สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในระหว่างการผลิตเทมเป้ โดยเชื้อรา Rhizopus oligosporus

นางสาวพนอ รวยสูงเนิน
นางสาวสายชล นุชน้อง

2/w.
W 194n
2537
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน.เดือน.ปี.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2538
2537

0125487281

INHIBITION OF AFLATOXIN PRODUCTION DURING TEMPEH PRODUCTION BY RHIZOPUS OLIGOSPORUS

Miss Panor Roisoongnoen
Miss Saichol Nuchnong

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
1995

หัวข้อโครงงานพิเศษ การยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในระหว่างการผลิตเทมเป้ โดยใช้เชื้อรา *Rhizopus oligosporus*

โดย นางสาวพนอ รวยสูงเนิน

นางสาวสายชล นุชน้อง

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร ดุษณี ธนะบริพัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อ. เหมือนหมาย อภินทนาพงศ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษ

ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(.....) หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(ดร. อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

..... ประธานกรรมการ

(ดร. อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล)

..... กรรมการ

(รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

..... กรรมการ

(อ. วันชัย สุทธินุ่น)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในระหว่างการผลิตเทมเป้โดยใช้เชื้อรา Rhizopus oligosporus
นักศึกษา	นางสาวพนอ รวยสูงเนิน
	นางสาวสายชล นุชน้อง
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อ. เหมือนหมาย อภินทนาพงศ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2537

บทคัดย่อ

เทมเป้เป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงเนื่องจากมีปริมาณโปรตีนและวิตามินสูง จึงเป็นอาหารที่บริโภคกันทั่วไปในประเทศอินโดนีเซีย โดยทั่วไปเทมเป้จะทำมาจากเมล็ดธัญพืชหลายชนิด แต่ที่นิยมมากที่สุดคือ ถั่วเหลือง และใช้เชื้อรา Rhizopus oligosporus ในการผลิต แต่ในบางครั้งผู้ผลิตได้นำถั่วเหลืองที่มีการปนเปื้อนของเชื้อรามาทำการผลิต ทำให้ผู้บริโภคไม่แน่ใจในความปลอดภัยของอาหารชนิดนี้ จึงมีการศึกษาการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในระหว่างการผลิตเทมเป้โดยใช้เชื้อรา Rhizopus oligosporus การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 ทำการบ่มเทมเป้ไว้ 2 วัน ส่วนอีกชุดหนึ่งจะเก็บเทมเป้ที่บ่มไว้ในตู้เย็นต่ออีกเป็นเวลา 7 วัน แต่ละชุดจะทำการศึกษาเทมเป้ในแต่ละเงื่อนไข คือ ถั่วเหลืองดิบ ถั่วเหลืองนึ่ง ถั่วเหลืองนึ่งเติมสปอร์ของเชื้อรา Aspergillus flavus เพียงชนิดเดียว ถั่วเหลืองนึ่งเติมสปอร์ของเชื้อรา Rhizopus ligosporus เพียงชนิดเดียว และถั่วเหลืองนึ่งเติมสปอร์ของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด จากการทดลองพบว่าถั่วเหลืองนึ่งที่ทำการเติมสปอร์ของเชื้อรา Rhizopus oligosporus และ Aspergillus flavus จะไม่มีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินเลย ในขณะที่ถั่วเหลืองนึ่งที่มีการเติมสปอร์ของเชื้อรา Aspergillus flavus เพียงชนิดเดียวจะมีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินขึ้น แสดงว่าเทมเป้น่าจะสามารถยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ เนื่องจากในการผลิตเทมเป้ต้องมีการเติมเชื้อรา Rhizopus oligosporus ลงไป

Special Project Title INHIBITION OF AFLATOXIN PRODUCTIION DURING TEMPEH PRODUCTON BY RHIZOPUS OLIGOSPORUS

Name Miss Panor roisoongnoen

Miss Saichol nuchnong

Special Project Advisor Associate Professor Dr. Dusanee Thanaboripat

Special project Coadvisor Miss Muanmai Apintanapong

Department Applied Biology

Academic Year 1994

Abstract

Tempeh, a highly nutritional source of protein and vitamins has been consumed widely in Indonesia. It is usually made from various cereal grains but soybean is the most common one. Tempeh is produced through the fermentation of soybean cake by Rhizopus oligosporus. Soybean used for the tempeh production may sometime be contaminated with toxigenic fungi. Thus, this study has been undertaken to observe the effect of Rhizopus oligosporus on the growth of Aspergillus flavus and aflatoxin production during the tempeh production at various conditions. The result showed that steamed soybean with the addition of Rhizopus oligosporus and Aspergillus flavus spores gave no aflatoxin production whereas the steamed soybean inoculated with only Aspergillus flavus spores produced afltoxin in tempeh.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ผู้ที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์อรไท สุขเจริญ อาจารย์เหมือนหมาย อภินทนาพงศ์ และอาจารย์ทุกท่านที่ได้สละเวลาอันมีค่าให้คำชี้แนะแนวทางที่เป็นประโยชน์ต่อโครงงานพิเศษนี้ ผู้เขียนต้องขอกราบขอบคุณทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ท้ายที่สุดนี้ผู้เขียนของขอบคุณสถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ถั่วเหลืองสำหรับทำโครงงานพิเศษนี้ นอกจากนี้ขอขอบคุณเพื่อนนักศึกษา และท่านที่มีอุปการะคุณที่มิอาจกล่าวนามได้ครบถ้วน ณ ที่นี้ ที่ได้เป็นกำลังใจ กำลังความคิด กำลังแรงกาย และให้ความร่วมมือในเรื่องต่างๆ เป็นอย่างดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2538

สารบัญ

เรื่อง		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่ออภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญตาราง		ง
สารบัญรูป		จ
บทที่ 1	บทนำ	1
บทที่ 2	การตรวจเอกสาร	
	2.1 สารพิษอะฟลาทอกซิน	3
	2.2 ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่พบในอาหารจากท้องตลาดภายในประเทศไทย	5
	2.3 อะฟลาทอกซินในอาหารกับการเกิดพิษอย่างเฉียบพลันและการเกิดมะเร็งตับในคน	6
	2.4 เทมเป้และการวิจัยด้านสารพิษอะฟลาทอกซิน	9
	2.5 การทำลายสารพิษอะฟลาทอกซิน	22
บทที่ 3	วิธีการทดลอง	32
บทที่ 4	ผลการทดลองและวิจารณ์	41
บทที่ 5	บทสรุปและข้อเสนอแนะ	47
ภาคผนวก		48
เอกสารอ้างอิง		51

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	ปริมาณโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ	10
2-2	ชนิดต่างๆ ของเทมเป้อื่นๆ นอกจากเทมเป้ถั่วเหลือง	16
2-3	ปริมาณความชื้น (moisture) และจำนวนเชื้อราที่ขึ้นปะปนอยู่บนอาหารพวกเมล็ดธัญพืชชนิดต่างๆ ที่เก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิและความชื้นในอากาศแตกต่างกันเป็นเวลา 3 สัปดาห์	21
4-1	ผลการเจริญของ Rhizopus oligsporus และ Aspergillus flavus 102566 ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร malt extract agar	41
4-2	ผลของการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดยเชื้อรา Rhizopus oligosporus ในเทมเป้	43
4-3	ผลการวิเคราะห์ ANOVA สำหรับการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดยเชื้อรา Rhizopus oligsporus ในเทมเป้	44

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2-1	แสดงสูตรโครงสร้างของอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ	4
2-2	วิธีการเตรียมเทมเป้	14
2-3	การเตรียมเทมเป้จากของเหลือทิ้ง	15
3-1	เครื่อง HPLC	37
3-2	เครื่อง Sonicator	37
3-3	อาหารปลายข้าวที่ใช้เพิ่มจำนวนของเชื้อรา Rhizopus oligosporus	38
3-4	เครื่อง Evaporator	38
3-5	ชุดกรอง millipore filter	39
3-6	สารเคมีที่ใช้ในการสกัดสารพิษอะฟลาทอกซิน	39
3-7	ถั่วเหลืองนึ่งก่อนการทำเทมเป้	40
3-8	ถั่วเหลืองดิบที่ใช้ในการทำเทมเป้	40

บทที่ 1
บทนำ

เชื้อราพบในโลกเรามีมากมายหลายชนิด บางชนิดมีประโยชน์ แต่บางชนิดก็มีโทษ เช่น ก่อให้เกิดโรคต่างๆ ทั้งในมนุษย์และสัตว์ หรือสารพิษของเชื้อราที่สร้างขึ้นอาจเป็นอันตรายต่อผู้ที่ได้รับสารพิษนี้เข้าไป ซึ่งก่อให้เกิดโรคตามมามากมาย เช่น สารพิษอะฟลาทอกซิน (AFLATOXIN) ซึ่งถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อรา Aspergillus flavus และ A. parasiticus สารพิษชนิดนี้อันตรายมากและจะก่อให้เกิดโรคมะเร็งตับทั้งในมนุษย์และสัตว์ สารพิษอะฟลาทอกซินนี้เป็นสารพิษที่ไม่ละลายน้ำ และทนความร้อนได้มากถึง 260 องศาเซลเซียส การทำลายสารพิษชนิดนี้หรือการลดความเป็นพิษลงจึงทำได้ยากมาก

ในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศในเขตร้อนชื้นจะมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา Aspergillus flavus และ Aspergillus parasiticus และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ในอาหารทั่วไปโดยเฉพาะพวกเมล็ดธัญพืชจะมีการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินมาก เช่น เมล็ดถั่วลิสง ข้าวโพด ถั่วเขียว ข้าว ส่วนในถั่วเหลืองจะไม่พบปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินเลย และถั่วเหลืองสามารถนำไปผลิตอาหารชนิดหนึ่งที่เรียกว่า **เทมเป้ (Tempeh)** ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของประเทศอินโดนีเซีย และมีคุณค่าทางอาหารสูง มีทั้งโปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ ได้มีการศึกษาถึงปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในเทมเป้กันมาก เนื่องจากมีการปนเปื้อนของเชื้อรา Aspergillus flavus ลงไปในถั่วเหลือง ทำให้ผู้บริโภคเกรงกลัวอันตรายที่จะเกิดจากสารพิษอะฟลาทอกซิน จึงมีการศึกษาว่าเชื้อรา Rhizopus oligosporus ที่ใช้ในการผลิตเทมเป้ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา Aspergilus flavus ที่ปนเปื้อนมากับถั่วเหลืองและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้หรือไม่

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา Aspergillus flavus และ Rhizopus oligosporus ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร *malt extract agar*
2. ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อรา Aspergillus flavus และการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดยเชื้อรา Rhizopus oligosporus ในเทมเป้

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

สามารถทราบได้ว่าเชื้อรา Rhizopus oligosporus สามารถยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในระหว่างการผลิตเทมเป้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

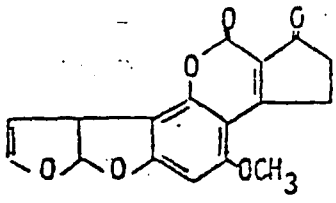
1. เพื่อเป็นแนวทางในการนำเอาเชื้อรา Rhizopus oligosporus มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมการเจริญของเชื้อรา Aspergillus flavus และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน
2. สามารถปรับปรุงเทมเป้ ให้เป็นอาหารที่ปลอดภัยจากสารพิษอะฟลาทอกซินได้

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

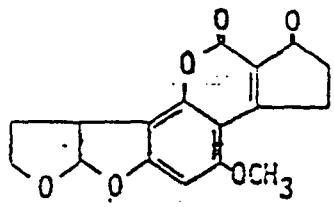
2.1 สารพิษอะฟลาทอกซิน

สารพิษอะฟลาทอกซินเป็นกลุ่มของสารเคมีพวกไดฟราโนคิวมาริน (difranocoumarin) ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกัน อะฟลาทอกซินที่พบอยู่ในอาหารของคนและสัตว์โดยทั่วๆ ไปจะเป็นอะฟลาทอกซิน B_1, B_2, G_1 และ G_2 แต่ก็มีอะฟลาทอกซินอีกหลายชนิดในปริมาณเล็กน้อยได้แก่ อะฟลาทอกซิน M_1, M_2, B_{2a} และ G_{2a} สูตรโครงสร้างและคุณลักษณะทางเคมีและฟิสิกส์ของอะฟลาทอกซินเหล่านี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2-1 จะเห็นได้ว่า ชนิด B_1 แตกต่างจาก B_2 ตรงที่มีพันธะคู่ (double bond)ที่วงแหวนที่หนึ่งส่วน B_1 และ G_1 แตกต่างกันตรงที่ B_1 ไม่มีกลุ่มแล็กโตนในวงแหวนที่ห้า การที่อะฟลาทอกซินมีสูตรโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน ทำให้ความรุนแรงของการเกิดพิษแตกต่างกันไปด้วย กล่าวคือการที่อะฟลาทอกซินมีพันธะคู่ ในวงแหวนที่หนึ่งและไม่มีกลุ่มแล็กโตนที่วงที่ 5 จะทำให้เกิดการเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน และมีผลทำให้เกิดมะเร็งที่ตับเพิ่มขึ้น ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินจะเรียงตามความรุนแรงได้ดังนี้ คือ B_1 , G_1 , B_2 , และ G_2 ตามลำดับ

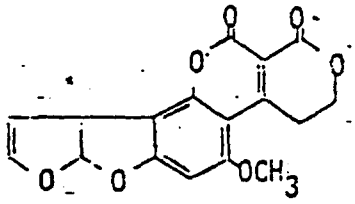
อะฟลาทอกซิน G_2 และ B_2 เป็น dihydroxderivative ของอะฟลาทอกซิน B_1 และ G_1 ส่วน M_1 และ M_2 นั้น เป็น hydroxylated metabolite ของอะฟลาทอกซิน B_1 และ B_2 มักพบในน้ำนมและปัสสาวะของสัตว์ที่ได้รับอะฟลาทอกซิน B_1 และ B_2 เข้าไป อะฟลาทอกซิน B_2 และ G_2 เกิดจากการ hydration ของอะฟลาทอกซิน B_{2a} และ G_{2a}เช่น การทำปฏิกิริยาของอะฟลาทอกซิน B_2 และ G_2 กับ trifluoroacetic acid จะได้อะฟลาทอกซิน B_2 และ G_2 สำหรับอะฟลาทอกซิน P_1 และ Q_1 อาจพบได้ในปัสสาวะของคนหรือสัตว์ ส่วนอะฟลาทอกซิน R_o นั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลง B_1 โดยเซลล์ตับของร่างกาย



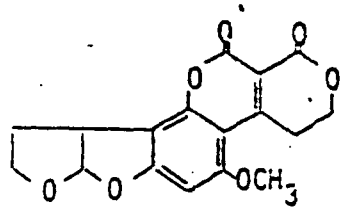
B_1 $C_{17}H_{12}O_6$



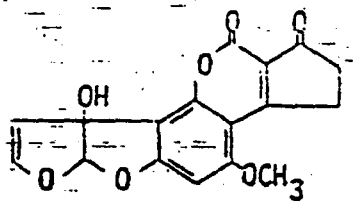
B_2 $C_{17}H_{14}O_6$



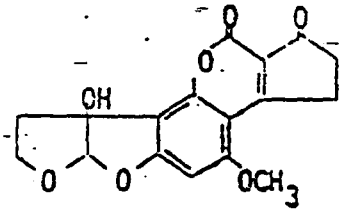
G_1 $C_{17}H_{12}O_7$



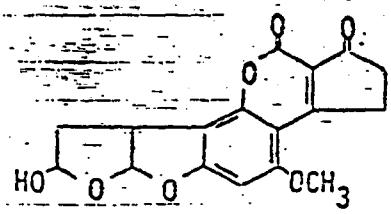
G_2 $C_{17}H_{14}O_7$



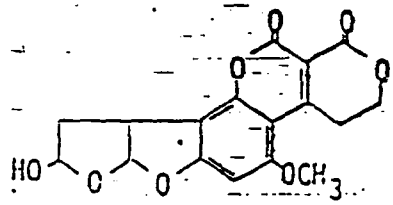
M_1 $C_{17}H_{12}O_7$



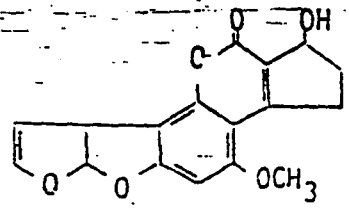
M_2 $C_{17}H_{14}O_7$



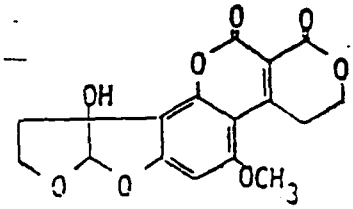
B_{2a} $C_{17}H_{14}O_7$



G_{2a} $C_{17}H_{14}O_8$



R_0 $C_{17}H_{16}O_6$



GM_1 $C_{17}H_{12}O_8$

รูปที่ 2-1 แสดงสูตรโครงสร้างของอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ

2.2 ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่พบในอาหารจากท้องตลาดภายในประเทศไทย

อาหารที่นำมาตรวจหาปริมาณอะฟลาทอกซินนั้นส่วนใหญ่เป็นอาหารที่ซื้อมาจากท้องตลาด อาหารพวกนี้ได้แก่ ข้าวชนิดต่างๆ ถั่วลิสงและถั่วชนิดอื่นๆ ข้าวโพด งา แป้งชนิดต่างๆ ปลาแห้ง กุ้งแห้งและพริกแห้งเป็นต้น จากจำนวนอาหารประมาณ 3,000 ตัวอย่างเหล่านี้พบว่า ถั่วลิสงจะมีเชื้อรา A. flavus ขึ้นอยู่มากที่สุดและมีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ในปริมาณสูงกว่าชนิดอื่นด้วย ถั่วลิสงป่นมีปริมาณอะฟลาทอกซินสูงกว่าถั่วลิสงที่ทำให้สุกแล้วปริมาณเฉลี่ยของอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงและข้าวโพดจะมีค่าประมาณ 0.6 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (Shank et al., 1972 a,b) นอกจากนี้ได้ทำการตรวจหาปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารจากท้องตลาดก็ได้ผลคล้ายคลึงกัน (Glinsukon และ Thamavit, 1976) สิ่งที่น่าสังเกตอีกอันหนึ่ง ก็คือว่าถั่วลิสงถึงแม้จะมีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่มากแต่ทว่ามีเพียงประมาณ 17-20% ของถั่วลิสงตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบว่ามีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ ดังนั้นถั่วลิสงหรือถั่วชนิดอื่นๆ ที่เก็บเกี่ยวมาใหม่ๆ และมีเชื้อราขึ้นอยู่น้อยที่สุดก็ยังสามารถจะนำมาใช้เป็นอาหารที่ให้คุณค่าทางโปรตีนและไขมันได้เป็นอย่างดี

อาหารที่เตรียมเสร็จเรียบร้อยพร้อมที่จะรับประทานก็มีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ได้เช่นเดียวกัน Shank et al. (1972 c) ได้รายงานถึงปริมาณของอะฟลาทอกซินในอาหารเหล่านี้จาก จังหวัดสิงห์บุรี จังหวัดราชบุรี และจังหวัดสงขลา โดยพบว่าที่จังหวัดสิงห์บุรี 4.4% ของอาหาร (1021 ตัวอย่าง) มีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ตั้งแต่ 1-200 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และที่จังหวัดราชบุรี 16% ของอาหาร (1005 ตัวอย่าง) มีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ตั้งแต่ 1-400 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แต่ที่จังหวัดสงขลานั้นพบว่าอาหารที่มีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่มีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นจะเห็นว่าอาหารที่ผ่านการหุงต้มแล้วก็ยังมีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ได้เช่นเดียวกัน

อะฟลาทอกซินถูกทำลายได้ด้วยแสงและความร้อนในรูปต่างๆ กัน ดังนั้นการใช้ความร้อนระหว่างการเตรียมอาหารอาจจะทำให้ปริมาณอะฟลาทอกซินลดลงไปได้บ้างตามสมควร ความพยายามที่จะใช้ความร้อนในรูปของการต้ม อบหรือคั่วและนึ่งโดยใช้ความดันไม่ค่อยจะได้ผลต่อการทำลายอะฟลาทอกซิน B_1 เท่าที่ควร อะฟลาทอกซินที่แยกมาจากอาหารจะคงสภาพเดิมอยู่จนกระทั่งใกล้จุดหลอมตัวที่อุณหภูมิ

250 องศาเซลเซียส (Feuell, 1966) อย่างไรก็ตาม Coomes et al. (1966) ได้ทำการทดลองนึ่งอาหารถั่วลิสง (ความชื้น 60%) ซึ่งมีปริมาณอะฟลาทอกซิน B_1 อยู่ 7,000 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (120 องศาเซลเซียส) ผลการทดลองปรากฏว่าปริมาณอะฟลาทอกซิน B_1 ในอาหารถั่วลิสงดังกล่าวนี้ลดลงเหลือ 2,000 และ 340 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมภายในเวลา 2 และ 4 ชั่วโมงตามลำดับ การใช้ความร้อนโดยการนึ่งแต่ไม่มีความดัน จะทำให้การทำลายอะฟลาทอกซิน B_1 ได้คล้ายคลึงกันกับการใช้ความดันด้วยนั่นคือการนึ่งอาหารสัตว์ที่เป็นเมล็ดฝ้าย (ความชื้น 20%) ซึ่งมีอะฟลาทอกซิน B_1 144 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะทำให้ปริมาณอะฟลาทอกซินลดลงเหลือ 44 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม อย่างไรก็ดีการคั่วถั่วลิสงที่มีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมงจะทำให้ปริมาณอะฟลาทอกซินลดลงเหลือเพียง 20% เท่านั้น (Cuoullu et al., 1966) ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่าอะฟลาทอกซินที่ปะปนอยู่ในอาหารอาจถูกทำลายไปได้บ้างตามสมควรแล้วแต่ระยะเวลาและอุณหภูมิของความร้อนที่ใช้

2.3 อะฟลาทอกซินในอาหารกับการเกิดพิษอย่างเฉียบพลันและการเกิดมะเร็งตับในคน

อะฟลาทอกซินที่พบในอาหารจากท้องตลาดและในอาหารสำเร็จรูปสำหรับคนและสัตว์ จะมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันออกไปตามชนิดของเชื้อราที่ขึ้นอยู่บนอาหารชนิดนั้นๆ ระยะเวลาที่เชื้อราขึ้นอยู่ และชนิดของอาหารเองด้วย ดังนั้นคนและสัตว์อาจจะได้รับอะฟลาทอกซินเข้าสู่ร่างกายโดยผ่านทางอาหารในปริมาณมากน้อยแตกต่างกันด้วย แต่ระยะเวลาที่ได้รับอาจจะเป็นเวลานาน หรือตลอดชีวิตซึ่งจะเป็นผลทำให้เกิดตับแข็ง (cirrrhosis) หรือเกิดมะเร็ง (carcinogenicity) ในตับขึ้นได้ ในทางตรงกันข้ามคนและสัตว์ก็อาจจะได้รับอะฟลาทอกซินจากอาหารในปริมาณสูงแต่ช่วงระยะเวลาสั้นซึ่งอาจจะทำให้เกิดอาการเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน (acute toxicity) ขึ้นได้เช่นกัน อย่างไรก็ดีทั้งการเกิดพิษอย่างเฉียบพลันและการเกิดมะเร็งจากอะฟลาทอกซินในคนนั้นไม่สามารถทำการทดลองโดยตรงอย่างที่ทำการทดลองในสัตว์ได้ กล่าวคือไม่สามารถจะให้คนรับประทานอาหารที่มีอะฟลาทอกซินซึ่งทราบปริมาณแน่นอนเข้าไปแล้วติดตามการเกิดพิษภายหลัง แต่การศึกษาการเกิดพิษอย่างเฉียบพลัน

นั้นอาจจะทำได้โดยนำเอาวิธีทางระบาดวิทยา (epidemiologic methods) เข้ามาใช้ วิธีการทางระบาดวิทยานี้อาจจะทำการศึกษาได้ โดยการหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอะฟลาทอกซินที่มีอยู่ในอาหาร หรือปริมาณอะฟลาทอกซินในเลือด ปัสสาวะ หรืออวัยวะต่างๆ ที่อาจจะมีเชื้อราขึ้นอยู่ด้วยกับอาการของโรคที่จะเกิดขึ้นภายหลังจากได้รับประทานอาหารนั้นเข้าไป โดยทั่วๆ ไปแล้วการเกิดพิษอย่างเฉียบพลันนั้นอาจจะเกิดขึ้นโดยบังเอิญดังเช่น ในระยะเวลาที่อาหารขาดแคลน (ทำให้จำเป็นจะต้องใช้อาหารที่มีเชื้อราขึ้นอยู่) หรือให้อาหารที่มีอะฟลาทอกซินแก่เด็กซึ่งมีความต้านทานต่อสารพิษต่ำกว่าผู้ใหญ่ เป็นต้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเกิดพิษอย่างเฉียบพลันในคนนั้นจะพบได้ไม่มากนัก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าปริมาณอะฟลาทอกซินที่ปะปนอยู่ในอาหารนั้นมีปริมาณไม่มากพอที่จะทำให้เกิดอาการ เป็นพิษอย่างเฉียบพลันในคนซึ่งมีน้ำหนักตัวมากได้

อะฟลาทอกซินสามารถทำให้เกิดมะเร็งในตับของสัตว์ทดลองชนิดต่างๆ ได้เกือบทุกชนิด รวมทั้งลิง ซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammal) ที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับคน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสังเกตว่าคนที่ได้รับอะฟลาทอกซินที่ปะปนอยู่ในอาหารปริมาณต่างๆ กันและเป็นเวลานาน (อาจจะเป็นตลอดช่วงเวลาของชีวิต) นั้นอาจจะเป็นมะเร็งในตับก็เป็นได้

โดยทั่วๆ ไปแล้วมะเร็งในตับนับได้ว่าเป็นโรคที่ไม่ค่อยพบมากนักในประชากรจากส่วนต่างๆ ของโลกซึ่งจะมีอัตราการเกิดเพียง 2 รายต่อประชากร 100,000 คนในระยะเวลาหนึ่งปี (สำหรับผู้ชายและผู้หญิงทุกอายุ) (Doll et al., 1966; Segi และ Kurihara, 1972) ประชากรในส่วนต่างๆ ของโลกเหล่านี้ได้แก่ ประชากรในทวีปแอฟริกา ประเทศอินเดีย ประเทศญี่ปุ่น และประเทศในกลุ่มเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จะมีอัตราการเกิดมะเร็งในตับสูงกว่าประชากรในส่วนอื่นๆ ของโลก แต่ก็เป็นที่น่าสังเกตว่าในประเทศดังกล่าวนี้จะอยู่ในพื้นที่ที่มีการเกษตรกรรมเป็นส่วนใหญ่และเป็นประเทศที่มีดินฟ้าอากาศค่อนข้างจะเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อราที่ขึ้นปะปนอยู่บนผลิตผลทางการเกษตรเหล่านั้น ฉะนั้นจากการขึ้นของเชื้อราดังกล่าวอาจจะทำให้เกิดมีการสร้างอะฟลาทอกซินหรือสารพิษจากเชื้อราชนิดอื่นๆ ปะปนอยู่ในอาหารดังกล่าวได้ด้วยเป็นอย่างดี (Tuyns และ Obradovuc, 1975) ดังนั้นจึงอาจจะเป็นได้ที่ว่าสารพิษจากเชื้อรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งอะฟลาทอกซินอาจจะเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งใน

ประชากรในกลุ่มประเทศในทวีปแอฟริกาและประเทศอื่นดังกล่าวแล้วข้างต้น จากการศึกษาพบว่ามะเร็งเซลล์ตับที่พบในประชากรจากส่วนต่างๆ ของโลกนั้นจะพบในผู้ชายมากกว่าผู้หญิงด้วยอัตราส่วนที่แตกต่างกันไปในประเทศต่างๆ ด้วยเหมือนกัน เช่น ในประเทศยูกานดาและประเทศเคนยาจะมีอัตราส่วน 3:1 ในประเทศสิงคโปร์ 3.5:1 ในประเทศสวาซิแลนด์ เป็นต้น นอกจากความแตกต่างในเรื่องเพศแล้ว อัตราการเกิดมะเร็งในตับของคนที่มีอายุต่างกันในประเทศต่างๆของโลกก็แตกต่างกันไปด้วย โดยจะมีอัตราสูงสุดที่อายุระหว่าง 35-45 ปีในประชากรของประเทศยูกานดาและประเทศโมแซมบิค ที่อายุระหว่าง 40-59 ปีในประชากรของประเทศไทย และที่อายุระหว่าง 50-59 ปีในประชากรของประเทศสิงคโปร์ เป็นต้น ดังนั้นจึงพอจะสรุปได้ว่าคนที่มีอายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไปจะมีอัตราการเกิดมะเร็งในตับสูงกว่าคนที่มีอายุน้อย

2.4 <u>เทมเป้และการวิจัยด้านสารพิษอะฟลาทอกซิน</u>

เทมเป้(Tempe หรือ Tempeh) เป็นอาหารพื้นบ้านที่นิยมมากของอินโดนีเซีย ได้จากการหมักถั่วเหลืองด้วยเชื้อรา <u>Rhizopus</u> จนกระทั่งถั่วเหลืองจับตัวเป็นก้อนและถูกปกคลุมด้วยเส้นใยสีขาวอย่างแน่นหนา

ถึงแม้ว่าถั่วเหลืองจะมีโปรตีนและสารอาหารชนิดอื่นสูงก็ตาม แต่ก็มีเพียงบางส่วนของโปรตีนและสารอาหารชนิดอื่นเท่านั้นที่ร่างกายสามารถใช้ได้ถ้าบริโภคถั่วเหลืองที่ผ่านการอบต้มหรือย่าง แต่ในระหว่างช่วงการหมักเทมเป้ด้วยเชื้อรา <u>Rhizopus oligosporus</u> ในระยะสั้น ๆ จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นในถั่วเหลืองนั้น ทั้งในแง่ของกลิ่นและรสชาติ (aomas and flavors) ลักษณะเนื้อ (texture) ที่ดีขึ้นและในขณะเดียวกันยังทำให้คุณค่าทางโภชนาการ (nutritional value) และความสามารถในการถูกย่อย (digestibility)สูงขึ้นด้วย

คุณสมบัติของเทมเป้มีดังนี้

1. มีโปรตีนซึ่งมีคุณภาพสูง

คุณค่าโปรตีนในอาหารขึ้นกับปัจจัยหลักสองประการคือ ปริมาณของโปรตีนในอาหารและคุณภาพของโปรตีนที่มีอยู่นั้นในแง่ของโปรตีน มักกล่าวในรูปของเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 2-1 จะเห็นได้ว่าเทมเป้และอาหารชนิดอื่นที่ผลิตมาจากถั่วเหลืองมีเปอร์เซนต์โปรตีนสูงและสูงกว่าเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์นมอีกด้วย

ส่วนในแง่ของคุณภาพของโปรตีนขึ้นกับความสามารถในการถูกย่อยของโปรตีนนั้น และปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็น 8 หรือ 10 ชนิดที่ร่างกายต้องการ คุณภาพของโปรตีนนี้ สามารถวัดได้โดยอาศัย Protein Efficiency Ratio , Biological value, Net Protein Utilization , Chemical score และ Amino acid (หรืออาจเรียกว่า Protein score) ทั้งนี้ในสามวิธีแรกจำเป็นต้องทดลองโดยใช้สัตว์ทดลอง เช่น หนู ส่วนสองวิธีหลังสามารถคำนวณได้จากกรดอะมิโนของอาหาร

ตารางที่ 2-1 ปริมาณโปรตีนในอาหารชนิดต่าง ๆ (ธีระยุทธ์และชัยวัฒน์, 2524)

อาหาร	โปรตีน (% โดยน้ำหนัก)
แป้งถั่วเหลืองสกัดไขมัน	51
เทมเป้ (ใช้ sun-dried soy)	43
แป้งถั่วเหลืองไม่ได้สกัดไขมัน	40
ถั่วเหลือง	35
เนย	30
ปลา	22
ไก่	21
เนื้อ	20
เทมเป้ (ใช้ fresh soy)	20
แฮมเบอเกอร์	18
ไข่	13
ข้าวสาลี	12
เต้าหู้	8
นม (whole daily)	3

จากการทดลองที่เทมเป้และถั่วเหลืองมีกรดอะมิโนที่จำเป็นทั้ง 8 หรือ10 ตัว (ถ้ารวมcystine และ tyrosine) ซึ่งร่างกายของคนเราไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ ดังนั้นจึงเรียกทั้งเทมเป้และถั่วเหลืองได้ว่าเป็น Complete Protein

นอกจากนี้แล้ว ในโปรตีนของถั่วเหลืองยังมีกรดอะมิโนไลซีนในปริมาณสูง ในขณะที่เมล็ดธัญพืชมีไลซีนในปริมาณต่ำหรือไม่มีเลย ดังนั้นเราจึงสามารถใช้ถั่วเหลืองผสมกับเมล็ดธัญพืชเพื่อทำเทมเป้ จะทำให้คุณท่าทางโภชนาการโดยเฉพาะปริมาณไลซีนสูงขึ้นด้วย

2. เป็นแหล่งของวิตามินบี 12

เทมเป้เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับพวกที่รับประทานอาหารแบบมังสวิรัติ เพราะมีคุณค่าทางโภชนาการรวมทั้งวิตามินบี 12 วิตามินบี 12 (Cyanocobalamin) เป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการสร้างเม็ดเลือดแดงและป้องกันโรคโลหิตจาง ซึ่งในเทมเป้ วิตามินบี 12 ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาจากแบคทีเรียพวก Klebsiella ซึ่งปนเปื้อนมากระบวนการผลิตเทมเป้ที่ใช้น้ำจากแม่น้ำลำคลอง

3. มีปริมาณไขมันที่อิ่มตัวต่ำ

เทมเป้มีไขมันที่อิ่มตัวในปริมาณต่ำแต่ในขณะเดียวกันก็มีเลซิทิน รวมกับ essentialpoly unsaturated เช่น linoleic และ linolenic acid ปริมาณมาก ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวผสมที่เรียกว่า emulsifier และกำจัดการสะสมคลอเรสเตอรอล และกรดไขมันชนิดอื่นตามอวัยวะ และกระแสโลหิต

4. เป็นตัวลดคลอเรสเตอรอล

อย่างที่ทราบกันดีว่า คลอเรสเตอรอล เป็นสาเหตุของโรคหัวใจ ซึ่งในปีหนึ่ง ๆ จะมีคนตายด้วยโรคนี้ปริมาณมากทีเดียว แต่ในอาหารพวกเทมเป้ และอาหารที่ทำมาจากถั่วเหลืองชนิดอื่น เช่น เต้าหู้, miso และ ซีอิ๊ว เป็นอาหารที่ไม่มีคลอเรสเตอรอล ดังนั้นจึงเหมาะสมอย่างยิ่งในการบริโภค

5. ถูกย่อยได้สูง

อาหารหลายชนิดที่ทำจากถั่วมักจะถูกย่อยได้ยาก ซึ่งจะก่อให้เกิดก๊าซขึ้นภายในทางเดินอาหาร ซึ่งทำให้เกิดผลเสียแก่สุขภาพ แต่เทมเป้เป็นอาหารที่ถูกย่อยได้ง่าย โดยมากความสามารถในการถูกย่อย มักจะกล่าวในรูปของ digestibility coefficient ซึ่งเทมเป้มีค่านี้เท่ากับ 86.1% ทั้งนี้เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในระหว่างช่วงของการหมัก รวมทั้งการใช้ความร้อนในช่วงการเตรียมวัตถุดิบ

6. เป็นแหล่งของวิตามินและเกลือแร่

นอกจากวิตามินบี 12 ในเทมเป้ ยังมีวิตามิน เอ บี 1 บี 6 ไนอะซิน และไบโอติน เป็นต้น ส่วนเกลือแร่ในเทมเป้ มีแคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก แมงกานีส เป็นต้น

นอกจากนี้แล้วในเชื้อรา Rhizopus ที่ใช้ในการทำเทมเป้ยังผลิตเอนไซม์ phytase ออกมาย่อยซึ่ง phytaseเป็น Chelating agent ในถั่วเหลืองทำให้เกลือแร่ต่าง ๆ สามารถนำออกมาใช้ประโยชน์ได้

7. สารปฏิชีวนะในเทมเป้

เชื้อราที่ใช้ในการทำเทมเป้สามารถผลิตสารซึ่งทำหน้าที่คล้ายสารปฏิชีวนะ เช่น เพนนิซิลิน มีผลในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคโดยเฉพาะพวกแบคทีเรียแกรมบวก

. 8. ปราศจากสารพิษ

เมื่อเปรียบเทียบ เนื้อ ปลา และสัตว์ปีก พบว่ามียาฆ่าแมลงติดอยู่กับเนื้อเยื่อสูงกว่าในเมล็ดพืชถึง 20 เท่า ส่วนในอาหารนมก็พบมากกว่า 4.5 เท่าเช่นกัน อย่างไรก็ตามสารพิษที่ติดอยู่ในเนื้อเยื่อสัตว์ นอกจากยาฆ่าแมลงแล้ว ยังอาจมียาฆ่าวัชพืช และโลหะหนัก แต่ในเทมเป้ที่บริโภคพบว่าปราศจากสารพิษที่เป็นอันตราย

9. ค่าใช้จ่ายในการผลิตต่ำ

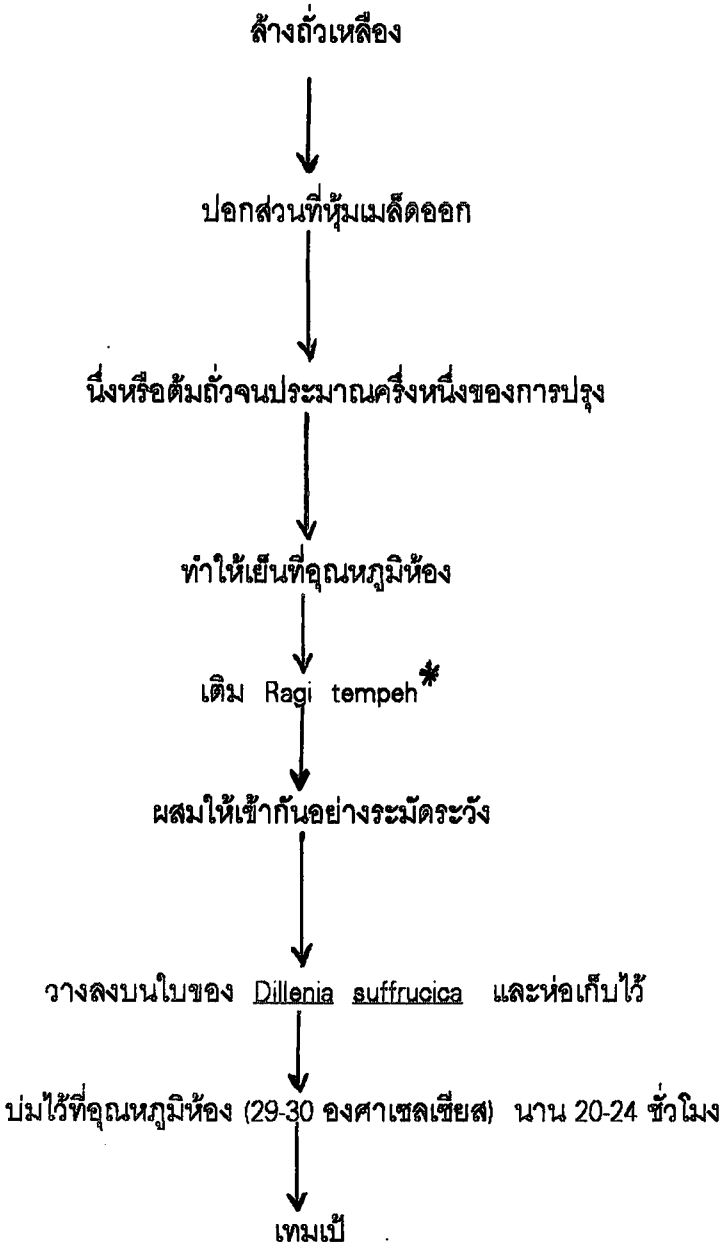
ค่าใช้จ่ายในการผลิตเทมเป้ถูกมาก เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารประเภทเนื้อสัตว์ดังนั้นจึงมีการใช้เทมเป้เป็นอาหารโปรตีนแทนเนื้อสัตว์

จากข้อดีต่าง ๆ ของเทมเป้ที่กล่าวมานี้ ในปัจจุบันอินโดนีเซียได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการนำเทมเป้ใช้ในแผนการพัฒนาโภชนาการในเด็กทารกอายุต่ำกว่า 5 ขวบมีการตายเป็นจำนวนมาก ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้ทดลองให้อาหารผสมเทมเป้แก่เด็กทารกอย่างต่อเนื่อง ปรากฏว่าให้ผลการทดลองที่ดี แต่ก็ต้องทำการทดลองต่อไปอีก สำหรับสูตรอาหารที่ใช้ประกอบด้วย เทมเป้ แป้งข้าวสาลี

น้ำตาล น้ำมันมะพร้าว หรือ น้ำมันข้าวโพด เกลือ ผงฟู ที่ใช้ทำขนมปัง และตัวผสม (emulsifier)

<u>การเตรียมเทมเป้จากถั่วเหลือง</u>

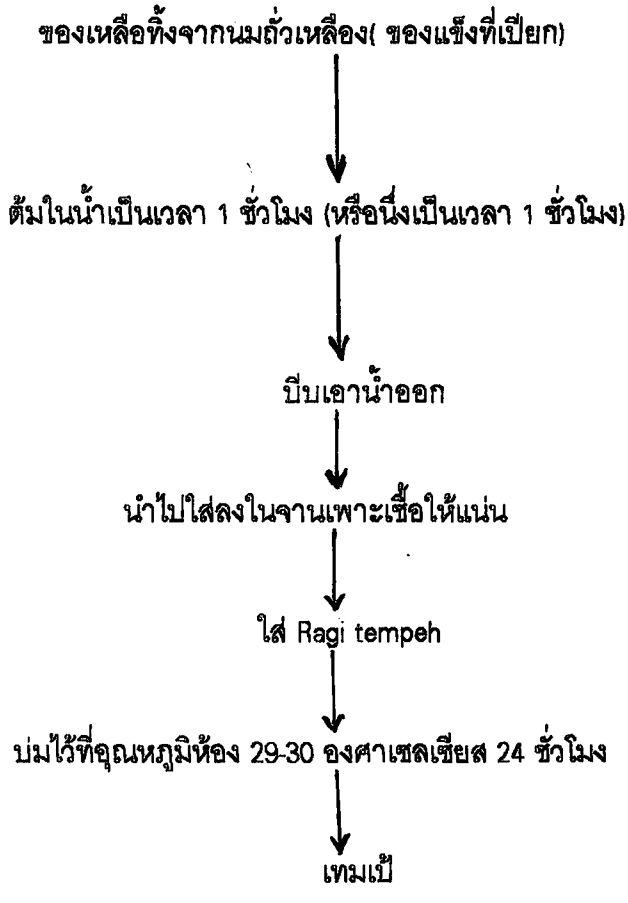
ในการเตรียมเทมเป้ โดยนำถั่วเหลืองล้างให้สะอาดและนำไปต้มประมาณ 30 นาที แล้วแช่ถั่วเหลืองนั้นในน้ำค้างคืน รุ่งขึ้นปอกเปลือกถั่วเหลืองโดยอาจใช้มีดหรือใช้เครื่องก็ได้ ล้างให้สะอาด จากนั้นนำไปนึ่งเป็นเวลา 30-40 นาที (ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของถั่วเหลือง) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติมเชื้อซึ่งอาจใช้เชื้อบริสุทธิ์ <u>Rhizopus</u> หรือเชื้อผงที่เรียกว่า Laru เป็นหัวเชื้อซึ่งเตรียมขึ้น คลุกเคล้าเชื้อให้ทั่วแล้วจึงบรรจุใส่ถุงพลาสติกที่เจาะรูหรือใบตองก็ได้บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30-40 ชั่วโมง ก็จะได้เทมเป้ออกมาประกอบอาหารรับประทานได้ เทมเป้ไม่ใช่จะทำมาจากถั่วเหลืองเท่านั้นแต่ยังสามารถใช้เมล็ดพันธุ์พืชชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น ถั่วเขียว ถั่วเหลืองสายพันธุ์สีดำ เป็นต้น นอกจากนี้แล้วของเหลือจากโรงงานผลิตภัณฑ์อาหารเช่นกากถั่วเหลืองจากโรงงานเต้าหู้ กากถั่วเขียวจากโรงงานผลิตวุ้นเส้น เป็นต้น ก็สามารถทำเป็นเทมเป้ได้เช่นกัน และเมื่อผลิตภัณฑ์ถูกปกคลุมอย่างแน่นด้วยสีขาวของเชื้อราซึ่งสภาวะนี้จะนานประมาณ 20-24 ชั่วโมงของการหมัก ถ้าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักถูกเก็บไว้นานขึ้นจะเริ่มมีการสร้างสปอร์ของเชื้อรามากขึ้น และเทมเป้ก็จะเริ่มมีกลิ่นของแอมโมเนีย เทมเป้ที่ผ่านการหมักมาแบบสด ๆ จะถูกใช้โดยฝานเป็นชิ้นบาง ๆ และนำไปทอดหรือทอดกับส่วนผสมอื่น ๆ เช่น เนื้อ ผัก หรือผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองอื่น ๆ เช่น เต้าหู้ หรือใส่ในซุป และอาจทานกับข้าวได้ วิธีการเตรียมเทมเป้ท้องถิ่นได้แสดงในรูปที่ 2-2



รูปที่ 2-2 วิธีการเตรียมเทมเป้ท้องถิ่น

* -Ragi tempeh สามารถซื้อหรือหาได้จากการผลิตเทมเป้ครั้งก่อน

จากการศึกษาเมื่อไม่นานนี้ที่แสดงถึงการเตรียมเทมเป้ พบว่าการต้มถั่วเหลืองจะดีกว่าการใช้ไอน้ำหรือวิธีการฆ่าเชื้อในด้านรสชาติที่ดีของผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมัก นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการนำของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตนมถั่วเหลืองมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเทมเป้ และพบว่าเทมเป้ให้โดยที่ถั่วเหลืองให้รสชาดที่ดีซึ่งของเหลือทิ้งไม่นำไปฆ่าเชื้อก่อนที่จะไปลงเชื้อ ลำดับการเตรียมดังในรูปที่ 2-3



รูปที่ 2-3 การเตรียมเทมเป้จากของเหลือทิ้ง

การศึกษานี้ได้แสดงว่าโปรตีนของเทมเป้ได้เพิ่มขึ้นโดยมาจากของเหลือทิ้งจากนมถั่วเหลือง ดังนั้นของเหลือทิ้งจากนมถั่วเหลืองแทนที่จะทิ้งไปหรือใช้เป็นอาหารสัตว์เราสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับผลิตอาหารของมนุษย์ที่อุดมไปด้วยโปรตีนได้

เทมเป้ถั่วเหลืองควรเรียกให้ถูกต้องว่า tempeh kedelai เทมเป้ชนิดอื่นๆ จะใช้ชนิดของพืชผักที่แตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 2-2 อาหารประเภทพืชผักอาจจะใช้ในการหมักเพื่อผลิตเทมเป้ได้

ตารางที่ 2-2 ชนิดต่าง ๆ ของเทมเป้อื่น ๆ นอกจากเทมเป้ถั่วเหลือง
(แหล่งที่มา Steinkraaus, 1983)

ผลิตภัณฑ์	พืชที่ใช้
Tempeh lamtoro	Leucaena lercocephala
Tempeh bengkuk	Mucuna proriens
Lupin tempeh	Lupinus angustifolius
Yellow pea tempeh	Pisum sativom
Broad bean tempeh	Visia faba
Tempeh lecipir	Psophocarpus tetragonolobus

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เทมเป้ชนิดต่าง ๆ และผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเหมือนเทมเป้จะหาได้ง่ายในอินโดนีเซีย เช่น เทมเป้จากมะพร้าวบดเรียกว่า tempeh bonkrek ได้ถูกเตรียมขึ้นโดยนำมะพร้าวบดมาผสมกับส่วนที่เหลือของของเหลือทิ้งจากถั่วลิสงหรือส่วนที่เหลือที่ข้นๆ ของถั่วเหลือง สำหรับเทมเป้ที่มีคุณภาพต่ำทำจากการหมักเปลือกถั่วเหลืองหรือการหมักของเหลือทิ้งจากกระบวนการบดเพื่อผลิตแป้งมันสำปะหลังหรือของเหลือทิ้งของถั่วลิสงเพื่อให้ได้เป็น Tempeh bungkil(Gandjar,1986) การใช้วัตถุดิบอื่น ๆ นอกจากถั่วเหลืองจะแตกต่างกันไปในแต่ละสถานที่ และขึ้นอยู่กับประโยชน์ที่จะได้และราคาของวัตถุดิบ มีน้อยคนนักที่จะรู้จักผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักพืชผักที่เป็นอาหารพื้นเมืองของประเทศอื่น ๆ เช่น อินเดีย เนปาล ไนจีเรีย ปากีสถาน และ Sikkim ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้รวมถึง Indian idli และ waries, The Nepalese knima และ The Nigerian ugba

การเตรียมเทมเป้เละการใส่เชื้อยังหลงเหลืออยู่เพียงเล็กน้อยตามหมู่บ้านเป็นอุตสาหกรรมขนาดเล็กในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ถึงแม้ว่าจากเวลาหนึ่งสู่เวลาหนึ่งแผนงานทำให้มันเข้าสู่อุตสาหกรรมที่มีขนาดใหญ่ขึ้นโดยใช้โรงงานในการผลิตให้ทันสมัยมากขึ้น ทำให้มีการถกเถียงและโต้แย้งกัน แต่ก็ไม่ประสบผล ที่อื่น ๆ ในโลก ยกตัวอย่างเช่นใน U.S.A. เทมเป้กลับมาเป็นที่นิยมในอาหารตะวันตกและมีความเป็นไปได้สูงในการผลิตอุตสาหกรรมขนาดใหญ่

<u>เชื้อราที่ใช้ทำเทมเป้</u>

เชื้อราใช้ในการเตรียมเทมเป้ถั่วเหลือง คือ <u>Rhizopus</u> ชนิดต่าง ๆ ที่สามารถใช้ได้ ในการทำครั้งแรก ๆ เชื้อที่ใช้คือ <u>R. oligosporus</u> ในการเตรียมเทมเป้ (Stahel,1946) ต่อมาเชื้อตัวอื่น ๆ อันดับแรกที่ใช้ คือ <u>R. oligosporus</u> นอกจากนี้ก็มีสปีชีส์อื่น ๆ ของ <u>Rhizopus</u> ที่สามารถใช้ผลิตเทมเป้คือ <u>R. arrhizus</u>, <u>R. oryzae</u>, และ <u>R. stolonifer</u>

การศึกษาบางอย่างเมื่อไม่นานมานี้ใน <u>Rhizopus</u> 4 หรือ 5 สปีชีส์ (<u>arrhizus</u>, <u>R microsporus</u> , <u>R oligosporus</u> และ <u>R oryzae</u>) ถูกใช้ในการเตรียมเทมเป้และพบว่ามี 2 ตัวเท่านั้นคือ <u>R oligosporus</u> และ <u>R oryzus</u> จะให้

เทมเป้ที่ดี ส่วนอีก 3 ตัวนั้นจะมีให้เทมเป้ที่มีคุณภาพไม่ดีเมื่อเทียบกับตัวแรก คำยืนยันนี้ทำให้ได้รู้ว่าเชื้อราที่ดีที่สุดสำหรับการเตรียมเทมเป้ คือ R. oligosporus (Steinkraus, 1983) กฎของเชื้อราในการผลิตเทมเป้คือ มันจะเจริญอย่างรวดเร็วเพื่อผลิตเส้นใยสีขาว

การวิจัยด้านสารพิษอะฟลาทอกซินในเทมเป้

ข้อดีของการกินเทมเป้ คือ เป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองที่มีความไ วต่ำต่อสารพิษอะฟลาทอกซิน Djien กล่าวว่า Rhizopus oligosporus จะป้องกันการผลิตอะฟลาทอกซินในการหมักถั่วลิสงที่อัดแน่น(oncom) โดยในการทดลองเพื่อตรวจหาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในเทมเป้ของอินโดนีเซีย (ถั่วเหลืองหมัก) จากตัวอย่าง 9 ตัวอย่าง โดยมีความมุ่งหมายเพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับยืนยัน ปริมาณอะฟลาทอกซินซึ่งจะเก็บตัวอย่างเทมเป้ดิบและเทมเป้ทอดจาก 3 เมืองในอินโดนีเซียและใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC จากผลการทดลองปรากฏว่าไม่มีอะฟลาทอกซินเกิดในเทมเป้สดและเทมเป้ทอด 9 ตัวอย่าง ผลการทดลองนี้จึงเป็นแนวทางว่าเป็นการยากที่อะฟลาทอกซินจะมีอยู่ในเทมเป้ จึงควรสนับสนุนให้ประชาชนใช้เทมเป้เป็นแหล่งของโปรตีน

2.5 การทำลายสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหาร

อาหารชนิดต่างๆ ของคนและสัตว์เศรษฐกิจจะมีเชื้อราพวก A. flavus และอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ อาหารโดยส่วนใหญ่จะเป็นเมล็ดพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งถั่วลิสงและเมล็ดฝ้าย เป็นต้น ถั่วลิสงกับอาหารที่ผลิตจากถั่วลิสงและเมล็ดฝ้ายนั้นจะมีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกันออvus spores produced afltoxin อกซินปะปนอยู่ในปริมาณที่สูงนั้นพบเพียงสองหรือสามแห่งของพื้นที่ในโลกเท่านั้น เช่น ถั่วลิสงกับอาหารที่ผลิตจากถั่วลิสงในประเทศจากทวีปแอฟริกา (Sellschop et al., 1965) เนยถั่วลิสง (peanut butter) ในประเทศฟิลิปปินส์ (Anomymous, 1965) น้ำมันถั่วลิสงในประเทศสิงคโปร์ (Chong และ Beng, 1965; Chong, 1966) นอกจากนี้ Loosmore et al. (1964) ยังได้รายงานถึงปริมาณอะฟลาทอกซินที่พบในเมล็ดฝ้ายซึ่งมีอยู่ปะปนประมาณ 500 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สำหรับในประเทศสหรัฐอเมริกานั้น Whitten (1966)ได้รายงานถึงปริมาณอะฟลาทอกซิน

ที่พบในเมล็ดฝ้ายและในอาหารเมล็ดฝ้ายจำนวน 1,293 ตัวอย่าง จากรายงานดังกล่าวพบว่าอาหารประมาณ 21% จะมีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่และในอาหารจำนวนนี้ประมาณ 7% จะมีอะฟลาทอกซินอยู่มากกว่า 30 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงวิธีการลดปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่ปะปนอยู่ในอาหารของคนและสัตว์เศรษฐกิจก็อาจจะทำได้ด้วย 2 วิธีดังนี้คือ

ก. วิธีป้องกันการขึ้นปะปนของเชื้อราโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราที่สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ ซึ่งได้แก่ เชื้อราพวก A. flavus เพื่อจะทำให้มีปริมาณการสร้างอะฟลาทอกซินในอาหารลดน้อยลง

ข. วิธีการทำลาย วิธีนี้จะเป็นการกำจัดอะฟลาทอกซินที่ปะปนอยู่แล้วในอาหารให้ลดน้อยลงหรือหมดไปเลยทีเดียว

1. วิธีป้องกันการขึ้นปะปนของเชื้อราและอะฟลาทอกซินในอาหารของคนและสัตว์เศรษฐกิจ

วิธีป้องกันการขึ้นปะปนของเชื้อราและอะฟลาทอกซินในอาหารอาจจะทำได้หลายระยะในระหว่างการเพาะปลูกจนถึงนำผลิตผลไปจำหน่าย เช่น การเลือกหาพันธุ์เพื่อทำการเพาะปลูก การเก็บเกี่ยวกับการทำให้แห้ง และการเก็บรักษาไว้ในยุ้งฉาง เป็นต้น

1.1 การเลือกหาพันธุ์พืชเพื่อทำการเพาะปลูก

การเลือกหาพันธุ์พืชที่เหมาะสมเพื่อทำการเพาะปลูกนั้นจะมีความจำเป็นต่อผลิตผลที่จะได้รับมากมายทีเดียว ทั้งนี้ต้องพิจารณาถึงคุณสมบัติต่างๆ หลายประการด้วยกันดังนี้คือ

ก. จะต้องเป็นพันธุ์ที่ให้เมล็ดพืชที่มีคุณค่าทางอาหารสูง

ข. จะต้องเป็นพันธุ์ที่มีความต้านต่อโรคพืชชนิดต่างๆ ได้ดี

ค. จะต้องเป็นพันธุ์ที่ให้เมล็ดพืชซึ่งสามารถป้องกันการขึ้นปะปนของเชื้อราได้มากที่สุด หรืออาจจะขึ้นปะปนอยู่ได้แต่ไม่สามารถสร้างสารพิษโดยเฉพาะอย่างยิ่งอะฟลาทอกซินได้

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าพันธุ์พืชที่มีคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นนั้นจะหาได้ยากมาก แต่ก็อาจจะเป็นวิธีการอันหนึ่งที่จะทำให้มีปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารน้อยลง การแสวงหาพันธุ์พืชดังกล่าวอาจจะทำให้ 2 วิธีด้วยกันคือ

ก. หาพันธุ์เก่าที่มีอยู่แล้วในปัจจุบันที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกันกับที่กล่าวมา

ข. ทำการผสมพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติตามต้องการ

1.2 การลดปริมาณความชื้นในอาหารพวกเมล็ดพืช (moisture) และในอากาศ (humidity) เพื่อป้องกันการขึ้นปะปนของเชื้อรา

ความชื้นในเมล็ดพืชนั้นจะมีความสัมพันธ์กันกับความชื้นในอากาศ กล่าวคือเมื่อความชื้นในอากาศเพิ่มมากขึ้นก็อาจจะทำให้ความชื้นในเมล็ดพืชสูงขึ้นไปด้วย การเพิ่มความชื้นในเมล็ดพืชจะทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อราชนิดต่างๆเป็นไปได้ดีซึ่งจะเป็นผลทำให้มีการเพิ่มปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารเหล่านี้ด้วย ฉะนั้นการลดปริมาณความชื้นในอากาศและความชื้นในเมล็ดพืช จะทำให้ให้ปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารลดน้อยลงไปด้วย ผลการทดลองถึงความสัมพันธ์ดังกล่าวพบว่าการลดปริมาณความชื้นในเมล็ดพืชลงให้เหลือน้อยกว่า 10% แล้วเก็บไว้ในบรรยากาศที่มีความชื้นในอากาศน้อยกว่า 50% จะป้องกันการขึ้นปะปนของเชื้อราบนเมล็ดพืชได้มากพอสมควรดังแสดงในตารางที่ 2- 3 (Majumder et al., 1965)

ตารางที่ 2-3 ปริมาณความชื้น (moisture) และจำนวนเชื้อราที่ขึ้นปะปนอยู่บนอาหารพวกเมล็ดพืชชนิดต่างๆ ที่เก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิและความชื้นในอาหารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 3 สัปดาห์

เมล็ดพืช	อุณหภูมิองศาเซลเซียส	ความชื้น (moisture)				
		30%	50%	70%	80%	90%
ข้าว	28-31	9	10.6	12.5	16	23
	10-11	9.9	11	12.4	13.2	22.5
ข้าวฟ่าง	28-31	8.9	11	13.6	17.5	21.6
	10-11	8.3	10.7	13.5	14.2	22.1
ข้าวสาลี	28-31	8.6	10.5	13.2	18	20.4
	10-11	8.4	11	13.2	14.1	23
ถั่วลิสง	28-31	3	4.8	6.6	10.3	18
	10-11	3.7	4.2	5.9	8.4	16.8
มะม่วงหิมพานต์	28-31	3.1	4.5	6.1	8.9	15
	10-11	4	4.1	5.2	7.4	14.5
กาแฟ	28-31	5.5	7.6	9	14.5	20
	10-11	6	7.2	8.8	14	18.2

1.3 การอบเมล็ดพืชในไอระเหย (fumigation) ของน้ำยาเคมี

การอบเมล็ดพืชในไอระเหยของน้ำยาเคมีชนิดต่างๆ เพื่อฆ่าเชื้อราที่ขึ้นปะปนอยู่บนเมล็ดพืชก็เป็นวิธีการป้องกันการสร้างอะฟลาทอกซินอีกวิธีหนึ่ง นอกจากจะทำให้จำนวนเชื้อราที่ขึ้นอยู่ลดน้อยลงหรือหมดไปแล้ว ยังจะทำการฆ่าแมลงที่กินพืชเป็นอาหารอีกด้วย แมลงที่อาศัยเมล็ดพืชเป็นอาหารเหล่านี้นอกจากจะทำลายเมล็ดพืชแล้วยังเป็นตัวขยายการขึ้นปะปนของเชื้อราไปยังเมล็ดพืชส่วนอื่นๆ อีก

ดังนั้นการอบเมล็ดพืชในไอระเหยของน้ำยาเคมีดังกล่าว จะทำให้ลดจำนวนของเชื้อรา และแมลงที่ปะปนอยู่กับเมล็ดพืชนั้นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าที่อุณหภูมิสูง (37 องศาเซลเซียส) จะทำให้มีการทำลายเชื้อราได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ (25 องศาเซลเซียส) อีกด้วย ความเข้มข้นที่ 34 มิลลิกรัมต่อลิตรของเอทิลีน ไดโบรไมด์และเมทิลโบรไมด์ (ethylene dibromide - methylbromide 1:1 w/w) สามารถทำลายแมลงซึ่งส่วนใหญ่เป็นด้วงข้าว (rice weevils) และเชื้อราชนิดต่างๆ บนพืชหลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพเหมือนกัน ทั้งยังเป็นที่น่าสังเกตว่าแมลงที่เพิ่มจำนวนมากขึ้นนั้นจะทำให้จำนวนเชื้อราเพิ่มมากขึ้นด้วย

2. <u>การทำลายอะฟลาทอกซินในอาหารของคนและสัตว์เศรษฐกิจ</u>

วิธีการที่จะลดปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารอีกวิธีหนึ่งนั้นก็โดยวิธีการทำลายอะฟลาทอกซินที่ปะปนอยู่ในอาหารเหล่านั้นด้วยวิธีการต่างๆ กัน เช่น การนำเอาอาหารที่ไม่มีอะฟลาทอกซินผสมลงไปในอาหารที่มีอะฟลาทอกซิน การแยกเมล็ดพืชที่มีอะฟลาทอกซินอยู่ออก การสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี การทำลายโดยวิธีทางเคมีและจุลชีววิทยา เป็นต้น แต่ก่อนอื่นควรจะได้พิจารณาถึงปริมาณอะฟลาทอกซินที่อาจจะให้มีปะปนอยู่ในอาหารของคนและสัตว์เศรษฐกิจได้โดยไม่ทำให้เกิดอันตรายแก่คนและสัตว์เหล่านั้น อย่างไรก็ดีหลักการโดยทั่วๆ ไปแล้วเมล็ดพืชที่จะนำมาเป็นอาหารของคนและสัตว์เศรษฐกิจนั้นไม่ควรจะมีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่เลย ในกรณีเช่นนี้ก็เป็นการยากลำบากที่ไม่ให้มีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ในอาหารได้บ้างเหมือนกัน การพิจารณาถึงปริมาณอะฟลาทอกซินที่อาจจะมีปะปนอยู่ได้ในอาหารนั้นจำเป็นจะต้องใช้ผลการทดลองจากสัตว์ทดลองที่มีความต้านทานต่ออะฟลาทอกซินน้อยที่สุดซึ่งได้แก่ ปลาเทราท์ (trout) และลูกเป็ด (duckling) เป็นต้น การทดลองพบว่าปลาเทราท์ซึ่งเป็นสัตว์ทดลองที่มีความต้านทานต่ออะฟลาทอกซินน้อยที่สุดนั้นจะเกิดอาการเป็นพิษขึ้นถ้าได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ในปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ดังนั้นจึงถือเอาปริมาณอะฟลาทอกซินดังกล่าวเป็นหลักเกณฑ์สำหรับอาหารที่จะใช้เลี้ยงปลาเทราท์ นั่นคืออาหารเมล็ดฝ้ายที่จะนำมาให้ปลาเทราท์จะต้องมีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ในปริมาณที่น้อยกว่า 1 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (Wogan, 1967)

สำหรับลูกเป็ดซึ่งมีความต้านทานต่ออะฟลาทอกซินได้น้อยรองลงมาจากปลาเทราท์นั้น เมื่อได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ในปริมาณ 30 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 14 เดือนจะทำให้ลูกเป็ดจำนวน 8 ตัวจากที่ทำการทดลองทั้งหมด 14 ตัวมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในตับ (Carnaghan, 1965) ต่อมา Wogan และ Newberne (1966) ก็พบว่าหนูพุกขาว (rat) มีความต้านทานต่ออะฟลาทอกซินปะปนอยู่ 30 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเช่นเดียวกัน ดังนั้นผู้เชี่ยวชาญขององค์การอาหารและเกษตรแห่งโลก จึงได้พิจารณาให้ปริมาณที่ต่ำสุดของอะฟลาทอกซินที่จะมีอยู่ได้มากที่สุดในอาหารเป็น 30 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ถึงกระนั้นก็ตามอันตรายอันอาจจะเกิดจากการขาดอาหาร (malnutriton) ก็ยังนับว่าสำคัญกว่าปริมาณอะฟลาทอกซินดังกล่าวที่อาจจะทำให้เกิดมะเร็ง (carcinogenicity) ในตับของคน (Anonymous, 1966 b)

2.1 การลดปริมาณอะฟลาทอกซินในเมล็ดพืชโดยการปนเมล็ดพืชที่ดีลงไป

วิธีการอันหนึ่งที่จะนำมาใช้ในการลดปริมาณอะฟลาทอกซินในเมล็ดพืชนั้นก็โดยการนำเอาเมล็ดพืชชนิดเดียวกันที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินน้อยกว่า หรือไม่มีอะฟลาทอกซินอยู่เลยมาปนลงในเมล็ดพืชที่มีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่มากกว่า เพื่อทำให้ปริมาณอะฟลาทอกซินดังกล่าวนั้นเจือจางลงไป แต่ถ้าพิจารณากันให้ดีแล้วจะเห็นได้ว่าอะฟลาทอกซินก็ยังมีปะปนอยู่ในเมล็ดพืชที่มีจำนวนมากขึ้นนั่นเอง

2.2 การกำจัดอะฟลาทอกซินในกระบวนการฟอกให้สะอาด (refining) ของน้ำมันพืช

อะฟลาทอกซินที่อาจจะมีปะปนอยู่ในน้ำมันดิบของถั่วลิสง (crude peanut oil) นั้นจะมีปริมาณลดลงเมื่อนำมาเข้ากระบวนการฟอกให้สะอาดด้วยเกลือของโซเดียมทำให้เป็นกรดด้วยกรดไฮโดรคลอริค (hydrochloric acid) ล้างด้วยน้ำและนำมาฟอกสี (bleaching) เป็นต้น

น้ำมันดิบของถั่วลิสงที่ได้มาจากฮ่องกงและประเทศสิงคโปร์นั้นมีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ในปริมาณ 3-16 ไมโครกรัมต่อน้ำมัน 1 กิโลกรัม จาก 13 ใน 28 ตัวอย่างที่นำมาทำการทดลอง แต่ภายหลังได้นำไปทำการฟอกให้สะอาดในห้องปฏิบัติการแล้วไม่พบว่ามีอะฟลาทอกซินเหลืออยู่ในน้ำมันดิบของถั่วลิสงดังกล่าว ต่อมาในปี ค.ศ 1966 Parker และ Melnick ได้ทำการทดลองโดยการใช้น้ำมันดิบของถั่วลิสงซึ่ง

สกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมีหรือที่ได้จากการบีบ (hydraulic pressing) ที่ไม่สามารถใช้เป็นอาหารสำหรับคนได้และมีปริมาณอะฟลาทอกซิน B_1 อยู่สูงถึง 812 ไมโครกรัมต่อน้ำมัน 1 กิโลกรัม เมื่อนำมาฟอกให้สะอาดด้วย 16^0 Barme NaOH 0.15% แล้วตามด้วยการล้างด้วยน้ำ (น้ำ 1 ส่วนกับน้ำมันดิบถั่วลิสง 10 ส่วน) 2 ครั้ง จะทำให้ปริมาณอะฟลาทอกซิน B_1 ลดลงเหลือ 14 ไมโครกรัมต่อน้ำมัน 1 กิโลกรัม ภายหลังที่นำไปฟอกสีด้วย APCS *Official Bleaching Earth* 3% ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จะทำให้น้ำมันดังกล่าวมีอะฟลาทอกซินปะนอยู่เพียง 1 ไมโครกรัมต่อน้ำมัน 1 กิโลกรัม เท่านั้น สำหรับน้ำมันดิบของข้าวโพดที่มีอะฟลาทอกซิน B_1 ปะปนอยู่ในปริมาณ 135 ไมโครกรัมต่อน้ำมัน 1 กิโลกรัมก็อาจจะมีปริมาณอะฟลาทอกซิน B_1 ลดน้อยลงเหลือเพียง 1 ไมโครกรัมต่อน้ำมัน 1 กิโลกรัม ภายหลังจากนำไปฟอกให้สะอาดด้วย 60^0 Baume NaOH 0.3% ล้างด้วยน้ำ 2 ครั้งและฟอกสีด้วย 0.6% "Special Fitrol" ที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ดังนั้นจะเห็นว่าน้ำมันพืชที่ผ่านการฟอกให้สะอาดแล้วจะมีปริมาณอะฟลาทอกซินปะปนอยู่น้อยมาก

2.3 การลดปริมาณอะฟลาทอกซินในเมล็ดพืชโดยการแยกเมล็ดพืชที่เสียออกด้วยเครื่องมือ (physical separation)

หลักการโดยทั่วๆ ไปของการแยกเมล็ดพืชที่เสียออกด้วยเครื่องมือนั้นก็โดยการแยกเอาเมล็ดพืชที่อ่อน แตก ถูกทำลายบางส่วนและที่มีสีสกปรกออกนั่นเอง ทั้งนี้เพราะว่าในเมล็ดพืชดังกล่าวจะมีเชื้อราขึ้นอยู่ในจำนวนมากซึ่งจะทำให้มีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่มากกว่าเมล็ดพืชที่มีเมล็ดโตและไม่แตก ดังนั้นเมื่อแยกเมล็ดพืชที่เสียออกออกก็จะทำให้ปริมาณของอะฟลาทอกซินลดน้อยลงไปด้วย

เครื่องมือที่ใช้แยกนั้นมีด้วยกัน 3 ชนิดคือ

ก. Zigzag separator (Kaiser, 1962) ซึ่งใช้แยกถั่วลิสงที่ Stanford Research Institute (Dollear และ Gardner, 1966) จากผลของการทดลองพบว่าเครื่องมือชนิดนี้สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซิน B_1 ลงเหลือเพียง 5% เท่านั้น (Golgblatt, 1968)

ข. Projection device (Holzenthal *et al.*, 1956) ซึ่งใช้แยกเมล็ดฝ้ายโดยการใช้คุณสมบัติทางความถ่วง (density) และการลอยตัว (ballistic) ภายหลังเมื่อ

ถูกพ่นออกมาจากเครื่องมือ เครื่องมือชนิดนี้ก็สามารถที่จะแยกเมล็ดพืชที่มีอะฟลาทอกซินอยู่ได้เหมือนกันแต่ไม่ค่อยสมบูรณ์นัก นอกจากนี้ถ้าทำการแยกเมล็ดพืชในจำนวนมากก็จะไม่ค่อยได้ผล

ค. Mechanical sorting การแยกวิธีนี้ใช้หลักการที่มีเมล็ดพืชซึ่งมีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่จะเรืองแสงสีน้ำเงินหรือสีเขียวแกมเหลืองเมื่ออยู่ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (long-wave ultraviolet light) (Whittin, 1966) ดังนั้นในเวลาต่อมา Ashworth et al. (1968) ได้นำหลักการดังกล่าวไปประยุกต์กับเครื่องมือที่ใช้เลือกด้วยไฟฟ้า (electric sorting machine) จากเครื่องมือดังกล่าวนี้สามารถจะแยกเมล็ดฝ้ายที่มีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่ได้ดีถึง 91% และจะลดปริมาณอะฟลาทอกซิน B_1 และ B_2 จาก 883 ลงเหลือเพียง 33 ไมโครกรัมต่อเมล็ดฝ้าย 1 กิโลกรัม

2.4 การกำจัดอะฟลาทอกซินโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี (solvent extraction)

อะฟลาทอกซินเป็นสารอินทรีย์เคมีที่สามารถละลายได้ดีในเมทานอล (methanol) เอททานอล (ethanol) คลอโรฟอร์ม (cholroform) และเบนซีน (benzene) แต่ไม่ค่อยละลายในน้ำและปีโตรเลียมอีเทอร์ (petrolerm ether) ดังนั้นการกำจัดอะฟลาทอกซินจากเมล็ดพืชอาจทำได้โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี ดังกล่าวข้างต้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีทั้งข้อดีและข้อเสียดังต่อไปนี้

1) ข้อดีของการใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี

ก. ตัวทำละลายทางเคมีเหล่านี้สามารถที่จะสกัดเอาอะฟลาทอกซินออกจากเมล็ดพืชได้หมด

ข. เมื่อใช้ตัวทำละลายทางเคมีเหล่านี้สกัดแล้วจะไม่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของอะฟลาทอกซินเป็นสารอย่างอื่นที่จะเป็นโทษต่อร่างกาย

ค. การใช้ตัวทำละลายทางเคมีเหล่านี้สกัดจะไม่ทำให้คุณค่าทางอาหารของโปรตีนเสียไป

2) ข้อเสียของการใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี (solvent extraction)

ก. จำเป็นจะต้องมีเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดและนำตัวทำละลายทางเคมีหลังจากสกัดแล้ว กลับมาใช้อีก

ข. ตัวทำละลายทางเคมีเหล่านี้จะสกัดเอาอาหารพวกแป้งออกมาพร้อมกับอะฟลาทอกซินด้วย

ค. การสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมีนี้จำเป็นจะต้องเพิ่มค่าใช้จ่ายเข้าไปในกระบวนการผลิตอีกด้วย

ง. ข้อเสียที่สำคัญอีกประการหนึ่งก็คือการที่มีตัวทำละลายทางเคมีเหล่านี้หลงเหลืออยู่ในเมล็ดพืชนั้นๆ ซึ่งอาจจะเป็นอันตรายเมื่อนำไปใช้เป็นอาหาร

ตัวทำละลายทางเคมีหลายชนิดทั้งที่เป็นตัวทำละลายเดี่ยวๆ หรือที่เป็นส่วนผสมได้ถูกนำมาใช้ในการสกัดอะฟลาทอกซินออกจากเมล็ดพืช ตัวทำละลายที่นำมาใช้ในการสกัดเดี่ยวๆ ได้แก่ อะซิโตน เบนซีน คลอโรฟอร์ม เมทานอล และน้ำเดือด (Anonymous, 1962; Feuell, 1966) กับอาหารถั่วลิสงแล้วนำอาหารถั่วลิสงดังกล่าวที่ถูกสกัดแล้วไปเลี้ยงลูกเป็ด พบว่าเมทานอลสามารถจะสกัดเอาอะฟลาทอกซินออกได้หมดซึ่งเป็นผลทำให้ลูกเป็ดเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดีและไม่พบอาการที่ตับภายหลังจากที่เลี้ยงอาหารดังกล่าวแล้วเป็นเวลา 17 วัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำเอาอาหารถั่วลิสงที่สกัดด้วยเมทานอลที่อุณหภูมิสูงแล้วนำไปเลี้ยงหนูพุกขาว พบว่า 15 ใน 88 ตัว ที่ทำการทดลองจะเป็นมะเร็ง (carcinogenicity) ในตับ Salmon และ Newberne, Newberne, 1963) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเมทานอลไม่สามารถจะสกัดเอาสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหารถั่วลิสงออกได้หมดที่อุณหภูมิสูง สำหรับส่วนผสมของตัวทำละลายทางเคมีหลายชนิดก็ได้ถูกนำมาใช้ในการสกัดอะฟลาทอกซินออกจากเมล็ดพืชด้วยเหมือนกัน ส่วนผสมของตัวทำละลายทางเคมีเหล่านี้ได้แก่

2.4.1 น้ำและอะซิโตน จากการทดลองพบว่าน้ำ (10%) ผสมกับอะซิโตนสามารถที่จะสกัดอะฟลาทอกซินในอาหารถั่วลิสงจากปริมาณ 113 ลดลงเหลือเพียง 8 ไมโครกรัมต่อ อาหาร 1 กิโลกรัมที่อุณหภูมิ 119 องศาฟาห์เรนไฮต์

2.4.2 ส่วนผสมของเฮกเซน (n-hexane) อะซิโตน เมทานอลและน้ำ จากการทดลองพบว่าส่วนผสมของอะซิโตน - เฮกเซน - น้ำ (54.5:44.1:1.1) สามารถสกัดอะฟลาทอกซินออกจากแผ่นถั่วลิสง (peanut cake) ได้มากที่สุด (Vorster, 1966)

2.5 การทำลายอะฟลาทอกซินในเมล็ดพืชโดยวิธีทางเคมี (chemical activation) อะฟลาทอกซินที่พบในเมล็ดพืชตามธรรมชาตินั้นส่วนใหญ่จะเป็นอะฟลาทอกซิน B_1, B_2, G_1 และ G_2 ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงสูตรโครงสร้างของอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ ก็พบว่ากลุ่มแลคโตน (lactone group) ในวง (ring) ที่ 4 ของอะฟลาทอกซิน B_1 และ B_2 กับกลุ่มแลคโตน (lactone group) ในวงที่ 4 และ 5 ของอะฟลาทอกซิน G_1 และ G_2 จะ

สามารถถูกย่อย (hydrolysis) ด้วยสารละลายที่เป็นด่างแก่ (strong alkalis) เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น ดังนั้นในการลดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลัน (acute toxicity) และการเกิดมะเร็ง (carcinogenicity) อาจจะทำได้โดยการย่อยด้วยด่างและตามด้วยการดิคาร์บอกซิเลชัน หรือ ออกซิเดชัน นอกจากนี้ก็ยังมีกลุ่มเมทิลอีเทอร์ (methyl ether) และกลุ่มฟูแลน อีเทอร์ (furan ether) ซึ่งสามารถที่จะถูกทำลายได้ด้วยกรดแก่ (strong acid) เช่น กรดไฮโดรคลอริก ((hydrochloric acid) เป็นต้น สำหรับพันธะคู่ (double bond) ในวงที่ 1 ของทั้งอะฟลาทอกซิน B_1 และ G_1 อาจจะถูกทำลายได้ด้วยสารที่มีประจุ (electrophilic reagent) เช่น ออสเมียมเตตรอกไซด์ (osmium tetroxide) เป็นต้น

สารเคมีหลายชนิดได้ถูกนำมาทดลองในการทำลายอะฟลาทอกซินในเมล็ดพืช สารเคมีเหล่านี้ได้แก่ แอมโมเนีย เมทิลลามีน (methylamine) โซเดียมไฮดรอกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โอโซน และการฉายด้วยรังสี (irradiation) เป็นต้น

2.5.1 ปฏิกิริยาของอะฟลาทอกซินกับแอมโมเนีย

แอมโมเนีย เป็นสารเคมีที่ใช้ในการทำลายอะฟลาทอกซินในเมล็ดพืชพวกถั่วลิสงและเมล็ดฝ้ายได้ดีที่สุด Dollear และ Gardner (1966) ได้รายงานผลการทดลองในการทำลายอะฟลาทอกซินในอาหารพวกเมล็ดฝ้ายและถั่วลิสงด้วยแอมโมเนีย (anhydrous ammonia) ภายใต้ความกดดันระหว่าง 20 ถึง 40 ปอนด์/ตารางนิ้ว เมื่อนำอาหารเมล็ดฝ้ายมาทำลายด้วยแอมโมเนียที่ความกดดัน 40 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 160-178 องศาฟาเรนไฮต์ เป็นเวลานาน 60 นาที แล้วพบว่าอะฟลาทอกซินจะถูกทำลายได้ทั้งหมด (98-100%) สำหรับอะฟลาทอกซินที่ปะปนอยู่ในอาหารถั่วลิสงจะถูกทำลายได้ในทำนองเดียวกัน

2.5.2 ปฏิกิริยาของอะฟลาทอกซินกับเมทิลลามีน

Dollear และ Gardner (1966) ได้รายงานผลการทดลองในการทำลายอะฟลาทอกซินในอาหารเมล็ดฝ้ายและถั่วลิสงด้วยเมทิลลามีน การทดลองนี้ได้นำอาหารถั่วลิสงที่ทำจากถั่วลิสงที่มีอะฟลาทอกซิน B_1 ปะปนอยู่ 2,850 ไมโครกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม และมีอะฟลาทอกซินทั้งหมดในเครื่องคั่ว (stirred reactor) ปนกับเมทิลลามีน 1.25% ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะทำให้อะฟลาทอกซิน B_1 ลดลงเหลือเพียง 63 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และปริมาณอะฟลาทอกซินทั้งหมดลดลงเหลือเพียง 65 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

2.5.3 ปฏิกิริยาของอะฟลาทอกซินกับโซเดียมไฮดรอกไซด์

อาหารที่มีอะฟลาทอกซิน B_1 ปะปนอยู่ 68 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1กิโลกรัมและมีอะฟลาทอกซินทั้งหมด 113 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และมีความชื้นในอาหาร 22% เมื่อนำไปคั่วที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ความร้อนดังกล่าวจะทำลายอะฟลาทอกซิน B_1 ที่ปะปนให้ลดลงเหลือ 47 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และอะฟลาทอกซินทั้งหมดลงเหลือ 75 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แต่ปริมาณอะฟลาทอกซิน B_1 จะลดลงเหลือเพียง 11 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1กิโลกรัมเมื่อเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป 2% อย่างไรก็ดีอะฟลาทอกซิน B_1 จะลดลงเหลือปริมาณน้อยมากเมื่อเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป 2% และเพิ่มความชื้นในอาหารเป็น 30% (Dollear และ Gardner, 1966)

2.5.4 ปฏิกิริยาของอะฟลาทอกซินกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Van Dorp et al. (1963) พบว่าอะฟลาทอกซิน B_1 จะถูกทำลายได้ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ พีเอช 9.5 กับใช้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ในการทำลายอะฟลาทอกซินที่ปะปนอยู่ในอาหารถั่วลิสง ทั้งนี้จะต้องทำในสภาวะที่ผสมกันเป็นของเหลว 10% ของอาหารดังกล่าว โดยที่จะต้องใช้ 5 มิลลิลิตรของ 6% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพื่อที่จะทำลายอะฟลาทอกซิน 90 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในอาหารถั่วลิสงจำนวน 5 กรัมได้

2.5.5 ปฏิกิริยาของอะฟลาทอกซินกับโอโซน (ozonization)

Dwaraknath et al. (1968) ได้รายงานถึงวิธีการทำลายอะฟลาทอกซินในอาหารเมล็ดฝ้ายและถั่วลิสงโดยใช้โอโซนในสภาวะต่างๆ กันของความชื้นในอาหาร อุณหภูมิ และเวลา โอโซนใช้ทำการผ่านเข้าไปในอาหารโดยให้มีปริมาณ 25 มิลลิกรัมต่อนาที บนอาหาร 700 กรัม พบว่าจะมีการทำลายอะฟลาทอกซิน B_1 ประมาณ 144 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในอาหารเมล็ดฝ้ายจะสมบูรณ์เมื่อใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ความชื้น 22% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แต่อะฟลาทอกซิน B_2 จะถูกทำลายเพียง 91% เท่านั้น สำหรับอาหารถั่วลิสงที่มีอะฟลาทอกซิน B_1, G_1 และ G_2 ปะปนอยู่ในปริมาณ 54,, 18 และ 10 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมนั้น จะต้องใช้ความชื้นเป็น 30% ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงจะทำให้อะ-

ฟลาทอกซินทั้งหมดถูกทำลายไปได้เพียง 78% เท่านั้น ภายหลังจากที่ใช้เวลามากขึ้นก็ไม่มีผลต่อการทำลายดังกล่าว สิ่งที่น่าสังเกตอีกอันหนึ่งก็คืออะฟลาทอกซิน B_2 ในอาหารถั่วลิสงจะไม่ถูกทำลายด้วยโอโซน

2.5.6 การทำลายอะฟลาทอกซินโดยใช้การฉายรังสี (irradiation)

อะฟลาทอกซินบริสุทธิ์ที่อยู่ในรูปของสารละลายหรืออยู่บนแผ่นกระจกที่เคลือบด้วย silca gel (thin layer plate) นั้นจะไวต่อการทำลายจากแสงอัลตราไวโอเลต แต่อย่างไรก็ดีถ้านำอาหารถั่วลิสงที่มีอะฟลาทอกซินปะปนอยู่มาวางบน thin layer plate แล้วนำมาอยู่ภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 8 ชั่วโมงจะไม่ทำให้ส่วนสกัดของอะฟลาทอกซินจากอาหารนั้นลดความเป็นพิษต่อลูกเป็ดลงได้เลย ในทำนองเดียวกันถ้านำอาหารดังกล่าวมาอยู่ภายใต้รังสีแกมมา (gamma rays) ขนาด 2.5 เมกะแรดส์ก็จะไม่ทำให้ความเป็นพิษลดน้อยลงแต่อย่างไร ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอะฟลาทอกซินที่อยู่ในอาหารถั่วลิสงนั้นจะไม่สามารถถูกทำลายได้ด้วยพลังจากกัมมันตภาพรังสี (Feuell, 1966) สิ่งที่ควรระวังอีกประการหนึ่งก็คือเมล็ดพืชที่ทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการฉายรังสีพบว่าจะช่วยเสริมการสร้างอะฟลาทอกซินจากเชื้อราเพิ่มมากขึ้นอีกด้วย (Priyadarshini และ Tulpule, 1976)

2.7 การทำลายอะฟลาทอกซินบนเครื่องแก้วที่ใช้ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธีทางเคมี

ได้มีผู้ทำการทดลองถึงการทำลายอะฟลาทอกซินโดยใช้สารเคมีที่สามารถออกซิไดส์ (oxidizing agents) ซึ่งได้แก่ เบนโซอิลเปอร์ออกไซด์ (benzoyl peroxide) ออสเมียม เตตรอกไซด์ และไอโอดีน เป็นต้น สารเคมีเหล่านี้จะทำลายอะฟลาทอกซิน B_1 และ G_1 แต่ไม่ทำลายอะฟลาทอกซิน B_2 และ G_2 นอกจากนี้ก็มีโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (NaOCl) โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนท ($KMnO_4$) โซเดียมโบเรท ($NaBO_3$) ซึ่งสามารถจะทำลายอะฟลาทอกซินทั้ง 4 ชนิดได้ แต่ก็เป็นที่น่าสังเกตว่าสารเคมีเหล่านี้จะมีประโยชน์ในการทำลายอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ ปะปนอยู่บนเครื่องแก้วหรือเครื่องใช้อื่นๆในห้องปฏิบัติการมากกว่าอาหารพวกเมล็ดพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ซึ่งนิยมใช้ในการทำลายอะฟลาทอกซินในห้องปฏิบัติการเพื่อป้องกันไม่ให้ผู้ทำการทดลองได้รับอะฟลาทอกซินเข้าไป สำหรับความเข้มข้นก็ขึ้นอยู่กับปริมาณอะฟลาทอกซินที่ปะปนอยู่กับเครื่องแก้วนั้นๆ

2.8 การทำลายอะฟลาทอกซินโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์

การควบคุมการกำจัดเชื้อรา และอะฟลาทอกซินโดยทางชีววิทยาทำได้โดยการนำเอาจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ คือ แบคทีเรีย ยีสต์ รา แอคติโนมัยสีท และอื่นๆ ประมาณ 1,000 ชนิด มาทำการทดสอบความสามารถในการควบคุมการกำจัดเชื้อรา และสารพิษอะฟลาทอกซิน หรือเปลี่ยนรูปโครงสร้างของอะฟลาทอกซินทำให้ความเป็นพิษลดลงหรือไม่เกิดเป็นพิษต่อสัตว์อื่นๆ จากการทดสอบพบว่าแบคทีเรีย Flavobacterium auranticum (NRRL B-184) สามารถเปลี่ยนรูปโครงสร้างของสารพิษอะฟลาทอกซิน B_1 เป็นชนิด B_{2a} ซึ่งเป็นอะฟลาทอกซินที่ไม่เป็นพิษต่อสัตว์ นอกจากนี้ยังได้มีการสกัดสารพิษอะฟลาทอกซินจากอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อ A. flavus ที่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ร่วมกับเชื้อ Flavobacterium auranticum แล้วนำสารพิษอะฟลาทอกซินที่ได้นี้ไปผสมกับอาหารใช้เลี้ยงลูกเป็ดเป็นผลปรากฏว่าลูกเป็ดไม่มีอาหารถูกพิษของสารอะฟลาทอกซินเลย (Ciegler, 1966) รายงานว่า Lactobacillus casei เมื่อใช้เลี้ยงร่วมกับเชื้อรา A. parasiticus ในอาหาร minimal salts glucose broth บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน พบว่า Lactobacillus casei สามารถช่วยลดปริมาณสารอะฟลาทอกซินได้ โดยเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ A. parasiticus เพียงอย่างเดียว สาหร่ายทะเลบางชนิด เช่น Sargassum despiense, Turbinaria decurense, Dilophus ligulatus และ Padina gavonia ทำให้สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้น้อยลงเช่นกัน

Sauer และ Burroughs (1980) ได้รายงานถึงการแข่งขันการเจริญของเชื้อราต่อการสร้างอะฟลาทอกซิน B_1 โดยข้าวโพดที่เก็บไว้ในขณะที่มีความชื้นสูง จะพบว่ามีเชื้อรา Fusarium และ A. flavus เจริญเติบโตเป็นจำนวนมากแต่ไม่พบอะฟลาทอกซินเลย Wicklow และคณะ (1980) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อรา A. flavus ร่วมกับเชื้อรา A. niger หรือเชื้อรา Trichoderma viride บนเมล็ดข้าวโพดที่พึ่งทำการเก็บเกี่ยวและนำมาทำการฆ่าเชื้อแล้วจะไม่พบอะฟลาทอกซินเลย Lillehoj และคณะ (1982) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อระหว่าง A. flavus, Penicillium oxalicum และ Fusalium moniliforms ลงบนฝักข้าวโพดจะทำให้ปริมาณอะฟลาทอกซินปะปนลดลง

Djion และ Hesseltine (1979) ได้รายงานว่าการนำผลผลิตที่ปนเปื้อนเชื้อรา A. flavus และ A. parasiticus มาใช้ทำเทมเป้ โดยใช้เชื้อรา Rhizopus oligosporus ปรากฏว่าสามารถลดการเจริญและการสร้างสปอร์ของ A. flavus และ A. parasiticus ได้รวมทั้งลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้ด้วย นอกจากนี้ Wang และคณะ (1981) ได้พบว่า R. oligosporus ยังมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกด้วย

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

1. เชื้อจุลินทรีย์ Aspergillus flavus 102566

   Rhizopus oligosporus

2. อุปกรณ์และสารเคมี

   อุปกรณ์

   1. ตู้บ่ม (Incubator)
   2. กล้องจุลทรรศน์
   3. Heamacytometer
   4. กรวยแยก (Separating funnel)
   5. เครื่องกลั่นระเหยระบบสุญญากาศ (Rotary evaporator)
   6. ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump)
   7. กระดาษกรองวัทแมน เบอร์ 1
   8. เครื่องเขย่า(Shaker)
   9. syringe ขนาด 5,10 มล.
   10. เครื่องชั่ง
   11. ฟลาสก์ขนาด 500 มล.
   12. ขวดก้นกลม(Round bottom)
   13. ชุดเครื่องมือsep-pak siliga gel
   14. ตู้UV
   15. กรวยแก้ว
   16. millipore filter
   17. HPLC(Shimadzu) LC-6ad injection

18. UV Spectrophotometric detector spd- 6A 365 nm
    Absorbance 0.08
19. Colume Reverse phase C18
20. Integrator (DATA MODEL- C- R6A Chromatopac)

สารเคมีที่ใช้ในการสกัด

1. เมทานอล (methanol)
2. คลอโรฟอร์ม (chloroform)
3. เฮกเซน (n-hexane)
4. อะซิโตน (acetone)
5. เบนซีน (benzene)
6. กรดแอซีติก (acetic acid)
7. เอทิลอีเทอร์ (ethyl ether)
8. เมทิลีนไดคลอไรด์ (CH_2Cl_2)
9. Standard aflatoxin B1, G1

<u>การทดลอง</u>

1. การเตรียมสปอร์ของเชื้อรา A flavus 102566

- เขี่ยเชื้อราจาก stock culture ลงในหลอดอาหาร malt extract agar slant เลี้ยงเชื้อให้มีการเจริญ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส)

- ทำการเพิ่มจำนวนสปอร์ให้มากขึ้น โดยการเขี่ยเชื้อราจาก slant ในข้อที่ 1 ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มล. ที่มีอาหาร malt extrac agar อยู่ประมาณ 200 มล. เลี้ยงเชื้อให้มีการเจริญ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

- นำฟลาสก์อาหารเลี้ยงเชื้อมาทำ spore suspension โดยใช้tween 80 (0.1%) ใช้ loop เขี่ยสปอร์ให้ออกจากอาหาร

- นำมากรองเอาใยราออกด้วยสำลีโดยวางสำลีไว้บนกรวยแก้ว

- นำ spore suspension ที่ได้ มานับจำนวนโดยใช้ Haemacytometer ให้ได้ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ถ้าไม่ได้ให้ทำการปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^6)

- spore suspention เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมสปอร์ของเชื้อรา Rhizopus oligosporus

- เขี่ยเชื้อราจาก stock culture ลงในหลอดอาหาร malt extract agar slant เลี้ยงเชื้อให้มีการเจริญ 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

- ทำการเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อราให้มากขึ้น โดยการถ่ายเชื้อราจาก slant ในข้อที่ 1 ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มล. ที่มีอาหารปลายข้าวอยู่ 50 กรัม เติมน้ำลงไปให้อาหารมีความชื้น 23%

- เลี้ยงให้เชื้อมีการเจริญ 7 วัน โดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที

- นำฟลาสก์อาหารเลี้ยงเชื้อ (ปลายข้าว) มาทำ spore suspension โดยใช้ tween 80 % (0.1%)

- นำมากรองเอาใยราออกด้วยสำลีโดยวางสำลีไว้บนกรวยแก้ว

- นำ spore suspension ที่ได้ มานับจำนวนโดยใช้ Haemacytometer ให้ได้ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ถ้าไม่ได้ให้ทำการปรับความเข้มข้นให้ได้ 10^8)

- เก็บ spore suspension ที่ได้ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

3. การลงเชื้อแบบ point inoculation ลงในจานเพาะเชื้อ

- เตรียม semisolid suspension โดยใช้วุ้นผง 0.2 % ผสมกับ 0.05 % tween 80 น้ำ 99.5 % ผสมให้เข้ากันโดยใช้ความร้อน แล้วปิเปตต์อาหาร 0.2 - 0.4 มล.ใส่ลงในขวดขนาดเล็กปิดฝาเกลียว แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

- ถ่ายสปอร์ของเชื้อรา Aspergillus flavus 102566 ลงใน suspension ที่เตรียมได้ในขวดอาหาร และอีกขวดหนึ่งถ่ายสปอร์ของเชื้อรา ~~Rhizopus oligosporus~~

- ใช้ loop ถ่ายเชื้อราจากข้อ 2 มาใส่จานเพาะเชื้อที่มีอาหาร malt extract agar โดยถ่ายสปอร์ของ A flavus 102566 ไว้ด้านหนึ่งของจานเพาะเชื้อ และถ่ายสปอร์ของ Rhizopus oligosporus ไว้อีกด้านหนึ่งของจานเพาะเชื้อเดียวกัน

- วัดการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ทุกวัน

4. ศึกษาผลของเชื้อรา R. oligosporus ต่อการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในเทมเป้

- ขั้นตอนการเตรียมถั่วเหลืองเพื่อทำเทมเป้

1. ล้างถั่วเหลืองให้สะอาด
2. ต้มถั่วเหลืองนานประมาณ 30 นาที
3. แช่น้ำทิ้งไว้ค้างคืน
4. ปอกเปลือกนอกออก
5. นำมานึ่งประมาณ 30-45 นาที
6. ทิ้งไว้ให้เย็น

- นำถั่วเหลืองที่เตรียมไว้ในขั้นตอนการเตรียมถั่วเหลืองมาใส่ถุง ๆ ถุงละ 50 กรัม 4 ถุง 2 ชุด ชุดละ 4 ซ้ำ

ถุงที่ 1 เติมสปอร์ของ A flavus 102566 1 มล.

ถุงที่ 2 เติมสปอร์ของ R oligosporus 1 มล.

ถุงที่ 3 เติมสปอร์ของ A flavus 102566 0.5 มล. และสปอร์ของ R. oligosporus 0.5 มล.

ถุงที่ 4 ไม่มีการเติมสปอร์ของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด

ถุงที่ 5 ถั่วเหลืองที่มิได้ทำการต้มและไม่มีการเติมสปอร์ของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด

ทำการคลุกเชื้อราให้ทั่วถั่วเหลืองทั้งหมดในแต่ละถุง

- ปรับความชื้นของถั่วเหลืองที่คลุกแล้วให้ได้ประมาณ 23 % โดยการเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วลงไป

- อัดถั่วเหลืองที่คลุกแล้วให้แน่นแล้วมัดปากถุง

- บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน

- ส่วนที่เหลือนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอีก 7 วัน แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน

5. การสกัดหาสารพิษอะฟลาทอกซินโดยวิธี Sep pak method

- นำเทมเป้ที่ต้องการสกัด 50 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ 500 มล. เติมคลอโรฟอร์ม 150 มล. น้ำ 25 มล. เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

- กรองด้วยกระดาษวัทแมนเบอร์ 1 โดยใช้ celite เป็นตัวช่วยกรอง จะได้สารละลาย ของคลอโรฟอร์มและน้ำที่มีอะฟลาทอกซินละลายอยู่

- นำสารละลายที่ได้ใส่ในกรวยแยก เขย่าทิ้งไว้จนแยกชั้นของคลอโรฟอร์มออกมา ชั้นที่เหลืออยู่ทำการสกัดซ้ำด้วย คลดโรฟอร์ม 50 มล. อีกครั้ง

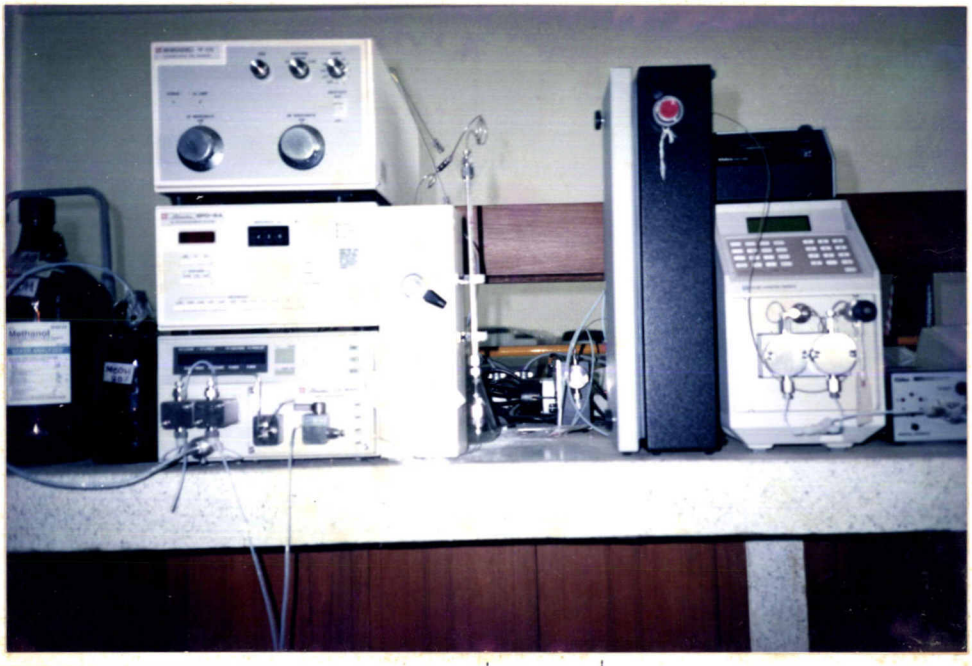
- นำสารละลายคลอโรฟอร์มที่ได้มาทำการระเหย ด้วยเครื่องกลั่นระเหย ภายใต้สุญญากาศ จนแห้ง

- เติมส่วนผสมของคลอโรฟอร์มกับเฮกเซนในอัตราส่วน 3 ต่อ 7 ลงไป 10 มล.

- นำสารละลายที่ได้มาผ่าน Sep pak siliga gel cartridge column chromatophy หลังจากนั้นทำการล้างคอลัมน์โดยใช้เฮกเซน 10 มล. แล้วส่วนผสมของเบนซินกับแอซิติก (ในอัตราส่วน 95.5 : 45) 10 มล. ล้างผ่านครั้งสุดท้ายใช้ส่วนผสมของ เอทิลอี-เทอร์กับเฮกเซน (อัตราส่วน 60 : 40) 10 มล.

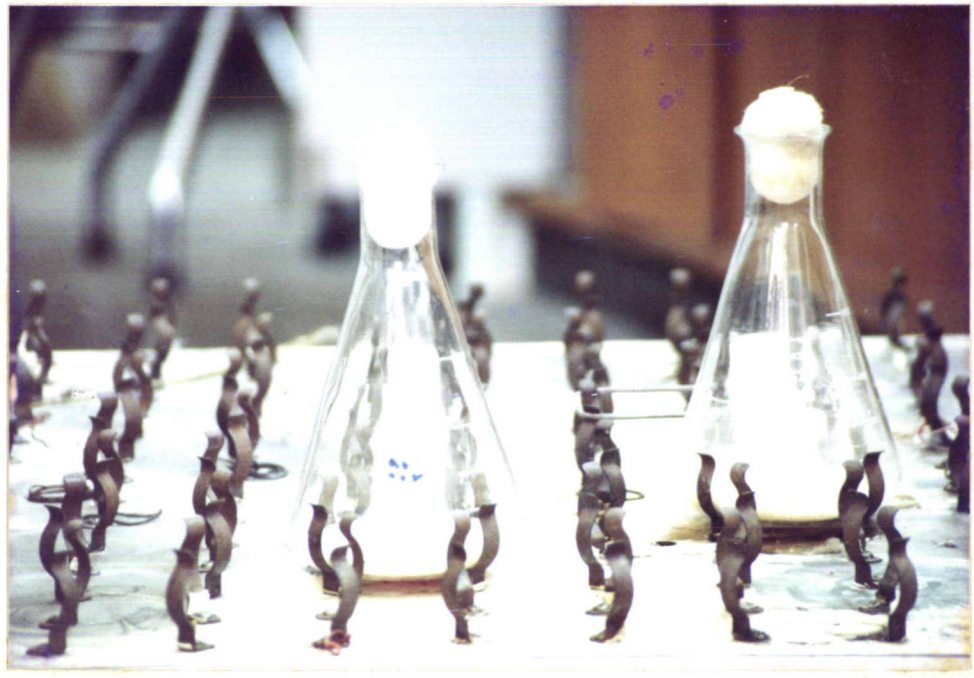
- หลังจากนั้นชะล้างอะฟลาทอกซินออกโดยใช้เมทิลีนคลอไรด์ กับอะซิโตน (9+1) 15 มล. ล้างผ่านคอลัมน์

- นำสารที่ได้ไปทำการระเหยโดยใช้เครื่องกลั่นระเหยภายใต้สุญญากาศจนแห้ง แล้วนำไป วิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินต่อไป



รูปที่ 3-1 เครื่อง HPLC

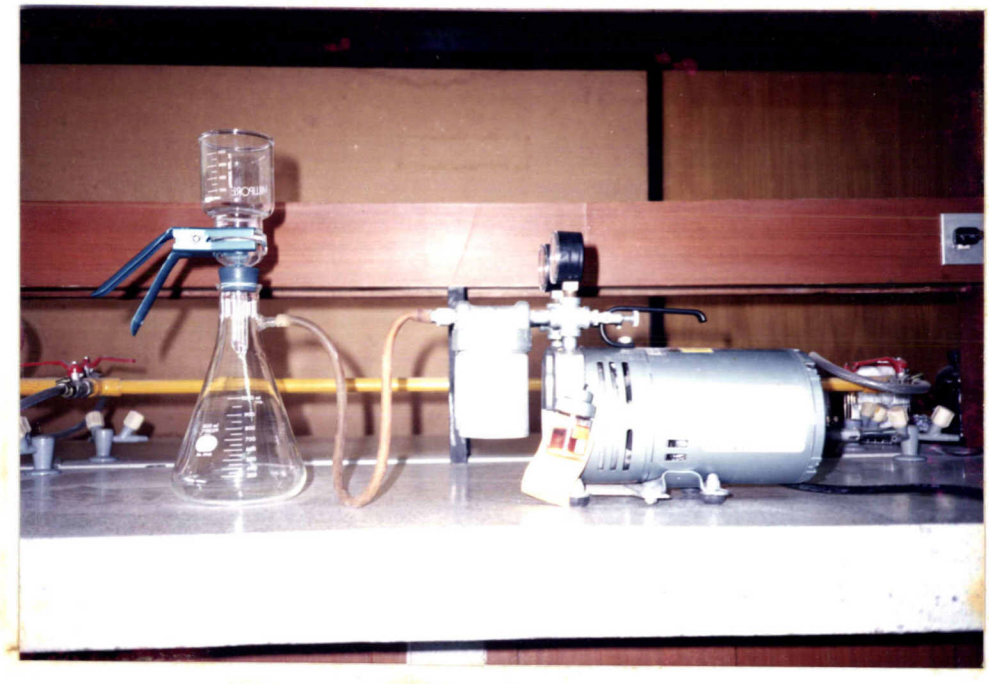
รูปที่ 3-2 เครื่อง Sonication



รูปที่ 3-3 อาหารปลายข้าวที่ใช้เพิ่มจำนวนของ Rhizoppus oligosporus

รูปที่ 3-4 เครื่อง Evaporator

รูปที่ 3-5 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอะฟลาทอกซิน



รูปที่ 3-6 ชุดกรอง millipore filter

รูปที่ 3-7 ถั่วเหลืองนึ่งก่อนทำเทมเป้

รูปที่ 3-8 ถั่วเหลืองดิบที่ใช้ในการทำเทมเป้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อ R. oligosporus และ A. flavus ในจานเพาะเชื้อ ที่มีอาหาร malt extract agar

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ A. flavus และ R. oligosporus ซึ่งอยู่คนละด้านของจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร malt extract agar พบว่าในวันที่ 1 สามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ R. oligosporus ได้ 42 มิลลิเมตร ในขณะที่ A. flavus ยังไม่มีการเจริญเกิดขึ้น เมื่อเข้าวันที่ 2 และ 3 จะสังเกตเห็นการเจริญของ A. flavus และสามารถวัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 12 และ 21 มิลลิเมตรตามลำดับ ส่วน R. oligosporus จะมีการเจริญเต็มที่จนเต็มจานเพาะเชื้อตั้งแต่วันที่ 2 เป็นต้นไป หลังจากวันที่ 3 ไปแล้วจะพบว่า A. flavus ไม่มีการเจริญเพิ่มขึ้นอีก โดยเส้นผ่านศูนย์กลางของ A. flavus จะคงที่ตลอดหลังจากวันที่ 3 เป็นต้นไป ดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ผลของการเจริญของ R. oligosporus และ A. flavus 102566 ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร malt extract agar

	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มิลลิเมตร)						
ชนิดของเชื้อรา วันที่	1	2	3	4	5	6	7
ในจานเพาะเชื้อเดียวกัน							
A. flavus	0	12	21	21	21	21	21
R. oligosporus	42	*	*	*	*	*	*
ในจานเพาะเชื้อแต่ละชนิด							
A. flavus	15	31	*	*	*	*	*
R. oligosporus	60	*	*	*	*	*	*

หมายเหตุ 0 หมายถึง ไม่มีการเจริญของเชื้อรา

* หมายถึง มีการเจริญของเชื้อราจนเต็มจานเพาะเชื้อ

2. ผลการศึกษาการใช้เชื้อรา R. oligosporus ยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในเทมเป้

จากผลการทดลองการใช้เชื้อรา R. oligosporus เพื่อยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในเทมเป้ซึ่งได้แสดงไว้ในตารางที่ 4-2 พบว่าถั่วเหลืองที่ไม่มีการเติมเชื้อราทั้ง 2 ชนิดลงไป และถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการนึ่งเมื่อบ่มทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 2 วันจะตรวจไม่พบอะฟลาทอกซิน สำหรับถั่วเหลืองที่มีการเติมเชื้อ A. flavus 102566 ลงไปเพียงตัวเดียว จะมีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินชนิด G_1 0.024 ไมโครกรัมต่อกรัมถั่วเหลือง ส่วนสารพิษอะฟลาทอกซินชนิด B_1 ยังไม่มีปรากฏขึ้น ในขณะที่ถั่วเหลืองที่มีการเติมทั้ง R. oligosporus และ A. flavus 102566 ลงไปจะไม่มีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินทั้งชนิด B_1 และ G_1 ซึ่งจะให้ผลเช่นเดียวกับถั่วเหลืองที่มีการเติม R. oligosporus ลงไปตัวเดียว ถั่วเหลืองที่ไม่มีการเติมเชื้อราทั้ง 2 ชนิดลงไป และถั่วเหลืองดิบที่ไม่ผ่านการนึ่ง ซึ่งก็ไม่พบสารพิษอะฟลาทอกซินเช่นเดียวกัน เมื่อเก็บเทมเป้ที่บ่มไว้ 2 วันแล้วนำไปแช่ตู้เย็นไว้เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน พบว่าถั่วเหลืองที่ไม่มีการเติมเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ,ถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการนึ่ง ,ถั่วเหลืองที่มีการเติม R. oligosporus และถั่วเหลืองที่มีการเติมทั้ง R. oligosporus และ A. flavus 102566 จะยังคงให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน คือไม่มีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินปรากฏขึ้นเลย ทั้งชนิด B_1 และ G_1 ส่วนในถั่วเหลืองที่มีการเติม A. flavus 102566 จะพบว่ามีปริมาณอะฟลาทอกซินชนิด B_1 0.111 ไมโครกรัมต่อกรัมถั่วเหลือง และชนิด G_1 0.150 ไมโครกรัมต่อกรัมถั่วเหลือง

จากผลทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าในถั่วเหลืองที่มีการเติมเชื้อรา A. flavus 12566 และ R. oligosporus, ถั่วเหลืองที่มีการเติม R. oligosporus เพียงตัวเดียว, ถั่วเหลืองที่ไม่มีการเติมเชื้อราทั้ง 2 ชนิด และถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการนึ่ง จะไม่พบปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินเลย ในขณะที่ถั่วเหลืองที่มีการเติม A. flavus 102566 จะมีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินทั้งชนิด B_1 และ G_1

ตารางที่ 4-2 ผลของการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดยเชื้อรา R. oligosporus ในเทมเป้

ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน (เฉลี่ย) ไมโครกรัมต่อกรัมถั่วเหลือง	B_1	G_1	Total B_1+G_1
วันที่ 2 (อุณหภูมิห้อง)			
ถั่วเหลืองดิบ	0	0	0
ถั่วเหลืองนึ่ง	0	0	0
ถั่วเหลืองนึ่ง + A. flavus	0	0.024	0.024
ถั่วเหลืองนึ่ง + R. oligosporus	0	0	0
ถั่วเหลืองนึ่ง + A. flavus + R. oligosporus	0	0	0
วันที่ 9 (อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส)			
ถั่วเหลืองดิบ	0	0	0
ถั่วเหลืองนึ่ง	0	0	0
ถั่วเหลืองนึ่ง + A. flavus	0.111	0.150	0.261
ถั่วเหลืองนึ่ง + R. oligosporus	0	0	0
ถั่วเหลืองนึ่ง + A. flavus + R. oligosporus	0	0	0

3. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

เมื่อนำค่าที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ จะพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของอิทธิพล 2 อย่าง คือ ชนิดของเชื้อราที่เติมลงไปในถั่วเหลือง (A) และอายุการเก็บ (B) แต่พบว่า อิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของเชื้อราที่เติมลงไปในถั่วเหลืองกับอายุการเก็บ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังแสดงไว้ในตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

ตารางที่ 4-3 ตารางวิเคราะห์ผล (ANOVA) ของการใช้ R. oligosporus ยับยั้งการการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในเทมเป้

SV	Df	SS	MS	F	Tabular F	
					0.05	0.01
A	4	013049	0.03262	1.45	2.69	4.02
B	1	0.02248	0.02248	1.00	4.17	7.56
A*B	4	0.24290	0.06072	2.70*	2.69	4.02
Error	30	0.67361	0.02245			
Total	39	1.06948	1.06948			

* หมายถึง แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05

หมายเหตุ A หมายถึง ชนิดของเชื้อราที่เติมลงไปในถั่วเหลือง

B หมายถึง อายุการเก็บรักษา

จากผลการทดลองและตรวจผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การเติมเชื้อรา R. oligosporus ลงในถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งแล้วและการเติมเชื้อรา R. oligosporusร่วมกับ A. flavus 102566 ลงในถั่วเหลืองที่ผ่านการนึ่งแล้วจะไม่มีการเกิดสารพิษขึ้นเลย

เมื่อเทียบกับตัวควบคุม คือถั่วเหลืองที่ผ่านและไม่ผ่านการนึ่งโดยไม่มีการเติมสปอร์ของเชื้อราใดๆ ก็จะให้ผลที่ไม่แตกต่างกันทั้งในวันที่ 2 และวันที่ 7 ของการเก็บ แต่ในถั่วเหลืองที่มีสปอร์ของเชื้อรา A. flavus 102566 อยู่เพียงชนิดเดียว ในวันที่ 2 จะมีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินชนิด G_1 ขึ้นเพียงชนิดเดียวเท่านั้น เพราะในช่วง 2 วันแรก เชื้อรา A. flavus 102566 ยังมีการเจริญไม่เต็มที่ แต่หลังจากนั้นเมื่อเก็บถั่วเหลืองไว้อีก 7 วันในตู้เย็น จะมีปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินเพิ่มมากขึ้น และจะมีทั้งชนิด B_1 และ G_1 ปรากฏขึ้น แสดงว่าระยะเวลาในการเก็บก็มีส่วนในการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน นอกจากนี้การใช้เชื้อรา R. oligoporus ร่วมกับ A. flavus 102566 ยังมีผลทำให้ A. flavus 102566 มีการเจริญเติบโตน้อยลงและไม่มีการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

โดยปกติถั่วเหลืองที่ยังไม่ได้ผ่านความร้อน จะไม่พบปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินในถั่วเหลืองเลย เนื่องจากจะมีสารบางอย่างในการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน Gupta และ Venkitasubramanian (1975) รายงานว่า ถ้านำถั่วเหลืองมานึ่งก่อนไปคลุกด้วยเชื้อราที่ผลิตอะฟลาทอกซิน จะมีการสร้างสารพิษได้มากกว่าถั่วเหลืองที่ไม่ได้นึ่ง เนื่องจากในถั่วเหลืองดิบปกติจะมีธาตุสังกะสี รวมอยู่กับกรด phytic เมื่อนำไปนึ่ง กรด phytic จะถูกทำลาย ทำให้ธาตุสังกะสีถูกปลดปล่อยออกมา และธาตุสังกะสีนี้เป็นตัวกระตุ้นการสร้างอะฟลาทอกซินได้ ถ้ามีสปอร์ของเชื้อรา A. flavus 102566 อยู่ นอกจากนี้เมื่อทำการทดลองเติมกรด phytic ลงไปในถั่วเหลืองที่นึ่งและไม่ได้นึ่ง พบว่าการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อราจะลดลงตามปริมาณของกรด phytic ที่เติมลงไปฉะนั้นถั่วเหลืองดิบจึงไม่มีสารพิษอะฟลาทอกซินอยู่ ทำให้ลดปัญหาเรื่องความผิดพลาดในการทดลองเนื่องจากการมีสารพิษอะฟลาทอกซินตกค้างอยู่ก่อนที่จะนำมาทำการทดลองได้

จากการทดลองในถั่วเหลืองที่มีการสร้างสปอร์ของเชื้อราทั้ง A. flavus 102566 และ R. oligosporus เชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีการเจริญแตกต่างกัน โดยที่มีเส้นใยของเชื้อรา R. oligosporus มากกว่าเชื้อรา A. flavus 102566 เพราะในการทดลองนี้จะต้องมีการปรับสภาวะให้เหมาะต่อการทำเทมเป้ ซึ่งหมายความว่าสภาวะนี้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา R. oligosporus ทำให้เชื้อราชนิดนี้เจริญเติบโตได้เต็มที่ ในขณะที่สภาวะดังกล่าวไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อรา A. flavus 102566 อันทำให้น่าจะตั้งสมมติฐานได้ว่า เชื้อรา R. oligosporus สามารถ

ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา A. flavus 102566 ได้ เป็นผลให้การสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินลดลง

Djion และ Hesseltine (1979) สนับสนุนว่าในผลิตภัณฑ์อาหาร **เทมเป้** ซึ่งผลิตโดยใช้เชื้อรา R. oligosporus เป็นส่วนประกอบนั้น R. oligosporus สามารถลดการเจริญเติบโต การสร้างสปอร์และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของ A. flavus และ A. parasiticus ได้ ในสภาวะที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของ R. oligosporus ทั้งความชื้นเริ่มต้นและปริมาณอาหาร ในเทมเป้จะมีความชื้นที่เหมาะสมในการผลิตประมาณ 20-22% ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินซึ่งต้องการความชื้นที่สูงกว่านี้

Chang และ Markakis (1981) รายงานว่าเชื้อราจะสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ดีในอาหารที่มีความชื้นประมาณ 25-31%

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่า เชื้อรา R. oligosporus จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา A. flavus 102566 และการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในเทมเป้ได้ โดยในการยับยั้งการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินนั้นจะต้องควบคุมสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการทำเทมเป้ หรือเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา R. oligosporus ซึ่งจะมีผลให้เชื้อราตัวนี้เจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ ในขณะที่เชื้อรา A. flavus 102566 เจริญเติบโตได้น้อยหรือไม่ได้เลย ทำให้ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินลดลงไปด้วย สรุปได้ว่าเชื้อรา R. oligosporus สามารถที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ ดังนั้นถึงแม้ว่าจะมีการนำถั่วเหลืองที่มีการปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินมาทำการผลิตเทมเป้ ก็จะไม่เกิดการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน เนื่องจากในการผลิตเทมเป้ต้องใช้เชื้อรา R. oligosporus ในการผลิตอยู่แล้ว แต่การทดลองนี้จะให้ผลการทดลองเฉพาะในเทมเป้ที่ทำจากถั่วเหลืองเท่านั้น เนื่องจากในเมล็ดถั่วเหลืองจะไม่มีการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินมาก่อนที่จะทำการผลิต แต่ในกรณีที่เทมเป้ทำมาจากเมล็ดพืชชนิดอื่น ยังหาข้อสรุปไม่ได้เพราะเมล็ดพืชเหล่านั้นอาจจะมีการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินมาก่อนการผลิตก็ได้ จึงควรมีการทดลองกับเทมเป้ที่ทำจากเมล็ดพืชชนิดอื่นต่อไป

ภาคผนวก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ malt extract agar

มีส่วนผสมดังนี้คือ

Malt Extract	30	กรัม
Mycological Peptone	5	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร
ปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง	5.4	

2. วิธีการใส่เชื้อแบบ point inoculation ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร malt extract agar

2.1 เตรียม semisolid suspension โดยมีส่วนผสมดังนี้ คือ

วุ้น	0.2	เปอร์เซ็นต์
tween 80	0.05	เปอร์เซ็นต์
น้ำ	99.75	เปอร์เซ็นต์

นำส่วนผสมต่างๆ มาผสมกันแล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที แล้วนำส่วนผสมต่างๆ ที่ผสมกันแล้ว 0.2-0.4 มิลลิลิตร มาใส่ลงในขวดขนาดเล็กปิดฝาเกลียว แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที

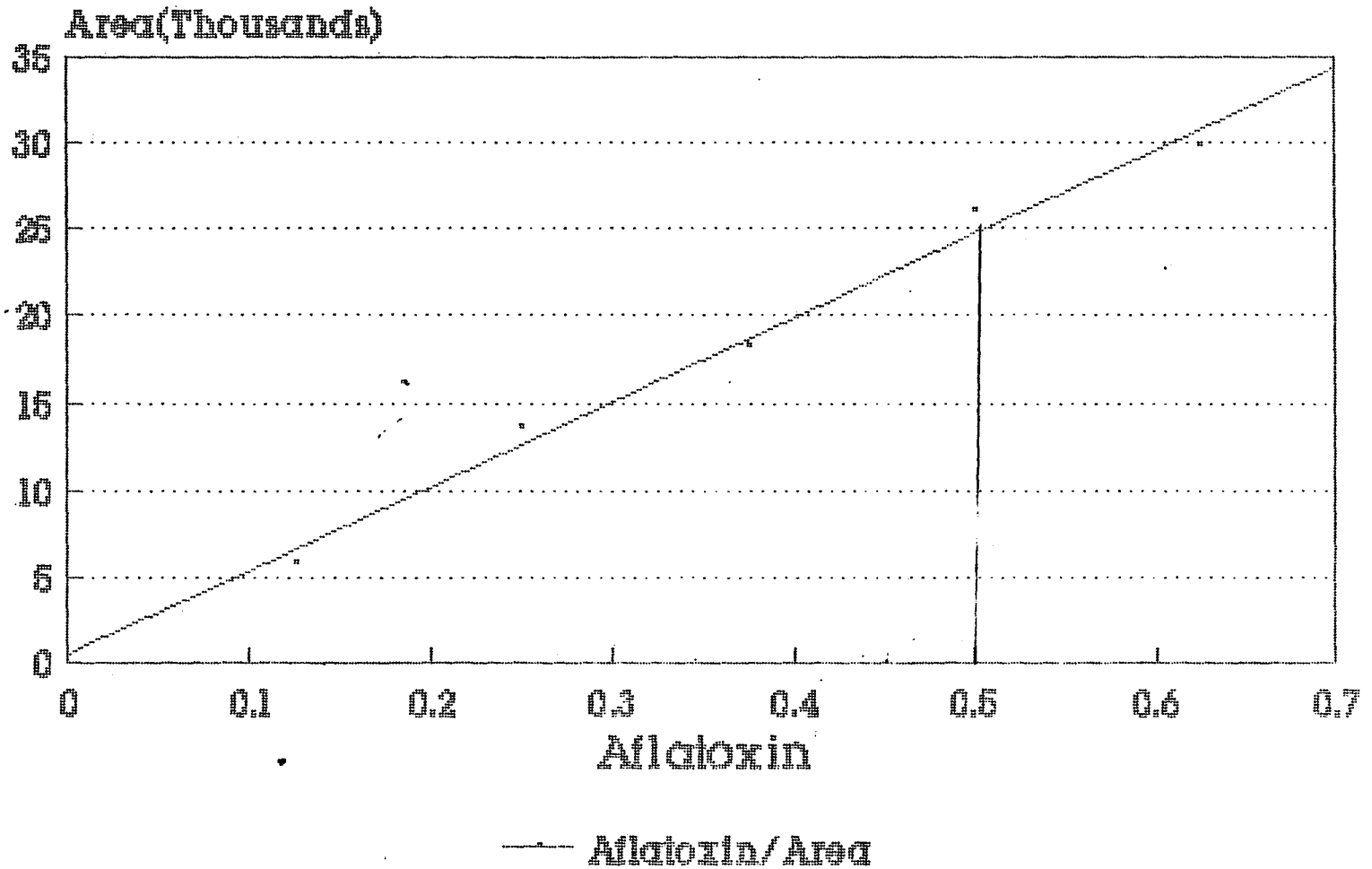
2.2 ถ่ายสปอร์ของเชื้อรา A. flavus 102566 และ R. oligosporus ลงใน suspension ที่เตรียมได้ อย่างละขวด

2.3 การเตรียม diluent เพื่อใช้ทำ spore suspension

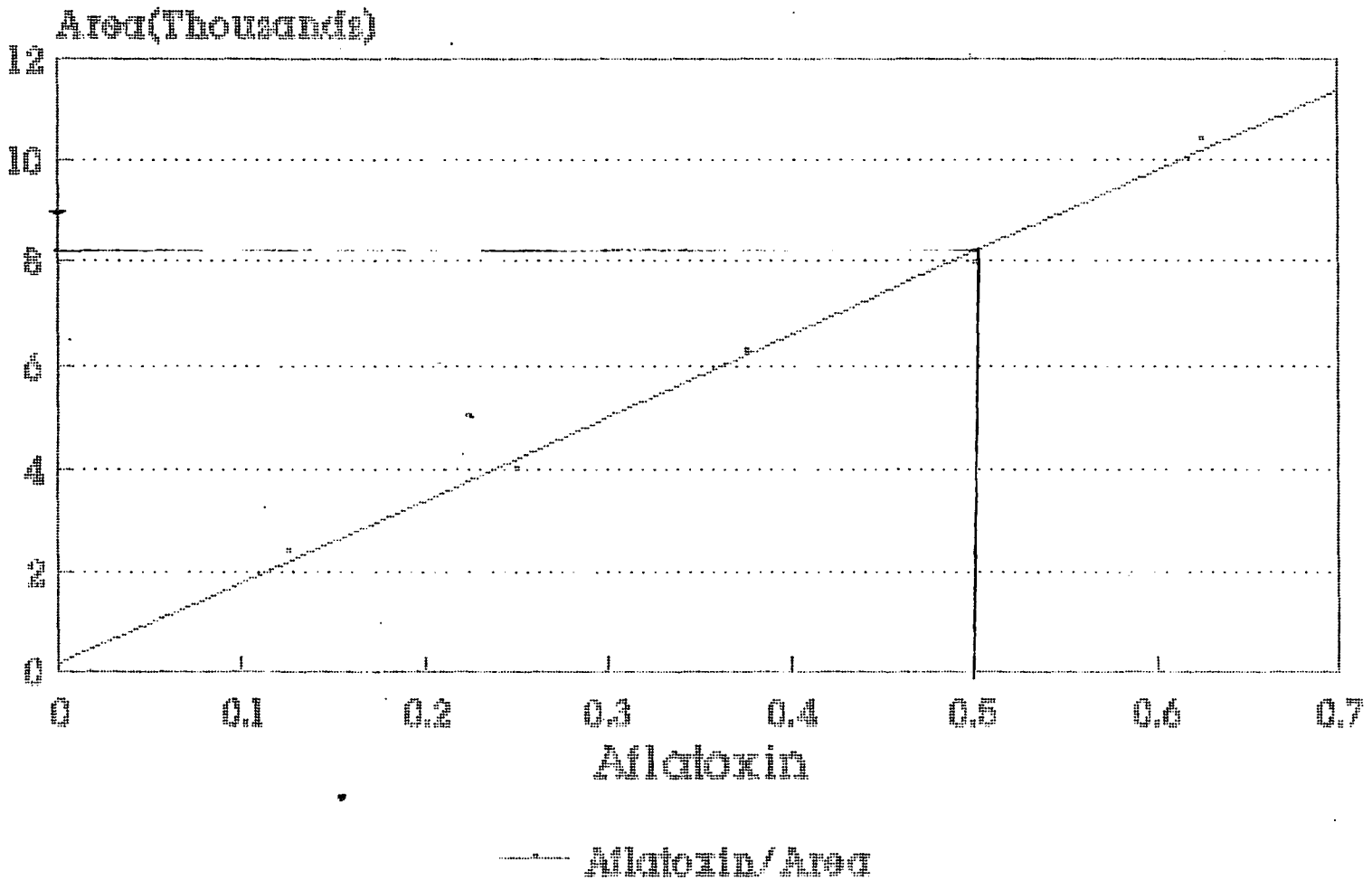
เตรียมโดยผสม Tween 80 0.1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่ง ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที

3. กราฟมาตรฐานของอะฟลาทอกซินชนิด B_1 และ G_1

Aflatoxin_B1



Aflatoxin_G1



เอกสารอ้างอิง

ดุษณี เดโชวิบูลย์. "การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์" จุลสารคณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เนื่องในงานพระจอมเกล้าลาดกระบังนิทรรศน์ '30 2530.

ธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว "อะฟลาทอกซิน (สารพิษจากเชื้อราที่ทำให้เกิดมะเร็งในตับ)" สำนักพิมพ์ ดร. สกล พงศกร, กรุงเทพฯ. 2524.

นรสิงห์ ตระกูล "เชื้อราบ่อนทำลายเศรษฐกิจ" แก่นเกษตร. 5(6). (2520) 269.

ประวัติ ตันบุญเอก, ดารา พวงสุวรรณ และกัญจนา พุทธสมัย "การศึกษาสารเคมีที่มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดสารพิษอะฟลาทอกซิน" กลุ่มงานวิจัยโรคพืชผลิตผลทางการเกษตร กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ 2528.

ปริมณฑ์ กาจนัษฐิติ และสุภร พันธุ์สิทธิกุล "การยับยั้งสารพิษอะฟลาทอกซิน" วารสารวิทยาศาสตร์. 31 (2520) 64-67.

ไมตรี สุทธิจิตต์ "สารพิษและสารอันตรายจากธรรมชาติ" วารสารวิทยาศาสตร์. 39 (2528). 207-222.

อรพิน ถิรวัฒน์ "สารพิษจากเชื้อรา" ก้าวหน้า. 2, (2526) 35-40.

Anynomous Rep. Trop. Prod. Tnst. Processed p. 18 (1962)

Anynomous FDA seizes aflatoxin contaminated peanut butter. Food Proc. 26: 37 (1965).

Anynomous Alarm about aflatoxin. Nature 212: 1512 (1966).

Ashwarth, L.J., Jr., McMeans, J.L., Pyle, J.L., Brown, C.M., Osgood, J.W. and Ponton, R.E. Aflatoxins in cotton seeds: Influence of weathering on toxin content of seeds and on a method for mechanically sorting seed lots. Phytopathology 58: 102 (1968).

Carnaghan, R.B.A. Hepatic tumors in ducks fed a low level of toxic groundnut meal. Nature 298: 308 (1965).

Chong, Y.H. and Beng, C.G. Aflatoxins in unrefined groundnut oils. Med. J. Malaya 20: 49 (1965).

Chong, Y.H. and Beng, C.G. Aflatoxins in groundnut and groundnut products. Med. J. Malaya 2: 228 (1966).

Ciegler, A., Lillehoj, E.B., Peterson, R.E. and Hall, H.H. Microbial detoxification of aflatoxin. Appl. Microbiol. 14: 934 (1966).

Coomes, T.J., Crowther, P.C., Feuell, A.J. and Francis, B.J. Experimental detoxification of groundnut meals containing aflatoxin. Nature 209: 406 (1966).

Cucullu, A.F., Lee, L.s., Mayne, R.Y. and Goldblatt, L.A. Determination of aflatoxins individual peanuts and peanut sections. J. Am. Oil. Chimists' Soc. 43: 89 (1966).

Djien, K.S. Setlf-protection of fermented foods against aflatoxin. Proce. Conggress Food Sci. Technol. 244-253. 1974.

Doll, R., Muir, C. and Waterhouse, J. Cancer incidence in five continents. Vol. I. Geneva: International Union Against Cancer (1966).

Dollear, F.G. and Gardner, H.K. Jr. Inactivation and removal of aflatoxin. Proc. 4th Nat. Peanut Res. Conf. Tifton, Georhia, July 14-15, 1966.

Dwaratanath, C.T., Rayner, E.T. , Mann, G.E. and Dollear, F.G. Reduction of aflatoxin levels in cottonseed and peanut meals by ozonigation. J. Am. Oil Chimists' Soc. 45: 93 (1968).

Feuell, A.J. Aflatoxin in groundnuts. Problems of detoxication. Trop. Sci. 8: 61 (1966).

Gandjar, I. Soybean fermentation and other tempeh products in Indonesia. Hesseltine, C.W. and Wang. H.L. (Eds.). Mycologia Memoir No. 11, Indigenous fermented food of non-western origin. Berlin: I. Cramer, 1986. pp 55-66.

Glinsukon, T. and thamavit, W. and Ruchirawat, M. Studies on the population of toxigenic fungi in market foods and foodstuffs. I. Mycoflora contamination. J. Sci Soc. Thailand 2: 176 (1976)

Goldblatt, L.A. Critical evaluation of aflatoxin detoxification in oilseeds. Conf. Protein - Rich Food Prod. Oilseeds. New Orleans, Louisiana. May 15 - 16, 1968. ARS 72.

Gupta, S.K. and T.A. Venkitasubranian. "Production of aflatoxin on soybeans". Applied Microbiology. 29(6) (1975) 834-836.

Holzenthal, L.L. Gentry, W.T. Jr., and Gastrock, E.A. New approach for the cleaning of cottonseed. Oil Mill Gaz. 60: 19 (1956).

Kaiser, F. Zig-Zah classifier, a windsifter with a novel classifying principle. Vortr. Diskussion on Europacischen Symp. Zerkleinern 1., Frankfurt am Main. pp. 587 (1962).

Lillehoj, E.B., W.F. Kwolek, W.D. Guthrie, D. Barry, W.W. McMillian and N.W. Widstrom "Aflatoxin accumulation in preharvest maize kernels : Interaction of three fungi species, European corn borer and two hybrids". Plant Soil., 65 (1982) 95-102.

Loosmore, R.M., Allcroft, R., Totton, E.A. and Carnaghan, R.B.A. The presence of aflatoxin in a sample of cottonseed cake. Vet. Record 76: 64 (1964).

Majumder, S.K., Narasimhan, K.S., and Parpea, H.A.B. Microecological factors of microbial spoilage and the occurrence of mycotoxins on stored grains. In:Mycotoxins in Foodstuffs (G.N. Wogan, ed.). M.I.T. Press, M.I.T. Cambridge, Massachusetts. p. 27 (1964).

Paker, W.A. and Melnick, D. Absence of aflatoxin from refined vegetable oils. J. Am. Oil Chemists' Soc. 43: 635 (1966).

Priyadarshini, E. and Tulpule, P.G. Aflatoxin production on irradiated foods. Fd. Cosmet. Toxicol. 14: 293 (1976).

Salmon, W.D. and Newberne, P.M. Occurrence of hepatomas in rats fed diets containing peanut meal as amajor source of protein. Cancer Res. 23: 571 (1963).

Sauer, D.B. and R. Burroughs (1980) Fungal growth, aflatoxin production and moisture equilibration in mixtures of wet and dry corn. Phytopathology, 70, 516-521.

Sellschop, J.P.F., Krick, N.P.J. and du Pprssz, J.C.G. Distribution and degree of occurrence of aflatoxin in groundnuts and groundnut products. Symp. Mycotoxins Foodstuffs, Agr. Asppects, Pretoria, South Africa, p. 9 (1965).

Shank, R.C., Wogan, G.N. and Gibson, J.B. Dietary aflatoxins and human liver cancer. I. Toxigenic moulds in foods and foofstuffs of tropical South-east Asia. Fd. Cosmet. Toxicol. 10:51 (1972 a).

Shank, R.C., Wogan, G.N. Gibson, J.B. and Nondasuta, A. Dietary aflatoxins and human liver cancer. II. Aflatoxins in market foods and foodstuffs of Thailand and Hong Kong. Fd. Cosmet. Toxicol. 10: 61 (1972 b).

Shank, R.C. Gordon, J.E., Wogan, G.N., A. Nondasuta and B. Subhamani. Dietary aflatoxins and human liver cancer. Field survey of rural Thai families for ingested aflatoxins. Fd. Cosmet. Tosicol. 10:71 (1972 c).

Sreenivasamurthy, V., Jayaraman, A. and Parpia, H.A.B. Aflatoxin in Indian ppeanuts: Analysis and extraction. In: Mycotoxins in Foodstuffs (G.N. Wogan, ed.). M.I.T. Cambridge, Massachuseth, p. 251 (1965).

Stahel, G. Foods from fermented soybeans II. Tempe, a tropical staple. J.N.Y. Bot. Gard. 47: 285-296; 1946.

Steinkraus, K.H. Handbook of indigenous fermented foods. N.Y.M. Dekker Inc., 1983.

Tuyns, A.J. and Obradovuc, M. Brief communication: Unexpected high incidence of primary liver cancer in Geneva, Switzerland. J. Natl. Cancer Inst. 54: 61 (1975).

Van Dorp, D.A., Van der zijden, A.S.M., Beerthius, R.K.., Sparreboom, Ond, W.O., de Jong, K. and Keuning, R. Dihydro-aflatoxin B, a metabolite of Aspergillus flavus. Remarks on the structure of aflatoxin B. Rec. Trav. Chim. 82: 587 (1963).

Vorster, L.J. Etudes sur la detoxification des arachides contaminees par 1'aflatoxin et destinees a 1'huilerie. Rev. Franc. Corps. 13: 7 (1966).

Wang, H.L. and C.W. Hesseltine "Use of microbial cultures : legume and cereal product". Food Technol., 35(1) (1981) 79.

Whitten, M.E. A rapid screening method for detecting aflatoxins in cottonseed. Contton Gin Oil Mill Press 67: 7 (1966).

Wicklow, D.T., C.W. Hesseltine, O.L. Shotwell and G.L. Adams (1980) Interference competition and aflatoxin levels in corn, Phytopath., 70, 761-764.

Wogan, G.N. and Newberne, P.M. Dose- response characteristics of aflatoxin B_1 carcinogenesis in the rat. Cancer Res. 27: 2370 (1967).