หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันนี้ แอฟลาทอกซินยังคง เป็นสา เหตุก่อให้ เกิดความ เสียหายทาง เกษตร กรรม เศรษฐกิจ และสุขภาพของประชากรทั่วโลกอยู่ ได้มีผู้ทำการศึกษา เกี่ยวกับแอฟลา-ทอกซินอย่างกว้างขวางในแง่ต่าง ๆ เช่น การผลิต แหล่งที่พบ การทำให้ เกิดพยาธิสภาพ ทั้งในคนและสัตว์ การทำลายพิษ และการควบคุมการผลิต ข่าวสารที่ปรากฏทำให้ประชาชน ตื่นตัวและระมัดระวังในการบริโภคมากขึ้น แต่นั่น เป็นการป้องกันที่ปลาย เหตุ ส่วนการป้องกัน ในแง่การควบคุมการผลิตสารพิษชนิดนี้ซึ่ง เป็นการป้องกันที่ต้น เหตุยังทำไม่ได้ผลสำ เร็จอย่าง เต็มที่ ประ เทศไทยมีประชากรส่วนใหญ่ เป็น เกษตรกรซึ่งได้รับผลกระทบโดยตรง เมื่อต่าง ประ เทศปฏิ เสธการรับซื้อสินค้า ไทย เฉพาะอย่างยิ่งถั่วลิสงและข้าวโพด เนื่องจากผลิตผล เหล่านั้นมีแอฟลาทอกซินปน เปื้อนอยู่ เป็นปริมาณมากกว่าที่ประ เทศนั้น ๆ ยอมรับได้[1] นอกจากนี้ ประชากรทั่วไปที่จำ เป็นต้องบริโภคอาหาร เหล่านั้นตลอดจน อาหารอื่นที่มีแอฟลาทอกซินปน-เปื้อนอยู่โดยไม่มีทางทราบ เพื่อจะได้หลีก เลี่ยงอย่างทันท่วงที ต้อง เผชิญกับอัตราการ เสี่ยงต่อ การ เกิดพยาธิสภาพ เนื่องจากสารพิษชนิดนี้ เป็นอย่างมาก

เพื่อให้ เกิดความ เข้าใจในงานวิจัยนี้อย่างถ่องแท้ ผู้วิจัยจึงสรุปความรู้พื้นฐานที่ เกี่ยวข้องกับการวิจัยไว้โดยสัง เขป คือ

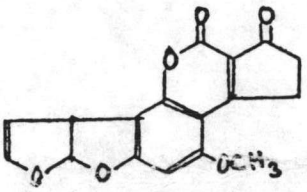
แอฟลาทอกซิน

1. คุณสมบัติทั่วไป

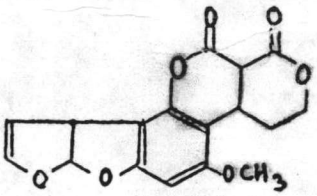
แอฟลาทอกซิน เป็น secondary metabolites ของ เชื้อราบางชนิด มีสูตรโครงสร้างหลัก เป็น coumarin nucleus เชื่อมต่อกับ bifuran ring เมื่ออยู่ใต้ แสง เหนือม่วงจะ เรืองแสง 2 แบบคือ เรืองแสงสีฟ้าและ เรืองแสงสี เขียว พวกที่ เรืองแสง สีฟ้าซึ่งได้แก่แอฟลาทอกซินกลุ่มบีและ เอ็ม และพวกที่ เรืองแสงสี เขียวซึ่งได้แก่แอฟลาทอกซิน กลุ่มจี มี pentanone ring และ lactone ring เชื่อมต่อกับโครงสร้างหลักที่กล่าว แล้วตามลำดับ

---

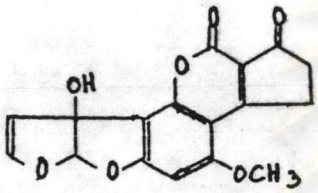
[1]จากรายการสนทนาปัญหาบ้าน เมือง เดือนพฤศจิกายน 2527 สถานี โทรทัศน์ช่อง 5 โดยนายยุกติ สาริกะภูติ อธิบดีกรมวิชาการ เกษตร กระทรวง เกษตรและสหกรณ์และคณะ



Aflatoxin B_1



Aflatoxin G_1



Aflatoxin M_1

ตัวอย่างโครงสร้างของแอฟลาทอกซินกลุ่มต่าง ๆ (Maggon และคณะ, 1977)

2. <u>แหล่งที่พบ</u>

เชื้อราที่ผลิตแอฟลาทอกซิน เป็น exotoxin ได้มีอยู่ทั่วไปทั้งในดิน น้ำ และอากาศในบรรดาเชื้อราหลายชนิดที่ผลิตแอฟลาทอกซินได้นี้ <u>Aspergillus flavus</u>, <u>Aspergillus parasiticus</u> และ <u>Penicillium puberulum</u> เป็นเชื้อรากลุ่มสำคัญที่ผลิตสารพิษดังกล่าวได้เป็นปริมาณมากเมื่อเทียบกับเชื้อราชนิดอื่น ๆ . เนื่องจากสปอร์ของเชื้อราเหล่านี้มีขนาดเล็ก และเบาจึงฟุ้งกระจายไปได้ทั่วไปในอากาศ เมื่อไปตกในที่ที่มีความสมบูรณ์และสภาวะแวดล้อมเหมาะสมก็จะงอกเป็นไมซีเลียมและผลิตแอฟลาทอกซิน ณ ที่นั้น ดังนั้นอาหารต่าง ๆ ทั้งที่เป็นอาหารสำเร็จรูปหรือที่ยังไม่ได้ปรุง จึงมีโอกาสปนเปื้อนด้วยสารพิษนี้ได้ง่าย อาหารต่าง ๆ ที่มักพบว่ามีแอฟลาทอกซินปนเปื้อนอยู่ได้แก่ ถั่วลิสง ข้าวโพด ข้าวต่าง ๆ มันสำปะหลัง ปลาแห้ง กุ้งแห้ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบได้ในน้ำมันพืช (Abalaka และคณะ, 1982) เนยแข็ง (Bullerman, 1977) ไส้กรอก (Guergue

และคณะ, 1977) ผลไม้หลายชนิด เช่นอินทผลัม (Buchanan และคณะ, 1975) สตรอเบอรี่ (Llewellyn และคณะ, 1982) เครื่องดื่มและของหมักดอง(Sripathomswat และคณะ, 1981) ซึ่งอาหารที่มีโอกาสปนเปื้อนด้วยแอฟลาทอกซินนี้จะแตกต่างกันไปตามสภาพทางภูมิศาสตร์ วิธีการผลิตและเก็บรักษาอาหาร และชนิดของอาหารที่เหมาะสมกับเชื้อราแต่ละชนิด

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต

(1) ความชื้นของอาหารและความชื้นสัมพัทธ์ Majumder และคณะ (1965) รายงานว่าความชื้น 8 และ 12.5 – 13.5 % สำหรับถั่วลิสงและข้าวโพดตามลำดับและความชื้นสัมพัทธ์ 85 % ขึ้นไป (Schroeder , 1969) ช่วยให้เชื้อราผลิตแอฟลาทอกซินได้ดี

(2) อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25° - 30° ซ (Diener, 1969 ; Reddy 1972 a และ b)

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิตแอฟลาทอกซิน ซึ่งได้แก่แร่ธาตุต่าง ๆ ปริมาณออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์, ชนิดและลักษณะของอาหาร ซึ่งทั้งหมดนี้จะต้องพอเหมาะ เชื้อราจึงจะผลิตสารพิษดังกล่าวได้เต็มที่ สายพันธุ์และสกุลของเชื้อราก็มีผลต่อการผลิตสารพิษนี้เช่นกัน

4. การทำให้เกิดพยาธิสภาพ

ในบรรดาอนุพันธ์ทั้งหมดของแอฟลาทอกซิน มีเพียง 6 ชนิดที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพในคนคือ แอฟลาทอกซิน บี$_1$, บี$_2$, จี$_1$, จี$_2$, เอ็ม$_1$ และเอ็ม$_2$ โดยพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นได้แก่ Reye's syndrome หรือ Encephalopathy and fatty degeneration of the viscera, hepatitis, Indian childhood cirrhosis และ hepatocellular carcinoma (Anukarahanonta, 1983)

จากการทดลองในลูกเป็ดอายุ 1 วัน (น้ำหนักเฉลี่ย 50 กรัม) ซึ่งเป็นสัตว์ที่จะแสดงอาการตอบสนองต่อสารพิษนี้ได้เร็วที่สุด พบว่า LD_{50} สำหรับแอฟลาทอกซิน บี$_1$, บี$_2$, จี$_1$ และจี$_2$ เป็น 18.2, 84.8, 39.2 และ 172.5 ไมโครกรัมตามลำดับ (Carnaghan, 1963)

ในแง่การเป็นสารก่อมะเร็ง Newberne และ Butler (1969) รายงานว่าเพียงปริมาณ 15 ส่วนในล้านล้านส่วนก็เพียงพอที่จะทำให้เกิดมะเร็งได้ในปลา, นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม Hesseltine (1974) และ Ueno (1983) สรุปว่าในบรรดาสารเคมี ที่ก่อให้เกิดมะเร็งได้นั้น แอฟลาทอกซิน บี$_1$ มีความร้ายแรงที่สุด

5. การออกฤทธิ์

ตัวแอฟลาทอกซิน บี$_1$ เองไม่เป็นพิษ แต่เมื่อรับประทานเข้าไปแล้วจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอ็นไซม์ในไซโตซอลของตับให้กลายเป็นแอฟลาทอกซิคอล จากนั้นเอ็นไซม์ในไมโครโซมจะเปลี่ยนต่อไปให้กลายเป็นแอฟลาทอกซิน เอ็ม$_1$, พี$_1$, คิว$_1$ และอีพอกไซด์ ซึ่งสารตัวสุดท้ายนี้จะจับกับเบสกวานีนในโมเลกุลของดีเอ็นเอได้เป็นเวลานาน ทำให้การสังเคราะห์ อาร์เอ็นเอ และโปรตีนถูกยับยั้ง

6. การผลิตแอฟลาทอกซินโดย non-growing mycelium

เนื่องจากอะซีเตทเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสังเคราะห์แอฟลาทอกซิน จึงนิยมใช้สารชนิดนี้ในรูปของกัมมันตภาพรังสีในการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตแอฟลาทอกซินโดยเชื้อราต่าง ๆ

ดังได้ทราบแล้วว่า แอฟลาทอกซินเป็น secondary metabolites ซึ่งเชื้อราผลิตขึ้นเมื่อเริ่มเข้าสู่ stationary phase Gupta และคณะ (1975) จึงเลือกใช้ non-growing mycelium ในการศึกษาผลของสารเคมีต่าง ๆ ต่อการผลิตแอฟลาทอกซินของเชื้อ A.parasiticus NRRL 3240 โดยไม่มีอิทธิพลของการเจริญของเชื้อมาเกี่ยวข้องด้วยเชื้อที่ใช้ในการทดลองเป็นเชื้ออายุ 4 วัน ซึ่งเป็นระยะที่เชื้อสามารถจับสารรังสีได้มากที่สุด คณะผู้ทำการทดลองได้สะกัดแอฟลาทอกซินจากเส้นใยไมซีเลียมของเชื้อ เนื่องจากเชื้อในลักษณะดังกล่าวเก็บกักแอฟลาทอกซินส่วนใหญ่ไว้ภายในเซลล์

7. การป้องกัน

การป้องกันการปนเปื้อนของแอฟลาทอกซิน ทำได้โดยการคัดเมล็ดธัญญพืชที่เสียหายทิ้ง การเก็บเกี่ยวก่อนเวลาปรกติและการอบแห้ง (Rodricks, 1976) การคัดเลือกพันธุ์ที่ไม่สร้างสารพิษนี้ (พวงสุวรรณ, รายงานการวิจัย เลขที่ทะเบียนวิจัย 25 11 13 02 02 01)

8. สาร เคมีที่ใช้ควบคุมปัญหาแอฟลาทอกซิน

ในการควบคุมปัญหาแอฟลาทอกซินปน เปื้อนในผลิตผลทาง เกษตรกรรม และอาหารต่าง ๆ นั้น ทำได้ 2 วิธี คือ การทำลายพิษ ซึ่ง เป็นการควบคุมที่ปลาย เหตุ และการป้องกันการผลิต โดยควบคุมทั้งการ เจริญและการผลิตสารพิษนี้โดย เชื้อราอัน เป็น การควบคุมที่ต้น เหตุ สาร เคมีที่นิยมใช้ในการทำลายพิษของแอฟลาทอกซินมีหลายชนิด เช่น กาซแอมโมเนีย (Brekke และคณะ, 1977) แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ไฮโดร เจน เปอร์ออกไซด์ ฟอร์มาลดีไฮด์ แคล เซียมไฮดรอกไซด์ ส่วนสาร เคมีที่ใช้ป้องกันการผลิต แอฟลาทอกซิน ได้แก่ กาซคาร์บอนมอนอกไซด์ (El-Goorani , 1979) กรดโพรพิ ออนนิค (Müller และ Thaler, 1981) อนุพันธ์ของกรด เบนโซอิค โปแตส เซียม ซัลไฟต์ และ โปแตส เซียมฟลูออไรด์ (Davis และ Diener, 1967) ไดคลอวอส (Rao และ Harein, 1972) เป็นต้น เมื่อพิจารณาถึงความปลอดภัยในการบริโภค แล้ว สารกัน เสียที่นิยมใช้กับอาหารทั่ว ๆ ไปน่าจะ เหมาะสมที่จะ เลือกใช้กับผลิตผลทาง เกษตรกรรมและอาหารอื่น ๆ ในการพยายามควบคุมปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้พิจารณา ใช้กรด เบนโซอิคและกรดโพรพิออนนิคในการวิจัยครั้งนี้

8.1 กรด เบนโซอิค

เป็นสารกัน เสียที่นิยมใช้ในการ เก็บและถนอมอาหารมากที่สุดในปัจจุบัน พบในผลไม้ที่มีรส เปรี้ยวบางชนิด เช่น ลูกพรุนส์ เป็นต้น ปรกติ เป็นผลึกละ เอียดสีขาว ไม่สลายตัวง่าย มีรสหวานปนฝาด ละลายน้ำได้ 30 % ออกฤทธิ์ได้ที่ pH 2.5 ถึง 4 ระดับอนุญาตให้ใช้ตามมาตรฐานสากลคือ 0.1 %ของอาหารและ 0.2 %ของยา หลังจาก เข้าสู่ร่างกายแล้ว ส่วนใหญ่จะถูกขับถ่ายออกทางปัสสาวะในรูปของกรดฮิพพูริค มีรายงาน ว่ากรดนี้ยับยั้งการทำงานของ เอ็นไซม์ อะคีโนซีนไตรฟอสฟา เทสในไมโตคอน เดรีย (Kozlov และคณะ, 1979) ยับยั้ง เอ็นไซม์โซ เดียม–โปแตส เซียม เอทีพี เอสแบบไม่ ย้อนกลับ (Tobin และคณะ, 1975) และทำปฏิกิริยา acylation กับไรโบนิวคลีโอ ไทด์ (Cedergren และคณะ, 1971) จากรายงานการวิจัยของ Uraih และคณะ (1977) พบว่า ปริมาณกรด เบนโซอิค 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรยับยั้งการ เจริญและการผลิต แอฟลาทอกซินโดย เชื้อราในอาหาร เลี้ยง เชื้อสัง เคราะห์ได้อย่างสมบูรณ์ใน เวลา 8 วัน ของการทดลอง

8.2 กรดโพรพิออนนิค

นิยมใช้ในการป้องกันการ เจริญของ เชื้อราในอาหาร เช่น ใช้ผสมในการทำขนมปัง เนยแข็ง และซอคโคแลค ใช้คลุก เคล้ากับปลาดิบก่อนทำปลา เค็ม ใช้ เคลือบกระดาษห่ออาหาร ช่วยทำให้อาหารมีรสดีขึ้น ออกฤทธิ์ได้ดีที่ pH 3.5 ถึง 4.5 ระดับอนุญาตให้ใช้ตามมาตรฐานสากลคือ 0.2 ถึง 0.4 % ในการทำแป้งขนมปังในสหรัฐอเมริกา หรือ 3,000 ส่วนในล้านส่วนในประเทศอังกฤษ และ 1,000 ส่วนในล้านส่วนในการใช้กับของหวานที่ประเทศอังกฤษ การออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียและเชื้อรา เป็นแบบ static effect เมื่อใช้ในปริมาณน้อย และเป็นแบบ cidal effect เมื่อใช้ในปริมาณมาก ออกฤทธิ์ได้ดีในอาหารที่มีปริมาณน้ำมากมากกว่าอาหารที่มีปริมาณน้ำน้อย กรดนี้ออกฤทธิ์โดยการกระตุ้นขบวนการออกซิเดทีฟ ทำให้ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรท และไขมันลดลง แต่ปริมาณ อาร์ เอ็น เอ เพิ่มขึ้น เมื่อใช้ในปริมาณมากจะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (Ibragimova และ Sakharova, 1974) จากรายงานการวิจัยของ Vandegraft และคณะ (1975) พบว่า ปริมาณกรดโพรพิออนนิค 1 % ยับยั้งการ เจริญและการผลิตแอฟลาทอกซินของ เชื้อราในข้าวโพดได้อย่างสมบูรณ์

เมื่อพิจารณาปริมาณกรดทั้งสองชนิดที่ใช้ยับยั้งการ เจริญและการผลิตแอฟลาทอกซินของ เชื้อราได้อย่างสมบูรณ์ดังกล่าวแล้วนั้นจะ เห็นว่าปริมาณดังกล่าวยังสูง เกินระดับอนุญาตตามมาตรฐานสากลซึ่งกำหนดให้ใช้ได้อย่างปลอดภัย เป็นปริมาณ 1 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในกรณี เบนโซ เอทและโพรพิออน เนตตามลำดับ จึงน่าทดลองนำสารทั้งสองมาใช้ร่วมกันในอัตราส่วนที่ เหมาะสมแล้วศึกษาดูว่า ในรูปของส่วนผสมนี้สารทั้งสองออกฤทธิ์ เสริมแรงกันหรือไม่ในการยับยั้งการ เจริญและการผลิตแอฟลาทอกซินของ เชื้อราที่ผลิตสารพิษชนิดนี้ได้ และปริมาณที่สามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์นั้นอยู่ในระดับอนุญาตตามมาตรฐานสากลหรือไม่ ผู้วิจัยจึงกำหนดวัตถุประสงค์ของการทดลองไว้ดังนี้

1. เพื่อศึกษารูปแบบการ เจริญและการผลิตแอฟลาทอกซิน B_1 ของ เชื้อ A. flavus ATCC 15546 ในอาหาร เลี้ยง เชื้อสังเคราะห์

2. เพื่อหาส่วนผสมระหว่าง เบนโซ เอทและโพรพิออน เนตที่ เหมาะสมในการยับยั้งการ เจริญและการผลิตแอฟลาทอกซิน B_1 ของ เชื้อ A. flavus ATCC 15546 ในอาหาร เลี้ยง เชื้อสังเคราะห์ได้อย่างสมบูรณ์

3. เพื่อหาส่วนผสมระหว่าง เบนโซ เอทและโพรพิออน เนตที่เหมาะสมในการยับยั้งการ เจริญของ เชื้อ A. flavus ATCC 15546 บน เมล็ดถั่วลิสงและข้าวโพดได้อย่างสมบูรณ์

4. เพื่อศึกษาผลกระทบของ เบนโซ เอทและโพรพิออน เนตต่อการ เจริญและการผลิตแอฟลาทอกซิน B_1 ของ เชื้อ A. flavus ATCC 15546

เพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ดังกล่าว ผู้วิจัยได้กำหนดขอบ เขตและ เลือกใช้วิธีต่อไปนี้ในการทำวิจัยคือ

1. ศึกษารูปแบบการ เจริญของ เชื้อ A. flavus ATCC 15546โดยการ เพาะ เลี้ยง เชื้อในอาหาร เลี้ยง เชื้อสังเคราะห์(Potato Dextrose Broth)ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการ เจริญของ เชื้อ เป็น เวลา 1 เดือน ติดตามการ เจริญโดยวัดปริมาณกลูโคซามีน ใน เส้นใยไมซี เลียมของ เชื้อดังกล่าว เป็นระยะ ๆ ตลอดการทดลอง

2. ศึกษารูปแบบการผลิตแอฟลาทอกซิน B_1 โดย เชื้อ A. flavus ATCC 15546 โดยวิธีการสกัดสารพิษนี้จาก Potato Dextrose Broth ที่ใช้ เพาะ เลี้ยง เชื้อ เพื่อศึกษารูปแบบการ เจริญ แล้วนำส่วนสกัดที่ได้ ไปวิ เคราะห์หาแอฟลาทอกซิน B_1 ทั้งโดยคุณภาพด้วย thin layer chromatography และปริมาณโดย fluorometry เป็นระยะ ๆ ตลอดการทดลอง

3. ศึกษาผลของ เบนโซ เอทและโพรพิออน เนตความ เข้มข้นต่าง ๆ กันทั้งในการใช้แบบ เดี่ยว ๆ และในรูปของส่วนผสมต่อการ เจริญและการผลิตแอฟลาทอกซิน B_1 ของ เชื้อ A. flavus ATCC 15546 เพื่อหาปริมาณที่ยับยั้งการ เจริญและการผลิตสารพิษนี้ใน Potato Dextrose Broth ได้อย่างสมบูรณ์

4. นำผลการศึกษาในข้อ 3 ไปประยุกต์ใช้กับถั่วลิสงและข้าวโพด เพื่อหาปริมาณของ เบนโซ เอทและโพรพิออน เนตที่ยับยั้งการ เจริญของ เชื้อ A. flavus ATCC 15546 ได้อย่างสมบูรณ์และ เปรียบ เทียบปริมาณดังกล่าวกับระดับอนุญาตให้ใช้ตามมาตรฐานสากลของสารทั้งสอง

5. ศึกษาผลกระทบของ เบนโซ เอทและโพรพิออน เนตต่อ การผลิตแอฟลาทอกซิน B_1 ของ เชื้อ A. flavus ATCC 15546 โดยใช้ $[1\text{-}^{14}C]$ อะซี เทท เป็นตัวบ่งชี้ผลดังกล่าว

ผู้วิจัยคาดว่า ผลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตผล

ทาง เกษตรกรรม เพื่อยับยั้งการ เจริญของ เชื้อราที่ผลิตแอฟลาทอกซินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต่อไป ซึ่ง เมื่อปราศจาก เชื้อที่จะผลิตสารนี้แล้ว ก็จะไม่มีการปน เปื้อนของสารพิษนี้ในผลิตผล เหล่านั้น เกษตรกรจะได้ผลผลิตที่ดี มีคุณภาพ และจะไม่ถูกปฏิเสธการรับซื้อจากตลาดต่าง ประ เทศดัง เช่นที่ปรากฏอยู่ในปัจจุบันนี้ ตลอดจนปัญหาด้านสุขภาพ เนื่องมาจากสารพิษชนิดนี้ ก็จะถูกแก้ไขสำ เร็จไปด้วยโดยปริยาย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย