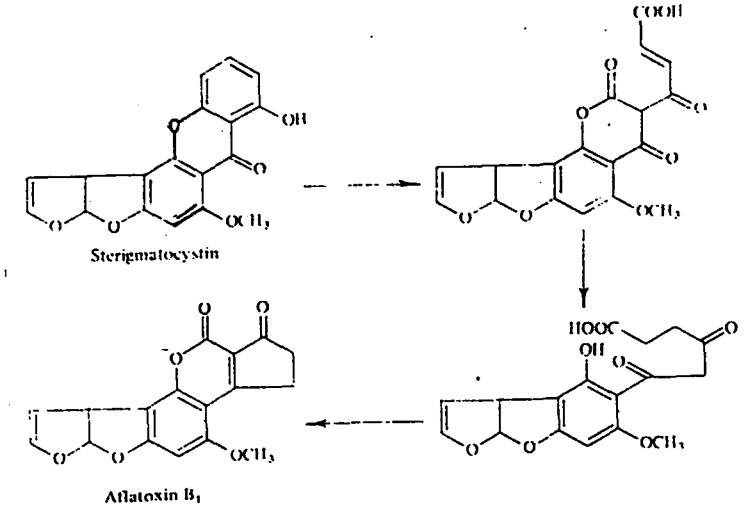
Turner,1976;Drew and Demain,1977: Martin and Demain,1978)รูปที่ 2-3

Detroy และ Hesseltine (1970) ได้แสดงหลักฐานว่าเอนไซม์ในการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซินใน A. parasiticus จะเกิดขึ้นระหว่าง transitianal phase (60-70 ชม.) ในขณะที่การสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิกลดลง

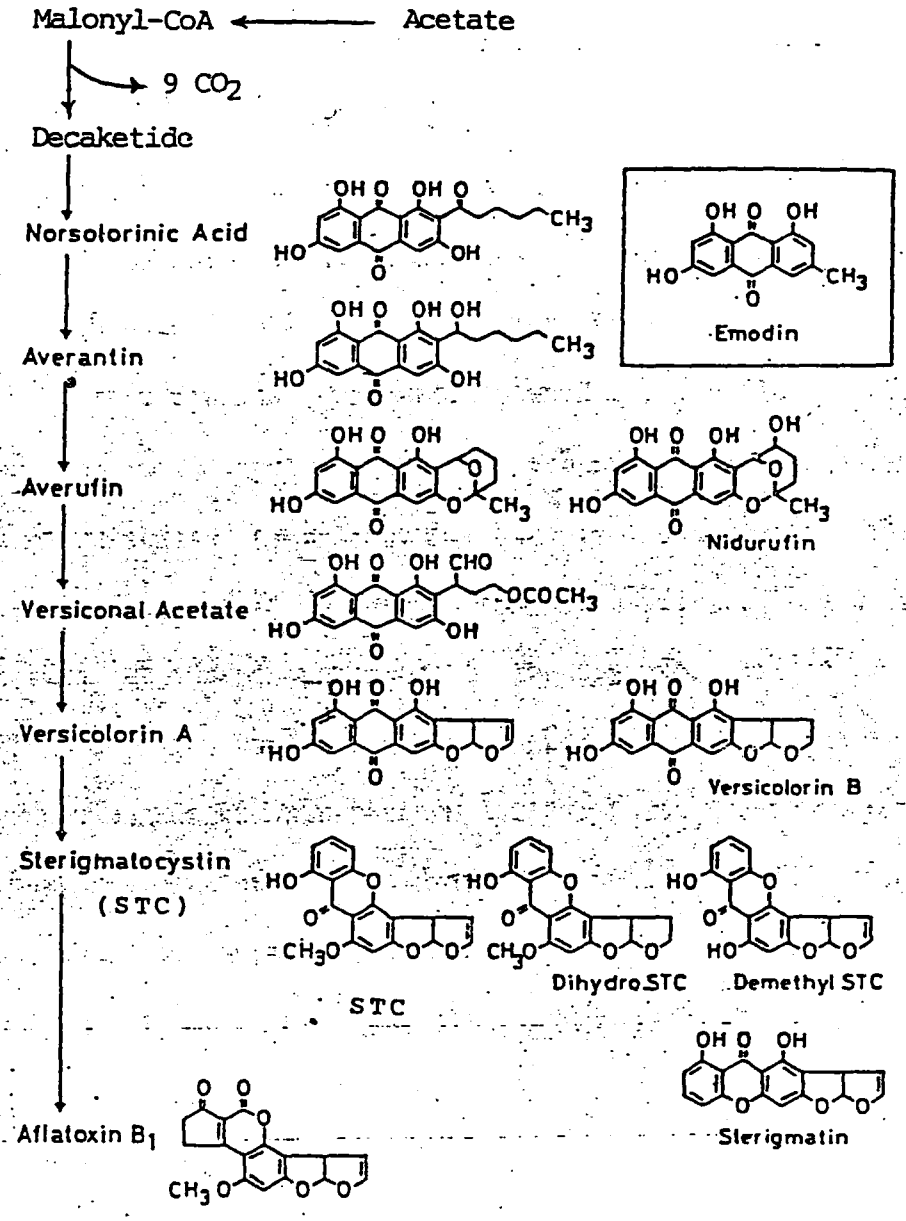
มีการศึกษาถึงบทบาทของกระบวนการไกลโคไลซีส ในการสังเคราะห์แอฟฟาทอกซิน โดย Tyagi และ Venki. tasubramanian (1981) ในเส้นใยของ A. parasiticus NRRL 3240 สารตัวกลางทั้งหมดในขบวนการไกลโคไลซิส ยกเว้นกลูโคส จะมีการกระตุ้นให้สังเคราะห์แอฟฟลาทอกซินจาก exogenous acetate การสร้างแอฟฟลาทอกซินจะเกี่ยวข้องกับระดับของphosphoenolและกรดไพรูวิก ไพรูเวทอาจมีผลหรือเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างแอฟฟลาทอกซิน Rao และคณะ(1980)เสนอว่ากิจกรรมของเอนไซม์ lipid peroxidase และ nucleotide oxidase ที่ระดับต่ำจะเหมาะสมกับการสร้างแอฟฟลาทอกซินมากกว่า นอกจากนั้น Doyle และ Marth (1979)

ยังเสนอว่ากิจกรรมของเอนไซม์ lipid peroxidase ที่สูงขึ้นจะกระตุ้นการสลายของแอฟฟลาทอกซิน Ceiglerและคณะ (1971) รายงานว่าแอฟฟลาทอกซินผลิตมาจากการที่อะซิเตต เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็นวงได้เป็น Cyclic polyketo acid ซึ่งมีคาร์บอน 20 ตัว และ สารประกอบนี้จะเปลี่ยนเป็น Averufin ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น Versiconal และ Sterigmatocystin และแอฟฟลาทอกซิน B_1 ในที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 2-4 และรูปที่ 2-5

จากการศึกษากระบวนการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซินจากเชื้อราในอาหารสังเคราะห์ที่ใช้สารกัมมันตรังสีเป็นแหล่งอาหารชนิดต่าง ๆ พบว่า อาหารที่มีโมเลกุลใหญ่เปลี่ยนแปลงไปได้เป็น Acetic acid ซึ่งเป็นสารที่เป็นตัวให้คาร์บอนและออกซิเจนในโมเลกุลของแอฟฟลาทอกซินเป็นส่วนใหญ่ โดยมีเมทไทรอนีนเป็นแหล่งของ methyl group ในโมเลกุลของแอฟฟลาทอกซิน



รูปที่ 2-4 กระบวนการสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซิน B_1 จาก sterigmatocystin



รูปที่ 2-5 การสังเคราะห์แอฟฟลาทอกซิน B_1

2.6 การเกิดพิษของแอฟฟลาทอกซิน

ความเป็นพิษต่อคนและสัตว์

การศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารพิษแอฟฟลาทอกซินนั้นส่วนใหญ่มุ่งศึกษาเฉพาะแอฟฟลาทอกซิน B_1 ทั้งนี้เนื่องจากแอฟฟลาทอกซิน B_1 เป็นชนิดที่มีความเป็นพิษรุนแรงมากที่สุด ในทางปฏิบัติกระทำโดยการป้อนหรือฉีดแอฟฟลาทอกซิน B_1 ที่มีกัมมันตภาพรังสี (^{14}C aflatoxin B_1) เข้าไปในสัตว์ทดลองเช่น หนูพุกขาว และหนูถีบจักร แล้ววัดดูการกระจายตัว (distribution) และการขับถ่าย (excretion) ภายในเวลาประมาณ 24 ชม. พบว่าแอฟฟลาทอกซิน B_1 จะกระจายตัวในตับ ลำไส้ กล้ามเนื้อ ผิวหนังและกระดูก 90 % ของแอฟฟลาทอกซินในสภาพอิสระออกทางปัสสาวะสำหรับอวัยวะอื่น ๆ เช่น ม้าม ตับอ่อน สมอง หัวใจ จะมีปริมาณของแอฟฟลาทอกซิน B_1 น้อยกว่าร้อยละ 0.1 ของทั้งหมด จากข้อมูลนี้อาจกล่าวได้ว่าแอฟฟลาทอกซิน B_1 สามารถทำให้เกิดพิษในตับในอัตราสูงที่สุด และพบการกระจายตัวในส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ ในหนูพุกขาวพบมากในไซโทพลาสซึม ไรโบโซม ไมโครโซม และไมโตคอนเดรีย

แอฟฟลาทอกซิน B_1 จะถูกขับออกนอกร่างกายเกือบหมดในเวลา 24 ชม. และการขับถ่ายออกนอกร่างกายโดยตรงเกิดขึ้นน้อยมาก ส่วนใหญ่แอฟฟลาทอกซิน B_1 จะถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเคมีให้เป็นอนุพันธ์ชนิดต่าง ๆ เช่น M_1 , B_{2a} และ R_0 เป็นต้น แต่จะมีสารพิษเหลือสะสมในอวัยวะต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตับรวมทั้งในกระแสเลือด ต่อเมื่อร่างกายได้รับสารพิษเข้าไปอย่างต่อเนื่องและเป็นเวลายาวนานพอสมควรแล้ว แอฟฟลาทอกซิน B_1 จึงค่อยแสดงการออกฤทธิ์โดยก่อให้เกิดเป็นมะเร็งต่อเซลล์ตับได้ในที่สุด

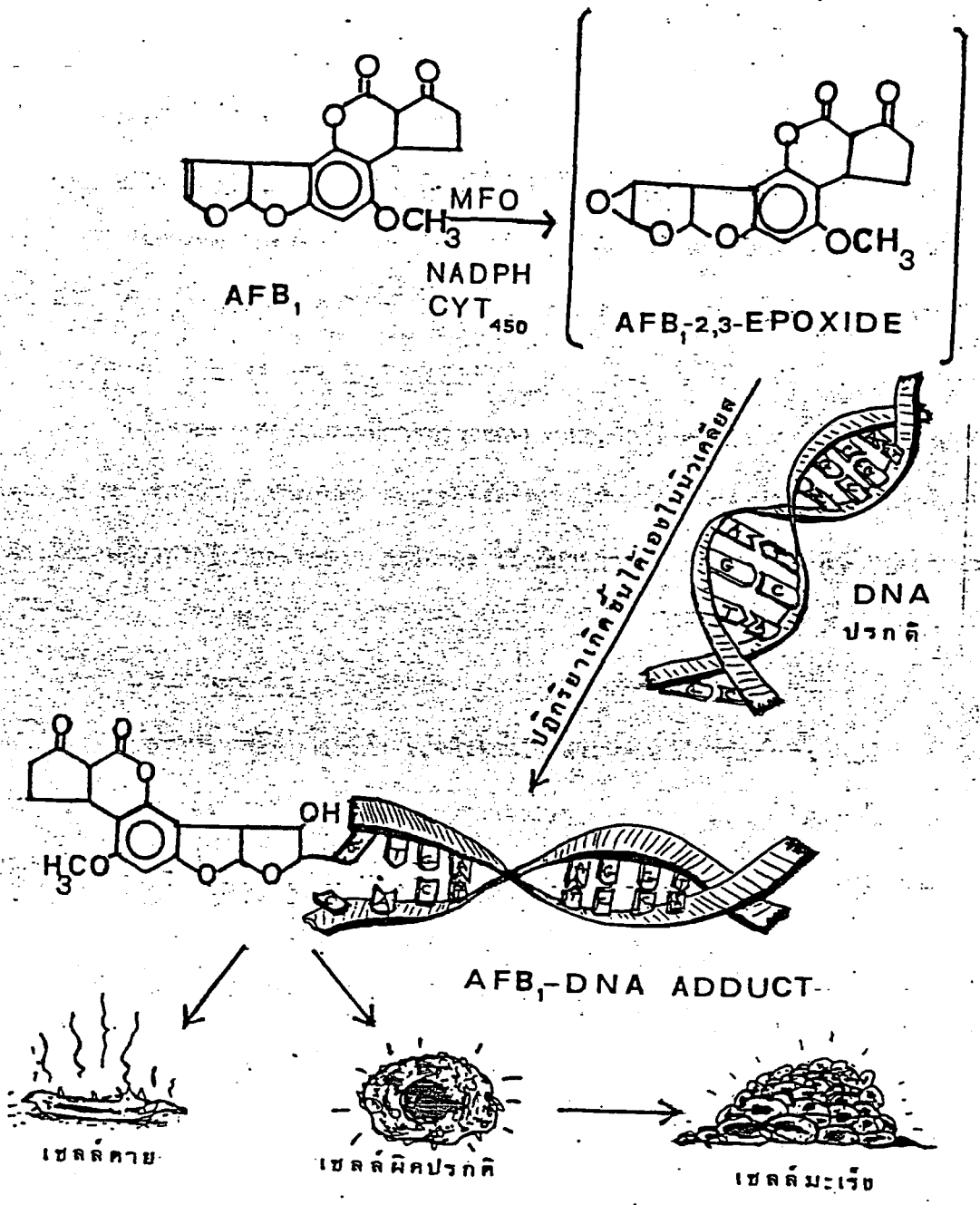
ภายหลังที่แอฟฟลาทอกซินชนิด B_1 เข้าไปในร่างกายของสัตว์ทดลองแล้วในเซลล์ของตับจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอฟฟลาทอกซิน B_1 โดยอาศัย การกระตุ้นของเอนไซม์และโคเอนไซม์ที่มีอยู่ในไมโครโซมของเซลล์ ได้แก่เอนไซม์ mixed function oxidase (MFO) ไซโตโครมพี-450 (cytochrom P-450), NADPH และถ้ามีออกซิเจนแล้วจะได้เมตาบอไลท์ที่สำคัญคือ อีพอกไซด์ของแอฟฟลาทอกซิน B_1 (aflatoxin B_1 -2,-3 epoxide) และเมตาบอไลท์นี้จะเป็นตัวที่สามารถรวมได้ดีกับสารชีวโมเลกุล (macromolecule) ในเซลล์ตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพันธุกรรมซึ่ง

หมายถึง DNA และ RNA รวมทั้งโปรตีน ทั้งนี้เนื่องจากอีพอกไซด์ของ aflatoxin B_1 เป็นสารประกอบพวกอีเลคโตรไฟล์ (electrophile) จึงรวมตัวได้ดีกับสารชีวโมเลกุลดังกล่าว ซึ่งเป็นสารประกอบพวกนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile)การรวมตัวของอีพอกไซด์กับ DNA หรือ RNA นั้นจะเกิดกับเบสกัวนีน (Guanine) ของ DNA เป็นสำคัญ แอฟฟลาทอกซินจะเป็นอันตรายต่อสารพันธุกรรมโดยขัดขวางหน้าที่ทางชีวภาพของ DNA ซึ่งยังผลให้การกระตุ้นกระบวนการเกิดพิษอย่างเฉียบพลันและการเกิดพิษอย่างค่อยเป็นค่อยไป รวมถึงการเกิดมะเร็งในเซลล์ตับด้วย แสดงในรูปที่ 2-6

จากการศึกษาถึงความเป็นพิษของสัตว์ต่าง ๆ พบว่า LD_{50} (lethal dose 50) ของสัตว์ต่าง ๆ จะแตกต่างกันออกไปตั้งแต่ 0.3-17.9 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว (WHO,1979) โดยพบว่าลูกเป็ดอายุ 1 วัน จะอ่อนแอต่อสารพิษนี้มากที่สุด ซึ่งมีค่า LD_{50} เพียง 0.33 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กก. (ศุภกิจ,2531) ในสัตว์เศรษฐกิจ เช่น โค กระบือ สุกร และแกะ โดยมากเป็นสัตว์ขนาดใหญ่ ดังนั้นการทดลองที่จะทำให้เกิดอาการเป็นพิษแบบเฉียบพลัน และ/หรืออย่าง ค่อยเป็นค่อยไปนั้นเป็นการลำบากและเสียค่าใช้จ่ายสูง จึงไม่ค่อยมีรายงานเกี่ยวกับการเกิดพิษของแอฟฟลาทอกซินต่อสัตว์เหล่านี้มากนัก แต่พอสรุปได้ว่าสัตว์เศรษฐกิจขนาดใหญ่ หลังจากให้อาหารที่มีแอฟฟลาทอกซินปะปนอยู่ในปริมาณ 10-100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กก. ก็จะแสดงอาการของการเกิดพิษให้เห็น นอกจากนี้ยังพบว่าสารพิษแอฟฟลาทอกซินมีผลต่อการลดปริมาณการสร้าง และการหลั่งน้ำนมของสัตว์เหล่านี้ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โคนม เป็นต้น

การเกิดอาการเป็นพิษของแอฟฟลาทอกซินในโค และ กระบือ

โคและกระบือเป็นสัตว์เศรษฐกิจอีกพวกหนึ่งที่ค่อนข้างจะมีความต้านทานต่อการเกิดพิษของแอฟฟลาทอกซินน้อย เช่นเดียวกับสุกร แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าลูกวัวจะมีความต้านทานต่อการเกิดพิษของแอฟฟลาทอกซินน้อยกว่าโคหรือกระบือที่โตเต็มที่แล้ว (adult cattle) สัตว์ที่โตเต็มที่ เมื่อได้รับแอฟฟลาทอกซินเข้าไปจะไม่ค่อยแสดงอาการของการเกิดพิษออกมาให้เห็นเท่าใดนัก (ขึ้นอยู่กับปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่ได้รับเข้าไปด้วย) นอกเสียจากน้ำหนักตัวลดลงเล็กน้อย แต่ปริมาณของการให้น้ำนมจากโคนมนั้นจะลดลงอย่างมาก ลูกวัวซึ่งมีความต้านทานต่อการเกิดพิษของแอฟฟลาทอกซินน้อยกว่าโคนม หรือ กระบือที่โตเต็มที่แล้วนั้น เมื่อเกิดอาการเป็นพิษอย่างเฉียบพลันขึ้นแล้ว จะทำให้มีอาการ



รูปที่ 2-6 กลไกทางชีวเคมีของแอฟฟลาทอกซินต่อความผิดปกติของสารพันธุกรรม

กระสับกระส่าย เพื่อการขับถ่ายอย่างแรง (severe tenesmus) ก่อนตายและยังมีการกลับเอาเยื่อบุผิว(mucous membrane)ของทวารหนักออกมาข้างนอก(anal prolapse) อีกด้วย Allcroft และ Carnaghan (1963) พบว่าแม่โคที่กินอาหารปนเปื้อนสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 เข้าไปจะมีสารพิษปนออกมาทางน้ำนม และในปี 1966 Halzapfel พบว่าสารพิษนี้คือ แอฟฟลาทอกซิน M_1 และ M_2 โดย แอฟฟลาทอกซิน M_1 คือ hydroxyaflatoxin B_1 และ aflatoxin B_2 คือ dihydroxyaflatoxin B_2 ในบางกรณีลูกวัวอาจจะได้รับแอฟฟลาทอกซิน M_1 ที่ปะปนอยู่ในน้ำนมของแม่โคที่กินอาหารที่มีแอฟฟลาทอกซิน B_1 ปะปนอยู่เข้าไปก็ได้ ผลการทดลองของ Allcroft และ Lewis (1963) พบว่าลูกวัวสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ เมื่อแม่โคได้รับแอฟฟลาทอกซินเข้าไปประมาณ 3.2-12.7 มก./วัน ผลการทดลองดังกล่าวนี้ แตกต่างไปจากการทดลองของ Calvert และคณะ(1966) ซึ่งพบว่าลูกวัว 3 ตัวจาก 6 ตัวจะตายภายในระยะ 4 เดือน ของการกินน้ำนมจากแม่โคนมที่ได้รับแอฟฟลาทอกซิน B_1 เข้าไปประมาณ 1.5 มก./วัน ผลการทดลองที่แตกต่างกันดังกล่าวข้างต้นอาจจะเกิดมาจากการใช้โค และ กระบือคนละชนิดเดียวกัน อาหาร และวิธีการเลี้ยงที่แตกต่างกันด้วย เป็นต้น อย่างไรก็ดี สัตว์เศรษฐกิจส่วนใหญ่ที่มีอายุน้อยจะมีความต้านทานต่อการเกิดพิษของแอฟฟลาทอกซินน้อยกว่าสัตว์ที่โตเต็มที่แล้ว

สำหรับในคนนั้น ความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของแอฟฟลาทอกซิน มักเกิดขึ้นในเด็กมากกว่าผู้ใหญ่และถ้าคนเราได้รับอาหารที่มีปริมาณแอฟฟลาทอกซินน้อยกว่า 5 นาโนกรัมต่อ กก. ของน้ำหนักตัวต่อวัน จะไม่ทำให้เกิดมะเร็งในตับแต่ถ้าได้รับในปริมาณสูงกว่านี้เป็นเวลานาน ๆ จะทำให้เป็นอันตรายจนกระทั่งเกิดมะเร็งในตับได้ (ธีรยุทธ และชัยวัฒน์ 2524)

เป็นที่น่าสังเกตว่าอาการที่เกิดจากพิษของแอฟฟลาทอกซินในเด็ก คล้ายคลึงกับอาการของเด็กที่เป็นโรค Reye's syndrome มาก คือมีอาการชักและหมดสติ มีความผิดปกติของตับและสมอง จะตายภายใน 2-3 วัน น้ำตาลในเลือดลดลง เอนไซม์ serum glutamicum oxaloacetic transaminase (SGOT) และ serum glutamic pyruvate transminase (SGPT) สูงขึ้น แอมโมเนียในเลือดเพิ่ม สมองบวม เลือดออกเป็นจุด ๆ มีการคั่งของไขมันในอวัยวะภายใน เช่นตับ ไต หัวใจ และปอด บางครั้งมี

การพบแอฟฟลาทอกซินในตับผู้ป่วยด้วย

Reye's syndrome เป็นกลุ่มอาการที่เกิดขึ้นอย่างเฉียบพลัน และ ยังไม่ทราบสาเหตุแน่ มีผู้เสนอแนะว่าอาจเกิดเนื่องจากเชื้อไวรัส แอฟฟลาทอกซิน หรือทั้งสองอย่างร่วมกัน การรับยาแอสไพรินบ่อย ๆ ก็อาจเป็นสาเหตุได้เช่นกัน โรคนี้พบบ่อยในเมืองไทย โดยเฉพาะที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบในเด็กอายุระหว่าง 1-7 ปี มากที่สุดและมักจะป่วยกันมากในช่วงฤดูฝน

Shank และคณะ (1972) ได้ศึกษาสาเหตุของการล้มป่วยอย่างเฉียบพลันของกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นเด็กที่ จ.อุดรธานี ในปี พ.ศ. 2513 พบว่าโรคสมองอักเสบที่ จ.อุดรธานี (Udorn encephlopathy) ที่เกิดขึ้น มีลักษณะอาการและการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีคล้ายคลึงกับอาการของกลุ่ม Reye's syndrome ที่นายแพทย์ไรย์ ได้กล่าวถึงในเด็กในประเทศออสเตรเลีย จากการตรวจเนื้อเยื่อตับของเด็กที่ตายพบแอฟฟลาทอกซิน B_1 สะสมอยู่มาก สาเหตุของโรคตั้งสมมติฐานไว้ว่า เกิดจากผู้ป่วยกินข้าวเหนียวที่นึ่งไว้กินครั้งละหลาย ๆ วันเป็นประจำ จากการนำตัวอย่างอาหารมาตรวจพบว่ามีเชื้อราจำพวก A. flavus , A. niger , A. ochraceous และ A, clavatus ปะปนอยู่ ซึ่งเชื้อราแต่ละชนิดจะสร้างสารพิษที่แตกต่างกัน ขณะนี้ยังหาข้อสรุปที่แน่นอนไม่ได้เพียงแต่มีความเชื่อว่าโรคนี้อาจเป็นผลร่วมกันระหว่างแอฟฟลาทอกซิน สารพิษจากเชื้อราอื่น ๆ และยาลดไข้ที่ใช้ขณะที่เด็กป่วย

ความเป็นพิษของแอฟฟลาทอกซินจะมากหรือน้อย ย่อมขึ้นอยู่กับ อายุ เพศ กรรมพันธุ์ ขนาดที่ได้รับ การทำงานของเอนไซม์ในตับ สภาวะที่ได้รับแอฟฟลาทอกซิน และระยะเวลาที่ได้รับแอฟฟลาทอกซิน เป็นต้น

2.7 นมเปรี้ยว

นมเปรี้ยวเป็นผลิตภัณฑ์น้ำนมที่ได้จากการใส่เชื้อแบคทีเรียบางชนิดลงไป เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลแล็กโทสให้กลายเป็นกรดแลกติก มี 2 ชนิดคือ

1. ชนิดที่เป็นของเหลว
2. ชนิดที่แข็งตัวเป็นลิ่ม

ปัจจุบันนิยมดื่มหรือรับประทานนมเปรี้ยวกันอย่างแพร่หลาย เพราะมีคุณค่าทางอาหารไม่ยิ่งหย่อนกว่าน้ำนมสด และมีโปรตีนที่ย่อยง่ายกว่า นอกจากนี้ยังป้องกันมิให้คนที่ไม่มีเอนไซม์แลกเทส (lactase) ท้องเดินเนื่องจากดื่มนมสด เพราะน้ำตาลแล็กโทสที่จะถูกขับออกมาเนื่องจากย่อยไม่ได้ ซึ่งเป็นสาเหตุของท้องเดินถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกก่อนที่จะดื่มหรือรับประทาน

นมเปรี้ยวที่ผลิตในขณะนี้มีมากมายหลายชนิดแต่ละชนิดมีชื่อเรียกต่างกันเช่น yogurt yakult , acidophilus milk , bulgarian milk , skyr , taette , kefir , kumiss เป็นต้น นอกจากนี้ชื่อเรียกยังอาจแตกต่างกันแล้วแต่ประเทศ เช่น อเมริกาเรียก yogurt อินเดียเรียก dadhi อาร์มิเนียเรียก mazum ซีเรียเรียก lebeny อียิปต์เรียก leban และในบุลกาเรียเรียกว่า Naja เป็นต้น

2.8 กระบวนการหมักกรดแลกติก

ในกระบวนการหมักอาหารโดยทั่วไป จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องมักจะเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ตามธรรมชาติ ซึ่งมีอยู่หลายชนิด แต่บางครั้งก็มีการคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์ และแยกให้บริสุทธิ์ นำมาใช้เพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีรส กลิ่น และลักษณะเนื้อสัมผัสตามต้องการ เช่น การคัดเลือกแบคทีเรีย homofermentative ที่ผลิตกรดแลกติกสำหรับผลิตผักดอง หรือการคัดเลือกยีสต์บางชนิดใช้หมักแอลกอฮอล์

สำหรับกระบวนการหมักที่เกิดจาก lactic acid bacteria จะเกิดที่สภาพความเป็นกรดสูงเนื่องจากมีฟีเอชต่ำ ขณะเดียวกัน oxidation-reduction potential ต่ำ ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ไม่ต้องการในกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลกติก

กระบวนการเกิดกรดแลกติกมี 2 กระบวนการ คือ

1. Homolactic fermentation เป็นกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลกติกอย่างเดียว หรือผลิตกรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่ โดยพวก Homofermentative lactic acid bacteria เช่น Streptococcus lactis , Streptococcus thermophilus , Streptococcus cremoris , Lactobacillus acidophilus ,Lactobacillus bulgaricus , Lactobacillus casei , Lactobacillus lactis แบคทีเรียใน กลุ่ม Streptococcus sp. นี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม มักพบ

แพร่กระจายตามนมดิบ , ในปากและลำไส้ของคนและสัตว์ เจริญได้ที่พีเอช สูงถึง 9.2 ส่วนแบคทีเรียใน กลุ่ม Lactobacillus sp. นี้มีลักษณะเป็นท่อน (rod) อยู่อย่างเดี่ยว ๆ หรือ อาจต่อเป็นลูกโซ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกกลไกการเกิดกรดแลกติกเข้าใจว่าคล้ายกับการเกิดเอทานอล คือกลูโคสเปลี่ยนไปเป็นกรดไพรูวิก โดยอาศัยเอนไซม์ dehydregenase แล้วจึงเปลี่ยนกรดไพรูวิคเป็นกรดแลกติก (ผ่าน EMP pathway)

$C_6H_{12}O_6$

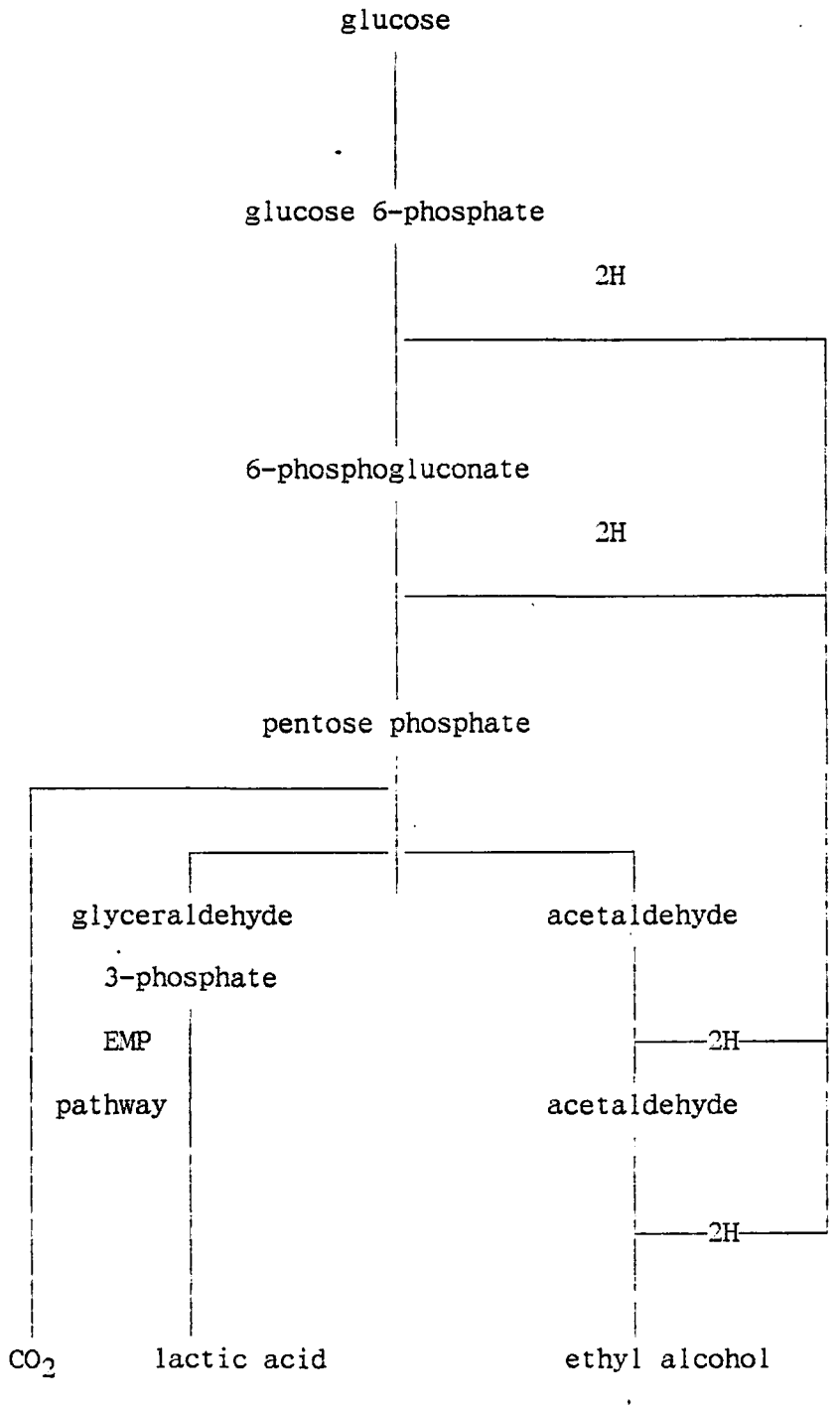
|

PYRUVIC acid

|

ethanol

2.Heterolactic fermentation เป็นกระบวนการที่เกิดกรดแลกติกได้เพียง 50% เท่านั้น และมีสารประกอบอื่น ๆ เกิดขึ้นด้วย ได้แก่ ethanol , CO_2 , acetic acid แบคทีเรียพวก Heterofermentative เช่น Leuconostoc mesenteriodes (ในผักดอง) , Leuconostoc dextranicum (ในผักและนม) , Leuconostoc citrovorum (ในผลิตภัณฑ์นม) แบคทีเรียในกลุ่ม Leuconostoc sp. นี้มีรูปร่างกลม บางครั้งรูปไข่ อยู่เป็นคู่หรือสายสั้น นอกจากนี้ยังมี Heterofermentative พวก Lactobacilli เช่น Lactobacillus brevis , Lactobacillus fermentum , Lactobacillus buchneri , Lactobacillus confusus อีกด้วย กลไกที่เกิดกรดแลกติกและสารอื่น ๆ จะผ่าน Pentose phosphate pathway และ EMP pathway ดังรูปที่ 2-7



รูปที่ 2-7 กระบวนการหมักกรดแลกติกจากกลูโคสโดย Leuconostoc mesenteroides

Heterofermentative lactic acid bacteria มีบทบาทในการผลิตรส และ กลิ่น มากกว่า Homolactic acid bacteria เช่น acetaldehyde และ diacetyl

การผลิตนมเปรี้ยวอาจใช้แบคทีเรีย ซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์ 1 หรือ 2 ชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของนมเปรี้ยวเช่น yakultใช้ Lactobacillus casei ,acidophilus milk ใช้ Lactobacillus acidophilus ,yogurtใช้ Streptococcus thermophilus และ Lactobacillus bulgaricus, kefir ใช้เชื้อยีสต์ เช่น Torula kefir และ Saccharomyces kefir และเชื้อแบคทีเรีย เช่น Lactobacillus caucasium , Streptococcus lactis , filmjolk ใช้ Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris , Leuconostoc citrovorum , Streptococcus diacetilactis , แกรดด์ฟิลใช้ Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris , Streptococcus diacetilactis , Leuconostoc citrovorum ปกติการผลิตนมเปรี้ยวนิยมใช้แบคทีเรีย 2 ชนิด ทั้งนี้เนื่องจากพบว่าถ้าใช้แบคทีเรียเพียงชนิดเดียวจะไม่ได้กลิ่นรสที่ต้องการ และเมื่อใช้แบคทีเรีย 2 ชนิดที่สามารถเจริญเติบโตร่วมกันได้ดี แบคทีเรียชนิดหนึ่งจะให้กรดแลกติก ส่วนอีกชนิดหนึ่งจะให้กลิ่นรส ทำให้นมเปรี้ยวที่ได้มีลักษณะและกลิ่นรสดี แบคทีเรียให้กรดแลกติกที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปได้แก่ Streptococcus lactis หรือ Streptococcus cremoris ส่วนแบคทีเรียที่ให้กลิ่นรสได้แก่ Leuconostoc citrovorum หรือ Leuconostoc dextranicum แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ควรมีอยู่ในนมเปรี้ยวในปริมาณใกล้เคียงกันหรืออยู่ในอัตราเหมาะสม

น้ำนมสดที่รีดใหม่ ๆ มีพีเอชประมาณ 6.6 มีปริมาณกรดคิดเป็นเปอร์เซนต์กรดแลกติกประมาณ 0.14-0.19% เมื่อ Streptococcus lactis หรือ Streptococcus cremoris เฟอร์เมนต์น้ำตาลแล็กโทสให้กรดแลคติกประมาณ 0.25% จะมีรสเปรี้ยว และเมื่อมีกรดแลกติกสูงประมาณ 0.5-0.65 % เคซีนจะจับตัวเป็นลิ่ม ผลิตภัณฑ์ที่ดีควรมีกรดแลกติกประมาณ 0.8-0.9% ซึ่งเป็นระยะที่มีคุณสมบัติและกลิ่นรสดี ในการผลิตนมเปรี้ยวจะพบว่าน้ำตาลแล็กโทสประมาณ 88.5% จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก น้ำตาลแล็กโทสบางส่วนจะหายไป และยังคงมีน้ำตาลแล็กโทสบางส่วนเหลืออยู่ในนมเปรี้ยว Streptococcus lactis , Streptococcus cremoris หรือ

แบคทีเรียที่ให้กรดแลกติกชนิดอื่น ๆ แต่ละสายพันธุ์ จะมีอัตราในการเฟอร์เมนต์น้ำตาลแล็กโทสแตกต่างกัน นอกจากนี้ปริมาณกรดและลักษณะของนมเปรี้ยวที่ได้ยังคงต่างกันด้วย เช่น Streptococcus lactis var hollandicus ทำให้นมเปรี้ยวมีกลิ่นคล้ายข้าวหมักหรือกลิ่นคล้ายของหวาน เป็นต้น

ในการเฟอร์เมนต์พบว่าเมื่อนมเปรี้ยวมีปริมาณกรดเพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงจุดหนึ่งแล้ว แบคทีเรียที่ให้กรดจะเริ่มตาย ในตอนนี้จะมีจำนวนเซลล์ลดลง แต่ยังมีการสร้างกรดแลกติกอย่างช้า ๆ กรดที่เกิดขึ้นนอกจากจะเป็นกรดแลกติกซึ่งมีในปริมาณสูงแล้วยังมีอะซิเตท และสารอื่น ๆ อีกเล็กน้อย

Leuconostoc citrovorum หรือ Leuconostoc dextranicum ทนกรดได้ดีกว่า Streptococcus sp. สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลแลคโตสให้กรดแลกติกเล็กน้อย ส่วนใหญ่เฟอร์เมนต์ซิเตรตให้สารที่ทำให้นมเปรี้ยวมีกลิ่นรสดีคือ biacetyl (2 , 3 - butanedione , $CH_3.CO.CO.CH_3$) , acetylamethyl carbinol (acetoin) , 2-3- butylene glycol , acetic acid , propionic acid และกาซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งละลายอยู่ในรูปกรดคาร์โบนิค ซึ่งให้กลิ่นรสกรด นอกจากนี้ยังมีสารอื่น ๆ อีกเล็กน้อย เช่นแอลกอฮอล์และอัลดีไฮด์ สารเหล่านี้เกิดขึ้นก่อนที่เคซีนจะตกตะกอนเป็นลิ่ม และหลังจากเคซีนตกตะกอนเป็นลิ่มแล้วจะเกิดได้ดียิ่งขึ้น แสดงว่าการเฟอร์เมนต์ซิเตรตเกิดได้ดีในสภาวะเป็นกรด

Pitte ได้แสดงการเฟอร์เมนต์ซิเตรตดังนี้

citric acid---------->pyruvic acid---------->intermediate

--- $+O_2$---->probiacetyl----------> biacetyl

ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นรสมากที่สุด ในขณะเดียวกันก็เกิด methyl glyoxal ด้วยดังสมการและในสภาวะที่เกิด biacetyl นี้

pyruvic acid---------->biacetyl + methyl glyoxal + H_2O

intermediate บางส่วนจะถูกรีดิวซ์ไปเป็น 2,3 butylene glycol แต่ถ้าการเฟอร์เมนต์อยู่ในสภาวะไม่มีออกซิเจน intermediate ทั้งหมดจะถูกเปลี่ยนไปเป็น acetylmethyl carbinol

ในการเฟอร์เมนต์จะเห็นว่าสารที่ให้กลิ่นรสดีมาจากการเฟอร์เมนต์ซิเตรต ดังนั้นถ้า

ใส่ซิเตรตในรูปกรดซิตริก หรือโซเดียมซิเตรต ประมาณ 0.15% และทำการเฟอร์เมนต์ ณ อุณหภูมิประมาณ 21-21 ซ จะได้นมเปรี้ยวที่มีรสกลิ่นดียิ่งขึ้น ที่อุณหภูมินี้แบคทีเรียที่ให้กรดและกลิ่นรสจะเจริญเติบโตได้ดีและมีอัตราส่วนของเชื้ออยู่ในสภาวะเหมาะสม

2.9 โยเกิร์ต

ปัจจุบันโยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายมากที่สุด เชื้อที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตมี 2 ชนิด คือ Streptococcus thermophilus และ Lactobacillus bulgaricus

ในการผลิตโยเกิร์ตในระดับอุตสาหกรรมจากน้ำนมวัวจะมีอยู่ 2 ชนิดคือ

1. โยเกิร์ตชนิดแข็งตัว (set yogurt) โดยกระบวนการหมักและการตกตะกอนจะเกิดขึ้นภายในภาชนะบรรจุเดียวกัน

2. โยเกิร์ตชนิดคน (stirred yogurt) โดยกระบวนการหมักที่ได้ก้อนนมแตก ๆ จะเกิดขึ้นภายในถังหมัก และต้องนำมาบรรจุในภาชนะอีกครั้งเพื่อจัดจำหน่าย

โยเกิร์ตทั้งสองชนิดนี้อาจนำมาเติมกลิ่นรสและพาสเจอร์ไรซ์ ก่อนที่จะนำไปจำหน่าย ซึ่งในประเทศอังกฤษนั้นโยเกิร์ตที่ผลิตได้ทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นโยเกิร์ตชนิดแข็งตัว , ชนิดคน โยเกิร์ตธรรมชาติ โยเกิร์ตที่มีการเติมสารให้ความหวาน เติมกลิ่นหรือผลไม้ก็แล้วแต่ จะมีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งนั้น ยกเว้นผลิตภัณฑ์ที่แสดงคำว่า พาสเจอร์ไรซ์ หรือ ยูเอชที จึงจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่นำมาผ่านความร้อนภายหลังกระบวนการหมักเสร็จสิ้นแล้ว ซึ่งจะทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ลดน้อยลง โดยปกติโยเกิร์ตที่ผลิตได้จะมีแบคทีเรีย ระหว่าง 200 - 1,000 ล้านตัว ต่อโยเกิร์ตใหม่ ๆ 1 มล. ซึ่งปริมาณจุลินทรีย์จะลดลงหลังจากการเก็บรักษา (Oberman ,1985) การผลิตโยเกิร์ตชนิดแข็งตัวนั้น จะเป็นการหมักนมด้วยเชื้อที่ต้องการและปล่อยให้นมมีการแข็งตัวในระหว่างการรอจำหน่ายในร้านค้า ส่วนโยเกิร์ตชนิดคนนั้น เมื่อหมักในถังใหญ่จนนมตกตะกอน จะทำก้อนนมให้แตกและคนให้เข้ากัน ก่อนที่จะเทบรรจุลงในภาชนะขนาดเล็ก เพื่อรอจำหน่าย หลังจากการบรรจุในภาชนะแล้ว โยเกิร์ต 2 ชนิดนี้จะนำมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 4 ซ อย่างรวดเร็วก่อนที่จะส่งจำหน่ายต่อไป

นอกจากโยเกิร์ตทั้งสองชนิดที่กล่าวมาแล้วยังมีโยเกิร์ตชนิดอื่นๆอีก (Bottazzi , 1983) ได้แก่

1.โยเกิร์ตเหลว (fluid yogurt) เป็นโยเกิร์ตที่มีก้อนนมแตกกระจายอยู่ มีความหนืดต่ำ ซึ่งมีการเติมน้ำและโยเกิร์ตที่หมักได้ ลงไปในอัตราส่วนเท่า ๆ กัน

2.โยเกิร์ตผลไม้ (fruit yogurt) เป็นการเติมผลไม้บด หรือ แยม และน้ำตาล ลงไปในโยเกิร์ตที่หมักแล้ว

3.โยเกิร์ตที่เติมกลิ่นรส (flavored yogurt) เป็นการเติมกลิ่นรสเทียม และน้ำตาล หรือสารให้ความหวานลงไป

4.โยเกิร์ตแช่แข็ง (frozen yogurt) เป็นโยเกิร์ตที่มีลักษณะคล้ายไอศกรีม

5.โยเกิร์ตแห้ง (dried yogurt) เป็นการนำโยเกิร์ตมาทำให้แห้งโดยการตากแดด โยเกิร์ตชนิดนี้พบในแถบตะวันออกกลาง และมักผลิตในฤดูร้อน

6.โยเกิร์ตที่มีแล็กโทสต่ำ (low lactose yogurt) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ค่อนข้างใหม่ ได้จากการย่อยแล็กโทสด้วยเอนไซม์ -D-galactosidase

7.โยเกิร์ตที่มีแคลอรีต่ำ (low calorie yogurt)เป็นโยเกิร์ตที่มีการลดระดับพลังงานจากปกติ 250-300 กิโลจูล ต่อ 100 กรัม เป็น 170 กิโลจูล ต่อ 100 กรัม

นอกจากจะมีการผลิตโยเกิร์ตจากนมวัวแล้วน้ำนมจากสัตว์อื่น ๆ ก็สามารถนำมาผลิตโยเกิร์ตได้ เช่น ม้า แพะ ควาย แกะ จามรี แกะ และกวาง ซึ่งส่วนประกอบของนมที่ได้จากสัตว์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ทำให้โยเกิร์ตที่ได้แตกต่างกันด้วย นมที่ได้จากกวาง จามรี และควาย จะมีปริมาณของแข็งสูงกว่านมวัวซึ่งจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ดี นอกจากนี้นมแกะมีเม็ดไขมันที่มีขนาดเล็กมาก ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องนำน้ำนมมาผ่านการhomogenized ในปัจจุบัน มีการผลิตโยเกิร์ตจากน้ำนมแพะในหลาย ๆ ประเทศ ในแถบประชาคมยุโรป โดยใช้เป็นอาหารสำหรับผู้ที่แพ้โปรตีนจากนมวัว

Megalla และ Hafez (1982) ได้ศึกษาถึงการใช้โยเกริต์ในการทำลายสารพิษแอฟฟลาทอกซินบี 1 ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งที่สร้างขึ้นโดยเชื้อรา A. flavus , A. parasiticus ,A. nomius โดยพบว่ากรดที่เกิดขึ้นสามารถเปลี่ยนสารพิษแอฟฟลาทอกซินบี 1 ไปเป็น hydroxydihydroaflatoxin B_1 ได้ และเมื่อให้สารนี้แก่ลูกไก่เป็นเวลา 7 วัน พบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่าโยเกริต์ที่มีการปนเปื้อนสารพิษแอฟฟลาทอกซินจะไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์

บทที่ 3

ขั้นตอนการทำงาน

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อจุลินทรีย์ Aspergillus flavus 102566

Streptococcus lactis TISTR 457

เชื้อจุลินทรีย์ใน commercial yogurt (ดัชชี่)

อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์

1. ตู้บ่ม (Incubator)
2. กล้องจุลทรรศน์
3. Haemacytometer
4. กรวยแยก (separotory funnel)
5. เครื่องกลั่นระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaptory)
6. ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump)
7. กรวยกรอง (buchner funnel)
8. กระดาษกรองวัทแมน เบอร์ 1
9. เครื่องเขย่า (shaker)
10. syringe ขนาด 5,10 มิลลิลิตร
11. เครื่องชั่ง
12. ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
13. ขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร
14. หลอด vial
15. Pasteur pipette

16. HPLC (shimadzu) LC-6AD injector
17. UV Spectrophotometric detector spd-6A 365 nm. adsorbance 0.02
18. Colume reverse phase C_{18}
19. Integrator (Data Module Madel C-R6A Chromatopac)
20. membrane filter ขนาด 0.45 ไมครอน
21. millipore filter
22. sep-pak
23. กระบอกตวงขนาด 50 มิลลิลิตร
24. ฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร
25. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)
26. กระดาษกรอง cellulase nitrate
27. กระดาษกรอง cellulase acetate

<u>สารเคมี</u>

1. เมทานอล
2. คลอโรฟอร์ม
3. เฮกเซน
4. อะซิโตน
5. เบนซีน
6. glacial acetic acid
7. เอทิลอีเทอร์
8. เมทิลลีนไดคลอไรด์
9. standard aflatoxin solution
10. น้ำกลั่นบริสุทธิ์
11. กรดไฮโดรคลอริค 5 นอร์มอล
12. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล
13. skimmed milk powder

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินของ A. flavus ในอาหารเหลว

1.1 นำ Lablemco tryptone broth medium ปริมาตร 100 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. จำนวน 21 ฟลาสก์ มาปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริก 5 นอร์มอล ให้ได้พีเอชประมาณ 4.3

1.2 ถ่าย spore suspension ที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มล.ลงในฟลาสก์อาหารในข้อ 3.1

1.3 นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที

1.4 เก็บตัวอย่างวันละ 3 ฟลาสก์ เป็นเวลา 7 วัน

1.5 นำตัวอย่างมาวัดพีเอช และสกัดสารพิษแอฟฟลาทอกซินออกจากอาหารเหลว

1.6 นำสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่สกัดได้ มาวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณโดย HPLC

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของ S. lactis ต่อปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่ผลิตโดย A. flavus

2.1 เมื่อเริ่มเลี้ยง S. lactis พร้อมกับ A. flavus

2.1.1 เตรียมอาหารเหมือนในข้อ 1.1

2.1.2 ถ่าย spore suspension ปริมาตร 0.5 มล. และ cell suspension ปริมาตร 0.5 มล. ลงในฟลาสก์อาหาร

2.1.3 ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 1.3 ถึง 1.6

2.2 เมื่อเริ่มเลี้ยง S. lactis ก่อน A. flavus เป็นเวลา 3 วัน

2.2.1 เตรียมอาหารเหมือนในข้อ 1.1

2.2.2 ถ่าย cell suspension ปริมาตร 0.5 มล. ลงในฟลาสก์อาหาร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

2.2.3 เมื่อครบเวลา ถ่าย spore suspension ปริมาตร 0.5 มล. ลงในฟลาสก์อาหารข้อ 2.2.2

2.2.4 ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 1.3 ถึง 1.6

2.3 เมื่อเริ่มเลี้ยง A. flavus ก่อน S. lactis เป็นเวลา 3 วัน

2.3.1 เตรียมอาหารเหมือนในข้อ 1.1

2.3.2 ถ่าย spore suspension ปริมาตร 0.5 มล. ลงในฟลาสก์อาหารนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน

2.3.3 เมื่อครบเวลา ถ่าย cell suspension ปริมาตร 0.5 มล.ลงในฟลาสก์อาหารในข้อ 2.3.2

2.3.4 ทำการทดลองซ้ำตามข้อ 1.3 ถึง 1.6

การทดลองที่ 3 ศึกษาการทำลายสารพิษแอฟฟลาทอกซินโดยใช้แบคทีเรียในโยเกิร์ต

3.1 เตรียมโยเกิร์ตดังวิธีการทำดังนี้

3.1.1 ผสมนมโคปริมาตร 100 มล. และหางนมผง 5 กรัม ในฟลาสก์ขนาด 125 มล.

3.1.2 นำมาอุ่นให้ร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 80-90 ซ. เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงจนเหลืออุณหภูมิประมาณ 48 ซ.

3.1.3 เติม starter 2-3 % ผสมให้เข้ากัน

3.1.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 45 ซ เป็นระยะเวลา 2-5 ชม. เพื่อให้ได้เปอร์เซนต์กรดที่เหมาะสม จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิประมาณ 5 ซ

3.2 ทำโยเกิร์ตตามวิธีในข้อ 3.1 จำนวน 14 ฟลาสก์ แบ่งเป็น 2 ชุด ชุดละ 7 ฟลาสก์ ชุดที่ 1 เติมหัวเชื้อที่ได้จาก S. lactis

ชุดที่ 2 เติมหัวเชื้อที่ได้จาก commercial yogurt

3.3 เติมสารละลายมาตราฐานแอฟฟลาทอกซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. ปริมาตร 1 มล. ในแต่ละฟลาสก์

3.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิประมาณ 5-10 ซ

3.5 ทำการเก็บตัวอย่างในวันที่ 1 , 2 และ 7 โดยเก็บตัวอย่างความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ สกัดสารพิษแอฟฟลาทอกซินออกจากโยเกิร์ต ทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณโดยใช้ HPLC

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

1.ผลการศึกษาการสร้างแอฟฟลาทอกซินของ A. flavus 102566

จากการศึกษาการสร้างแอฟฟลาทอกซินของ A. flavus 102566 ในอาหารเหลว Lablemco tryptone broth ที่ความเข้มข้นของสปอร์ 1 x 10^6 สปอร์ต่อมล. เป็นเวลา 7 วัน พบว่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงโดยจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนสิ้นสุดเวลาการเลี้ยงเชื้อ พีเอชในวันที่ 7 คือ 8.80 ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1 จะเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 แล้วลดลงเรื่อย ๆ และจะเพิ่มอีกครั้งในวันที่ 6 ได้ปริมาณสูงสุดคือ 22.57 ไมโครกรัมต่อมล. ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน G_1 จะสูงสุดในวันที่ 2 คือ 89.396 ไมโครกรัมต่อมล. แล้วจะลดลงเรื่อย ๆ ผลแสดงการเปลี่ยนแปลงของพีเอชและปริมาณแอฟฟลาทอกซินของเชื้อราA. flavus 102566 แสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ค่าพีเอชและปริมาณแอฟฟลาทอกซินของ A. flavus 102566 ในอาหารเหลว

อายุเชื้อ (วัน)	พีเอช เฉลี่ย	ปริมาณแอฟฟลาทอกซินเฉลี่ย ไมโครกรัมต่อมล.		แอฟฟลาทอกซินทั้งหมด (B_1 + G_1) ไมโครกรัมต่อมล.
		B_1	G_1	
1	4.55	11.67	87.04	98.71
2	6.33	18.93	89.4	108.33
3	8.17	17.41	85.96	103.37
4	8.26	16.39	49.296	65.69
5	8.45	12.82	35.01	47.83
6	8.73	22.57	33.546	56.12
7	8.80	8.73	34.183	42.91

2.ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *S. lactis* TISTR 457 และ *A. flavus* 102566 ต่อการสร้างแอฟฟลาทอกซินในอาหารเหลว

จากการศึกษาการสร้างแอฟฟลาทอกซินของ *A. flavus* ในอาหารเหลวที่มีเชื้อผสมของ *S. lactis* TISTR 457 และ *A. flavus* 102566 ที่ความเข้มข้นเชื้อ $1x10^6$ เซลล์ต่อมล. เป็นเวลา 7 วัน โดยแบ่งการศึกษา 3 แบบดังนี้

2.1 เมื่อเริ่มเลี้ยง *A. flavus* พร้อมกับ *S. lactis* เป็นเวลา 7 วัน พบว่า พีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนสิ้นสุดเวลาการเลี้ยงเชื้อได้พีเอชสุดท้ายคือ 8.80 ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1 จะเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 แล้วลดลงเรื่อย ๆ และจะเพิ่มอีกครั้งได้ปริมาณสูงสุดในวันที่ 6 คือ 19.09 ไมโครกรัมต่อมล. ส่วนแอฟฟลาทอกซิน G_1 ปริมาณสูงสุดในวันที่ 2 คือ 79.69 ไมโครกรัมต่อมล. แล้วจะลดลงเรื่อย ๆ เมื่อเลี้ยง *A. flavus* พร้อมกับ *S. lactis* เป็นเวลา 7 วัน แสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4-2 ผลแสดงการเปลี่ยนแปลงของพีเอชและปริมาณแอฟฟลาทอกซินของ A. flavus เมื่อเลี้ยง A. flavus พร้อมกับ S. lactis เป็นเวลา 7 วัน

อายุเชื้อ (วัน)	พีเอช เฉลี่ย	ปริมาณแอฟฟลาทอกซินเฉลี่ย ไมโครกรัมต่อมล.		แอฟฟลาทอกซินทั้งหมด (B_1 + G_1) ไมโครกรัมต่อมล.
		B_1	G_1	
1	4.44	9.55	64.80	74.35
2	6.10	14.49	79.69	94.18
3	7.98	12.84	51.92	64.76
4	8.09	14.02	46.45	60.47
5	8.43	11.68	26.74	38.42
6	8.49	19.09	24.28	43.37
7	8.80	5.79	22.90	28.69

2.2เมื่อเริ่มเลี้ยง A. flavus ก่อนเป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงใส่เชื้อ S. lactis

พบว่าพีเอชของอาหารเปลี่ยนแปลงและพบว่าปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1 จะสูงสุดในวันที่ 1 คือ 9.52 ไมโครกรัมต่อมล. แล้วจะลดลงและจะเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 จากนั้นปริมาณแอฟฟลาทอกซินจะลดลงเรื่อย ๆ จนสิ้นสุดเวลาการเลี้ยงเชื้อ ส่วนแอฟฟลาทอกซิน G_1 พบว่าปริมาณมากที่สุดในวันที่ 1 คือ 31.51 ไมโครกรัมต่อมล. จากนั้นปริมาณจะลดลงและเพิ่มขึ้นในวันที่ 3 จากนั้นจะลดลงเรื่อย ๆ จนสิ้นสุดเวลาการเลี้ยงเชื้อ ผลแสดงพีเอชและปริมาณแอฟฟลาทอกซินในอาหารเหลวเมื่อเริ่มเลี้ยง A. flavus ก่อน S. lactis เป็นเวลา 3 วัน แสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลแสดงพีเอช และปริมาณแอฟฟลาทอกซินในอาหารเหลวเมื่อเริ่มเลี้ยง A. flavus ก่อน S. lactis เป็นเวลา 3 วัน

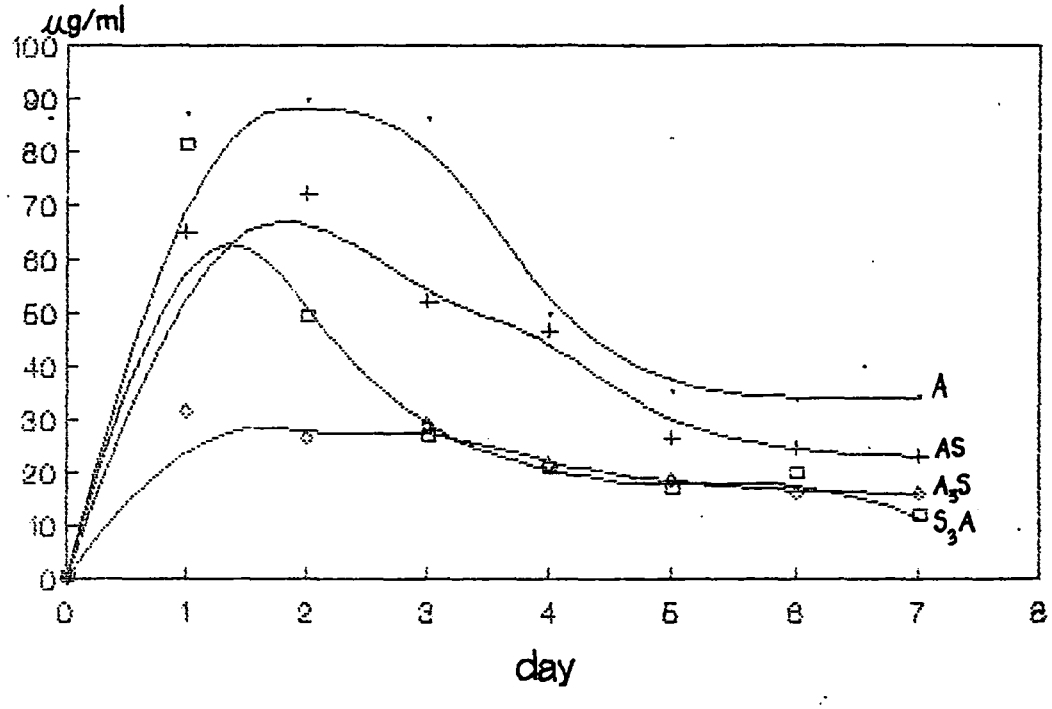
อายุเชื้อ (วัน)	พีเอช เฉลี่ย	ปริมาณแอฟฟลาทอกซินเฉลี่ย ไมโครกรัมต่อมล.		แอฟฟลาทอกซินทั้งหมด ($B_1 + G_1$) ไมโครกรัมต่อมล.
		B_1	G_1	
1	8.35	9.52	31.51	41.03
2	8.33	4.68	26.33	31.01
3	8.35	6.97	29.07	36.04
4	8.35	6.15	21.47	27.62
5	8.34	4.92	18.29	23.21
6	8.37	4.32	16.08	20.40
7	8.36	4.69	16.21	20.90

2.3 เมื่อเริ่มเลี้ยง S. lactis ก่อนเป็นเวลา 3 วันแล้วจึงใส่เชื้อ A. flavus พบว่า พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนสิ้นสุดเวลาของการเลี้ยงเชื้อ พีเอชสุดท้ายที่ได้คือ 8.15 ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1 จะมีค่าสูงสุดในวันที่ 2 คือ 8.82 ไมโครกรัมต่อมล. แล้วจะลดลงเรื่อย ๆ และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 6 หลังจากนั้นจะลดลงอีก แอฟฟลาทอกซิน G_1 มีปริมาณสูงสุดในวันที่ 1 คือ 80.87 ไมโครกรัมต่อมล. แล้วจะลดลงเรื่อย ๆ และเพิ่มขึ้นอีกครั้งในวันที่ 6 หลังจากนั้นจะลดลงอีก ผลแสดงการเปลี่ยนแปลงของพีเอช และปริมาณแอฟฟลาทอกซินของ A. flavus เมื่อเริ่มเลี้ยง S. lactis ก่อน A. flavus เป็นเวลา 3 วัน แสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4ผลแสดงการเปลี่ยนแปลงของพีเอช และปริมาณแอฟฟลาทอกซินของ A. flavus เมื่อเริ่มเลี้ยง S. lactis ก่อน A. flavus เป็นเวลา 3 วัน

อายุเชื้อ (วัน)	พีเอช เฉลี่ย	ปริมาณแอฟฟลาทอกซินเฉลี่ย ไมโครกรัมต่อมล.		แอฟฟลาทอกซินทั้งหมด (B_1 + G_1) ไมโครกรัมต่อมล.
		B_1	G_1	
1	4.43	8.50	80.87	89.37
2	3.38	8.82	49.19	58.01
3	7.24	6.14	26.59	32.73
4	7.63	4.14	20.36	24.50
5	7.96	3.62	16.26	19.88
6	8.03	3.73	19.75	23.48
7	8.15	3.48	11.76	15.24

จากผลการศึกษาปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1 และ G_1 ในอาหาร Lablemco tryptone broth พบว่า ปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละวันมีปริมาณไม่คงที่ อาจเนื่องมาจาก A. flavus ปล่อยเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการสลายแอฟฟลาทอกซิน B_1และ G_1เมื่อปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินทั้งสองชนิดเพิ่มสูงขึ้น ส่วนพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่วัดได้คาดว่าจะไม่เกี่ยวข้องกับปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินที่วิเคราะห์ได้ในแต่ละวันเนื่องจากไม่พบความสัมพันธ์ของค่าทั้งสอง



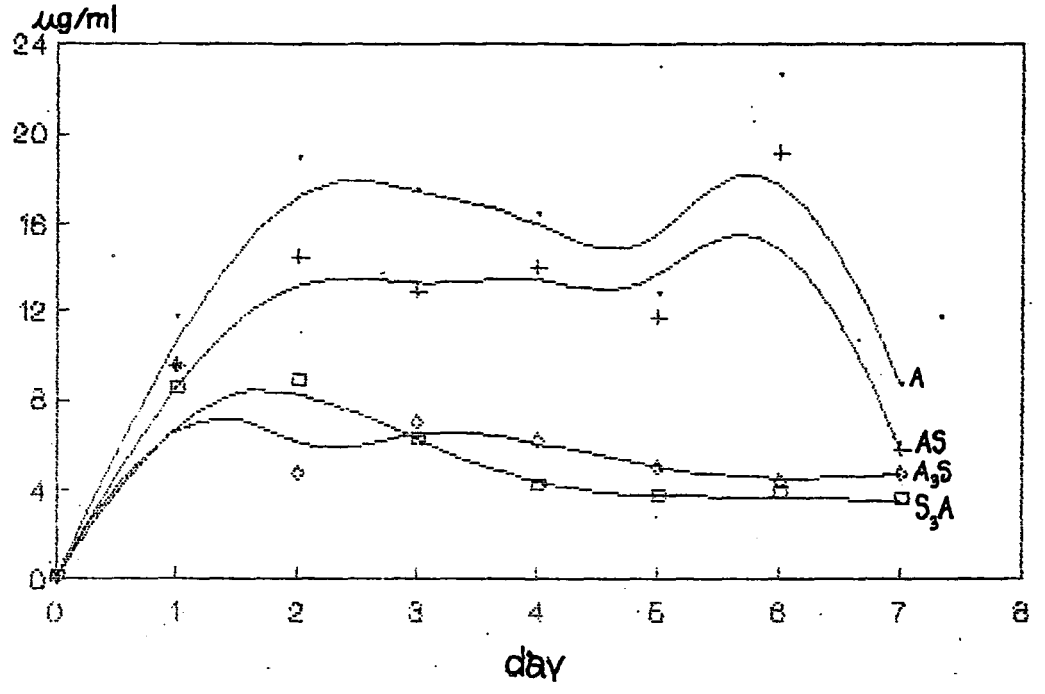
รูปที่ 4-1 ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน G_1 ของ A. flavus ที่วิเคราะห์ได้ในสภาวะต่างๆ

โดยที่กำหนดให้ A คือ เมื่อเลี้ยง A. flavus เชื้อเดียว

AS คือ เมื่อเริ่มเลี้ยง A. flavus พร้อม S. lactis

A_3S คือ เมื่อเริ่มเลี้ยง A. flavus ก่อน S. lactis เป็นเวลา 3 วัน

S_3A คือ เมื่อเริ่มเลี้ยง S. lactis ก่อน A. flavus เป็นเวลา 3วัน



รูปที่ 4-2 ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1 ของ A. flavus ที่วิเคราะห์ได้ในสภาวะต่างๆ

โดยที่กำหนดให้ A คือ เมื่อเลี้ยง A. flavus เชื้อเดียว

AS คือ เมื่อเริ่มเลี้ยง A. flavus พร้อม S. lactis

A_3S คือ เมื่อเริ่มเลี้ยง A. flavus ก่อน S. lactis เป็นเวลา 3 วัน

S_3A คือ เมื่อเริ่มเลี้ยง S. lactis ก่อน A. flavus เป็นเวลา 3วัน

3.ผลการศึกษาการลดปริมาณแอฟฟลาทอกซินโดยเชื้อแบคทีเรียในยีเกิร์ต

3.1 การศึกษาการลดปริมาณแอฟฟลาทอกซินโดยเชื้อ S. lactis ในนมหมัก

จากการศึกษาการลดปริมาณแอฟฟลาทอกซินโดยเชื้อ S. lactis ในนมหมักที่มีเปอร์เซนต์ความเป็นกรดเริ่มต้นที่ 0.7% พบว่าตลอดระยะเวลาการบ่มนมหมัก ที่อุณหภูมิ 7 ซ ค่าเปอร์เซนต์ความเป็นกรดมีการเปลี่ยนแปลงโดยจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่เติมลงในนมหมักมีปริมาณลดลงจากที่เติมลงไป 50 ไมโครกรัมต่อมล. จะลดลงเป็น 33.70 ไมโครกรัมในวันที่ 7 ผลแสดงการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซนต์ความเป็นกรดและปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่เหลืออยู่ แสดงในตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 ผลแสดงการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซนต์ความเป็นกรด และ ปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่เหลืออยู่

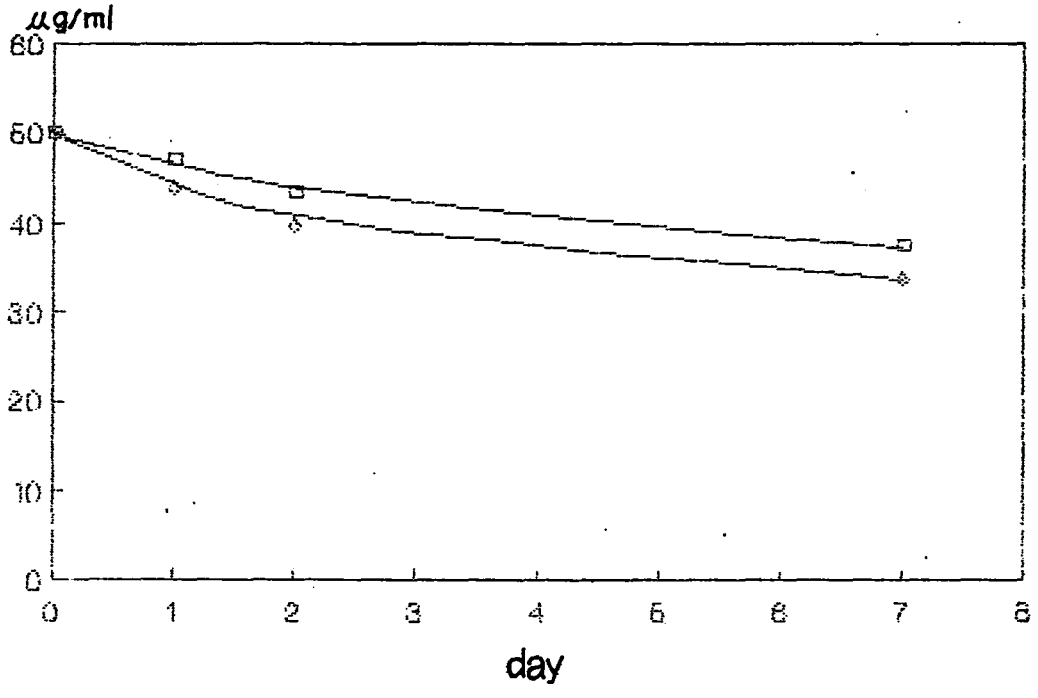
อายุเชื้อ (วัน)	เปอร์เซนต์ความเป็นกรด	ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1 ที่เหลืออยู่ ไมโครกรัมต่อมล.	% แอฟฟลาทอกซินที่เหลืออยู่
1	0.98%	44.00	87.00%
2	1.16%	39.65	79.30
7	1.5%	33.70	67.40

3.2 การศึกษาการลดปริมาณแอฟฟลาทอกซินโดยเชื้อแบคทีเรียในโยเกิร์ต

จากการศึกษาการลดปริมาณแอฟฟลาทอกซินโดยเชื้อแบคทีเรียใน commercial yogurt ที่มีเปอร์เซนต์ความเป็นกรดเริ่มต้นที่ 0.7 เปอร์เซนต์ พบว่า ตลอดระยะเวลาการบ่มโยเกิร์ตที่อุณหภูมิ 7 ซ ค่าเปอร์เซนต์ความเป็นกรดมีการเปลี่ยนแปลงโดยจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่เติมลงไปในโยเกิร์ตมีปริมาณลดลงจากที่เติมลงไป 50 ไมโครกรัมต่อมล.เป็น 37.25 ไมโครกรัมต่อมล. ผลแสดงการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซนต์ความเป็นกรดและปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่เหลืออยู่แสดงในตารางที่ 4-6

ตารางที่ 4-6 ผลแสดงการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซนต์ความเป็นกรดและปริมาณแอฟฟลาทอกซินที่เหลืออยู่

อายุเชื้อ (วัน)	เปอร์เซนต์ความเป็นกรด	ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1 ที่เหลืออยู่ ไมโครกรัมต่อมล.	% แอฟฟลาทอกซินที่เหลืออยู่
1	0.95%	46.85	93.72%
2	1.08%	43.25	86.50%
7	1.40%	37.25	74.50%



รูปที่ 4-3 ปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1 ที่วิเคราะห์ได้จากกรีกเกิร์ต
โดยกำหนดให้ --- คือ ใช้หัวเชื้อ commercial yogurt
—— คือ ใช้หัวเชื้อ S. lactis

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

การทดลองที่ 1 และ 2

จากผลการศึกษาปริมาณการสร้างสารพิษแอฟฟลาทอกซินของ A. flavus ใน Lablemco tryptone broth medium และผลการศึกษาความสัมพันธ์ของ S. lactis ที่มีผต่อปริมาณแอฟฟลาทอกซินของ A. flavus ใน Lablemco tryptone broth medium เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้แบบแผนการทดลองสำหรับ 2 ปัจจัยคือ Factorial Experiment in CRD (Completely Randonized Design)โดยทำการวิเคราะห์แยกระหว่างปริมาณแอฟฟลาทอกซิน G_1 และ แอฟฟลาทอกซิน B_1 หน่วยเป็นไมโครกรัมต่อมล. ผลแสดงในตารางที่ 5-1 และ 5-2 ตามลำดับ

ตารางที่ 5-1 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณแอฟฟลาทอกซิน G_1

source of variation	degree of freedom	sum of square	mean square	F	Tabular F 5%	Tabular F 1%
Age	6	24296.81	4049.47	261.288**	2.29	3.19
Microbial	3	15670.56	5223.52	337.043**	2.79	4.20
A x M	18	7687.04	427.06	27.555**	1.80	2.29
Error	56	867.89	15.50			
Total	83	48522.298				

** ต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 %

ตารางที่ 5-2 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1

source of variation	degree of freedom	sum of square	mean square	F	Tabular F 5%	Tabular F 1%
Age	6	375.18	62.53	62.53**	2.29	3.19
Microbial	3	1546.35	515.45	515.45**	2.79	4.20
A x M	18	500.76	27.82	27.82**	1.80	2.29
Error	56	56.37	1.00			
Total	83	2478.66				

** ต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 %

จากตารางที่ 5-1 และ 5-2 พบว่ามีความแตกต่างกันมากระหว่างอายุของเชื้อในด้านปริมาณของแอฟฟลาทอกซิน จากนั้นทำการเปรียบเทียบระหว่างค่าเฉลี่ยโดยใช้ Least Significant Difference test (LSD) โดยให้ปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินของ A. flavus ในอาหารเหลวเป็นค่า control ใช้เปรียบเทียบกับปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซินของ A. flavus ในอาหารเหลว เมื่อเลี้ยงร่วมกับ S. lactis ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 5-3 และ 5-4

ตารางที่ 5-3 การเปรียบเทียบสารพิษแอฟฟลาทอกซิน G_1 ในอาหารเหลว

อายุ (วัน)	ค่าที่ต่างจาก control (ไมโครกรัมต่อมล.)		
	AS	A_3S	S_3A
1	22.44^{**}	55.53^{**}	6.17^{n}
2	17.71^{**}	63.06^{**}	40.30^{**}
3	34.04^{**}	56.89^{**}	59.37^{**}
4	2.84^{ns}	27.83^{**}	28.94^{**}
5	8.27^{*}	16.73^{**}	18.75^{**}
6	9.27^{**}	17.46^{**}	13.80^{**}
7	11.29^{**}	17.97^{**}	22.42^{**}

AS : เมื่อเลี้ยง A. flavus พร้อมกับ S. lactis

A_3S : เมื่อเลี้ยง A. flavus ก่อน S. lactis 3 วัน

S_3A : เมื่อเลี้ยง S. lactis ก่อน A. flavus 3 วัน

ns : ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

* : มีความแตกต่างกันทางสถิติด้วยความเชื่อมั่น 95%

** : ต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 %

จากผลการเปรียบเทียบในตารางที่ 5-3 พบว่า S. lactis ไม่สามารถลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน G_1 ของ A. flavus ได้ ในวันที่ 4 เมื่อเริ่มเลี้ยง A. flavus พร้อมกับ S. lactis และในวันที่ 1 เมื่อเริ่มเลี้ยง S. lactis ก่อน A. flavus 3 วัน เท่านั้น นอกเหนือจากนี้ถือว่า S. lactis สามารถลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน G_1 ได้มากที่ระดับความเชื่อมั่น 99% นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเริ่มเลี้ยง A. flavus

ก่อน S. lactis 3 วันและ เมื่อเลี้ยง S. lactis ก่อน A. flavus 3 วัน นั้นเชื้อ S. lactis มีความสามารถลดสารพิษแอฟฟลาทอกซิน G_1 ต่างกันมาก เพียงสองวันแรกโดย เมื่อเลี้ยง A. flavus ก่อน S. lactis 3 วัน สามารถลดสารพิษแอฟฟลาทอกซิน G_1 ได้มากกว่า และตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไปใน 2 กรณีนี้เชื้อ S. lactis สามารถลดสารพิษแอฟฟลาทอกซิน G_1 ได้ไม่ต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 5-4 การเปรียบเทียบปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 ในอาหารเหลว

อายุ (วัน)	ค่าที่ต่างจาก control (ไมโครกรัมต่อมล.)		
	AS	A_3S	S_3A
1	2.12**	2.15**	3.17**
2	4.44**	14.25**	10.11**
3	4.57**	10.44**	11.27**
4	2.37**	10.24**	12.25**
5	1.14ns	7.90**	9.20**
6	3.48**	18.25**	18.84**
7	2.94**	4.04**	5.25**

AS : เมื่อเลี้ยง A. flavus พร้อมกับ S. lactis

A_3S : เมื่อเลี้ยง A. flavus ก่อน S. lactis 3 วัน

S_3A : เมื่อเลี้ยง S. lactis ก่อน A. flavus 3 วัน

ns : ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** : ต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 %

จากผลการเปรียบเทียบในตารางที่ 5-4 พบว่า S. lactis ไม่สามารถลดสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 ได้เฉพาะในวันที่ 5 เมื่อเลี้ยง A. flavus พร้อมกับ S. lactis ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% นอกเหนือจากนี้ถือว่า S. lactis สามารถลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 ได้มากและพบว่า เมื่อเลี้ยง A. flavus ก่อน S. lactis 3 วัน เชื้อ S. lactis สามารถลดสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 ได้มากไม่แตกต่างจากเมื่อเริ่มเลี้ยง S. lactis ก่อน A. flavus 3 วัน ยกเว้นในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อพบว่า เมื่อเลี้ยง A. flavus ก่อน S. lactis 3 วัน S. lactis สามารถลดสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 ได้มากกว่าที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการศึกษาในขั้นนี้สามารถสรุปได้ว่า S. lactis มีความสามารถในการลดสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 และ G_1 ของ A. flavus ในอาหารเหลว Lablemco tryptone broth medium และเมื่อเริ่มเลี้ยง A. flavus ก่อน S. lactis 3 วัน จะทำให้ S. lactis มีประสิทธิภาพในการลดแอฟฟลาทอกซิน บี 1 และ จี 1 ได้ดีที่สุด

การทดลองที่ 3 และ 4

เมื่อนำ S. lactis จากการศึกษาในขั้นต้นมาทำรีเกิร์ตเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 ระหว่างการใช้เชื้อ S. lactis เป็นหัวเชื้อ กับการใช้ commercial yogurt เป็นหัวเชื้อ นำผลการศึกษามาวิเคราะห์ความแปรปรวน โดยใช้แบบแผนการทดลองสำหรับ 2 ปัจจัยคือ Factorial Experiment in CRD ได้ผลดังตารางที่ 5-5

ตารางที่ 5-5 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณแอฟฟลาทอกซิน B_1

source of variation	degree of freedom	sum of square	mean square	F	Tabular F 5%	Tabular F 1%
Age	2	202.17	101.085	176.41**	5.14	10.92
Microbial	1	30.08	30.08	52.50**	5.99	13.74
A x M	2	0.25	0.13	0.22ns	5.14	10.92
Error	6	3.44	0.573			
Total	11	235.947				

ns : ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** : ต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 %

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ตารางที่ 5-5 พบว่าระยะเวลาที่ใช้บ่มเชื้อทั้ง 2 ชนิด และ ชนิดของหัวเชื้อ มีความแตกต่างกันมากในด้านปริมาณแอฟฟลาทอกซิน ส่วนอิทธิพลร่วมไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ เพื่อยืนยันผลสรุปข้างต้นดังกล่าวจึงทำการวิเคราะห์โดยใช้ LSD ได้ผลดังตารางที่ 5-6

ตารางที่ 5-6 แสดงการเปรียบเทียบชนิดของหัวเชื้อ

เวลา	ค่าที่แตกต่าง
1	2.85**
2	3.60**
7	3.55**

** แตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 %

จากผลการเปรียบเทียบในตารางที่ 5-6 พบว่า หัวเชื้อที่ได้จาก commercial yogurt และ S. lactis มีความสามารถในการลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 ได้แตกต่างกันมาก โดย S. lactis สามารถลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 ได้มากกว่า commercial yogurt ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% โดย commercial yogyrt สามารถลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 ได้ 12.75 พีพีเอ็ม แต่เชื้อ S. lactis สามารถลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1ในโยเกิร์ตได้ถึง 16.3 พีพีเอ็ม

การลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 สามารถอธิบายได้โดยใช้หลักทางเคมีดังนี้ เมื่อสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 อยู่ในสภาวะที่เป็นกรดจะถูกสลายโดยมีน้ำเข้ามาเกี่ยวข้อง และจะเปลี่ยนไปเป็น hydroxidihydroaflatoxin B_1 (aflatoxin B_{2a}) (Biichi และคณะ,1966; Ciegler และคณะ ,1966b; Pohland และคณะ,1988) ซึ่งแอฟฟลาทอกซิน B_{2a} มีความเป็นพิษน้อยกว่าแอฟฟลาทอกซินบี 1 (Ciegler และ Peterson,1988 ; Dutton และ Heathcote , 1968 ; Lillehoj และ Ciegler,1969) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้กรดเป็น detoxifying agent กับสารหรือวัตถุซึ่งปนเปื้อนแอฟฟลาทอกซินได้ (Feuell,1966a) แต่อย่างไรก็ตามก็ควรคำนึงถึงปฏิกิริยา dehydration ของ B_{2a} ซึ่งจะได้ผลผลิตเป็นแอฟฟลาทอกซิน B_1 (Dutton และ Heathcote,1968)

ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน ที่ปนเปื้อนในสารหรือวัตถุต่าง ๆ ได้ เช่น การลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน M_1 ที่ปนเปื้อนอยู่ในนมโค เนื่องจากแม่โคได้รับแอฟฟลาทอกซิน B_1 เข้าไป (Allcroft และ Lewis.,1963) ซึ่งแอฟฟลาทอกซิน B_1 และ M_1 มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกันมากโดยนำโคที่ปนเปื้อนแอฟฟลาทอกซินนี้มาทำโยเกิร์ต หรือการลดปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน B_1 ซึ่งอาจปนเปื้อนมากับ Aspergillus flavus ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่พบมากที่สุดในอากาศเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่พบในโยเกิร์ตในระหว่างการบรรจุ (Jordano,R.1987)

2.ควรมีการศึกษาถึงกลไกจากจุลินทรีย์ที่มีผลต่อปริมาณสารพิษแอฟฟลาทอกซิน

ภาคผนวก

-ก-

การเตรียมสปอร์เชื้อรา

1.เขี่ยเชื้อราจาก stock culture ลงใน PDA slant เลี้ยงให้เชื้อมีการเจริญ 7 วัน

2.นำเชื้อที่มีการเจริญ 7 วัน มาถ่ายลงใน PDA 200 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ให้เชื้อมีการเจริญ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

3.นำสปอร์ของเชื้อที่มีการเพิ่มปริมาณสปอร์แล้วเป็นเวลา 7 วัน มาทำการเก็บเกี่ยวโดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาณเล็กน้อย หยด tween 80 1-2 หยดตั้งทิ้งไว้ 15-20 นาที เขย่าให้สปอร์กระจายแขวนลอยในน้ำกลั่น นำไปเหวี่ยงตกตะกอนที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที ล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วในปริมาณเล็กน้อยหลาย ๆ ครั้ง รวบรวม spore suspension ที่ได้แล้วนำไปเหวี่ยงตกตะกอนอีกเพื่อแยกสปอร์ออกจากน้ำกลั่น เทน้ำใสทิ้งเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไป 10 มิลลิลิตร ถ่ายลงในขวดที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำซ้ำจนปริมาตรเพิ่มขึ้นเป็น 30 มิลลิลิตร เก็บไว้ศึกษาต่อไป

4.spore suspensionที่ได้จะนำมานับจำนวนโดยใช้ Haemacytometer ให้มีความเข้มข้น 10^8 สปอร์ต่อมล. นำไปเก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียม cell suspension ของ S. lactis

1.เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย S. lactis จาก stock culture ลงในหลอดอาหาร nutrient agar slant เลี้ยงเชื้อให้มีการเจริญ 7 วัน

2.นำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำ cell suspension โดยเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไปปริมาณเล็กน้อย แล้วใช้ loop เขี่ยเชื้อให้ออกจากหลอดอาหาร

3.suspension ที่ได้นำมาตรวจนับโดยใช้ Haemacytometer ให้มีความเข้มข้น $1x10^8$ เซลล์ต่อมล. แล้วนำไปเก็บเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

วิธีสกัดสารพิษแอฟฟลาทอกซินออกจากอาหารเหลว

กรองเส้นใยด้วย buchner funnel แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 20 มล.ได้เป็น 2 ส่วน คือ ของเหลวที่กรองได้ และแผ่นกระดาษกรอง+เส้นใย

การหาสารพิษแอฟฟลาทอกซินในของเหลวที่กรองได้ (filtrate)

1. นำของเหลว (filtrate) ปริมาตร 20 มล. ใส่ลงในกรวยแยก

2. เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 20 มล. ลงในกรวยแยก ทำการเขย่าแรง ๆ เพื่อให้สารผสมกัน ปล่อยทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้น

3. ไขแยกชั้นคลอโรฟอร์มออกมา (ชั้นล่าง)

4. แยกซ้ำด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 100 มล. โดยให้แบ่งทำ 2 ครั้ง

5. นำคลอโรฟอร์มที่ไขแยกชั้นได้เทรวมกัน นำไประเหยในเครื่องกลั่นระเหยแบบสูญญากาศ จนเหลือสารละลาย 2-3 มล.

6. ถ่ายสารละลายลงใน vial ด้วยพาสเจอร์ปิเปตต์ แล้วนำเข้าเดซิกเคเตอร์ที่อุณหภูมิห้องจนเย็น

7. นำ vial ไปเก็บในที่มืด เพื่อรอการวิเคราะห์หาชนิด และปริมาณด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

วิธีการแยกสารพิษแอฟฟลาทอกซินออกจากอาหารแข็ง(กึ่งแข็ง)โดยวิธี "Sep-pak"

1. ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 150 มล. และน้ำ 25 มล. ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล.

2. นำเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

3. กรองผ่านด้วยกระดาษวัทแมนเบอร์ 1 ใช้ celite เป็นสารช่วยกรอง

4. ของเหลวที่กรองได้เทใส่กรวยแยก เติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 20 มล. เขย่าแรง ๆ เพื่อให้สารผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ปล่อยให้แยกชั้น

5. ไขแยกชั้นคลอโรฟอร์มออก ทำการสกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม 100 มล. แบ่งทำ 2 ครั้ง นำคลอโรฟอร์มที่ไขแยกชั้นได้เทรวมกัน นำไประเหยในเครื่องกลั่นแบบสุญญากาศจนแห้ง

6. ละลายตัวอย่างด้วย คลอโรฟอร์ม ต่อ เฮกเซน (อัตราส่วน 3:7) 10 มล.

7. สารละลายที่ได้มาผ่าน sep-pak siliga gel cartridge column chromatography แล้วล้างด้วย n-hexane 10 มล.

8. ล้างต่อด้วย เบนซีน กับ กรดแอซีติก (อัตราส่วน 95.5:4.5) 10 มล.

9. ล้างด้วยเอทิลอีเทอร์ กับ เฮกเซน (อัตราส่วน 60:40) 10 มล.

10. ชะสารพิษแอฟฟลาทอกซินออกจาก sep-pak ด้วย ไดคลอโรมีเทน กับ อะซิโตน (อัตราส่วน 9:1) 5 มล.

11. สารละลายที่ได้นำไประเหยด้วยเครื่องกลั่นแบบสุญญากาศจนแห้ง

12. ละลายตัวอย่างด้วย เมทานอล 1 มล. กรองผ่าน millipore ใส่ vial

13. เก็บไว้เพื่อรอการวิเคราะห์หาชนิด และปริมาณด้วยเครื่อง HPLC

<u>การหาเปอร์เซนต์ความเป็นกรดในนม</u>

นมโคปกติจะมีฤทธิ์เป็นกรด พีเอชประมาณ 6.6 ความเป็นกรดของนมนี้เนื่องมาจาก albumin globulin citrate phosphate และคาร์บอนไดออกไซด์ รวมทั้งเกลือแร่ต่าง ๆ ที่ละลายอยู่ในนมโดยธรรมชาติ โดยทั่วไปนมที่มีไขมันสูงจะมีความเป็นกรดสูง และ solid not fat มักสูงไปด้วย ดังนั้นถ้าหากมีการเติมน้ำลงในนมจะทำให้ความเป็นกรดลดลงเนื่องจาก solid not fat ลดลง

กรดแลกติกที่เกิดขึ้นในนมเป็นผลมาจากการเปลี่ยนน้ำตาลแล็กโทสบางส่วนในนม ให้เป็นกรดแลกติกโดยจุลินทรีย์ ความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นจากธรรมชาติเรียกว่า developed acidity เป็นกรดที่จะทำให้นมเสีย

การศึกษาความเป็นกรดในนมมักนิยมการไทเทรตนม กับด่างมาตราฐานแล้วคำนวณค่าความเป็นกรดของนม ออกมาในรูปของกรดแลกติก ($CH_3CHOHCOOH$) หลังจากไทเทรตนมด้วยด่างมาตราฐานแล้วคำนวณด้วยสูตร

เปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดแลกติกในนม = $\frac{\text{มล.0.1นอร์มอลด่างที่ใช้ x 0.009x100}}{\text{จำนวนกรัมของตัวอย่าง}}$

วิธีการ

ทำการไทเทรตน้ำนม 9.0 ลบ.ซม. กับ 0.1 นอร์มอลสารละลายมาตราฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ 1% ฟีนอฟทาลีน 2-3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ จุดยุติจะมีสีชมพูเกิดขึ้นอย่างถาวร

การวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography

นำเมทานอล 1 มล. ละลายแอฟฟลาทกซินที่อยู่ในขวดตัวอย่างแล้วกรองผ่าน membrane filter (millipore) 0.45 ไมโครเมตร ใส่ในขวดแก้วเล็ก (vial) นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC (Shimadzu) UV Sprectrophotometric detector SPD-6A 365 นาโนเมตร adsorbance 0.02 ใช้คอลัมน์ reverse phase C18 4.9x25 ซม. flow rate ใช้ 1 มล.ต่อนาที mobile phase ใช้อัตราส่วนของเมทานอล:น้ำ:แอซีติก (2:1:1)บันทึกโครมาโทแกรมของแอฟฟลาทอกซินชนิด G_1,B_1 ประมาณนาทีที่ 6.8 และ 7.2 ตามลำดับแล้วใช้ data module model G-R6A Chromatopac เป็น integrator คำนวณค่าที่วัดได้เปรียบเทียบกับค่ามาตราฐานทั้ง 2 ชนิดโดยดูจาก peak area และ retention time

ภาคผนวก

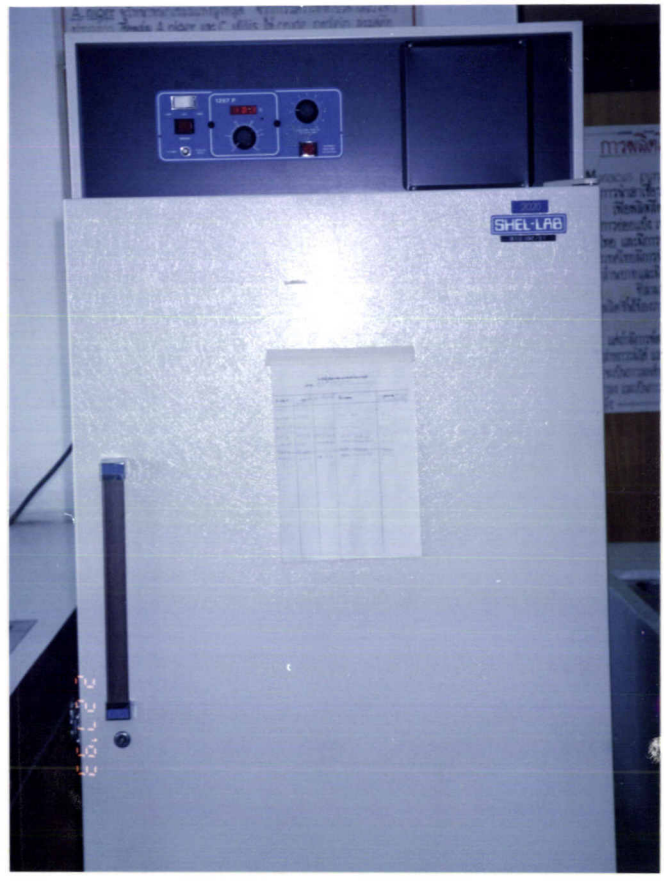
—ข—

รูปที่ 1 Stock culture ของ S. lactis และ A. flavus

รูปที่ 2 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

รูปที่ 3 เครื่องเขย่า

รูปที่ 4 การสกัดสารพิษแอฟฟลาทอกซินในกรวยแยกโดยใช้คลอโรฟอร์ม

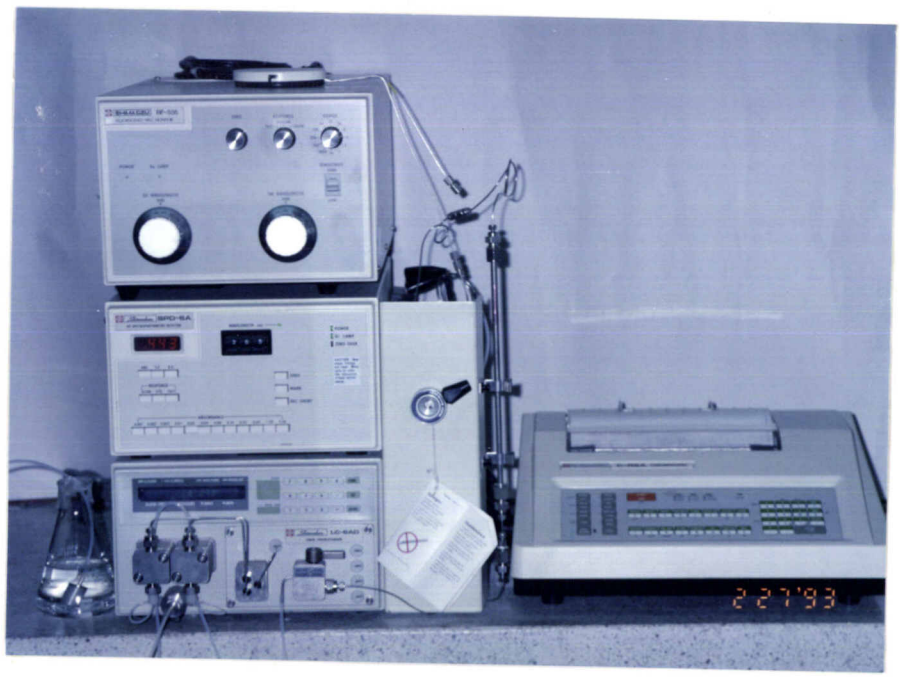


รูปที่ 5 ตู้บ่มอุณหภูมิต่ำ

รูปที่ 6 การกรองโยเกิร์ตออกจากคลอโรฟอร์ม

รูปที่ 7 เครื่องกลั่นระเหยสูญญากาศ

รูปที่ 8 การกรองโดยใช้ sep-pak



รูปที่ 9 High Pressure Liquid Chromatography รุ่น LC-6AD

ภาคผนวก

—ค—

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อ</u> Lablemco tryptone broth
มีส่วนผสมดังนี้

glucose	1 %	
yeast extract (Difco)	1 %	
Leblemco beef extract	1 %	(Oxoid ,London ,UK)
tryptone	1 %	
NaCl	0.5 %	
Na_2HPO_4	0.2 %	

ปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้ได้ 4.3 ด้วย 5 นอร์มอลกรดไฮโดรคลอริก
หลังผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

เอกสารอ้างอิง

1 ศุภกิจ อังศุภากร 2531. อันตรายในคนและสัตว์ที่เกิดจากสารพิษจากเชื้อรา เอกสารประกอบการบรรยายในการฝึกอบรมเรื่องการป้องกันแอฟฟลาทอกซินในข้าวโพด กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ,14-20,กันยายน 2531.

2 ธีรยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และ ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว 2524 แอฟฟลาทอกซิน (สารพิษจากเชื้อราที่ทำให้เกิดมะเร็งในตับ) สำนักพิมพ์ ดร. สกล พงศกร,กรุงเทพฯ

3 นรินทร์ ทองศิริ 2531. เทคโนโลยีอาหารนม

4 ไมตรี สุทธิจิตต์ 2531. สารพิษรอบตัวเรา ภาควิชาเคมี คณะแพทย์ศาสตร์ , มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ,256 - 286.

5 Magalla , S.E. and Hafez , A.H. 1982. Detoxification of aflatoxin B_1 by acidogenous yoghurt, Mycopathol.77,89-99.

6 Oberman , H. 1985. Fermented milks. In Microbiology of fermented food , Vol 1 , pp.167-196 . Edited by B.J.B. Wood. Elsevier Applied Science Publishers. London and New York

7 Mabbitt., L.A.,Davies, F.L., law , B.A.and Marshall, V.M. 1987. Microbiology, pp.154-166. Edited by J.R.Norris and G.L. Pettipher. John Wikey and Sons LTD., Chichester.

8 Marshall , V.M.E. 1986. The microflora and production of fermented milk. In Progress in Industrial Microbiology , Vol 23 , pp. 1-44. Edited by M.R. Adams. Elserier, Amsterdam

9 Dulley , J.R. and Houlihan , D.B.1979. An examination of Queensland milk and cheese for possible aflatoxin contamination., The Australian Journal of Dairy Technology - March 1979.,pp.12-13.

10 Kiermeier , F. (1977) , Int. Dairy fed. A.Bull.No 98.

11 Girant ,D.W. and Carlson,F.W. 1971, Bull. Environ. Contam. Toxicol. pp.6,521.

12 Coallier - Ascah, J. and Idziak , E.S.1985. Interaction between Streptococcus lactis and Aspergillus flavus on production of aflatoxin.Appl. Env. Microbiology. pp.49,163-167.

13 Kurtzman, C.P., Horm, B.W. and Hesseltine , C.W. 1987. Aspergillus nomius , A new aflatoxin producing species related to Aspergillus flavus and Aspergillus tamarii. Antonie. van Leeuw. pp.53, 147-158

14 Jordano, R. 1987. Relationship between airborne contamination by yeasts and molds and packaging system in commercial yogurt. Microbiol. Aliment. Nutr.5:253-255.

15 Jordano,R. Jodral , M. Martinez,P. Salmeron,J. and Pozo,R. Aflatoxin-Producing Strains of Aspergillus fluvus in yogurt. Journal of Food Protection , Vol. 52, No. 11, pages 823-824.

16 Polzofer, K. 1977. Determination of Aflatoxins in milk and milks products. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 163: 175-177

17 Ciegler,A.,Peterson,R.E.,Lsgoda,A.A. and Hall,H.H. 1966. Aflatoxin production and degradation in 20 L fermenters. Appl. Microbiol. 14, 826 - 833.

18 Megalla,S.E. and Hafez,A.H. 1982. Detoxification of aflatloxin B 1 by acidogenous yoghurt. Mycopathol. 77, 89-91.

19 Doyle,M.P.,and E.H.Marth.1979. Peroxidase activity in mycelia of Aspergillus parasiticus that degrade aflatoxin, European J. Appl. Microbiol, Biotechnol,7:211-217.

20 Allcroft,r., and Canaghan,R.B.A.1963.Groundnut toxicity. An examinatation for toxin in human food products from animals fed toxic ground nut meal. Vet. Rec.75,259-263.

21 Jordano,R.1987. Relation between airbone contamination by yeasts and molds and packaging system in commercial yogurt. Microbial Aliment. Nutr. 5: 253-255.

22 Blount,W.P. 1961: Turkey X diesease. Turkeys, 9,52.

23 Goldblatt ,L.A. 1969. Aflatoxin-scientific Background,Control and Implications. Academic Press,New york.

24 Sargeant,K.1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts,Nature,192,1096-1097

25 Hartley,R.D.,Nesbitt,B.F.and Kelly,J.O.1963. Toxic metabolite of Aspergillus flavus .Nature(London),198,1056-1058

26 Ceigler,A., Kadis, S.and Aji,S.J.1971.Microbial toxin Vol.6 Fungal Toxins. Acadamic Press,New York,165.

27 Glinsulol,T. ,Thamavit,W. and Ruchirawat,M.1976 Studies an the population of toxigenic fungi in market foods and foodstuff. J.Sci.Soc.Thailand,2,176.

28 Shank ,R.C.,Wagon,G,N. Gibson,J.B. and Nondasuta,A.1972. Dietary aflatoxins and human liver cancer : Aflatoxin in market foods and foodstuffs in Thailand and Hong Kong. Food Conmet. Toxicol.,10,61-65

29 Tores,J. Guarra,J.,Suarez,G.,Sune,N.Calvo,M.A. and Ramirez, C.1980. Morphological changes in strains of Aspergillus flavus. Link Ex Fries and Aspergillus parasiticus Speares related with aflatoxin production. Mycopathologia. 72(3),171-174

30 Landers,K.E.,Davis,N.D. and Diener,U.L. 1967. Influence of atmosphere on aflatoxin by Aspergillus flavus in products. Phytopathology,57,1086-1090

31 Al-Hilli,A.L. and Smith,J.E.1979. Influence of propionic acid on growth and aflatoxin production by Aspergillus flavus . FEMS Microbiology Letters,6,367-370.

32 Gareis,M., Baur,J., Von Mantgelas,A. and Gedek,B.1984. Stimulation of aflatoxin B_1 and T-2 toxin production by sorbic acid.Appl.Environ. Microbiol.,47(2)416-418.

33 Yac,R.C. and Hsich,D.P.H.1974. Step of dichlorvos inhibition in the pathway of aflatoxin biosynthesis. Appl. Environ. Micorbiol., 28,52-57

34 WHO.1979.Environment health criteria in Mycotoxins. Worlds Health Organization, Geneva.