บทที่ 5

สรุปการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยเพื่อศึกษาผลกระทบของเบนโซเอตและโพรพิออนเนตต่อการเจริญและการผลิตแอฟลาทอกซินของ Aspergillus flavus นี้ ผู้วิจัยเลือกใช้เชื้อ A. flavus สายพันธุ์ ATCC 15546 ตลอดการวิจัยด้วยเหตุผลที่ว่า เชื้อสายพันธุ์นี้ผลิตแอฟลาทอกซินได้ปริมาณค่อนข้างมากและคงที่เมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่นในตระกูลเดียวกัน ดังนั้นผลกระทบเนื่องจากสารยับยั้งที่มีต่อการเจริญและการผลิตแอฟลาทอกซินของเชื้อนี้ควรจะเป็นไปในทำนองเดียวกันกับเชื้อสายพันธุ์อื่นในตระกูลเดียวกันด้วย

การเลือกใช้ปริมาณกลูโคซามีนเป็นตัวบ่งชี้การเจริญของเชื้อราในอาหารสังเคราะห์ชนิดเหลวร่วมกับการติดตามน้ำหนักแห้งของเส้นใยไมซีเลียม เนื่องจากปริมาณกลูโคซามีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของไคติน (chitin) ในผนังเซลล์ของเชื้อรามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับหน่วยเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโต อายุ และปริมาณไมซีเลียมของเชื้อ (Cochran และ Vercellotti , 1978) และอีกประการหนึ่ง คือ การหาปริมาณกลูโคซามีนอาศัยปฏิกิริยาเคมีโดยตรง จึงให้ผลละเอียด แน่นอน และน่าเชื่อถือได้มากกว่าการหาน้ำหนักแห้งเพียงอย่างเดียวซึ่งมีโอกาสที่จะมีตัวแปรมาเกี่ยวข้องได้มากกว่า

การเลือกวิธีสกัดและวิเคราะห์ปริมาณแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ที่เชื้อราผลิตจาก Potato Dextrose Broth แทนที่จะวิเคราะห์จากตัวเชื้อราเองนั้น เนื่องจากว่าแอฟลาทอกซินเป็นสารที่เชื้อผลิตแล้วปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อม (เป็น exotoxin) ที่เป็นปัญหาอยู่ในปัจจุบันก็เนื่องมาจากการปนเปื้อนของสารพิษที่เชื้อปล่อยออกมาในอาหารต่าง ๆ ดังนั้น การที่จะศึกษาเพื่อควบคุมปัญหาเนื่องจากสารพิษชนิดนี้จึงควรต้องทำในสภาพที่ใกล้เคียงกับสิ่งที่เป็นปัญหาอยู่ตามธรรมชาติให้มากที่สุด อีกประการ

หนึ่งก็คือจากการวิเคราะห์ปริมาณแอฟลาทอกซินในไมซีเลียมนั้น ผู้วิจัยพบว่าไมซีเลียมมีปริมาณสารพิษน้อยกว่า คือประมาณ 30 % ของแอฟลาทอกซินที่เชื้อปล่อยออกมาใน Potato Dextrose Broth โดยตลอดระยะเวลา 28 วันของการทดลอง

จากการศึกษาของนวลศรี พิชิตปัจจา (1977) เกี่ยวกับความไวของวิธีวิเคราะห์หาแอฟลาทอกซินโดย thin layer chromatography พบว่า ที่ปริมาณแอฟลาทอกซิน บี$_1$ มาตรฐานตั้งแต่ 8 นาโนกรัมขึ้นไป สามารถมองเห็นการเรืองแสงของแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ที่ใช้ได้ด้วยตาเปล่า และจากการทดลองของผู้วิจัยเอง พบว่าปริมาณแอฟลาทอกซิน บี$_1$ มาตรฐานที่หยดลงบนแผ่นซิลิกาเจลโดยตรงตั้งแต่ 4 นาโนกรัมขึ้นไปเท่านั้นที่เรืองแสงให้เห็นด้วยตาเปล่าได้ แสดงว่าวิธีวิเคราะห์ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้เป็นวิธีที่มีความไวเพียงพอ

จาก % recovery ของการสกัดแอฟลาทอกซินเป็น 62.5 แต่ % recevery ของการชะล้างสารพิษนี้จากซิลิกาเจลสูงถึง 95 % แสดงว่ามีการสูญเสียแอฟลาทอกซินไปในการสกัดเป็นจำนวนมาก ในการใช้ photofluorometer วัดปริมาณแอฟลาทอกซิน บี$_1$ พบว่า ปริมาณต่ำสุดที่วัดได้อย่างถูกต้องคือ 50 นาโนกรัม เมื่อทำกราฟมาตรฐานของแอฟลาทอกซิน บี$_1$ พบว่าปริมาณสารพิษตั้งแต่ 0.1 ถึง 1.2 ไมโครกรัมมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับค่าการเรืองแสงสัมพัทธ์

เมื่อพิจารณารูปแบบการผลิตแอฟลาทอกซิน บี$_1$ เปรียบเทียบกับปริมาณกลูโคซามีนตลอดการทดลอง เกี่ยวกับการเจริญของเชื้อราที่ใช้ มีข้อน่าสังเกตว่าในช่วงที่ปริมาณแอฟลาทอกซินลดลงในระหว่างวันที่ 4 ถึงวันที่ 6 ของการทดลองนั้น เป็นระยะ exponential log phase ของการเจริญของเชื้อพอดี และหลังจากนั้นเมื่อเชื้อเริ่มเจริญช้าลงและเข้าสู่ stationary phase ปริมาณสารพิษดังกล่าวกลับเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ปรากฏการณ์เหล่านี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อราน่าจะใช้พลังงานจากแหล่งเดียวกันทั้งในการเจริญเติบโตและการผลิตแอฟลาทอกซิน การลดลงของสารพิษในระยะดังกล่าวคล้ายคลึงกับผลการทดลองในรายงานของ Ciegler (1966) หลังจากวันที่ 14 หลังการเพาะเชื้อพบว่าปริมาณแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ลดลงโดยตลอดจนกระทั่งถึงวันสุดท้ายของการทดลอง ทั้งนี้อาจเป็นไปเพราะว่าเชื้ออยู่ในอาหารชนิดเดียวมาเป็นเวลานาน เมื่อเชื้อเจริญถึง stationary phase แล้วจึงมีการสลายตัวของไมซีเลียมซึ่งเป็นไปอย่างไม่จำเพาะ

เจาะจง ไม่ขึ้นกับปริมาณแอฟลาทอกซิน และไม่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของ เอ็นไซม์ (Ciegler , 1966)

ผู้วิจัยได้เลือกใช้กรดเบนโซอิคและกรดโพรพิออนนิค เป็นสารยับยั้งในครั้งนี้ เนื่องจากกรดทั้งสองมีคุณสมบัติเป็นสารต่อต้านจุลชีพและนิยมใช้เป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมด้านอาหารตลอดจนได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาหรือหน่วยงานคล้ายคลึงกันทั่วโลกแล้วว่า ในปริมาณที่ใช้เป็นสารกันเสียอย่างได้ผลนั้น ปลอดภัยต่อผู้บริโภค จากรายงานของ Uraih และคณะ (1977) และ Vandegraft และคณะ (1975) ทำให้ทราบว่ากรดทั้งสองออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและการผลิตแอฟลาทอกซินของเชื้อราได้ แต่ปริมาณที่ใช้ยับยั้งได้สมบูรณ์นั้น สูงเกินระดับอนุญาตตามมาตรฐานสากล จึงได้แนวคิดว่าหากนำกรดทั้งสองชนิดมาทดลองใช้ในรูปของส่วนผสมในปริมาณที่เหมาะสม อาจออกฤทธิ์เสริมแรงกันในการยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษดังกล่าวได้อย่างสมบูรณ์โดยปริมาณที่ใช้อยู่ในระดับอนุญาตตามมาตรฐานสากลได้ ซึ่งเมื่อทำการทดลองแล้วได้ผลดังที่คาดหมายไว้คือ ปริมาณกรดเบนโซอิคและกรดโพรพิออนนิคในรูปของส่วนผสมที่ใช้ระงับการเจริญและการผลิตแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ของเชื้อราได้สมบูรณ์คือ 20 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของ PDB มีข้อสังเกตว่ากรดเบนโซอิคออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ได้มากกว่าการเจริญ ส่วนกรดโพรพิออนนิคยับยั้งการเจริญได้มากกว่าการผลิตแอฟลาทอกซิน บี$_1$ กรณีใช้ในรูปของส่วนผสม กรดทั้งสองออกฤทธิ์เสริมแรงกันในการยับยั้งการผลิตแอฟลาทอกซินได้มากกว่าการเจริญ เมื่อทดลองประยุกต์ใช้กับถั่วลิสงและข้าวโพดพบว่า ต้องใช้ปริมาณกรดทั้งสองมากกว่าเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อคือ Potato Dextrose Broth ถึง 10 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนเชื้อที่ใช้ในการทดลองเกี่ยวกับถั่วลิสงและข้าวโพดมากกว่าที่ใช้ในกรณี broth 10 เท่า และอาจเป็นเพราะใน broth มีการกระจายของกรดทั้งสองได้ดีกว่าจึงมีโอกาสสัมผัสกับเชื้อได้มากกว่าเมื่อใช้บนเมล็ดถั่วลิสงและข้าวโพด มีข้อน่าสังเกตอีกประการหนึ่งคือกรดทั้งสองแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนเมล็ดข้าวโพดได้ดีกว่าบนถั่วลิสง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมวลของเมล็ดข้าวโพดมีความชื้นมากกว่าและไม่อัดตัวกันแน่นเท่าในเมล็ดถั่วลิสง กรดที่ใช้จึงสามารถซึมเข้าไปและป้องกันการเจริญของเชื้อได้ดีกว่า ประการสุดท้ายคือ กรดโพรพิออนนิคแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อบนเมล็ดถั่วลิสงและข้าวโพดได้ดีกว่ากรดเบนโซอิค เช่นเดียวกับใน broth ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกรด

โพรพิออนนิคละลายน้ำได้ดีกว่าจึงซึมแทรกเข้าไปในเนื้ออาหารได้ดีกว่า เมื่อทดลองใช้กรดทั้งสองในการศึกษาผลกระทบต่อการผลิตแอฟลาทอกซิน บี$_1$ จาก [1-^{14}C] acetate เมื่อใช้กรดแต่ละชนิดเพียงเดี่ยว ๆ ได้ผลสอดคล้องกัน คือ กรดเบนโซอิคออกฤทธิ์ยับยั้งการผลิตสารพิษนี้ได้มากกว่ากรดโพรพิออนนิค เมื่อใช้ในรูปของส่วนผสมที่ความเข้มข้นของกรดทั้งสองเป็น 30 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของ PDB ปรากฏว่ากรดทั้งสองไม่แสดงว่าเสริมฤทธิ์กัน เมื่อเทียบกับการใช้กรดเบนโซอิคเพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้นเท่ากันนี้ แต่แสดงว่ากรดเบนโซอิคเสริมแรงกรดโพรพิออนนิคในการยับยั้งการผลิตสารพิษดังกล่าวเพียงฝ่ายเดียว ผลการยับยั้งการผลิตสารพิษในการศึกษาด้วย [1-^{14}C] อะซีเตทนี้ ต่างจากกรณีศึกษาด้วยวิธี fluorometry ทั้งนี้เป็นเพราะการศึกษาการผลิตแอฟลาทอกซิน บี$_1$ จาก [1-^{14}C] อะซีเตทเป็นการหาปริมาณสารพิษนี้ในไมซีเลียมซึ่งไม่มีการเจริญ (เป็น non-growing mycelium) ส่วนวิธี fluorometry เป็นการหาปริมาณแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ที่เชื้อปล่อยออกมาสู่ broth ในขณะที่เชื้อมีการเจริญด้วย อย่างไรก็ตาม เมื่อศึกษารูปแบบของการผลิตแอฟลาทอกซิน บี$_1$ ทั้งที่ปล่อยออกมานอกเซลล์และในไมซีเลียมเองจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันและมีความสัมพันธ์กันถึงแม้ว่าปริมาณของสารพิษนี้ที่พบในไมซีเลียมจะต่ำกว่าภายนอกเกือบ 3 เท่า การออกฤทธิ์ของกรดเบนโซอิคอาจเนื่องจากกรดนี้ทำปฏิกิริยา acylation กับไรโบนิวคลีโอไทด์ (Cedergren และคณะ, 1971) เป็นผลให้การสังเคราะห์ อาร์ เอ็น เอ และโปรตีนถูกระงับ และ/หรือกรดนี้อาจยับยั้งเอ็นไซม์ sodium-potassium ATPase แบบไม่ย้อนกลับ (Tobin และคณะ, 1975) ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ lactate dehydrogenase isoenzymes (Rothe, 1976) และยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ adenosine triphosphatase ในไมโตคอนเดรียด้วย (Kozlov และคณะ, 1979) ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นเอ็นไซม์ที่จำเป็นในการเจริญและการสร้างพลังงานของสิ่งมีชีวิตทั่วไป นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เอ็นไซม์ส่วนใหญ่ที่ใช้ผลิตแอฟลาทอกซินอยู่ในไมโตคอนเดรีย (Viswanathan และคณะ, 1969) ดังนั้น เมื่อเอ็นไซม์เหล่านี้ถูกกระทบโดยกรดเบนโซอิค การผลิตแอฟลาทอกซิน บี$_1$ จึงลดลงจนเมื่อความเข้มข้นของกรดนี้มากพอสามารถยับยั้งการผลิตสารพิษนี้ได้อย่างสมบูรณ์ กรณีกรดโพรพิออนนิคน่าจะออกฤทธิ์โดยการกระตุ้นขบวนการออกซิเดทีฟต่าง ๆ เป็นผลทำให้คาร์โบไฮเดรท

โปรตีน และไขมันลดลง (Ibragimova และ Sakharova , 1974) ซึ่งสารทั้ง 3 พวกนี้จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราอยู่แล้ว การที่กรดนี้ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนได้ (Arnaiz และคณะ, 1975 ; Weeks และคณะ, 1972 ; Maragoudakis , 1972 ; และ Aspart , 1978) ทำให้ขาดเอ็นไซม์ที่จำเป็นทั้งในการเจริญและการผลิตแอฟลาทอกซิน นอกจากนี้ Taylor และคณะ (1973) ได้รายงานว่ากรดนี้ลดอัตราการเปลี่ยน ^{14}C-acetate ไปเป็น $^{14}CO_2$ ด้วย

ผลการวิจัยทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นชัดเจนว่า กรดเบนโซอิคและกรดโพรพิออนนิคสามารถออกฤทธิ์เสริมแรงกันในการยับยั้งการเจริญและการผลิตแอฟลาทอกซิน บี[1] ของเชื้อรา A. flavus ATCC 15546 ทั้งในอาหารสังเคราะห์ ถั่วลิสง และข้าวโพดได้ โดยปริมาณที่ใช้ยับยั้งได้สมบูรณ์อยู่ในระดับอนุญาตตามมาตรฐานสากล แต่ก่อนที่จะนำไปเผยแพร่เพื่อใช้กับผลิตผลทางเกษตรกรรมควรต้องทำการวิจัยต่อไปด้วยว่า ในระดับที่ใช้ยับยั้งการเจริญและการผลิตแอฟลาทอกซินอย่างได้ผลนั้นปลอดภัยต่อผู้บริโภคหรือไม่เพียงไร เป็นที่น่าสังเกตว่า สำหรับกรดเบนโซอิคนั้น หากใช้ในปริมาณที่มากเกินไปอาจทำให้เกิดอาการแพ้แบบ urticaria (Clemmensen และคณะ, 1982) หรืออาจทำให้เกิด anaphylactic shock ได้ (Pevny และคณะ, 1981) ส่วนกรณีกรดโพรพิออนนิคอาจทำให้เกิดความผิดปรกติต่อไปนี้ได้ คือ หลอดลมตีบในคนเป็นหืด (Cohen และคณะ, 1982) ผมและขนงอกงามมากและเร็วกว่าปรกติ (Fenton และคณะ, 1982) เยื่อบุกระเพาะอาหารถูกทำลาย (Rainsford และคณะ, 1982) เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophils และเกล็ดเลือดน้อยลง (Leen และคณะ, 1982) ท่อน้ำดีอุดตันในผู้สูงอายุ (Taggart และคณะ, 1982) เลือดออกในกระเพาะอาหาร (Halsey และคณะ, 1982) จากฤทธิ์ข้างเคียงของกรดทั้งสองดังที่กล่าวมาแล้ว จึงน่าทำการวิจัยต่อไปเพื่อพิสูจน์ด้วยว่า กรดทั้งสองจะออกฤทธิ์เสริมแรงกันอย่างไรหรือไม่ต่อผู้บริโภค

ในการทดลองครั้งนี้พบว่า ปริมาณกรดเบนโซอิคและกรดโพรพิออนนิคที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเชื้อ A. flavus ATCC15546 บนเมล็ดถั่วลิสงและเมล็ดข้าวโพดอย่างได้ผลสมบูรณ์ที่ 100 – 200 มิลลิกรัมเปอร์เซนต์ในกรณีกรดเบนโซอิค และ 200 – 300 มิลลิกรัมเปอร์เซนต์ในกรณีกรดโพรพิออนนิค อยู่ในระดับอนุญาตตามมาตรฐานสากล

คือ 0.1 – 0.2 และ 0.2 – 0.4 เปอร์เซนต์สำหรับกรดเบนโซอิคและกรดโพรพิออนนิคตามลำดับ (บัญชีวัตถุเจือปนในอาหาร :พระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหาร , 2510) ดังนั้น หากนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการปรับปรุงวิธีการให้เหมาะสมน่าจะไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค รวมทั้งค่าใช้จ่ายที่ต้องใช้เพิ่มเติมจากปัจจุบันที่ไม่ได้มีการใช้กรดทั้งสองชนิดนี้ในการป้องกันการเจริญของเชื้อราต้นเหตุการผลิตแอฟลาทอกซินในถั่วลิสงและข้าวโพดก็ไม่สูงนักเพราะกรดทั้ง 2 ชนิดนี้หาได้ง่ายและราคาถูก เมื่อสามารถควบคุมเชื้อราต้นเหตุการผลิตสารพิษดังกล่าวได้แล้ว ย่อมจะช่วยให้การจำหน่ายและโดยเฉพาะอย่างยิ่งการส่งออกเพื่อจำหน่ายยังต่างประเทศดีขึ้นกว่าปัจจุบัน อันเป็นการแก้ไขปัญหาทางเกษตรกรรมและเศรษฐกิจของเกษตรกรไทย ตลอดจนแก้ปัญหาด้านสุขภาพของประชาชนที่ปัจจุบันต้องเผชิญกับอันตรายจากแอฟลาทอกซินอยู่เป็นประจำได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย