บทที่ 2

เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อะฟลาท็อกซิน บี1 และเอ็ม 1 (Aflatoxin B1 , Aflatoxin M1)

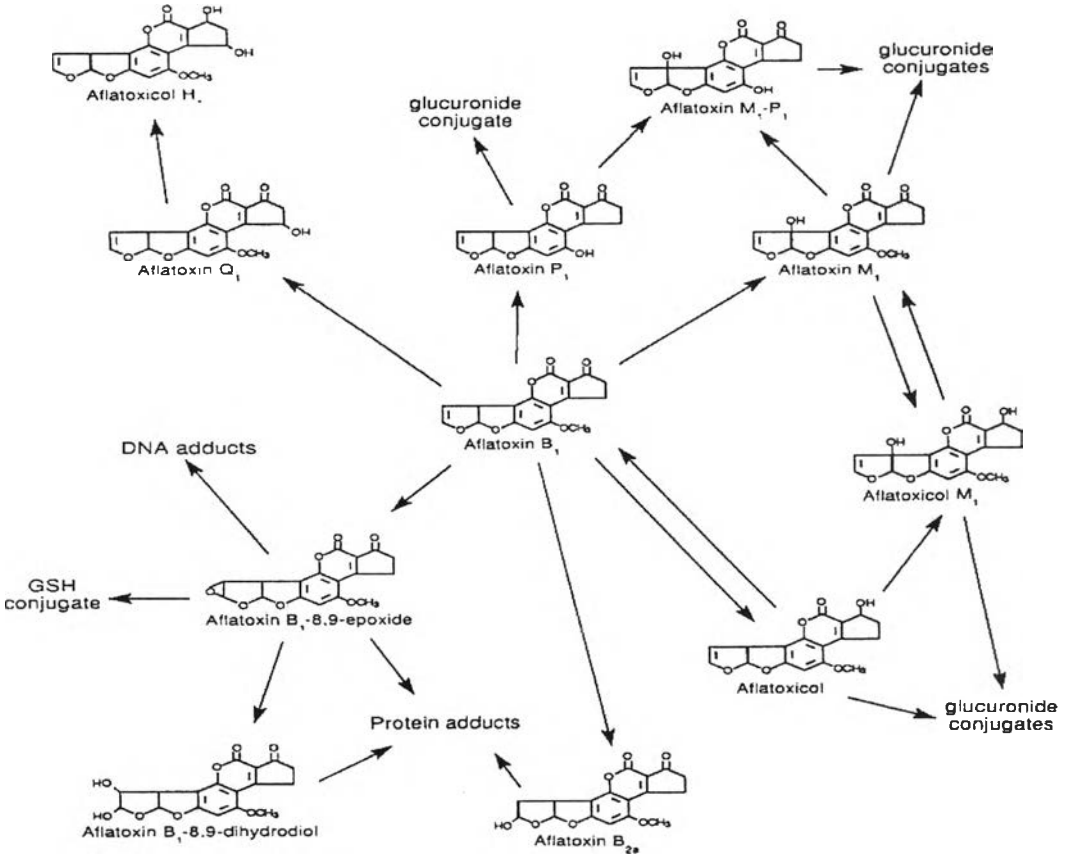
อะฟลาท็อกซินเป็นสารพิษที่ผลิตโดยเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus spp.* สปอร์ของเชื้อรานี้แพร่กระจายไปได้ในอากาศและดินโดยแมลง นกและสัตว์ฟันแทะ เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เชื้อราจะเจริญพันธุ์และผลิตอะฟลาท็อกซินซึ่งอาจใช้เวลาเพียง 24-48 ชั่วโมง (Yoshizawa, 1991) สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษของเชื้อราต้องประกอบด้วย ความชื้นมากกว่า 13% ความชื้นสัมพัทธ์อากาศมากกว่า 70% อุณหภูมิมากกว่า 13 °C ความเป็นกรด-ด่างของอาหารประมาณ 4-5 มีปริมาณออกซิเจนและอาหารอย่างเพียงพอ (Mahanna, 1999) อะฟลาท็อกซินที่พบในธรรมชาติมี 4 ชนิดคือ AFB1, AFB2, AFG1 และ AFG2 โดยทั่วไป AFB1 เป็นสารพิษที่เชื้อราผลิตได้มากที่สุดและมีความรุนแรงในการเกิดพิษสูง จึงถูกใช้เป็นตัวแทนในการศึกษากลุ่มสารพิษอะฟลาท็อกซิน (Bhatnagar et al., 1994)

AFB1 เป็นสารพิษที่คงทนและทนความร้อนได้ถึง 269 °C กระบวนการแปรรูปอาหารไม่สามารถทำลาย AFB1 ได้ทั้งหมด (Applebaum et al., 1982) เมื่อมนุษย์หรือสัตว์ได้รับ AFB1 เข้าไปในร่างกายส่วนใหญ่จะถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็กกระจายเข้าสู่ระบบหมุนเวียนไปยังตับแล้วถูกเปลี่ยนแปลงทางเคมีได้เป็นเมทะโบไลท์หลายชนิด (รูปที่ 1) AFB1 ทำให้เกิดอันตรายต่อหลายระบบในร่างกาย มีความเป็นพิษรุนแรงต่อตับ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเซลล์ กดภูมิคุ้มกัน มีฤทธิ์ทำให้เกิดความผิดปกติของตัวอ่อน ความผิดปกติทางพันธุกรรม และเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์หลายชนิด มีข้อมูลแสดงถึงความสัมพันธ์เชิงระบาดวิทยาระหว่างการได้รับอะฟลาท็อกซินจากอาหารกับการเกิดมะเร็งในมนุษย์ (Coulombe, 1994 ; Cullen, 1994) สถาบันวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Reseach on Cancer, IARC) จึงจัดให้ AFB1 เป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่ม 1A คือ เป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (Group 1A : Carcinogenic to human) (Hendrick, 1994)

AFM1 เป็นเมทะโบไลท์สำคัญของ AFB1 ที่ถูกขับออกทางน้ำนมได้มากที่สุด การศึกษาความรุนแรงในการเกิดพิษของ AFM1 โดยใช้เซลล์ตับของหนู Rat พบว่า AFM1 มีฤทธิ์เป็นอันตรายต่อสารพันธุกรรมต่ำกว่า AFB1 เพียง 2 เท่า และมีฤทธิ์ก่อกลายพันธุ์ต่ำกว่า AFB1 ประมาณ 3.2 เท่า (Green et al., 1982) Hendrick (1994) รายงานผลการทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งของ AFB1 ในลูกเป็ดที่ได้รับ AFB1 ปริมาณ 3 ppm ผสมในอาหารให้กินเป็นเวลา 14 เดือน พบว่าลูกเป็ดจำนวน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8 ใน 10 ตัวพบเนื้องอกที่ตับ และในการทดสอบฤทธิ์ก่อมะเร็งของ AFM1 ใน Fisher rat พบว่า AFM1 มีความรุนแรงน้อยกว่า AFB1 ประมาณ 10 เท่า สถาบันวิจัยมะเร็งนานาชาติจัดลำดับ AFM1 เป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่มที่ 2B คือ สารที่อาจจะทำให้เกิดมะเร็งได้ในมนุษย์ (Group 2A : Possibly carcinogenic to human) เนื่องจากยังขาดข้อมูลทางระบาดวิทยาที่ชัดเจนในมนุษย์และข้อมูลในสัตว์ยังมีจำกัด



รูปที่ 1 เมทะโบไลท์ชนิดต่างๆของ AFB1 (Hendrick, 1994)

การที่โคนมกินอาหารที่มีการปนเปื้อนของ AFB1 แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกลายเป็น AFM1 ซึ่งต่อมาถูกขับออกทางน้ำนมนั้นจัดเป็นปัญหาสำคัญทางสาธารณสุข เพราะน้ำนมเป็นอาหารหลักอย่างหนึ่งโดยเฉพาะในเด็กและทารก ความร้อนที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปน้ำนมก็ไม่สามารถทำลาย AFM1 ที่มีในน้ำนมได้ ผู้บริโภคจึงอาจได้รับอันตรายจากการบริโภคสารพิษนี้ การป้องกันอันตรายดังกล่าวสามารถทำได้โดยการควบคุมปริมาณการปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำนมให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัย และเนื่องจากเป็นที่ทราบกันว่า AFM1 เป็นเมทะโบไลท์ที่เกิดจากการกิน AFB1 ดังนั้น การควบคุมการปนเปื้อนอะฟลาท็อกซินในน้ำนมโคที่ดีที่สุด ก็คือ การควบคุมปริมาณ AFB1 ในวัตถุดิบและอาหารโคนม (FAO, 1997)

2.2 รายงานการปนเปื้อนอะฟลาท็อกซินในอาหารโคนมและน้ำนมดิบในประเทศไทย

กรมปศุสัตว์ (2544) เก็บตัวอย่างวัตถุดิบและอาหารสำหรับโคนมในระหว่างปี พ.ศ. 2539 ถึง 2540 จำนวนทั้งสิ้น 1,709 ตัวอย่าง แบ่งเป็นวัตถุดิบชนิดต่างๆ จำนวน 974 ตัวอย่าง ได้แก่ กากมะพร้าว 111 ตัวอย่าง กากถั่วลิสง 92 ตัวอย่าง กากปาล์ม 126 ตัวอย่าง ข้าวโพด 191 ตัวอย่าง กากถั่วเหลือง 139 ตัวอย่าง รำละเอียด 177 ตัวอย่างและมันเส้น 138 ตัวอย่าง อาหารสำเร็จรูปจำนวน 354 ตัวอย่าง อาหารที่เกษตรกรผสมใช้เองจำนวน 98 ตัวอย่าง อาหารหยาบจำนวน 113 ตัวอย่าง แบ่งเป็นฟางข้าว 38 ตัวอย่าง ต้นข้าวโพด 50 ตัวอย่าง และเปลือกสับปะรด 25 ตัวอย่าง ตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินโดยวิธี Immunoaffinity column (Aflatest®, Vicam USA) แล้วอ่านผลด้วย Spectrofluorometer ปรากฏว่า พบการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินในวัตถุดิบและอาหารทุกชนิดในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 ผลการตรวจในอาหารหยาบ พบว่าหญ้าสดไม่มีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินแต่ในต้นข้าวโพดแห้งสามารถตรวจพบได้ในปริมาณตั้งแต่ 0-10 ppb และฝักข้าวโพดคัดทิ้งอาจพบได้ในปริมาณสูงถึง 13 ppb

ตารางที่ 1 ปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินในวัตถุดิบและอาหารโคนม

ชนิดอาหาร / ปริมาณอะฟลาท็อกซิน(ppb)	พ.ศ. 2539			พ.ศ. 2540			ปริมาณอะฟลาท็อกซินเฉลี่ย (ppb)
	Min	Max	n	Min	Max	n	
กากมะพร้าว	1.5	200	32	3.72	1,500	79	139.3
กากถั่วลิสง	0	200	28	0.01	1,100	64	229.5
กากปาล์ม	0	180	45	0	950	81	22.5
ข้าวโพดป่น	0	150	31	0	939.4	72	73.4
ข้าวโพดเมล็ด	0	80	21	0	300.4	67	
กากถั่วเหลือง	0	10	40	0	94.34	99	12.5
รำละเอียด	0	20	81	0	184.5	96	7.7
มันเส้น	0	60	35	0	48.02	103	3.47
อาหารสำเร็จรูป	0	180	46	0	290.6	318	19.49
อาหารเกษตรกรผสมใช้เอง	0	180	37	0	600	61	ไม่ได้รายงาน

ที่มา : กรมปศุสัตว์ (2544) Min =ค่าที่พบต่ำสุด Max = ค่าที่พบสูงสุด n = จำนวนตัวอย่าง

ภัทนีย์ (2540) รายงานถึงการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินในข้าวโพด ถั่วลิสง และกากถั่วเหลืองที่ศึกษาในปี พ.ศ. 2539 พบการปนเปื้อนในทุกตัวอย่างที่ระดับตั้งแต่ 0-560 ppb ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของเยาวมาลย์และคณะ (2542) ที่ทำการวิเคราะห์วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่ใช้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง ระหว่างปี พ.ศ. 2539-2540 พบว่า การปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินในข้าวโพดมีปริมาณในระดับ 3-484 ppb รำละเอียด 10-280 ppb กากถั่วเหลือง 0-42 ppb และกากถั่วลิสง 48-920 ppb

เบญจมาศ (2540) ทำการศึกษาข้อมูลในฟาร์มโคนมเขตอำเภอเขาขลุง จังหวัดราชบุรี จำนวน 24 ฟาร์ม ระหว่างเดือน มกราคม-ตุลาคม 2540 โดยมีตัวอย่างอาหารข้นทั้งหมด 175 ตัวอย่าง ทำการสกัดตัวอย่างด้วยวิธี Immunoaffinity column (Aflatest®, Vicam USA) แล้วอ่านผลด้วย Spectrofluorometer พบว่า มีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินในอาหารข้น 100 % ในปริมาณตั้งแต่ 2.6-190 ppb โดยในฤดูหนาว (มกราคม-กุมภาพันธ์) มีปริมาณการปนเปื้อนมากกว่าฤดูอื่นๆ คือที่ระดับ 30.13 $\pm$ 11.61 ถึง 40.88 $\pm$ 23.14 ppb แล้วค่อยๆลดลงในฤดูร้อนจนถึงต้นฤดูฝนและจะกลับมาสูงอีกครั้งหนึ่งในเดือนกันยายน คือ มีปริมาณการปนเปื้อนเฉลี่ย 125.7 $\pm$ 52.54 ppb และการปนเปื้อนในน้ำนมดิบที่เก็บตัวอย่างจากแม่โครายตัวทั้งหมด 696 ตัวอย่าง พบว่า มีการปนเปื้อนของ AFM1 คิดเป็น 97.84 % (681 ตัวอย่าง) ในปริมาณตั้งแต่ 0-1.80 ppb สอดคล้องกับ เกรียงศักดิ์ (2540) รายงานถึงปริมาณสารพิษอะฟลาท็อกซินที่ตรวจในอาหารไก่ ซึ่งใช้วัตถุดิบหลักเป็นส่วนประกอบคล้ายกับอาหารโคนม ระหว่างปี พ.ศ. 2538-2539 พบว่าในช่วงเดือนตุลาคม ถึงกุมภาพันธ์มีการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินสูงสุดในรอบปี

สุเทพและเบญจมาศ (2539) ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอะฟลาท็อกซินในอาหารและในน้ำนมของโคนมในเขตจังหวัดนครปฐม-สุพรรณบุรี จำนวน 4 ฟาร์ม ใช้โคนมทั้งหมด 9 ตัว โดยมีตัวอย่างอาหารข้นทั้งหมด 60 ตัวอย่าง แบ่งเป็นอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ด 42 ตัวอย่าง และอาหารชนิดผงผสมเปลือกถั่วเหลืองและมันสำปะหลัง 18 ตัวอย่าง ทำการสกัดด้วย Silica gel column แล้วอ่านผลด้วย Densitometer ปรากฏว่าพบการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินในทุกตัวอย่าง โดยพบว่าในอาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดมีปริมาณอะฟลาท็อกซินตั้งแต่ 26-52 ppb และ 16-45 ppb ในอาหารชนิดผงผสมเปลือกถั่วเหลืองและมันสำปะหลัง ส่วนในน้ำนมที่เก็บตัวอย่างจากแม่โครายตัวทั้งหมด 308 ตัวอย่าง นำมาสกัดด้วย C_{18} Sep Pak และ Silica gel minicolumn อ่านผลด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatographs (HPLC) พบว่ามีการปนเปื้อนของ AFM1 ในทุกตัวอย่างเช่นกันมีปริมาณตั้งแต่ 0.01-1.44 ppb โดยขึ้นกับระยะเวลาการให้นม และปริมาณน้ำนม เมื่อนำมาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ AFB1 ในอาหารและ AFM1 ในน้ำนม (Carry-over rate)

พบว่าในระยะแรกของการให้นมมี Carry-over rate 2 ± 0.7% และลดลงเหลือ 0.7 ± 0.1% ในระยะท้ายของการให้นม (สัปดาห์ที่ 34-36)

อุมาและดวงจันทร์ (2537) เก็บตัวอย่างน้ำนมดิบจากถังรวม จำนวน 45 ตัวอย่าง วิเคราะห์หาปริมาณ AFB1 ด้วยวิธี HPLC พบว่าในน้ำนมดิบตรวจพบการปนเปื้อนจำนวน 12 ตัวอย่างในปริมาณตั้งแต่ 0.15-0.8 ppb

Saitanu (1997) ใช้การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Radioimmunoassay หาปริมาณ AFM1 ในตัวอย่างน้ำนมดิบที่เก็บจากศูนย์รวมน้ำนมจำนวน 67 ตัวอย่าง พบว่า มีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่ตรวจไม่พบการปนเปื้อนของ AFM1 และพบว่าตัวอย่างน้ำนมจำนวนถึง 89.26% มี AFM1 ปนเปื้อนในปริมาณมากกว่า 0.05 ppb

ความแตกต่างของปริมาณ AFB1 ที่พบในวัตถุดิบและอาหารข้นที่รายงานไว้ข้างต้น ส่วนหนึ่งเกิดจากความแตกต่างของ ชนิด ลักษณะ แหล่งที่มา และระยะเวลาการเก็บรักษาของวัตถุดิบ กากมะพร้าว ข้าวโพด กากถั่วลิสง เป็นวัตถุดิบที่มีการปนเปื้อนอะฟลาท็อกซินในระดับที่สูง เนื่องจากมีองค์ประกอบเป็นโปรตีนและไขมันในสัดส่วนที่สูงเหมาะแก่การเป็นแหล่งอาหารของเชื้อรา กากมะพร้าวที่มาจากโรงงานบีบน้ำมันจะมีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในปริมาณมากกว่าที่มาจากโรงงานผลิตกะทิกระป๋อง ข้าวโพดชนิดเมล็ดมีปริมาณอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนต่ำกว่าข้าวโพดป่น วัตถุดิบบางชนิดที่นำเข้าจากต่างประเทศในภาวะขาดแคลนจำเป็นต้องมีการกักตุนไว้เป็นเวลานาน (กรมปศุสัตว์, 2544) เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในประเทศไทยมากกว่า 80% ใช้อาหารสำเร็จที่ผลิตจากโรงงานอาหารสัตว์เป็นแหล่งอาหารหลักสำหรับโคนม เนื่องจากการขาดแคลนอาหารหยาบคุณภาพดีไว้ใช้ จึงทำให้โรงงานผลิตอาหารสัตว์มีส่วนสำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนมของประเทศ โรงงานอาหารสัตว์ขนาดใหญ่ที่มีกำลังการผลิตวันละสิบตันขึ้นไปสามารถกำหนดคุณสมบัติและคัดเลือกวัตถุดิบที่มีคุณภาพจากผู้นำเข้าหรือจำหน่ายได้ เพราะมีความพร้อมด้านงบประมาณ การมีไซโลเพียงพอที่จะเก็บวัตถุดิบ และมีฝ่ายตรวจสอบคุณภาพวัตถุดิบได้เองอย่างสม่ำเสมอ ในขณะที่โรงงานผลิตอาหารสัตว์ขนาดเล็กไม่สามารถดำเนินการได้ เพราะขาดปัจจัยเหล่านั้นวัตถุดิบที่ใช้จึงมักเป็นวัตถุดิบที่มีในท้องถิ่นและราคาถูก ทำให้สาเหตุที่มาของการปนเปื้อนอะฟลาท็อกซินในอาหารสัตว์แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการวางมาตรการแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนอะฟลาท็อกซินในอาหารสัตว์จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาให้ครอบคลุมทุกระดับก่อนที่จะมีข้อกำหนดไปในทิศทางใดทิศทางหนึ่ง เพราะถ้าสามารถควบคุมการผลิตอาหารจากโรงงานอาหารสัตว์ให้มีคุณภาพตามที่กำหนดได้แล้วจะส่งผลดีต่อการแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนอะฟลาท็อกซินในน้ำนม

2.3 แนวทางการควบคุมปัญหาอะฟลาท็อกซิน

2.3.1 การกำหนดปริมาณการปนเปื้อนในอาหารสัตว์และน้ำนม

เนื่องจากปัญหาการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินเป็นปัญหาที่พบกระจายทั่วโลก แต่มีความรุนแรงของปัญหาต่างกันออกไปตามลักษณะสภาพแวดล้อมภูมิอากาศของแต่ละภูมิภาค และเนื่องด้วยข้อมูลทางพิษวิทยาของอะฟลาท็อกซินทำให้แต่ละประเทศพยายามกำหนดระดับการปนเปื้อนในอาหารและในน้ำนมให้ต่ำที่สุดเท่าที่สามารถทำได้ FAO (1995) ได้รวบรวมระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมให้มีได้ (Maximum tolerated level) ของสารพิษเชื้อราในอาหารสัตว์ น้ำนมและผลิตภัณฑ์จากนมของแต่ละประเทศที่ได้กำหนดแล้ว ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ระดับการปนเปื้อนสูงสุดที่ยอมให้มีได้ของสารพิษเชื้อราในน้ำนม ผลิตภัณฑ์จากนมและอาหารสัตว์

ประเทศ	ประเภทอาหาร/วัตถุดิบ	สารพิษเชื้อรา	ระดับสูงสุดที่ยอมให้มีได้ (ppb)	วิธีวิเคราะห์
USA (dairy)	Wholemilk,skim milk,low fat milk	M1	0.5	TLC,HPLC
USA (feed)	Feedstuffs	B1,B2,G1,G2	20	”
	Cottonseed meal	”	300	
	Maize and peanut product	”	100	
E.U.	Straight feedstuffs	B1	50	TLC,HPLC
(feed)	Straight:groundnut,copra,palmnut, Cottonseed,babassu,maize product	B1	20	”
	Complementary feedstuffs	B1	5	”
	Raw materials	B1	200	
E.U. (dairy)	Milk,milk powder,infant food on milk basis	M1	0.05	
Brazil (feed)	Peanut meal (export)	B1,B2,G1,G2	50	
India (feed)	Peanut meal (export)	B1,B2,G1,G2	120	-
Thailand (food)	All food	B1,B2,G1,G2	20	TLC,HPLC

ที่มา : ดัดแปลงจาก FAO (1995)

ค่ามาตรฐานการปนเปื้อนที่กำหนดโดยรัฐบาลของแต่ละประเทศมีความแตกต่างกันไป และเนื่องจากน้ำนมเป็นอาหารที่มนุษย์ทั่วโลกใช้บริโภคและมีการค้าขายระหว่างประเทศ ทำให้ต้องมีค่ามาตรฐานสากลการปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ในปี ค.ศ. 2001 คณะกรรมการ Codex ซึ่งเป็นผู้จัดทำค่ามาตรฐานสากลของวัตถุเจือปนและสารปนเปื้อนในอาหารได้เสนอไว้ว่าในน้ำนมควรมีการปนเปื้อนของ AFM1 ในระดับไม่เกิน 0.5 ppb (Codex, 2001) ส่วนมาตรฐานการปนเปื้อนในอาหารข้นสำหรับโคนมนั้น คณะกรรมการได้พิจารณาว่าเป็นเรื่องยากที่จะกำหนดเป็นมาตรฐานเดียวกันทั่วโลก เนื่องจากมีความแตกต่างทางภูมิศาสตร์และความหลากหลายของการใช้วัตถุดิบ ระบบการจัดการด้านปศุสัตว์ และกฎหมายของแต่ละประเทศ อีกทั้งอาหารข้นสำหรับโคนมไม่ได้เป็นสินค้านำเข้าหรือส่งออกระหว่างประเทศมากนักจึงไม่มีการกำหนดค่าไว้

สำหรับประเทศไทยนั้นยังไม่มีการกำหนดค่ามาตรฐานการปนเปื้อนของ AFM1 ในน้ำนมไว้โดยเฉพาะ เพียงแต่อนุโลมใช้ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 ที่กำหนดปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินรวมในอาหารไว้ไม่เกิน 20 ppb สำหรับวัตถุดิบและอาหารสำหรับโคนมนั้นการกำหนดปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินที่มีลักษณะเป็นกฎหมายบังคับใช้ยังไม่ชัดเจนมากนักเป็นเพียงการอนุโลมใช้ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ.2537 เรื่องการกำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพเท่านั้น ดังตารางที่ 3 ซึ่งตามประกาศกระทรวงฯ ฉบับนี้มีรายละเอียดระบุไว้เฉพาะ กากถั่วเหลือง กากถั่วลิสง ปลาป่น รำข้าว (รำละเอียด, รำหยาบ, รำสกัดน้ำมัน) ข้าวโพดป่น, ข้าวโพดเมล็ด, ปลา และกระดูกปลาป่นเท่านั้น ทั้งที่มีวัตถุดิบอีกหลาย 10 ชนิดที่ใช้กันอยู่ในประเทศแต่ไม่ได้มีความหมายเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ตามกฎหมาย

ตารางที่ 3 ข้อกำหนดลักษณะของอาหารสัตว์เสื่อมคุณภาพ

ชนิดอาหารสัตว์	ปริมาณอะฟลาท็อกซิน (ppb)
กากถั่วเหลือง	> 50
กากถั่วลิสง	> 500
ปลาป่น	> 40
รำข้าว : รำละเอียด,รำหยาบ,รำสกัดน้ำมัน	> 50
ข้าวโพดป่น	> 100
ข้าวโพดเมล็ด	> 100
อาหารสำเร็จรูปโค อายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป	> 200
มีเชื้อรามากกว่า 1 x 10^5 โคโลนี/ 1 กรัมอาหาร	
ยกเว้นข้าวโพดป่น มากกว่า 5 x 10^5 โคโลนี/ 1 กรัมอาหาร	

ที่มา : ดัดแปลงจากประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2537)

ส่วนการกำหนดมาตรการเพื่อควบคุมปัจจัยที่มีผลต่อการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดชื่อ ประเภท ชนิดหรือลักษณะของอาหารสัตว์ คุณภาพหรือมาตรฐานของอาหารสัตว์ตาม ชื่อ ประเภท ชนิดหรืออายุของสัตว์ คุณภาพหรือมาตรฐานของภาชนะบรรจุและการใช้ภาชนะบรรจุ (ฉบับที่ 8) พ.ศ. 2538 มีเพียงมาตรการควบคุมความชื้นในวัตถุดิบ โดยกำหนดให้มีปริมาณความชื้นของวัตถุดิบที่ถือได้ว่ามีคุณภาพเหมาะสมสำหรับผลิตอาหารสัตว์ไว้ดังนี้ กากถั่วเหลืองต้องมีความชื้นไม่มากกว่า 13% กากถั่วลิสงความชื้นไม่มากกว่า 12% รำละเอียดความชื้นไม่มากกว่า 11% รำหยาบความชื้นไม่มากกว่า 11% ข้าวโพดป่นความชื้นไม่มากกว่า 13% และข้าวโพดเมล็ดความชื้นไม่มากกว่า 14.5% อย่างไรก็ตามแม้ว่าในโรงงานบางแห่งจะมีการตรวจสอบความชื้นวัตถุดิบเมื่อแรกเข้า แต่ถ้าหากไม่มีมาตรการที่ดีในการควบคุมในระหว่างการเก็บรักษาและในขั้นตอนของการผลิตก็มีโอกาสที่วัตถุดิบเหล่านั้นจะได้รับความชื้นเพิ่มขึ้นจากสิ่งแวดล้อม (กรมปศุสัตว์, 2544)

Codex Alimentarius Committee (1997) แนะนำว่าในขั้นตอนการเก็บรักษาวัตถุดิบ และผสมอาหารสำหรับสัตว์นั้นต้องทำอย่างถูกสุขอนามัย (Good sanitation) ภาชนะหรือถุงที่บรรจุต้องสะอาด แห้ง ป้องกันความชื้นจากพื้นได้ มีการป้องกันแมลงและสัตว์ที่เข้าไปทำลายวัตถุดิบ เก็บรักษาไว้ในที่แห้ง และอุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมอาหารต้องสะอาด ในทำนองเดียวกันกรมปศุสัตว์ (2544) แนะนำให้โรงงานผลิตอาหารสัตว์เก็บรักษาวัตถุดิบไว้ในกระสอบที่สามารถป้องกันความชื้นจากพื้นหรือสิ่งแวดล้อมได้ ไม่ควรกองวัตถุดิบไว้กับพื้นโดยตรง และควรเลือกใช้กระสอบพลาสติกมากกว่าการใช้กระสอบป่านในการบรรจุวัตถุดิบ การวางกระสอบวัตถุดิบควรห่างจากผนังอาคารประมาณ 1 ฟุตครึ่งและให้มีช่องว่างระหว่างกอง เพื่อป้องกันความชื้นจากผนังซึมผ่านกระสอบที่บรรจุวัตถุดิบและเพื่อให้มีอากาศหมุนเวียนได้สะดวกขึ้น รวมทั้งไม่ควรวางทับซ้อนกันมากชั้นจนเกินไปและการใช้วัตถุดิบควรเป็นระบบตามการหมุนเวียนเข้าออกก่อนหลัง การที่อากาศหมุนเวียนได้ดีจะลดปัญหาการ กลั่นตัวของหยดน้ำที่อยู่ในอากาศหรืออุปกรณ์เครื่องมือต่างๆในขั้นตอนการผลิตโดยเฉพาะโรงงานผลิตอาหารสัตว์ชนิดที่มีการอัดเม็ด ซึ่งขั้นตอนนี้จะต้องฉีดพ่นไอน้ำอุ่นเข้าไปในระหว่างอัดเม็ดซึ่งเป็นการเพิ่มความชื้นให้กับอาหารประมาณ 3-5% ในฤดูหนาวถ้าอุณหภูมิของน้ำอุ่นที่ต้องใช้ในการอัดเม็ดสูงขึ้นจากปกติ 1.5 ^{o}C จะทำให้น้ำที่เกาะอยู่ตามผนังของเครื่องผสมละลายเข้าสู่เม็ดอาหารได้ รวมถึงระยะเวลาที่ใช้ในการอัดเม็ดถ้าเพิ่มขึ้นจะทำให้ความชื้นของอาหารเพิ่มขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้เมื่ออัดเม็ดแล้วเสร็จผ่านไปสู่ขั้นตอนการเก็บในไซโลเพื่อรอบรรจุ ความแตกต่างของอุณหภูมิและความชื้นระหว่างอาหารที่ผ่านการอัดเม็ดและสิ่งแวดล้อมภายนอกและภายในถังอาจทำให้มีการเพิ่มขึ้นของความชื้นในอาหารได้ (Sahin and Cerci, 1994)

ในปี พ.ศ.2544 กรมปศุสัตว์ได้ทดลองนำระบบ GMP และ HACCP มาใช้ในโรงงานผลิตอาหารโคนม รวมทั้งการแก้ไขกฎหมายที่เกี่ยวข้องและได้ผ่านร่างการกำหนดระดับอะฟลาท็อกซินในวัตถุดิบและอาหารสัตว์ขึ้นมาใหม่ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ร่างกำหนดระดับอะฟลาท็อกซินในวัตถุดิบและอาหารสัตว์ พ.ศ. 2544

วัตถุดิบ	ปริมาณอะฟลาท็อกซิน (ppb)		
	ระดับที่ผ่านร่าง	ระดับตามประกาศเดิมกำหนด	ระดับที่ E.U. กำหนด
กากถั่วลิสง	300	500	20
กากถั่วเหลือง	30	50	50
ถั่วเหลืองอบ	20	-	50
Corn gluten meal	20	-	-
รำละเอียด รำหยาบ รำสกัด	25	50	50
ข้าวโพดเมล็ด ข้าวโพดป่น	50	100	20
ปลาป่น	20	40	50
ปลาและกระดูกปลาป่น	20	-	50
ขนไก่ป่น	20	-	50
เนื้อป่น เนื้อและกระดูกป่น	20	-	50
กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม กากผลปาล์ม	50	-	20
กากมะพร้าว	50	-	20
มันเส้น มันอัดเม็ด	25	-	50
หัวอาหารโคเนื้อ-โคนม (โค-กระบือ)	50	100	-
อาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูป			
อาหารโคอายุไม่เกิน 1 ปี	50	100	10 (โคนม)
อาหารโคอายุตั้งแต่ 1 ปี ขึ้นไป	80	200	5 (โคนม)

ที่มา : ดัดแปลงจาก กรมปศุสัตว์ (2544)

2.3.2 แนวทางการแก้ปัญหาอะฟลาท็อกซินในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์โดยการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP

ปัญหาสารพิษเชื้อราเป็นปัญหาที่กระทบกับผู้บริโภคในวงกว้าง หน่วยงานสากลหลายแห่งได้ให้ความสนใจและร่วมมือกันแก้ปัญหาโดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการควบคุมและวางแผนแก้ไข ในปี ค.ศ. 1999 FAO, World Health Organization (WHO) และ United Nations Environment Programme (UNEP) ร่วมกันจัดการประชุมนานาชาติในหัวข้อเรื่องสารพิษเชื้อราในอาหารและอาหารสัตว์ และได้เสนอการนำแนวทางของระบบการวิเคราะห์อันตรายและจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (Hazard Analysis and Critical Control Point , HACCP) เข้ามาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์เพื่อควบคุมปัญหาสารพิษเชื้อรา (FAO , 1999)

ระบบ HACCP ถูกพัฒนาขึ้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1960 จากการร่วมมือระหว่างบริษัท Pillsbury ห้องปฏิบัติการกองทัพสหรัฐอเมริกาและองค์การ NASA (National Aeronautics and Space Agency) เพื่อควบคุมการผลิตอาหารให้ปลอดภัยสำหรับนักบินอวกาศ ระบบ HACCP เป็นระบบที่ให้ความสำคัญในการป้องกันการเกิดปัญหามากกว่าการแก้ไขปัญหา ดังนั้นระบบ HACCP จึงไม่เน้นการทดสอบผลิตภัณฑ์สุดท้าย แต่เน้นที่การควบคุมกระบวนการผลิตในขั้นตอนที่สามารถประยุกต์วิธีการควบคุมเข้าไปใช้ได้ โดยจะพิจารณาตั้งแต่วัตถุดิบ กระบวนการผลิต การขนส่งจนถึงผู้บริโภค (สุวิมล, 2544) ระบบ HACCP ได้ถูกประยุกต์และนำมาใช้กับการผลิตอาหารประเภทต่างๆ รัฐบาลของประเทศสหรัฐอเมริกาบังคับใช้ระบบนี้ในอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด ได้แก่ การผลิตอาหารกระป๋อง การผลิตอาหารทะเลแปรรูป เป็นต้น ประเทศสมาชิกประชาคมยุโรป ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ และสิงคโปร์ ก็ได้นำระบบ HACCP ไปใช้ควบคุมอุตสาหกรรมอาหารบางประเภทแล้วเช่นกัน นอกจากนี้คณะกรรมการ Codex ได้จัดทำข้อแนะนำการประยุกต์ใช้ระบบ HACCP (Guidelines for the Application of the Hazard Analysis and Critical Control Point System) ในอุตสาหกรรมอาหารขึ้นเมื่อเดือนมิถุนายน ค.ศ. 1997 เพื่อให้ประเทศสมาชิกนำไปใช้ นอกจากนี้องค์การการค้าโลก (World Trade Oranization) ได้กำหนดข้อตกลงว่าด้วยการบังคับใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Sanitary and Phytosanitary Measure ; SPS) และเสนอให้ประเทศสมาชิกมีมาตรฐานการผลิตอาหารให้ปลอดภัยบนพื้นฐานเดียวกันโดยให้ปฏิบัติตามข้อแนะนำและข้อเสนอต่างๆ ในด้านความปลอดภัยของอาหารที่กำหนดโดย Codex ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้ทำให้ระบบ HACCP เป็นระบบที่มีความสำคัญมากอย่างยิ่งสำหรับอุตสาหกรรมอาหารและอาหารสัตว์

ระบบ HACCP ประกอบด้วยหลักการสำคัญ 7 ประการ (สุวิมล, 2544) ดังนี้

1) ดำเนินการวิเคราะห์อันตราย (Conduct a Hazard Analysis) คือ การเก็บรวบรวมและประเมินข้อมูลเกี่ยวกับอันตรายทั้งหมดที่อาจเกิดขึ้นในกระบวนการผลิตอาหาร ได้แก่ อันตรายทางชีวภาพ ทางเคมี ทางกายภาพและสภาวะที่ทำให้มีโอกาสเกิดอันตรายและพิจารณาตัดสินว่าอันตรายเหล่านั้นมีความสำคัญต่อความปลอดภัยของอาหารที่จะผลิตหรือไม่
2) กำหนดจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (Determine the Critical Control Point ;CCP) หมายถึงขั้นตอนในกระบวนการผลิตหนึ่งๆที่จำเป็นต้องมีการควบคุมเพื่อป้องกันหรือขจัดอันตรายที่มีต่อความปลอดภัยของอาหารหรือลดอันตรายดังกล่าวจนถึงระดับที่ยอมรับได้
3) กำหนดค่าวิกฤต (Establish Critical Limits) คือ กำหนดค่าเกณฑ์แบ่งระหว่างการยอมรับได้และยอมรับไม่ได้ทางด้านความปลอดภัยของอาหาร

4) กำหนดระบบการตรวจติดตามเพื่อควบคุมจุดวิกฤตที่ต้องควบคุม (Establish a System to Monitor Control of the CCP) หมายถึงการดำเนินกิจกรรมอย่างเป็นลำดับเพื่อสังเกตหรือตรวจวัดค่าต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ที่ต้องควบคุมหรือค่าวิกฤตเพื่อประเมินว่า CCP นั้นๆอยู่ภายใต้สภาวะควบคุมหรือไม่
5) กำหนดวิธีแก้ไข (Establish the Corrective Action) เมื่อกระบวนการผลิตเกิดการเบี่ยงเบนจากค่าปฏิบัติงาน คณะทำงานต้องกำหนดมาตรการแก้ไขสำหรับตัวผลิตภัณฑ์และสายการผลิต
6) กำหนดการทดสอบ (Establish Procedures for Verification) เพื่อยืนยันว่าระบบ HACCP ดำเนินการอย่างมีประสิทธิภาพ
7) กำหนดระบบเอกสารและการเก็บบันทึกข้อมูล (Establish Documentation and Record Keeping)

Park et al., (1999) แนะนำว่าการใช้ระบบ HACCP จำเป็นต้องประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมในแต่ละประเทศ โดยควรยึดปัจจัยด้านต่างๆ เช่น สภาวะภูมิอากาศ ระบบการจัดการฟาร์ม เทคโนโลยีการผลิตวัตถุดิบและอาหาร ปัญหาทางด้านการสาธารณสุข วิธีการผลิต ความแปรปรวนของระบบการวิเคราะห์ข้อมูลและความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์เป็นเกณฑ์ในการกำหนด การที่จะนำระบบเข้าไปควบคุมปัญหาได้นั้นต้องสามารถระบุหรือแยกแยะได้ว่าสถานภาพ ณ จุดนั้นของกระบวนการผลิตที่เป็นอยู่จริงของประเทศอยู่ในสภาวะที่จะเป็นปัญหาหรือไม่

ในการนำระบบ HACCP ไปใช้ให้ประสบความสำเร็จจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการจัดทำโปรแกรมพื้นฐาน (Pre-requisite programs establishment) เป็นลำดับแรกก่อน เนื่องจากโปรแกรมพื้นฐานเน้นเรื่องการจัดการด้านสุขลักษณะของสถานที่ผลิตรวมทั้งสภาพแวดล้อมของกระบวนการผลิต เพื่อป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับอาหารทั้งทางตรงและทางอ้อม ส่วนหนึ่งในการจัดทำโปรแกรมพื้นฐาน คือ การจัดทำระบบปฏิบัติงาน (Procedures) ให้สอดคล้องกับขั้นตอนการผลิตและลักษณะของสถานที่ผลิต วิธีที่นิยมในการจัดทำระบบปฏิบัติงาน คือ การจัดทำขั้นตอนการปฏิบัติงานเป็นเอกสารที่สามารถนำไปปฏิบัติงานได้จริง (Work Instructions) ขั้นตอนการปฏิบัติงานจะระบุถึงวิธีการปฏิบัติต่อวัตถุดิบ อุปกรณ์และเครื่องจักรที่ใช้ในการผลิต วิธีการปฏิบัติต่อวัตถุดิบเพื่อป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นจากอะฟลาท็อกซิน คือการควบคุมปัจจัยที่มีผลทำให้เชื้อราผลิตอะฟลาท็อกซินได้เพิ่มขึ้น ปัจจัยเหล่านั้น ได้แก่ ความชื้น อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์อากาศ ระยะเวลาการเก็บรักษา ปริมาณออกซิเจน อาหารที่เชื้อราต้องการ วิธีและลักษณะการเก็บรักษา (FAO, 1997) การศึกษาและมีผลของข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณอะฟลาท็อกซินที่เกิดขึ้นภายในโรงงานจะช่วยให้กำหนดขอบเขตการตรวจติดตามเพื่อเฝ้า

ระวังการเปลี่ยนแปลงนั้นๆ ถูกต้องแม่นยำขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการควบคุมอะฟลาท็อกซินให้ได้ผล ในการจัดทำขั้นตอนการปฏิบัติงานควรนำวิธีการด้านสุขลักษณะที่ใช้ในโรงงานและข้อมูลที่เกิดขึ้นจริงไปกำหนดและปฏิบัติจะมีประสิทธิภาพมากกว่าการลอกเลียนคู่มือของโรงงานอื่น (สุวิมล, 2544) การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นเพื่อหาคำตอบที่จะนำมาซึ่งค่าปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของอะฟลาท็อกซินที่เกิดขึ้นจริงในโรงงานที่ทำการศึกษาเพื่อให้โรงงานนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการกำหนดการปฏิบัติงานที่เหมาะสมในโอกาสต่อไป

2.4 ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซินของเชื้อราในขั้นตอนการผลิตอาหารข้นสำหรับโคนม

จากการศึกษาของ Truckses และคณะ (1988), Wilson และ Payne (1994), Gourama และ Bullerman (1995) สรุปได้ว่าเชื้อราจะสร้างอะฟลาท็อกซินได้มากหรือน้อยขึ้นกับองค์ประกอบ 3 ส่วน คือ ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อรา อาหารที่เชื้อราต้องการ และปัจจัยแวดล้อมที่เหมาะสม

2.4.1 ชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อรา

เชื้อราในตระกูล *Aspergillus* มีทั้งหมด 18 กลุ่ม (Serogroups) 132 สายพันธุ์ (Species) และ 18 ชนิด (Varieties) ที่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซิน ได้แก่ *A. flavus* , *A. parasiticus*, *A. nomius, A. niger, A.wontii,* และ *A. ruber* นอกจากนี้ยังมีเชื้อรา *Penicillium spp.* บางสายพันธุ์ที่ผลิตอะฟลาท็อกซินได้ (Wilson and Payne , 1994) *A. parasiticus* และ *A. flavus* เป็นเชื้อรา 2 ชนิดที่แยกได้จากวัตถุดิบมากว่า 80% ของเชื้อราที่พบทั้งหมด Shotwell (1991) ทำการเพาะแยกเชื้อราจากข้าวโพด อาหารสำเร็จ และพืชอาหารสัตว์อื่นๆ พบว่า ประมาณ 80% เป็นเชื้อรา *A. flavus* และ 90% ของอะฟลาท็อกซินที่ตรวจพบเป็น AFB1 Gourama และ Bullerman (1995) รายงานว่าเชื้อราที่แยกได้จากกากถั่วลิสงและกากถั่วเหลืองส่วนใหญ่จะเป็น *A. flavus* สายพันธุ์ 2999 ในข้าวโพดมักพบเป็น *A. flavus* สายพันธุ์ 3000 และ *A. flavus* สายพันธุ์ 3145 แยกเชื้อจากวัตถุดิบได้น้อย

Bhatnagar และคณะ(1994) รายงานว่าเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* ที่เพาะแยกได้ประมาณ 20-45% ไม่ผลิตอะฟลาท็อกซิน ซึ่งสอดคล้องกับ Strange (1991) ที่รายงานว่ามี 30-96% ของเชื้อรา *A. flavus* ที่เพาะแยกได้จากถั่วลิสง 79%ในเมล็ดฝ้าย 35%ในข้าว และ49%ในข้าวฟ่างที่ผลิตอะฟลาท็อกซิน Moss (1991) ศึกษาการเพาะเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* จากวัตถุดิบภายใต้สภาวะห้องทดลองเดียวกัน พบว่าเชื้อราที่แยกได้จากถั่วลิสง และเมล็ดฝ้ายสามารถผลิต

อะฟลาท็อกซินได้ประมาณ 74-100% แต่มีเชื้อราเพียง 20-58% ที่เพาะแยกได้จากข้าวเท่านั้นที่ผลิตอะฟลาท็อกซิน จะเห็นได้ว่าการตรวจพบเชื้อราไม่ได้หมายความว่าจะมีอะฟลาท็อกซินอยู่มากหรือน้อย ในขณะเดียวกันการไม่พบเชื้อราก็ไม่ได้หมายความว่าไม่มีอะฟลาท็อกซิน เนื่องจากในระหว่างขั้นตอนการเตรียมอาหารและสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเชื้อราจะถูกลดปริมาณลงแต่อะฟลาท็อกซินที่เชื้อราผลิตนั้นมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมและความร้อนจะยังคงอยู่ในอาหาร ดังนั้นการตรวจสอบระดับการปนเปื้อนของอะฟลาท็อกซินในอาหาร ควรวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาท็อกซินโดยตรงจะได้ค่าที่แท้จริงกว่าการเพาะแยกเชื้อ

2.4.2 อาหารที่เชื้อราต้องการ

โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาท็อกซินประกอบด้วยธาตุคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก ธาตุคาร์บอนที่ได้มาจากโปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรตที่มีในอาหาร เมื่อเชื้อราดูดซึมสารอาหารผ่านผนังเซลเข้าสู่กระบวนการเมทะโบลิซึมพื้นฐาน (Metabolism) ของสิ่งมีชีวิต เช่น Kreb's cycle เพื่อผลิตพลังงานไว้ใช้ในการดำรงชีวิต แต่ถ้ากระบวนการเมทะโบลิซึมถูกขัดขวางหรือไม่สิ้นสุด เชื้อราจะผลิตสารเมทะโบไลท์ชุดที่ 2 (2^{nd} Metabolite) ขึ้นมาซึ่งอะฟลาท็อกซินนั้นเป็นเมทะโบไลท์ชุดที่ 2 เชื้อราอาศัยกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนและไขมันเพื่อสร้าง Acetate units ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตอะฟลาท็อกซิน พืชที่มีองค์ประกอบของกลุ่มกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturated fatty acid) จะถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายกลายเป็นแหล่งคาร์บอน (carbon source promoting) ให้เชื้อราใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษ มีการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. parasiticus* บนเมล็ดทานตะวันและถั่วลิสง ซึ่งเมล็ดทานตะวันมีส่วนประกอบเป็น linoleic acid 75.5 % ส่วนถั่วลิสงมีส่วนประกอบเป็นที่ linoleic acid เพียง 29% เมื่อตรวจปริมาณอะฟลาท็อกซิน พบว่าเมล็ดทานตะวันมีอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในปริมาณถึง 712 μg / g ในขณะที่ถั่วลิสงพบเพียง 335 μg / g (Zaika and Buchman , 1987) พันทิพา (2543) อ้างถึงรายงานของ Church และ Pond (1982) ที่รายงานถึงส่วนประกอบที่เป็นไขมันในพืชอาหารสัตว์หลายชนิด โดยพบว่าในมะพร้าวมีไขมันเป็นองค์ประกอบประมาณ 63% ปาล์ม 50% ถั่วลิสง 45% เมล็ดฝ้าย 35-40% ทานตะวัน 40% และถั่วเหลือง 13-20%

Mehan และคณะ (1991) รายงานถึงความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษอะฟลาท็อกซินของเชื้อรา *A. parasiticus* ในกลุ่มธัญพืชหลายชนิด เช่น พืชตระกูลถั่ว พืชที่มีหัวใต้ดิน และเมล็ดพืช โดยจัดแบ่งพืชเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพืชที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบหลัก กลุ่มที่ 2 เป็นพืชที่มีส่วนประกอบเป็นไขมันในปริมาณสูง และกลุ่มที่ 3 เป็นพืชที่มีส่วนประกอบเป็นโปรตีนในปริมาณสูง พบว่า เชื้อราเจริญเติบโตได้ดีในพืชกลุ่มที่ 1 และ 2 และ

ยังพบว่าในกลุ่มที่ 2 สามารถผลิตอะฟลาท็อกซินได้สูงสุดในปริมาณตั้งแต่ 4.4-1,223 μg/g ส่วนในกลุ่มที่ 1 และ 3 พบว่าสามารถผลิตอะฟลาท็อกซินได้ในปริมาณ 0.1-172 และ 0.9-10.2 μg/g ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในพืชจำพวกเมล็ดละหุ่งซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม 2 ถึงแม้เชื้อราจะสามารถเจริญเติบโตได้ดีแต่การผลิตอะฟลาท็อกซินค่อนข้างต่ำ เนื่องมาจากปัจจัยบางชนิดในเมล็ดละหุ่งมีผลยับยั้งการผลิตอะฟลาท็อกซินของเชื้อรา Moss (1991) รายงานว่าการผลิตอะฟลาท็อกซินปริมาณที่สูงจะสัมพันธ์กับพืชที่มีองค์ประกอบเป็นไขมันและโปรตีนในสัดส่วนที่สูง นอกจากนี้ Zaika และ Buchanan (1987) รายงานว่า เชื้อราต้องการวิตามินและแร่ธาตุอีกหลายชนิดสำหรับการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษ โดยเฉพาะสังกะสี (Zinc) เป็นแร่ธาตุที่จำเป็นมากสำหรับการสังเคราะห์อะฟลาท็อกซิน เนื่องจากเป็นส่วนสำคัญในการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นและเอนไซม์ที่ใช้เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของ Acetate units ไปเป็นอะฟลาท็อกซิน Truckses และคณะ (1988) รายงานเพิ่มเติมว่า Phytic acid ซึ่งมีมากในพืชตระกูลถั่วเหลืองนั้นเป็นตัวขัดขวางการทำงานของธาตุสังกะสี (zinc) จึงสามารถยับยั้งการผลิตอะฟลาท็อกซินในพืชตระกูลนี้ได้

นอกจากสารอาหารที่เชื้อราต้องการแล้วยังพบว่าสมบัติทางเคมีของอาหารก็มีผลต่อการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษด้วยเช่นกัน Mahanna (1999) รายงานว่าความเป็นกรด – ด่างที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษของเชื้อราควรอยู่ที่ประมาณ 4-5 Bhatnagar และคณะ (1994) รายงานว่าถ้าความเป็นกรด-ด่างมีค่าต่ำกว่า 3 หรือสูงถึง 10 จะสามารถยับยั้งการผลิตอะฟลาท็อกซินของเชื้อราได้ ในขณะที่ Gourama และ Bullerman (1995) รายงานว่าค่าความเป็นกรด – ด่างไม่มีนัยสำคัญต่อการผลิตอะฟลาท็อกซินเท่าใดนัก Samarajeewa (1991) รายงานว่าการหมักในขั้นตอนการทำเบียร์ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของวัตถุดิบลดลงแต่ไม่สามารถกำจัดอะฟลาท็อกซินได้ทั้งหมด โดยยังมีอะฟลาท็อกซินตกค้างอยู่ประมาณ 18-27% ของปริมาณที่ตรวจพบในครั้งแรกซึ่งมีค่าประมาณ 1-10 ppb

2.4.3 ปัจจัยด้านสภาวะแวดล้อม

2.4.3.1 ความชื้น

FAO (1997) และ Wilson และ Payne (1994) พบว่าปัจจัยด้านสภาวะแวดล้อมที่สำคัญเป็นลำดับแรกที่เชื้อราต้องการในการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษ คือ ความชื้นของอาหารและอุณหภูมิของการเก็บรักษา ความชื้นที่พบในวัตถุดิบมาได้ 3 ทางคือ ความชื้นที่มีตามธรรมชาติในวัตถุดิบ ความชื้นจากกระบวนการผลิตและความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ Dickens (1977) รายงานว่าสำหรับ

การผลิตอะฟลาท็อกซินในถั่วลิสงที่มีความชื้น 15% ที่อุณหภูมิ 32.2 °C ใช้เวลานานเพียง 2 วันหลังการเพาะเชื้อเท่านั้น แต่ในถั่วลิสงที่มีความชื้น 20% ที่อุณหภูมิ 21.1 °C ใช้เวลาถึง 4 วัน

Williams (1991) ได้ทำการวิเคราะห์หาค่าวิกฤตของความชื้นในเมล็ดพืชที่ก่อให้เกิดการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษของเชื้อรา โดยควบคุมสภาพการทดลองให้มีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 70 % และอุณหภูมิที่ 32 °C ผลพบว่าค่าความชื้นที่วิกฤตของข้าวโพดทั้งเมล็ดคือ 14.17% ข้าวโพดป่น 13% กากถั่วเหลือง 13.1% และเมล็ดฝ้าย 11.5% ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ FAO (1997) ที่พบว่าที่ความชื้นสัมพัทธ์ 70% และอุณหภูมิ 27 °C ค่าวิกฤตของความชื้นในข้าวโพดคือ 13.5% ถั่วเหลือง 15% เมล็ดฝ้าย 10% เมล็ดปาล์ม 5.7% และถั่วลิสง 7% Sahin และ Cerci (1994) รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงความชื้นของข้าวโพดจาก 12.20% เป็น 16.65% ทำให้มีปริมาณอะฟลาท็อกซินเพิ่มขึ้นจาก 3.36 ppb เป็น 11.12 ppb และรายงานเพิ่มเติมว่าการป้องกันไม่ให้เชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* เจริญเติบโตต้องควบคุมความชื้นสัมพัทธ์ให้ต่ำกว่า 65% หรือควบคุมปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์ใช้ประโยชน์ได้ (Water activity, a_w) ให้น้อยกว่า 0.7 Truckses และคณะ (1988) รายงานถึงความต้องการปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์ใช้ประโยชน์ได้สำหรับเชื้อรา พบว่าที่อุณหภูมิ 16 °C a_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราในข้าวโพด ถั่วเหลืองและสับปะรด คือ 0.88,0.77 และ 0.85 เมื่อใช้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 26 °C พบว่า a_w ที่เหมาะสม คือ 0.73 , 0.69 และ 0.75 ตามลำดับ

2.4.3.2 อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ในการเก็บรักษาวัตถุดิบและอาหาร

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A.flavus* ประมาณ 25 °C และ *A.parasiticus* อยู่ในช่วง 25-35 °C ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการสร้างอะฟลาท็อกซินอยู่ระหว่าง 25-28 °C (Gourama and Bullerman, 1995) Aidoo (1991) อ้างถึงรายงานของ Hall (1969) ในการรายงานอุณหภูมิต่ำสุดและสูงสุดที่เชื้อราสามารถผลิตอะฟลาท็อกซินได้ คือที่อุณหภูมิ 13 °C ± 1 °C เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่ความชื้นสัมพัทธ์ 98 ± 1% เป็นเวลา 21 วัน และอุณหภูมิ 41.5 °C ± 1.5 °C เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่ความชื้นสัมพัทธ์ 98 ± 1% เป็นเวลา 12 วัน นอกจากนี้เชื้อรา *Aspergillus* ต้องการความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 70% สำหรับการเจริญเติบโต (Strange, 1991; Wilson and Payne, 1994; Mahanna, 1999)

Bhatnagar และคณะ (1994) รายงานว่าในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 24-34 °C ความชื้น 14-30% เชื้อราสามารถเจริญเติบโตและสร้างสารพิษได้ในเวลา 7-14 วัน โดยสารพิษอะฟลาท็อกซินจะถูกสร้างสูงสุดในวันที่ 7 แล้วจะค่อยๆลดลงจนถึงวันที่ 10 Gourama และ Bullerman (1995)

รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้อุณหภูมิ 24 °C เชื้อราจะผลิตสารพิษอะฟลาท็อกซินได้สูงสุดในวันที่ 4-7 Strange (1991) รายงานว่าในเมล็ดฝ้ายอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อราเจริญได้สูงสุดคือ 30-35 °C แต่อุณหภูมิที่เชื้อราผลิตอะฟลาท็อกซินได้มากที่สุดอยู่ที่ประมาณ 25-30 °C และสรุปว่าที่อุณหภูมิ 30 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 83% หรือ อุณหภูมิ 20 °C และความชื้นสัมพัทธ์ 86% เป็นอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่ยอมรับได้สูงสุดในการเก็บรักษาถั่วลิสง Wilson และ Payne (1994) ศึกษาความแตกต่างของอุณหภูมิระหว่างวันต่อการติดเชื้อราของข้าวโพด พบว่าที่อุณหภูมิกลางวัน/กลางคืน 34/30 °C เมล็ดข้าวโพดมีการปนเปื้อนเชื้อราประมาณ 28% แต่เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนเป็น 34/22 °C ทำให้ข้าวโพดมีการปนเปื้อนเชื้อราเพิ่มขึ้นอีก 7%

2.4.3.3 ปริมาณอากาศหรือออกซิเจน

เชื้อราต้องการออกซิเจนไปใช้ในกระบวนการ Hexose monophosphate pathway ซึ่งให้ผลผลิตเป็นกลูโคสเพื่อใช้เป็นพลังงานในการดำรงชีวิตและเชื้อรายังใช้ออกซิเจนในการเร่ง (Catalyze) กลูโคสที่ผลิตได้ให้เข้าสู่วงจรกรดซิตริค (Citric acid cycle) แล้วเปลี่ยนเป็น Acetate เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตอะฟลาท็อกซิน (Zaika and Buchanan , 1987) ปริมาณออกซิเจนที่ลดลงจึงมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและการสังเคราะห์อะฟลาท็อกซินให้น้อยลงด้วยแต่ต้องเป็นการลดลงในปริมาณที่มากจึงจะเห็นผลต่อการลดของอะฟลาท็อกซินอย่างชัดเจน

Moss (1991) พบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ CO_2 ในอากาศจาก 0.03% (ซึ่งเป็นความเข้มข้นในอากาศปกติ) เป็น 20% ภายใต้อุณหภูมิ 25 °C ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 99% ทำให้เชื้อราผลิตอะฟลาท็อกซินลดลง 75% แต่ถ้าอุณหภูมิลดลงเหลือ 17 °C และความชื้นสัมพัทธ์อยู่ระหว่าง 86-92% การผลิตอะฟลาท็อกซินจะถูกยับยั้งได้ทั้งหมด

2.4.3.4 ระยะเวลาในการเก็บรักษา

การเจริญเติบโตและสร้างสารพิษของเชื้อราจะใช้เวลาที่แตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยต่างๆที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เช่น ในวัตถุดิบชนิดเดียวกัน อุณหภูมิ ความชื้น ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศและปริมาณอากาศแตกต่างกันทำให้ระยะเวลาที่เชื้อราจะเจริญและสร้างสารพิษต่างกัน Sahin และ Cerci (1994) ศึกษาสภาวะการเก็บรักษาอาหารสำเร็จรูปสำหรับโคในสภาพที่มีการหมุนเวียนอากาศไม่ดีนัก โดยแบ่งระยะเวลาการเก็บรักษาออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-3 วัน กลุ่มที่ 2 ระยะเวลาการเก็บรักษา 4-8 วัน กลุ่มที่ 3 ระยะเวลาการเก็บรักษา 9- 15 วัน และกลุ่มที่ 4 ระยะเวลาการเก็บรักษา 16-30 วัน พบว่า เมื่อเริ่มต้นอาหารสำเร็จมีความชื้นประมาณ

12.20% หลังจากทำการศึกษาแล้วปรากฏว่าทั้ง 4 กลุ่มมีความชื้นเพิ่มขึ้นในระดับที่แตกต่างกันจนถึงสูงสุดที่ 16.65% และพบการปนเปื้อนของ AFB1 ในกลุ่มที่ 3 และ 4 เพิ่มขึ้นในปริมาณ 3.36 และ 11.12 ppb ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความชื้น ระยะเวลาในการเก็บรักษา และปริมาณ AFB1 ที่เปลี่ยนแปลงพบว่าค่าเหล่านี้มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาข้าวโพดที่ปลอดภัยถ้าข้าวโพดมีความชื้น 15% เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 24 °C สามารถเก็บได้นานถึง 116 วัน แต่ถ้าข้าวโพดมีความชื้นเพิ่มขึ้นเป็น 20% ทำให้อายุการเก็บรักษาสั้นลงเหลือเพียง 12.1 วัน

2.4.3.5 การแตกหักของเมล็ดหรือฝัก

ปัญหาสำคัญอีกประการที่พบในระหว่างการเก็บรักษาวัตถุดิบ คือ การแตกหักของเมล็ด เนื่องจากการกัดแทะของแมลง นก และสัตว์ฟันแทะ ทำให้เชื้อรามีโอกาสเข้าสู่เมล็ด และใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเจริญเติบโตและสร้างสารพิษได้ง่ายขึ้น Wilson และ Payne (1994) รายงานว่าสามารถแยก *A. flavus* ที่พบในแมลงและสัตว์จำพวกมอดได้มากถึง 79% Proctor (1994) รายงานว่าถ้าเมล็ดวัตถุดิบมีการแตกหักเพิ่มขึ้นจากเดิม 5% ทำให้อายุการเก็บรักษาสั้นลงถึง 135 วัน