

ชื่อวิทยานิพนธ์

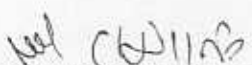
การศึกษาการปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์

นางวันทนา เลิศศิริวรกุล

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(รศ.ดร. สนั่น จอกลอย)


.....กรรมการ
(อ.ดร. โสภณ วงศ์แก้ว)


.....กรรมการ
(อ.ดร. บรรยง ทุมแสน)

บทคัดย่อ

สารอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในถั่วลิสง เป็นปัญหาสำคัญต่อสุขภาพของผู้บริโภคถั่วลิสง เนื่องจากอะฟลาทอกซินทำให้เกิดโรคมะเร็งในตับ การปนเปื้อนของเชื้อราและอะฟลาทอกซินพบทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะในระดับโรงงานกะเทาะเปลือกซึ่งเป็นตัวกลางในการกระจายผลผลิตจากเกษตรกรไปสู่โรงงานแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ สภาพแวดล้อม การกะเทาะเปลือกและควมชื้นขนาดของโรงงานอาจมีอิทธิพลต่อปริมาณอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในถั่วลิสงได้ ดังนั้นการทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินของถั่วลิสงหลังการเก็บเกี่ยวในระดับโรงงานกะเทาะเปลือก โดยศึกษาถึงประสิทธิภาพในการใช้วิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) สำหรับตรวจวัดปริมาณอะฟลาทอกซิน และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อรา และอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนกับเมล็ดถั่วลิสง ก่อนทำการทดลองได้ศึกษาสภาพโดยทั่วไปของโรงงานกะเทาะเปลือก โดยเลือกตัวแทนจากโรงงานจังหวัดกาฬสินธุ์

เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปกำหนดระยะเวลาการเก็บรักษาถั่วลิสงในการทดลอง โดยการทดลอง แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกได้นำถั่วลิสงฝักแห้งที่โรงงานรับซื้อไว้จำนวน 200 กิโลกรัมมา เก็บรักษาไว้ในลักษณะบรรจุกระสอบ เก็บไว้ในโรงเรือนที่มีการระบายอากาศดี ทำการเก็บ รักษาไว้ 28 วัน สุ่มเก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณอะฟลาทอกซินในวันเก็บรักษาที่ 0,3,6,9,12 และ 28 และศึกษาอิทธิพลของการคัดแยกเกรดต่อคุณภาพของถั่วลิสง โดยนำถั่วลิสงมา กะเทาะเปลือกและคัดแยกเมล็ดเป็นเกรด 1-4 แล้วสุ่มเก็บตัวอย่าง ในวันเก็บรักษาที่ 12 และ 28 ทำการทดลองใน 2 ฤดูปลูกคือ ฤดูฝน และฤดูแล้ง ปี 2537 ที่หมวดพืชไร่ มหาวิทยาลัย ขอนแก่น ตัวอย่างถั่วลิสงที่สุ่มเก็บมาจะนำเข้าสู่การทดลองส่วนที่ 2 ในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทำการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซิน ด้วยวิธี ELISA เพื่อใช้เป็นข้อมูลศึกษาการสะสมอะฟลาทอกซินในการเก็บรักษาที่อายุต่าง ๆ นอกจากนั้นยังมีการทดลองอื่น ๆ ในห้องปฏิบัติการ คือ การศึกษาประสิทธิภาพของวิธี ELISA ในการตรวจวัดอะฟลาทอกซิน ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง ซ้ำ 2 ครั้ง ห่างกัน 7 วัน การ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินกับปริมาณการติดเชื้อรา *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* และ *A. niger* ทำโดยนำตัวอย่างที่ทราบปริมาณ อะฟลาทอกซินตั้งแต่ 2.4 - 2,392.5 ppb ไปตรวจสอบการติดเชื้อราทั้ง 3 ชนิด บน rose bengal agar medium นับจำนวนโคโลนี/กรัม ถั่วลิสง แล้วหาค่าสัมประสิทธิ์ของสห สัมพันธ์กับปริมาณอะฟลาทอกซิน และสุดท้ายเป็นการศึกษาการสร้างสารอะฟลาทอกซิน โดยเชื้อ *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. niger* จากไอโซเลต (isolate) ที่แยกได้จาก ตัวอย่างถั่วลิสง โดยศึกษาผลของความชื้นเมล็ดที่เพิ่มขึ้นจาก 8.55 % เป็น 27 % ต่อ การเกิดอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง และเปรียบเทียบปริมาณอะฟลาทอกซินระหว่าง การปลูก เชื้อ และ ไม่ปลูกเชื้อลงบนถั่วลิสงที่มีความชื้นเมล็ด 27 % ที่ทำให้เมล็ดมีและไม่มีแผล

ผลการศึกษาพบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษามีผลต่อ การเพิ่มขึ้นของปริมาณ อะฟลาทอกซิน โดยเฉพาะในฤดูฝนจะมีปริมาณ อะฟลาทอกซิน เพิ่มขึ้นมากกว่าในฤดู แล้ง เนื่องจากในฤดูฝนมีปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ และอุณหภูมิเหมาะสมต่อ การเจริญเติบโตของเชื้อรา และการสร้างอะฟลาทอกซิน โดยมีความชื้นสัมพัทธ์ของ อากาศ และอุณหภูมิสูงสุดของการเก็บรักษา เท่ากับ 80 % และ 27 - 35° C ตามลำดับ ในขณะที่ฤดูแล้งมีความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ 70 % และมีอุณหภูมิสูงสุด 30 - 40° C

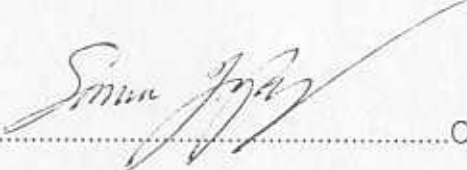
การคัดแยกเกรตเมล็ดถั่วลิสงมีผลในการลดปริมาณอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง แต่ไม่เด่นชัดว่าปริมาณอะฟลาทอกซินจะลดลงในถั่วเกรตใดมากที่สุด สำหรับปริมาณเชื้อ *A. flavus* ที่ตรวจพบไม่มีสหสัมพันธ์ต่อปริมาณอะฟลาทอกซิน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ = 0.173 $R^2 = 0.03$ แต่กลับพบสหสัมพันธ์ระหว่างเชื้อ *A. niger* กับปริมาณอะฟลาทอกซิน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ = 0.806 $R^2 = 0.649$ แต่ผลการทดสอบการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อ *A. flavus*, *A. parasiticus* และ *A. niger* พบว่า *A. flavus* ไอโซเลตที่สร้าง cleistothecium มีการสร้างอะฟลาทอกซินได้สูงที่สุดถึง 7,800 ppb ส่วนถั่วที่ปลูกเชื้อ *A. niger* ตรวจพบอะฟลาทอกซินต่ำสุด 36 ppb และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างถั่วแห้ง ซึ่งมีความชื้นเมล็ด 8.55% กับถั่วขึ้น มีความชื้นเมล็ด 27% โดยไม่มีการปลูกเชื้อพบว่าเมื่อความชื้นเมล็ดเพิ่มขึ้น เชื้อรามีการเจริญเติบโตดีมากในถั่วที่มีบาดแผล และมีการสร้างอะฟลาทอกซินได้สูงถึง 5,000 ppb ส่วนในถั่วที่ไม่มีบาดแผลมีการตรวจพบอะฟลาทอกซินได้ถึง 1,250 ppb เช่นกัน

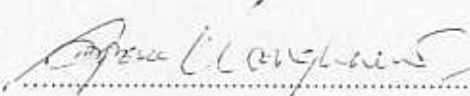
สำหรับผลการศึกษาประสิทธิภาพของวิธี ELISA ในการตรวจวัดปริมาณอะฟลาทอกซิน นั้นพบว่าวิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ = 1 เมื่อวิเคราะห์พร้อมกันแต่ต่าง plate และให้ค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ = 0.986 เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างเดียวกัน แต่ห่างกัน 7 วัน จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าปัจจัยที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน คือ ชนิดของเชื้อซึ่งรวมถึงปริมาณไอโซเลตที่สร้าง และไม่สร้างอะฟลาทอกซิน ความชื้นของเมล็ด ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ อุณหภูมิ ระยะเวลาในการเก็บรักษา และฤดูกาล มีผลต่อการสร้างอะฟลาทอกซิน ซึ่งถ้าโรงงานกะเทาะเปลือกสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ให้อยู่ในสภาพที่ไม่ส่งเสริมการสร้างอะฟลาทอกซินก็จะสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงที่ออกจากโรงงานได้

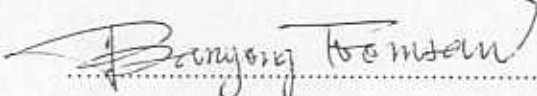
THESIS TITLE : STUDY OF AFLATOXINS CONTAMINATION IN GROUNDNUT

AUTHOR : MRS.WANTANA LERTSIRIWORAKUL

THESIS ADVISORY COMMITTEE :


.....Chairman
(Associate Professor Dr.Sanun Jogloy)


.....Member
(Dr.Sopone Wongkaew)


.....Member
(Dr.Banyong Toomsan)

ABSTRACT

Aflatoxins contamination in groundnuts is a health problem to consumers, because aflatoxins can induce liver cancer in mammals. Contamination of *Aspergillus spp.* and aflatoxins occurs in both preharvest and postharvest in groundnuts especially during the processes of shell milling factories which are the middle stage of groundnut distribution from the farmers to the factories where groundnut seeds are made into several products. The level of aflatoxins contamination is affected by environmental conditions of the milling factory especially during shelling and grading processes. The objectives of this research are 1) to study aflatoxins contamination in groundnuts during postharvest at shell milling level using ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) to check aflatoxins and 2) to study the correlation between *Aspergillus spp.* incidences and aflatoxins production in groundnuts. Before the experiment was conducted, a case study on environmental conditions of a shell milling factory in Kalasin province was

conducted to gain information of storage duration used in the experiment. The experiment was divided into two parts. In the first part, two hundred kilograms of groundnuts dry pod were bought from a shell milling factory at Kalasin. They were stored in bags and placed inside a good ventilated room for 28 days. Samples of groundnuts were taken to check aflatoxins contamination at days 0, 3rd, 6th, 9th, 12th, and 28th of storage. At days 12th and 28th of storage, the shelled seeds were graded into grades 1-4 in order to study the effects of grading to the quality of groundnuts. This first part experiment was conducted in both wet and dry seasons of 1994 at Field Crop Research Farm, Khon Kaen University. The second part of the experiment was conducted in the Plant Pathology Laboratory, Khon Kaen University with the objective of using ELISA to analyze aflatoxins contamination at different storage duration. In addition, an effectiveness of ELISA technique in quantifying the amount of aflatoxins was conducted by analyzing aflatoxins 2 times at 7 days interval. Aflatoxins contaminated samples at the levels of 2.4 - 2,392.5 ppb were tested for incidences of *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. niger* by counting the number of colonies grown on rose bengal agar medium and then the incidences of colonies of each species were correlated to aflatoxins levels. Finally, a study of aflatoxins production by isolates of *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. niger* in seed samples where moisture content was increased from 8.55 % to 27 %, comparisons were also made between inoculated and uninoculated seed, and between injured and uninjured seeds at the 27 % seed moisture content.

The results of the study revealed that the duration of storage had a major effect on the levels of aflatoxins contamination. Aflatoxins contamination was higher in the wet season than in the dry season. This was due to higher relative humidity in the rainy season than in the dry season. Meanwhile, the temperature in the rainy season might be optimum for the growth of fungi and therefore increased aflatoxins contamination. The maximum relative humidity and temperature during

storages in the wet season were 80 % and 27 - 35 °C respectively, whereas in dry season were 70 % and 30 - 40 °C respectively. Grading of groundnuts reduced the level of aflatoxins contamination but it was difficult to pinpoint in which grades. *A. flavus* incidence was not correlated to the level of aflatoxins (correlation = 0.173 $R^2 = 0.03$), whereas *A. niger* incidence correlated to the level of aflatoxins (correlation = 0.806 $R^2 = 0.649$). The level of aflatoxins production by *A. flavus* isolated from cleistothecium was the highest which was 7,800 ppb whereas *A. niger* had the lowest level of aflatoxins which was 36 ppb. The comparison between dry groundnuts (8.55 % moisture content) and wet groundnuts (27 % moisture content) revealed that the higher seed moisture content, the higher level of aflatoxins contamination. The injured groundnut seeds had a higher level of aflatoxins (5,000 ppb) than those uninjured groundnut seeds (1,250 ppb).

ELISA was effective in detecting aflatoxins contamination. It gave a high correlation of 1 when analyzed samples at the same time of different plates and also gave a correlation of 0.986 when analyzed the same sample at 7 days interval.

In conclusion, the factors that induced aflatoxins contamination in groundnuts were : types of fungi (including all isolates that formed and did not formed aflatoxins), seed moisture content, relative humidity (%), storage temperature, storage duration and seasons. Therefore, it is very important to the shell milling factories to control all these factors to reduce the levels of aflatoxins contamination in their products.