

การตรวจเอกสาร

1. การผลิตและการตลาดถั่วลิสง

1.1 การผลิตถั่วลิสงของโลก

ถั่วลิสงเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง การผลิตถั่วลิสงของโลกในปีเพาะปลูก 2536/37 มีปริมาณการผลิต 23.5 ล้านตัน คิดเป็นร้อยละ 10.0 ของปริมาณการผลิตพืชน้ำมันของโลก (ประมาณ 234.8 ล้านตัน) สำหรับปริมาณการผลิตถั่วลิสงของโลกนั้นมีแนวโน้มลดลงจาก 25.3 ล้านตันในปี 2531 ลดลงเหลือ 23.5 ล้านตันในปี 2535 ซึ่งสาเหตุมาจากการลดลงของพื้นที่ปลูก และ ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ โดยในปี 2531 มีปริมาณการปลูกถั่วลิสงของโลกถึง 130.5 ล้านไร่ ลดลงเป็น 128.7 ล้านไร่ในปี 2535 และผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่ลดลงจาก 194 กิโลกรัมต่อไร่ในปี 2531 เป็น 182 กิโลกรัมต่อไร่ในปี 2535 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร , 2537)

1.2 การผลิตถั่วลิสงของประเทศไทย

การผลิตถั่วลิสงของประเทศไทยในปีเพาะปลูก 2536/37 มีเนื้อที่เพาะปลูก 602,790 ไร่ ได้ผลผลิต 136,363 ตัน ผลผลิตเฉลี่ย 238 กิโลกรัมต่อไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร , 2537) ซึ่งการผลิตถั่วลิสงของไทยมีแนวโน้มลดลงทั้งในแง่ของเนื้อที่เพาะปลูกและผลผลิต เช่นเดียวกับการผลิตของโลก เนื่องจากต้นทุนการผลิตสูงทั้งด้านราคาเมล็ดพันธุ์ สารเคมีที่ใช้มีราคาแพง ปัญหาสำคัญคือเสียดำค่าใช้จ่ายในการจ้างแรงงานเก็บเกี่ยวสูง แรงงานหายาก ผลผลิตต่อไร่ต่ำ มีปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารอะฟลาทอกซิน (aflatoxins) ทำให้คุณภาพของผลผลิตต่ำกว่ามาตรฐาน และมีการลักลอบนำเข้าถั่วลิสงจากต่างประเทศทำให้ราคาถั่วลิสงในประเทศตกต่ำ เกษตรกรจึงหันไปปลูกพืชอื่นทดแทน เมื่อเทียบกับปีเพาะปลูก 2533/34 ประเทศไทยมีเนื้อที่เพาะปลูกถั่วลิสงถึง 759,554 ไร่ ได้ผลผลิต 161,114 ตัน มีผลผลิตเฉลี่ย 220 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์แล้ว ในปีเพาะปลูก 2536/37 มีเนื้อที่เพาะปลูกลดลง 20.64 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตลดลง 15.36 เปอร์เซ็นต์ แต่ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจาก 220 กิโลกรัมต่อไร่เป็น 238 กิโลกรัมต่อไร่ เมื่อพิจารณาถึงแหล่งการผลิตถั่วลิสงที่สำคัญของประเทศไทยจะอยู่ทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และ

ภาคกลาง โดยภาคเหนือมีเนื้อที่เพาะปลูกถั่วลิสงในปี 2536/37 286,796 ไร่ ภาคตะวันออก เชียงเหนือมีเนื้อที่เพาะปลูก 198,901 ไร่ ภาคกลาง 91,976 ไร่ และภาคใต้ 25,117 ไร่ ตามลำดับ สำหรับผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่สูงที่สุดอยู่ในภาคกลาง 271 กิโลกรัมต่อไร่ จังหวัดที่มีเนื้อที่เพาะปลูกถั่วลิสงมากในภาคเหนือคือ จังหวัดลำปาง เชียงราย น่าน พะเยา และ เชียงใหม่ โดยมีพื้นที่ปลูกมากกว่า 3 หมื่นไร่ ในแต่ละจังหวัด ส่วนในภาคตะวันออกเชียงเหนือมีพื้นที่ปลูกสำคัญอยู่ในจังหวัดเลย กาฬสินธุ์ ศรีสะเกษ อุตรดิตถ์ และขอนแก่น ในจังหวัดที่มีพื้นที่เพาะปลูกมากเหล่านี้ จังหวัดที่มีผลผลิตเฉลี่ยสูงกว่าค่าเฉลี่ยของประเทศ (238 กิโลกรัมต่อไร่) คือจังหวัดเชียงใหม่ (256 กิโลกรัมต่อไร่) อุตรดิตถ์ (248 กิโลกรัมต่อไร่) และเลย (268 กิโลกรัมต่อไร่) (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร , 2537) สำหรับการผลิตถั่วลิสงของไทยจะมีการปลูกกันมากในช่วงต้นฤดูฝน และ ลดน้อยลงไปปลายฤดูฝน และ ฤดูแล้งตามลำดับ

การผลิตถั่วลิสงของเกษตรกรจะแตกต่างกันตาม สภาพพื้นที่ และ ฤดูกาล โดย ฤดูกาลปลูกสามารถแบ่งได้ 3 ฤดูคือ ต้นฤดูฝน ปลายฤดูฝน และฤดูแล้ง การปลูกต้นฤดูฝน เกษตรกรมักปลูกถั่วลิสงเพียงอย่างเดียวในที่ดอนอาศัยน้ำฝนโดยเริ่มปลูกประมาณเดือน เมษายน ถึง พฤษภาคม เก็บเกี่ยวประมาณเดือนกรกฎาคม ถึง สิงหาคม การปลูกปลายฤดูฝนและฤดูแล้งมักเป็นการปลูกเป็นพืชรองหรือพืชเสริมในระบบการปลูกพืชร่วมกับพืชไร่ หรือ ข้าว ถ้าปลูกปลายฤดูฝนมักจะปลูกถั่วลิสงในที่ดอนตามหลังการปลูกพืชไร่ โดยเริ่มปลูกประมาณเดือนกรกฎาคม ถึง สิงหาคม เก็บเกี่ยวประมาณเดือนพฤศจิกายน ถึง ธันวาคม ถ้าปลูกในฤดูแล้งมักจะปลูกถั่วลิสงในที่นาในเขตชลประทานโดยเริ่มปลูกประมาณเดือน ธันวาคม ถึง มกราคม เก็บเกี่ยวประมาณเดือนมีนาคม ถึง เมษายน (สุกัญญา และคณะ, 2533) ถั่วลิสงที่ปลูกปลายฤดูฝนหรือฤดูแล้งจะเป็นถั่วที่มีคุณภาพดี เนื่องจากในช่วงเก็บเกี่ยวมีความชื้นต่ำ (สุกัญญา และคณะ, 2533 ; วุฒิสักดิ์ และคณะ, 2536) จึงมีการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินต่ำ

1.3 การตลาดถั่วลิสงฝักแห้งในประเทศไทย

การตลาดถั่วลิสงฝักแห้งของประเทศไทยแบ่งตามประเภทสินค้าได้ 3 ประเภท คือ ถั่วลิสงกะเทาะเปลือก ถั่วลิสงคั่ว(ทั้งเปลือก) และเมล็ดพันธุ์ (ศรีณย์ และคณะ , 2533 ; ขวาลทวุฒิ , 2532 และ วีระ , 2532)

การตลาดถั่วลิสงกะเทาะเปลือก

การตลาดถั่วลิสงกะเทาะเปลือก ผลผลิตถั่วลิสงจะเข้าสู่โรงงานกะเทาะเปลือก ซึ่งโรงงานจะทำหน้าที่กะเทาะเปลือก คัดแยกเกรด และเป็นผู้รวบรวมผลผลิตถั่วลิสง โดยการรับซื้อเฉพาะถั่วลิสงที่แห้งแล้วจากพ่อค้าในหมู่บ้าน พ่อค้าเร่ พ่อค้าพืชไร่ หรือเกษตรกรอาจนำถั่วลิสงฝักแห้งมาขายให้กับโรงงานเอง ปริมาณการรับซื้อของโรงงานจะซื้อได้เป็นวัตถุดิบทยอยกะเทาะเปลือกตามความต้องการของโรงงานแปรรูป ซึ่งปกติถั่วลิสงทั้งเปลือกจะเก็บสำรองไว้ไม่เกิน 3 เดือน หลังจากนั้นจะมีผลผลิตถั่วลิสงรุ่นใหม่ออกสู่ตลาดอีก เนื่องจากถ้าเก็บไว้นานเกิน 1 เดือน สีของเยื่อหุ้มเมล็ดจะเปลี่ยนไป ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด และทำให้ราคาขายตก โรงงานจึงกะเทาะเปลือกเมื่อได้รับการสั่งซื้อเท่านั้น หลังจากกะเทาะเปลือกแล้วจะมีการคัดขนาดเมล็ดถั่วลิสงออกเป็น 3 เกรด คือ เกรด 1 ขนาดเมล็ดใหญ่สม่ำเสมอไม่มีเมล็ดแตก เกรด 2 ขนาดเมล็ดเล็กลงมีเมล็ดแตกหรือถั่วซีกปน เกรด 3 ขนาดเมล็ดเล็กมีเมล็ดแตกปนมาก ถั่วเกรด 1 จะขายส่งโรงงานทำขนม ถั่วเกรด 2 ส่งโรงงานทำถั่วลิสงป่นหรือโรงงานสกัดน้ำมันถั่วลิสง ถั่วเกรด 3 นำไปสกัดน้ำมัน (ศรินย์ และคณะ , 2533) และจากการสุ่มวัดขนาดของเมล็ดถั่วลิสงเกรดต่าง ๆ ของโรงงานกะเทาะเปลือกถั่วลิสง จังหวัดกาฬสินธุ์ พบว่าถั่วเกรด 1 , 2 และ 3 มีขนาด 100 เมล็ดประมาณ 66 , 40 - 45 และ 30 - 35 กรัม ตามลำดับ (สนั่น และคณะ , 2540)

การตลาดถั่วลิสงคั่ว

ผลผลิตถั่วลิสงฝักแห้งจะถูกนำไปผลิตเป็นถั่วลิสงคั่ว โดยพ่อค้าที่ทำการคั่วถั่วลิสงขายส่ง ซึ่งจะมีอยู่แทบทุกจังหวัด พ่อค้าที่คั่วถั่วลิสงอาจจะซื้อถั่วลิสงฝักแห้งจากเกษตรกรเอง หรือจากพ่อค้ารวบรวมถั่วลิสงในหมู่บ้าน พ่อค้าเร่ พ่อค้ารับซื้อพืชไร่ และโรงงานกะเทาะเปลือกที่รับซื้อถั่วลิสงไว้เป็นจำนวนมาก พ่อค้าคั่วถั่วลิสงจะซื้อถั่วลิสงกักตุนไว้เป็นจำนวนมากในขณะที่มีราคาต่ำ แต่ส่วนใหญ่จะมีกำลังการผลิตถั่วลิสงคั่วขายวันละ 1 - 2 กระสอบเท่านั้น (กระสอบละ 38 - 45 กิโลกรัม) โดยมีวิธีการผลิตแบบง่าย ๆ คือ นำถั่วลิสงฝักแห้งไปคั่วในกะทะทราย จนฝักเหลือง มีกลิ่นหอม ใช้ตะแกรงตักร่อนฝักถั่วออกมา คัดฝักไม่ดีออกบรรจุถุงพลาสติกทำเป็นพวง ๆ ละ 14 ถุง ขายส่งพวงละ 7 บาท มีน้ำหนักพวงละประมาณ 0.5 กิโลกรัม แล้วจึงนำไปขายให้กับร้านค้าในหมู่บ้าน ร้านขายส่งในเมือง ตลาดกลางขายส่งฝัก ผลไม้ในจังหวัด และจะมีพ่อค้าขายปลีกมาซื้อไปขายอีกต่อหนึ่ง สำหรับปริมาณการบริโภคถั่วลิสงของประชาชนจะเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาลและงานเทศกาลต่าง ๆ และมี

แนวโน้มว่าจะขยายการบริโภคมากขึ้น ซึ่งในปัจจุบันนี้มีการพัฒนาวิธีการผลิตจากการคั่วไปเป็นการใช้หม้ออบที่จังหวัดร้อยเอ็ด ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาหลายรูปแบบ เช่น ถั่วลิสงคั่วกรอบถุงพลาสติก ถั่วลิสงคั่วแกะเปลือกและเยื่อหุ้มเมล็ด และถั่วลิสงป่น ทำให้ผู้บริโภคมีความสะดวกมากขึ้น และได้บริโภคผลิตภัณฑ์ถั่วลิสงที่ผลิตออกมาใหม่ ๆ อยู่เสมอ เนื่องจากผู้บริโภคส่วนใหญ่จะเลือกซื้อเฉพาะผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ ดังนั้นพ่อค้าจะมีการปรับเปลี่ยนปริมาณการผลิตถั่วลิสงคั่วในแต่ละวันให้พอดีกับความต้องการของผู้ซื้อ ผลิตภัณฑ์จึงไม่ตกค้าง และเป็นการควบคุมคุณภาพผลิตภัณฑ์ได้ด้วย (วีระ , 2532)

การตลาดเมล็ดพันธุ์

เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสงที่เกษตรกรใช้ปลูกมาจากหลายแหล่ง เช่น เมล็ดพันธุ์ที่เก็บไว้เอง เมล็ดพันธุ์ที่ซื้อหรือขอยืมจากเกษตรกรรายอื่นที่เห็นว่าเป็นถั่วลิสงพันธุ์ดี ผลผลิตสูง เมล็ดพันธุ์จากพ่อค้ารับซื้อพืชไร่หรือพ่อค้าขายส่งถั่วลิสงระดับต่าง ๆ โรงงานกะเทาะเปลือก และหน่วยงานราชการ เช่น ศูนย์ขยายพันธุ์พืชต่าง ๆ ของกรมส่งเสริมการเกษตร ทั้งในรูปของการแจก ให้ยืม และแลกเปลี่ยนกับเมล็ดพันธุ์พืชอื่น ๆ ซึ่งเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากศูนย์ขยายพันธุ์พืชเป็นเมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพดี ตรงตามพันธุ์ และเปอร์เซ็นต์ความงอกสูง แต่ส่วนใหญ่แล้วเกษตรกรจะใช้เมล็ดพันธุ์ที่เก็บไว้เองมากกว่า นอกจากเมล็ดพันธุ์ของตนเองไม่พอจึงจะซื้อหรือหาจากแหล่งอื่น ซึ่งการเก็บเมล็ดถั่วลิสงไว้ทำพันธุ์ เกษตรกรจะคัดเลือกถั่วลิสงในแปลงหลังจากถอน ตากไว้ในแปลงประมาณ 5 วัน ปลิดฝัก ตากฝักบนลานดิน หรือบนกระสอบปุยเคมีจนแห้ง แล้วเก็บใส่กระสอบป่านเอาไว้ได้ฤกษ์บ้าน สำหรับเมล็ดพันธุ์ที่ซื้อจากพ่อค้านั้นเป็นถั่วลิสงที่รับซื้อจากเกษตรกร แต่มีการคัดเลือกถั่วลิสงจากกระสอบที่มีฝักสมบูรณ์ดี ฝักสะอาด มีสิ่งเจือปนน้อย แล้วนำมาขายให้เกษตรกรอีกต่อหนึ่ง การใช้พันธุ์ที่เกษตรกรเก็บไว้เองข้ามฤดูปลูก หรือใช้พันธุ์จากพ่อค้าต่าง ๆ มักเป็นเมล็ดพันธุ์เก่าคุณภาพไม่ดี มีเปอร์เซ็นต์ความงอกไม่สูงนัก ฝักไม่เต็ม ต้องเสียเวลาในการกะเทาะเปลือกและคัดเมล็ดเสียออก สำหรับเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากโรงงานกะเทาะเปลือกนั้นบางโรงงานมีการส่งเสริมให้เกษตรกรใช้เมล็ดพันธุ์ใหม่ที่กะเทาะเปลือกและมีการคัดเมล็ดเสียออกแล้ว โดยให้ใช้เมล็ดพันธุ์ที่มีขนาดไม่ใหญ่เกินไป เนื่องจากเมล็ดที่มีขนาดใหญ่จะถูกตะแกรงขัดสีมากทำให้เปอร์เซ็นต์ความงอกต่ำ (วีระ , 2532 ; ศรัณย์ และคณะ , 2533)

2. อะฟลาทอกซินและเชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซิน

สารอะฟลาทอกซินจัดอยู่ในกลุ่ม diflanocoumarin ซึ่งมีอยู่ 5 ชนิด ดังนี้ คือ อะฟลาทอกซิน บี 1 ($C_{17}H_{12}O_6$) บี 2 ($C_{17}H_{14}O_6$) จี 1 ($C_{17}H_{12}O_7$) จี 2 ($C_{17}H_{12}O_7$) และ เอ็ม 1 ($C_{17}H_{12}O_7$) สารพิษในกลุ่มนี้ประกอบด้วย furan ring 2 อัน กับ clyclopentanone ring ตัวอักษร บี และ จี ย่อมาจากคำว่า Blue และ Green ตามสีของการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365 nm (Wogan and Busby, 1980 และ Coulibaly, 1989) ส่วนอะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 เป็นสารพิษที่ตรวจพบในน้ำนมของสัตว์ที่ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซิน บี 1 (Baht, 1989) สำหรับความแตกต่างทางโครงสร้างเคมีคือ อะฟลาทอกซิน บี 1 จี 1 และ เอ็ม 1 มี double bond ที่ ring ที่ 1 ส่วนอะฟลาทอกซิน บี 2 และ จี 2 ไม่มี double bond ที่ ring ที่ 1 (ภาพที่ 1) กลุ่มของอะฟลาทอกซิน บี จะแตกต่างจากกลุ่มของอะฟลาทอกซิน จี ตรงที่กลุ่มจีมี lactone group ใน ring ที่ 5 สำหรับกลุ่มของอะฟลาทอกซิน เอ็ม ไม่มี lactone group ใน ring ที่ 5 แต่มี hydroxy group ที่ ring ที่ 1 (Davis and Diener, 1983 อ้างถึงใน ธรรมศักดิ์, 2533 และ Goto and Manabe, 1989) อะฟลาทอกซิน บี 1 เป็นสารพิษชนิดที่ร้ายแรงและมีความเป็นพิษสูงที่สุด (Gaur et al., 1981; Pestka et al., 1982; Chu et al., 1987) จากการทดลองวัดความเป็นพิษของสารพิษในกลุ่มอะฟลาทอกซินกับลูกเป็ดอายุ 1 วัน ซึ่งมีความไวต่อความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินมากที่สุด พบว่าค่า LD₅₀ ของอะฟลาทอกซิน บี 1, บี 2, จี 1 และ จี 2 เท่ากับ 0.5, 1.7, 0.8 และ 3.4 mg/kg ตามลำดับ (Armbrrecht et al., 1963 อ้างถึงใน ธรรมศักดิ์, 2533)

สารอะฟลาทอกซินสร้างขึ้นโดยเชื้อรา 2 ชนิด คือ *A. flavus* Link. และ *A. parasiticus* Spear. นอกจากนั้นยังมี *A. niger*, *A. wentii*, *A. ruber*, *A. ostianus*, *A. ochraceous*, *Penicillium* spp. เช่น *P. citrinum*, *P. frequentom*, *P. puerum*, *P. variable* และ *Rhizopus* ที่สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ (อุดมลักษณ์, 2526) สำหรับเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* spp. มักจะสร้างอะฟลาทอกซิน บี 1 มากกว่าชนิดอื่น ๆ (Wogan and Busby, 1980) และเชื้อราแต่ละชนิดที่สร้างสารอะฟลาทอกซิน เช่น *A. flavus* มีทั้งสายพันธุ์ (strains) ที่สร้างและไม่สร้างอะฟลาทอกซิน บางสายพันธุ์สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ทุกชนิดคืออะฟลาทอกซิน บี 1, บี 2, จี 1 และ จี 2 บางสายพันธุ์สร้างเฉพาะอะฟลาทอกซิน บี 1 หรือ จี 1 เท่านั้น และเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ยังมีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน (ดารา และคณะ, 2526) เช่นเดียวกับ Klich และ Pitt (1985) และ

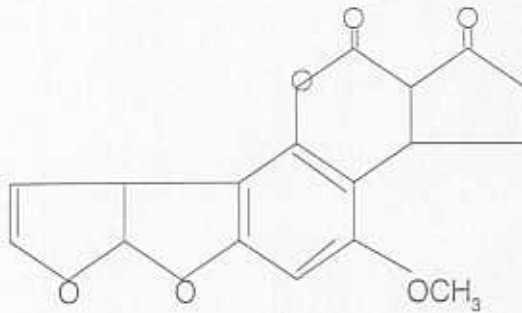
Klich และ Pitt (1988, อ้างถึงใน Pitt , 1989) สรุปไว้ว่า เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ในห้องปฏิบัติการพบว่า *A. parasiticus* สร้างทั้งอะฟลาทอกซิน บี และ จี ในขณะที่ *A. flavus* สร้างเพียงอะฟลาทอกซิน บี และ *A. parasiticus* 300 ไอโซเลตมีการสร้างอะฟลาทอกซินได้เกือบทุกไอโซเลต แต่ *A. flavus* สร้างอะฟลาทอกซินได้เพียง 40 % จาก 100 isolates และพบว่า *A. flavus* หลายสายพันธุ์ในธรรมชาติไม่มีการสร้างอะฟลาทอกซิน จึงเป็นไปได้ว่า *A. flavus* ที่พบในไร่นาหรือโรงเก็บของเกษตรกรอาจจะเป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีการสร้างสารพิษ ดังนั้นเมล็ดถั่วที่มีการปนเปื้อนด้วยเชื้อรา *A. flavus* อาจจะไม่มีปัญหาเรื่องอะฟลาทอกซินก็ได้

ลักษณะสำคัญของเชื้อ *Aspergillus spp.*

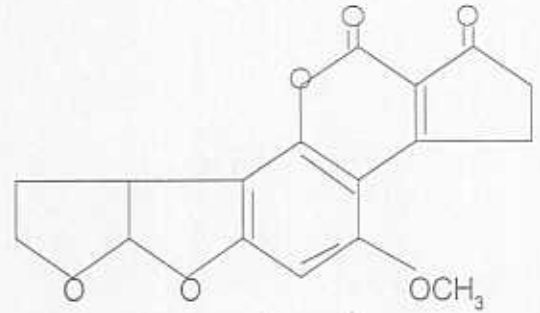
เชื้อ *Aspergillus spp.* มีการสร้าง conidiophores และ conidia มากมาย เชื้อจึงมีสีต่าง ๆ ตามสีของ conidiophores และ conidia ซึ่งโคโลนีของ *Aspergillus spp.* จะเป็นสีดำ น้ำตาล เหลือง เขียว และสีอื่น ๆ ดังนั้นจึงสามารถใช้สีของโคโลนีในการจำแนกชนิดของเชื้อรา *Aspergillus spp.* ได้ เช่น conidial head ของ *A. flavus* มีสีเขียวปนเหลือง รูปร่างกลม อาจแตกออกเป็นแฉกที่มีลักษณะหลวม ๆ ตั้งแต่สองแฉกขึ้นไป มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 300 - 400 μm ส่วนของ conidiophore ยาวประมาณ 700 - 800 μm ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 - 25 μm ผนังขรุขระไม่มีสี หนา 1.0 μm เส้นผ่าศูนย์กลางของ vesicle มีขนาด 20 - 60 μm รูปร่างค่อนข้างกลม มี sterigma แบบ 2 ชั้น conidia มีรูปร่างกลม ผนังขรุขระสีเขียวอ่อน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 - 4.5 μm (อุทัยวรรณ, 2522 อ้างถึงใน ธรรมศักดิ์, 2533) *A. parasiticus* จะสร้าง conidia ที่มีผนังขรุขระ เมื่อเปรียบเทียบกับ *A. flavus* ซึ่งมีผนัง conidia เรียบกว่า และในบางครั้งเชื้อ *A. flavus* สามารถสร้าง sclerotium สีน้ำตาลเข้มจนเกือบดำ รูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม ขนาดประมาณ 1.0 มม. ในธรรมชาติ sclerotia นี้สามารถคงอยู่ในดินได้นาน จึงเป็นแหล่งของเชื้อที่จะเข้าทำลายพืชในฤดูถัดไป (Pitt, 1989)

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* คือ สายพันธุ์ของเชื้อรา , อุณหภูมิ , ความชื้นในอาหาร , ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศที่เชื้อราเจริญอยู่ , สัดส่วนของแก๊สในบรรยากาศ , การถ่ายเทอากาศ , เวลา และวิธีการวิเคราะห์ (Diener and Davis , 1977 และ ธรรมศักดิ์ , 2533) Dickens และ Pattee (1966) พบว่าการสร้างอะฟลาทอกซินจะเกิดขึ้นในเวลา 2 วัน ถ้าเมล็ดถั่วลิสงมีความชื้นอยู่ระหว่าง

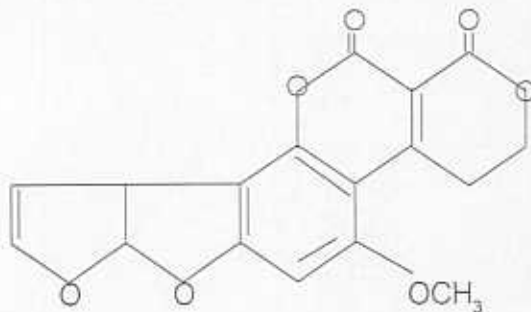
15 - 30 % ที่อุณหภูมิ 32.2° C และจะมีการสร้างอะฟลาทอกซินในเวลา 4 วัน ที่ปริมาณความชื้นระหว่าง 20 - 31 % ที่อุณหภูมิ 21.1° C



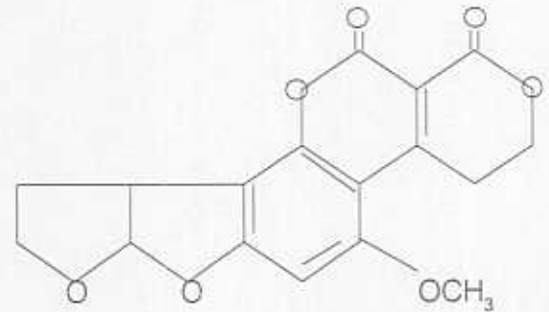
Aflatoxin B₁ (C₁₇H₁₂O₆) น้ำหนักโมเลกุล 312



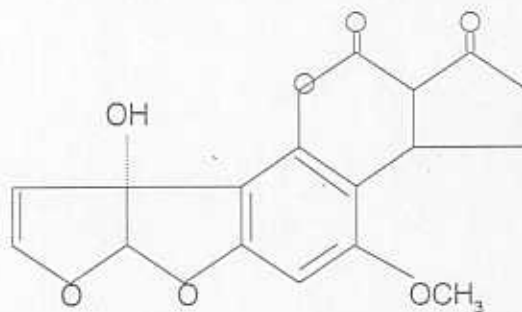
Aflatoxin B₂ (C₁₇H₁₄O₆) น้ำหนักโมเลกุล 314



Aflatoxin G₁ (C₁₇H₁₂O₇) น้ำหนักโมเลกุล 328



Aflatoxin G₂ (C₁₇H₁₄O₇) น้ำหนักโมเลกุล 330



Aflatoxin M₁ (C₁₇H₁₂O₇) น้ำหนักโมเลกุล 328

ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้าง และน้ำหนักโมเลกุลของอะฟลาทอกซิน บี 1, บี 2, จี 1, จี 2 และเอ็ม 1

ที่มา : Goto และ Manabe, 1989

3. ปัจจัยส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อราและการสร้างอะฟลาทอกซิน

3.1 แหล่งอาหาร (substrate)

อาหารที่เชื้อราใช้สำหรับการเจริญเติบโตตามปกติ (primary metabolites) ได้แก่ protein , nucleic acid , lipids และ carbohydrates ซึ่งเป็นสารประกอบที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต ในการเจริญเติบโตทางด้านเส้นใยและการสร้างสปอร์ระยะแรกเชื้อราจะสร้าง primary metabolites ดังกล่าวขึ้นเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตตามปกติ ในสภาวะเช่นนี้เชื้อราจะยังไม่มีการสร้างสารพิษ แต่ถ้าปล่อยให้เชื้อรามีการใช้สารอาหารต่อไป ปริมาณไนโตรเจน (nitrogen) , ฟอสฟอรัส (phosphorus) และธาตุรอง (trace elements) ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตจะลดลง ทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อราลดลง เชื้อราจะสังเคราะห์ primary metabolites ข้างลงไปด้วยและเกิดการสะสม acetate , malonate , pyruvate และ amino acids ซึ่งทำให้เชื้อรามีการพัฒนาและกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme) บางชนิดให้สังเคราะห์อะฟลาทอกซินซึ่งเป็น secondary metabolites ขึ้น (Demain , 1973 ; O'Dell et al., 1973 อ้างถึงใน คมสัน, 2530)

เชื้อราทุกชนิดต้องการแหล่งอาหาร เช่น กลูโคส และไนโตรเจน เพื่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษ เชื้อ *A. parasiticus* ต้องการกลูโคสความเข้มข้น 30 % และไนโตรเจนความเข้มข้น 1 % ของแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อใช้ในการสร้างอะฟลาทอกซิน ในขณะที่น้ำหนักแห้งของเชื้อราดังกล่าวมีค่าสูงที่สุดที่ความเข้มข้นกลูโคส 10 % และไนโตรเจน 3 % ของแอมโมเนียมซัลเฟต (Shih and Marth , 1974) ในทำนองเดียวกันถ้าเติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น glucose 15 % , ribose 15 % , xylose 15 % , glycerin 15 % จะทำให้อะฟลาทอกซิน บี1 และ จี1 เกิดเร็วขึ้น แต่น้ำตาล lactose และสารบางชนิดได้แก่ oleic acid , fumaric acid , sodium acetate , pyruvic acid , ethyl alcohol และ α - ketoglutaric acid จะยับยั้งไม่ให้เชื้อราสร้างอะฟลาทอกซินขึ้น

กรดอะมิโนบางชนิด เช่น asparagine , aspartic acid และ alanine กระตุ้นการสร้าง อะฟลาทอกซินได้ใน *A. parasiticus* ส่วน glycine และ glutamic acid กระตุ้นการสร้างอะฟลาทอกซินได้ 65 % และ 43 % ของ asparagine ตามลำดับ ซึ่งสาเหตุที่ aspartate และ asparagine มีผลต่อการสร้างอะฟลาทอกซิน เนื่องจาก aspartate ถูกนำไปใช้เป็นองค์ประกอบของ Tricarboxylic acid (TCA) intermediates และให้ acetate สำหรับการสร้าง secondary metabolites (Reddy et al , 1971 ; Davis and Diener ,

1983 อ้างถึงใน ธรรมศักดิ์, 2533)

การใช้ธาตุอาหารรองในการสร้างอะฟลาทอกซินนั้น แมงกานีส (Mn) ทองแดง (Cu) และสังกะสี (Zn) กระตุ้นการสร้างอะฟลาทอกซินใน germ ของข้าวโพด ถ้าขาดสังกะสีการเจริญเติบโตของเชื้อราจะลดลง การสังเคราะห์อะฟลาทอกซิน โปรตีน และ nucleic acid ลดลง ในขณะที่มีการสร้าง lipid เพิ่มขึ้น (Demyers , 1980 ; Venkitasubramanian and Gupta , 1977) เนื่องจากสังกะสีไปเป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์ในขบวนการ glycolysis ทำให้เกิดการสะสม adenine monophosphate (AMP) มากขึ้น และ AMP จะไปยับยั้งการสร้าง lipid แต่ส่งเสริมการสร้างอะฟลาทอกซินขึ้นแทน (Nesbitt *et al.*, 1962 ; Lillehoj *et al.*, 1974 ; Gupta *et al* , 1976) ธาตุบางชนิดเช่น Mg , Fe , Cd เป็นตัวเร่งการสร้างอะฟลาทอกซิน แต่ในทางตรงกันข้าม Vitamin B9 กลับทำให้การสร้างอะฟลาทอกซินช้าลง

3.2 ความชื้น (moisture)

ความชื้นของเมล็ดและความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศในการเก็บรักษามีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา เนื่องจากเมล็ดธัญพืชส่วนใหญ่สามารถดูดความชื้นจากอากาศได้ เมื่อความชื้นของเมล็ดสูงขึ้น ทำให้เชื้อราที่ติดมากับเมล็ดเจริญและสร้างอะฟลาทอกซินขึ้น Sauer และ Burroughs (1980) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศและความชื้นของเมล็ดข้าวโพดพบว่าถ้าความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศต่ำกว่า 85 % เชื้อรา *A. flavus* จะเจริญและสร้างอะฟลาทอกซินได้น้อยลง แต่ถ้าความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศอยู่ในช่วง 86 - 87 % การเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินมากขึ้น สำหรับอิทธิพลของความชื้นในเมล็ดที่มีต่อการสร้างอะฟลาทอกซินนั้น จากการศึกษาในข้าวซึ่งเป็นธัญพืชที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินต่ำ โดย Nandi และ Haeggbloom (1984) ได้นำเมล็ดข้าวที่มีความชื้นเพียง 15.4 % ไปแช่น้ำกลั่นจนข้าวมีความชื้นเพิ่มขึ้นเป็น 18 และ 21 % ตามลำดับแล้วปลูกเชื้อ *A. flavus* M 82 จำนวน 1.4×10^4 และ 4.1×10^3 สปอร์/ข้าว 25 กรัม แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 30° C เป็นเวลา 5 , 10 และ 20 วัน พบว่าข้าวที่มีความชื้น 21 % เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30° C เป็นเวลา 20 วัน และมีการปลูกเชื้อในปริมาณสูง สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้สูงที่สุด โดยมีการสร้างอะฟลาทอกซิน ปี 1 2,430 - 10,643 µg/kg และสร้างอะฟลาทอกซิน ปี 2 205 - 737 µg/kg

3.3 อุณหภูมิ (temperature)

เชื้อ *A. flavus* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 6 - 46 °C แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 36 - 38 °C ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างอะฟลาทอกซินอยู่ในช่วง 25 - 35 °C (ดารา และคณะ , 2526 ; Christensen , 1957) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Shih และ Marth (1974) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับปริมาณเส้นใยและการสร้างอะฟลาทอกซิน พบว่าน้ำหนักแห้งของเส้นใยและปริมาณอะฟลาทอกซินจะสูงสุดที่อุณหภูมิ 35 °C และ 25 °C ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นจาก 15 °C ถึง 28 °C ในเวลา 48 ชั่วโมง จะทำให้ปริมาณอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้นถึง 4 เท่า (West et al., 1973) ,

3.4 แสง (light)

แสงสามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้ ในสภาพที่มีแสงปริมาณอะฟลาทอกซินจะน้อยกว่าสภาพที่ไม่มีแสง เนื่องจากแสงสามารถทำลายอะฟลาทอกซินได้ โดยเฉพาะแสง ultraviolet (ประภา , 2526) Shantha และ Sreenivasamurthy (1977) ได้ศึกษาการทำลายสารอะฟลาทอกซินในน้ำมันโดยใช้ แสงแดด, แสงอุลตราไวโอเลต แสงอินฟราเรดและแสงจากหลอดทั้งสะเตน 150W พบว่า แสงแดดสามารถทำลายสารพิษได้ 100 % ในเวลาประมาณ 15 นาที และยังได้รับแสงแดดนานยิ่งลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้ดีขึ้น โดยที่แสงชนิดอื่น ๆ ต้องใช้เวลาถึง 18 ชั่วโมงจึงจะลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้เพียงเล็กน้อย และไม่สามารถลดอะฟลาทอกซินได้เลยในเวลา 2 ชั่วโมง เนื่องจากแสงแดดมีความแรงมากกว่าแสงชนิดอื่น ๆ และอะฟลาทอกซินมีลักษณะเป็นอนุภาคที่ละลายในน้ำมัน จึงถูกทำลายด้วยแสงได้ง่ายกว่าอะฟลาทอกซินในเมล็ดถั่วลิสงเนื่องจากยังผูกติดกับโมเลกุลของโปรตีน แสงแดดจึงไม่สามารถทำลายพันธะระหว่างอะฟลาทอกซินกับโปรตีนได้ (Shantha and Sreenivasamurthy (1981) แต่ Paster และ Bullerman (1988) ได้ใช้การฉายแสงแกมมาในการทำลายอะฟลาทอกซิน บี 1 ในอาหารเหลวพบว่าอะฟลาทอกซิน บี1 ถูกทำลายเพียงบางส่วน และอัตราการทำลายอะฟลาทอกซิน บี 1 ในสภาพสารละลาย ขึ้นกับความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน บี 1 ยิ่งความเข้มข้นมากยิ่งมีอัตราการทำลายต่ำลง และในสภาพของแข็ง (solid state) อะฟลาทอกซิน บี 1 ด้านทานต่อการฉายแสงแกมมาสูงมาก โดยอะฟลาทอกซิน บี1 ถูกทำลายเพียง 10 % จากการฉายแสงที่ 182 kGy แต่ Priyadarshini และ Tulpule (1976) กลับพบว่าการสร้างอะฟลาทอกซินในอาหารที่ถูกฉายแสงจะสูงขึ้นในธัญพืชบางชนิดเช่น millet , หัวผักกาด เมล็ดข้าวสาลีที่ถูกฉายแสงปริมาณ 10 , 25 หรือ 40

kGy มีการเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซิน ของ *A. flavus* ในปริมาณมากและเร็วกว่า ข้าวสาลีที่ไม่ได้ฉายแสง หรือเมล็ดข้าวสาลีที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น ใช้ การรมกอง ข้าวสาลีด้วย ethylene oxide หรือ ใช้ Autoclave ซึ่งเป็นไปได้ว่าการฉายแสงทำให้สัญญาณอ่อนแอต่อการติดเชื้อที่สร้างอะฟลาทอกซิน หรือระดับของรังสีแกมมาที่ฉายไปนั้นอาจจะ กระตุ้นเชื้อราที่อยู่ในเมล็ดให้สร้างอะฟลาทอกซินได้มากขึ้น

3.5 การถ่ายเทอากาศ (aeration)

อากาศช่วยในการแพร่กระจายสปอร์ของเชื้อราและสัดส่วนของออกซิเจนและ คาร์บอนไดออกไซด์ ในอากาศของการเก็บรักษามีผลต่อการเจริญและการสร้างสปอร์ รวมทั้งการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา เนื่องจากเชื้อราส่วนใหญ่เป็นพวก aerobic organisms ต้องการออกซิเจนในการหายใจ Siriacha และคณะ (1991) รายงานถึงการปรับเปลี่ยนปริมาณก๊าซที่มีอยู่ในบรรยากาศของการเก็บรักษาเช่นการเพิ่มความเข้มข้นของก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ หรือ ไนโตรเจน ในโรงเก็บเมล็ดข้าวโพด ทำให้มีสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราและการสร้างอะฟลาทอกซิน ซึ่งอาจจะทำได้โดย เก็บเมล็ดข้าวโพดไว้ในสภาพที่อากาศเข้าไม่ได้ (airtight) โดยเก็บไว้ในถุงพลาสติก polyethylene หรือถุง พลาสติก double polyethylene สามารถเก็บรักษาข้าวโพดไว้ได้เป็นเวลา 20 วัน โดยไม่มีการเข้าทำลายของเชื้อ *A. flavus* และไม่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Suhirawat และคณะ (1992) ที่พบว่าการเจริญเติบโตของ *A. flavus* ใน ข้าวโพดที่มีความชื้น 30 - 37 % จะถูกยับยั้งถ้าเก็บไว้ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) โดยสามารถเก็บข้าวโพดไว้ได้นานถึง 4 สัปดาห์ และในทำนองเดียวกัน วีรวัฒน์ และคณะ (2535ก) ศึกษาการป้องกันการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินโดยใช้ก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์และไนโตรเจน รมกองข้าวโพดเปรียบเทียบกับกองข้าวโพดไว้ใน สภาพอากาศปกติ ในระยะเวลา 5 วัน ข้าวโพดที่กองไว้ในสภาพอากาศปกติมีเชื้อ *A. flavus* เข้าทำลายทั่วทั้งกอง อุณหภูมิของกองข้าวโพดเพิ่มขึ้นจาก 29 °C เป็น 49 °C การปนเปื้อน ของอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้นจาก 5 ppb เป็น 27 ppb ในขณะที่กองข้าวโพดที่รมด้วยก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์ และ ไนโตรเจน มี *A. flavus* เข้าทำลาย เพียง 2 - 3 จุด บนผิวหน้า ของกองข้าวโพด อุณหภูมิของกองข้าวโพดเพิ่มขึ้นจาก 29° C เป็น 31° C ปริมาณอะฟลาทอกซินไม่ เพิ่มขึ้น

3.6 ระยะเวลา (duration)

ระยะเวลาในการเกิดอะฟลาทอกซินขึ้นกับสภาพแวดล้อมในการเก็บรักษา โดยทั่วไป ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสม เช่น มีความชื้นและอุณหภูมิที่พอเหมาะ ระยะเวลาที่เชื้อราจะเจริญ และสร้างอะฟลาทอกซินจะน้อยกว่าในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ถั่วลิสงฤดูฝนที่ใช้เวลาในการตากแห้งนานกว่าถั่วฤดูแล้งมักจะมีปริมาณอะฟลาทอกซินสูงกว่า และพบว่าหลังจากที่มีการตากแห้งไปบางส่วนแล้วแต่ถัวยังไม่แห้งสนิทมักจะมีฝนตกทำให้ความชื้นของถั่วเพิ่มขึ้นอีก ประกอบกับสภาพแวดล้อมของลานตากไม่ดี มีสปอร์ของเชื้อราในอากาศมากทำให้ยืดระยะเวลาการเข้าทำลายของเชื้อและมีการสะสมอะฟลาทอกซินเพิ่มขึ้น (Jackson , 1967)

3.7 สภาพของเมล็ด (seed condition)

ฝักหรือเมล็ดที่ได้รับอันตรายจากการเข้าทำลายของแมลง เช่น เลียนดิน ไล่เดือนฝอย หรือจากเครื่องมือการเกษตรที่ใช้เก็บเกี่ยว ทำให้ฝักและเมล็ดมีบาดแผลหรือไม่สมบูรณ์ เชื้อราสามารถเข้าทำลายและสร้างสารพิษได้มากกว่าฝักและเมล็ดปกติ (สนั่น และคณะ, 2539) อรุณศรี และคณะ (2526) เปรียบเทียบการเข้าทำลายของ *A. flavus* ของเมล็ดถั่วลิสงในสภาพถั่วเมล็ดสมบูรณ์ ถั่วช้ำ และถั่วเน่า พบเชื้อรา *A. flavus* 21.5 , 54.5 และ 87.5 % ตามลำดับ

ฝักที่แตกในดินก่อนเก็บเกี่ยว เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความชื้นในดินในระหว่างฤดูปลูกที่มีการกระเทบแล้ง หรือปริมาณฝนตกไม่เพียงพอ เมล็ดที่ได้จะมีเชื้อ *A. flavus* เข้าทำลาย และมีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในเวลาต่อมา (Graham , 1982)

3.8 ปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ (microorganism interaction)

ในการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและอะฟลาทอกซินมักจะพบเชื้อราปนเปื้อนอยู่หลายชนิดบนเมล็ด ทำให้มีการแข่งขันกันในการใช้ปัจจัยต่าง ๆ ในการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษ ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมอาจจะมีเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่มีความสามารถในการใช้ปัจจัยต่าง ๆ ได้ดีกว่าเชื้อที่มีการสร้างอะฟลาทอกซิน ทำให้การสร้างอะฟลาทอกซินถูกจำกัดได้ (Diener *et al.*, 1982) ซึ่งปฏิกริยาระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และการสร้างอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* มีดังนี้

ปฏิกริยาระหว่างจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งทำให้จุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งเจริญได้น้อย

เชื้อ *Bacillus subtilis* (ทิพย์วรรณ และธรรมศักดิ์ 2531n) , *Rhizoctonia solani* และ *A. niger* มีผลทำให้เชื้อ *A. flavus* มีการเจริญเติบโตลดลงและจำกัดการสร้าง

อะฟลาทอกซิน (ดารา และคณะ , 2526 ; Ashworth et al , 1965) ในทำนองเดียวกัน Joffe (1969) และ Calvert และคณะ (1978) พบว่า *A. niger* มีความสัมพันธ์แบบ antagonistic กับ *A. flavus* และ *A. parasiticus*

ปฏิกิริยาที่ทำให้จุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งสร้างสารบางชนิดไม่ได้

เชื้อราหรือแบคทีเรียบางชนิดที่พบบนเมล็ดถั่วลิสงสร้างสารบางชนิดขึ้นมาทำให้ *A. flavus* ไม่สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ (ดารา และคณะ , 2526) ส่วนในข้าวโพดมี รายงานว่าข้าวโพดความชื้นสูงที่เก็บรักษาไว้ซึ่งตรวจพบเชื้อ *Fusarium spp.* และ *A. flavus* เป็นจำนวนมากแต่กลับไม่พบอะฟลาทอกซินเลย (Sauer and Burrough , 1980) ในทำนองเดียวกัน ปริศนา และคณะ (2533) พบว่าการเกิดอะฟลาทอกซินในข้าวโพดขึ้นกับความชื้นในเมล็ด ที่ความชื้น 29.1 - 33.5 % จะมี yeast เกิดขึ้นมากและตรวจพบ อะฟลาทอกซินต่ำ ในขณะที่ความชื้นเมล็ด 22.4 % ปริมาณ yeast ลดลง และพบอะฟลาทอกซิน สูงขึ้น เช่นเดียวกับ Boller และ Schroeder (1974) ได้ศึกษาอิทธิพลของ *A. candidus* ต่อการสร้างอะฟลาทอกซิน ในข้าวของ *A. parasiticus* พบว่า เมื่อปลูกเชื้อลงบนเมล็ดข้าวโดยใช้จำนวน conidia ของ *A. parasiticus* น้อยกว่าหรือเท่ากับ conidia ของ *A. candidus* แล้วนำไปป้อนไว้ที่อุณหภูมิ 25 - 35 °C ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 85 , 90 และ 100 % เป็นเวลา 7 วัน เชื้อ *A. candidus* จะเจริญขึ้นมามากกว่า *A. parasiticus* และพบอะฟลาทอกซินเพียงเล็กน้อยหรืออาจจะไม่พบเลย และในการปลูกเชื้อ *A. parasiticus* มากกว่า *A. candidus* ในอัตราส่วน 7 : 1.พบอะฟลาทอกซิน ปี1 เพียง 3 - 5 % ของปริมาณที่ตรวจพบในเมล็ดข้าวที่ปลูกเชื้อ *A. parasiticus* เพียงอย่างเดียว ซึ่งการสร้างอะฟลาทอกซินนั้นลดลงอย่างรวดเร็วมากกว่าการลดลงในปริมาณการติดเชื้อของ *A. parasiticus* อันเนื่องมาจากการแข่งขันของ *A. candidus*

Dalcero และคณะ (1989) ได้ศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเชื้อ *Alternaria alternata* กับ *A. parasiticus* ในทานตะวัน พบว่าปริมาณอะฟลาทอกซินเมื่อปลูกเชื้อ *A. parasiticus* เพียงอย่างเดียวเท่ากับ 1,200 µg/kg และปริมาณอะฟลาทอกซินลดลงเป็น 700 µg/kg เมื่อมี *Alternaria alternata* ร่วมอยู่ด้วย ซึ่งสาเหตุของปริมาณอะฟลาทอกซินที่ลดลงคือ *Alternaria alternata* แข่งขันกับ *A. parasiticus* ในการใช้ substrate สำหรับการสร้าง alternariol และ alternariol monomethyl ether

ปฏิกิริยาที่เชื้อไปทำลายสารบางอย่างที่จุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งสร้างขึ้น

เชื้อ *Flavobacterium aurantiracum* สามารถทำลายพิษของอะฟลาทอกซินในอาหารได้โดยการเปลี่ยนรูปโครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินทำให้ความเป็นพิษหมดไป (ดารา และคณะ , 2526)

4. การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

เชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* สามารถเจริญได้ดีในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหลายชนิด เนื่องจากเป็นเชื้อที่ขึ้นได้ในอาหารที่มีช่วงความชื้นกว้าง ตั้งแต่อาหารที่มีความชื้นสูง ไปจนถึงอาหารที่มีความชื้นต่ำ หรืออาหารค่อนข้างแห้งก็สามารถเจริญได้ดี เช่นพวก ธัญพืชต่าง ๆ ดังนั้นจึงพบว่าการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่สำคัญหลายชนิด เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าว ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ทานตะวัน งา ละหุ่ง และเมล็ดฝ้าย สำหรับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินมีการศึกษาค่อนข้างมากในถั่วลิสง และข้าวโพด เนื่องจากมีการปนเปื้อนค่อนข้างสูง โดยเฉพาะถั่วลิสงเป็นพืชที่มนุษย์นำไปบริโภคโดยตรง ส่วนข้าวโพดเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ซึ่งการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรดังกล่าวจะเป็นผลต่อเนื่องถึงสุขภาพของมนุษย์ในภายหลัง โดยในบทนี้จะขอลำดับถึงการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในผลผลิตของพืชเศรษฐกิจที่สำคัญดังนี้

4.1 ถั่วลิสง

การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงพบทั้งระยะปลูก ก่อนเก็บเกี่ยว ระหว่างเก็บเกี่ยว หลังเก็บเกี่ยว ตั้งแต่การตากแห้ง ในระหว่างการเก็บรักษาของเกษตรกร แม้แต่เมล็ดถั่วลิสง และผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสงที่วางขายตามท้องตลาดก็มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินค่อนข้างสูง โดยเฉพาะถั่วลิสงที่ปลูกในช่วงฤดูฝนของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากในช่วงเก็บเกี่ยวมีความชื้นในอากาศสูง (ธรรมศักดิ์, 2533; วุฒิดักดี และคณะ, 2536)

ประเทืองศรี และ ไพจิตร (2530) วิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่างถั่วลิสงที่เก็บจากไร่เกษตรกร และโกดังเก็บรักษาเมล็ดพืชเพื่อการส่งออกในปี พ.ศ. 2523 พบว่า ถั่วลิสงจำนวน 34 ตัวอย่างมีปริมาณอะฟลาทอกซินอยู่ระหว่าง 0 - 1,980 ไมโครกรัมต่อ 1 กิโลกรัม (ppb) จะเห็นได้ว่าปริมาณอะฟลาทอกซินที่วิเคราะห์ได้อยู่ในระดับที่สูงมาก ซึ่งสอดคล้องกับการสำรวจข้อมูลเกษตรกรผู้ปลูกถั่วลิสงในฤดูแล้งจังหวัดกาฬสินธุ์ ของ พวงทอง

(2527) โดยตรวจพบเชื้อรา *A. flavus* ในระดับ 1 - 97 % ถึง 165 ตัวอย่าง จากถั่วลิสง จำนวน 166 ตัวอย่าง และจากการวิเคราะห์ปริมาณ อะฟลาทอกซิน 181 ตัวอย่าง พบ ตัวอย่างที่มีอะฟลาทอกซินมากกว่า 20 ไมโครกรัมต่อ 1 กิโลกรัม เพียง 11 ตัวอย่าง เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อรา *A. flavus* กับการเกิดอะฟลาทอกซินพบว่า การมีเชื้อราไม่ได้หมายความว่า จะมีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินเสมอไป

อรุณศรี และคณะ (2525) วิเคราะห์ตัวอย่างถั่วลิสงในระยะก่อนเก็บเกี่ยว 1 สัปดาห์ และขณะเก็บเกี่ยว ผลการวิเคราะห์ไม่พบอะฟลาทอกซินในตัวอย่างก่อนเก็บเกี่ยว แต่พบ อะฟลาทอกซิน 3 ตัวอย่าง (20 , 20 และ 30 ppb) จาก 40 ตัวอย่างของตัวอย่างขณะเก็บเกี่ยว และได้สุ่มตัวอย่างถั่วลิสงจากพ่อค้าคนกลาง 2 ลักษณะ คือ ถั่วลิสงที่ยังไม่ได้กะเทาะเปลือกและถั่วลิสงกะเทาะเปลือกชนิดต่าง ๆ โดยสุ่มถั่วที่ยังไม่ได้กะเทาะเปลือกอายุ 1 สัปดาห์ 1 เดือน และ 1 ปี พบว่ามีอะฟลาทอกซินทุกอายุการเก็บในปริมาณ 30 - 75 ppb ส่วนถั่วลิสงกะเทาะเปลือกสุ่มตัวอย่าง 3 ชนิด คือถั่วเมล็ดโต ถั่วซีก และถั่วเน่า พบว่ามี ปริมาณอะฟลาทอกซิน 20 - 50 ppb , 30 - 350 ppb และ 75 - 1,350 ppb ตามลำดับ

การวิเคราะห์การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในส่วนของโรงงานกะเทาะเปลือกถั่วลิสง โดยเกศรา (2527) ได้วิเคราะห์ตัวอย่างถั่วลิสงจากโรงงานกะเทาะเปลือกถั่วลิสง จำนวน 11 แห่ง จากจังหวัดลำปาง 6 แห่ง จังหวัดศรีสะเกษ 3 แห่ง และจังหวัดระยอง 2 แห่ง พบว่าถั่วลิสงชั้น 1 และชั้น 2 ที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง (เดือนธันวาคม) มีค่าอะฟลาทอกซินต่ำกว่าค่าที่มาตรฐานกำหนด (ต่ำกว่า 20 ppb) ส่วนถั่วที่เก็บในช่วงฤดูฝน(เดือนกันยายน) จะได้ถั่วที่มี อะฟลาทอกซินสูง โดยเฉพาะในถั่วเน่ามีค่าอะฟลาทอกซินสูงมากในฤดูฝน ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับการตรวจปริมาณเชื้อรา *A. flavus* ในถั่วลิสงคัดเกรด 3 เกรดของโรงงานกะเทาะเปลือกถั่วลิสง โดยอรุณศรี และคณะ ในปี 2526 ได้ตรวจพบเชื้อรา *A. flavus* ใน ปริมาณ 21.5 , 54.5 และ 87.5 % ของถั่วเมล็ดโต ถั่วซีก และถั่วเน่าตามลำดับ ซึ่ง ปริมาณ *A. flavus* ที่พบนี้มากกว่าปริมาณ *A. flavus* ที่พบจากถั่วลิสงในไร่ลักษณะเก็บเกี่ยว และขณะเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 1 , 2 และ 3 เดือน (พบ *A. flavus* 0.3 , 17.3 , 25.0 และ 27.5 % ตามลำดับ) โดยเฉพาะถั่วเน่านั้นมีการตรวจพบอะฟลาทอกซินในปริมาณสูง เช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ในปี 2518 (อ้างถึงใน สุภัทรา และมยุรี 2523) พบอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงดิบทั้งเมล็ด 18

ตัวอย่างจาก 34 ตัวอย่าง (52.94 %) ถั่วลิสงคั่วคลุกเกลือและผ่าซีก 6 ตัวอย่างจาก 20 ตัวอย่าง (30 %) ถั่วลิสงป่นพบอะฟลาทอกซินสูงมากถึง 21 ตัวอย่างจาก 33 ตัวอย่าง (63.63 %) ส่วนอาหารสัตว์ที่มีกากถั่วลิสงป่นอยู่พบ 3 ตัวอย่างจาก 7 ตัวอย่าง (42.85 %) โดยปริมาณอะฟลาทอกซินที่วัดได้มีตั้งแต่ระดับต่ำ (น้อยกว่า 5 ppb) จนถึงสูงมาก (มากกว่า 1000 ppb) ซึ่งมักจะพบในตัวอย่างของถั่วลิสงป่น

สำหรับผลิตภัณฑ์จากถั่วลิสงที่มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินนั้นได้มีการสุ่มตัวอย่างถั่วลิสงชุบแป้งทอดมาตรวจสอบคุณภาพ โดยวิชัย และคณะ (2532) ได้วิเคราะห์อะฟลาทอกซินในถั่วลิสงชุบแป้งทอดจำนวน 24 ตัวอย่างพบว่า มีอะฟลาทอกซินเกือบทุกตัวอย่าง และมีปริมาณอะฟลาทอกซินเกินกว่ามาตรฐานกำหนด 20 ppb ถึง 21 ตัวอย่าง เนื่องจากเมล็ดถั่วลิสงที่นำมาทำถั่วลิสงชุบแป้งทอดมีคุณภาพไม่เหมาะสม ส่วนผลิตภัณฑ์น้ำมันถั่วลิสงธรรมชาติที่ไม่ได้ผ่านกรรมวิธีการทำน้ำมันให้บริสุทธิ์ ซึ่งได้จากการบีบหรืออัดถั่วลิสงนั้นส่วนมากจะมีปริมาณอะฟลาทอกซินเจือปนอยู่สูงกว่า 20 ppb (จินตนา และคณะ , 2533) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ประเทืองศรี และไพจิตร (2530) ที่รายงานว่าน้ำมันพืชที่ขายตามท้องตลาดที่ใช้เมล็ดถั่วลิสงเป็นวัตถุดิบ และสกัดน้ำมันโดยวิธีบีบแบบธรรมชาติ (screw press) นั้น มีอะฟลาทอกซินในน้ำมันมากกว่า 25 ppb

4.2 ข้าวโพด

การปนเปื้อนของ *A. flavus* และอะฟลาทอกซินในข้าวโพดเกิดขึ้นตั้งแต่ก่อนเก็บเกี่ยวและระหว่างเก็บเกี่ยว แต่ปริมาณการปนเปื้อนจะน้อยมากเมื่อเทียบกับหลังเก็บเกี่ยว การกะเทาะเมล็ดเป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน และจะเพิ่มขึ้นอีกในการเก็บรักษาของพ่อค้าในตลาดระดับต่าง ๆ เช่น ตลาดรับซื้อข้าวโพดระดับท้องถิ่น ตลาดกลางระดับจังหวัด และตลาดสุดท้ายระดับการส่งออก หรือส่งให้โรงงานอาหารสัตว์ การเก็บรักษาข้าวโพดในระดับเกษตรกรเพื่อรอการจำหน่ายมักเก็บในรูปฝักที่ตากแห้งแล้ว สถานที่เก็บจะยกพื้นผาผนังทำด้วยไม้ไผ่สาน บางรายอาจเก็บไว้ในใต้ถุนบ้าน โดยกันเป็นคอกปูพื้นด้วยไม้ การเก็บรักษาดังกล่าวเป็นจุดเริ่มต้นของการเข้าทำลายของเชื้อราในขณะที่ข้าวโพดยังเป็นฝัก เนื่องจากในขณะที่เก็บรักษาถ้าฝนตกฝักข้าวโพดจะดูดความชื้นจากอากาศทำให้ความชื้นของฝักเพิ่มขึ้น (Buangsuwon, 1986 ; Senanarong et al., 1992) พ่อค้าคนกลางระดับท้องถิ่นจะรับซื้อเมล็ดข้าวโพดที่กะเทาะแล้วจากเกษตรกร ซึ่งเกษตรกรจำนวนมากที่เก็บเกี่ยวข้าวโพดแล้วจะสีขายให้พ่อค้า โดยพ่อค้าจะนำเครื่องมือกะเทาะข้าวโพดที่ไร่แล้วรับซื้อ

ไปหลังจากกะเทาะเสร็จ ข้าวโพดที่ได้จึงยังคงมีความชื้นสูงมาก พ่อค้าระดับท้องถิ่นจะนำข้าวโพดไปตากที่ลานเพื่อลดความชื้นซึ่งมักจะพบว่าปริมาณอะฟลาทอกซินจะเพิ่มขึ้นมากในขณะที่อยู่ในลานตากของพ่อค้าระดับท้องถิ่น ซึ่ง Arai และคณะ (1992) รายงานว่าการเก็บรักษาข้าวโพดที่พ่อค้าคนกลางระดับท้องถิ่นจะเก็บไว้เป็นระยะเวลาสั้น ๆ โดยพ่อค้าจะตากข้าวโพดเป็นเวลา 1 - 2 วัน ในกรณีที่แดดจัด แต่ถ้าแดดไม่จัดต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นประมาณ 5 - 6 วัน พ่อค้าคนกลางระดับท้องถิ่นจะรวบรวมข้าวโพดส่งให้พ่อค้าระดับจังหวัดหรือพ่อค้าส่งออกต่อไป

จากการวัดปริมาณอะฟลาทอกซินก่อนตากบนลานของพ่อค้าในจังหวัดนครสวรรค์ โดยวีระวัฒน์ และคณะ (2535) พบว่ามีอะฟลาทอกซิน 45 ppb ก่อนตาก และ 187 ppb หลังจากตากแห้งแล้ว เนื่องจากการตากข้าวโพดบนลานนั้นไม่สามารถลดความชื้นของข้าวโพดลงให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยได้ทัน การที่ฝนมักจะตกอยู่เสมอ ๆ ในช่วงการตาก หรือในกรณีที่รับซื้อข้าวโพดมาเป็นจำนวนมากจนลานตากไม่พอ ประกอบกับการแตกหักของเมล็ดจากการกะเทาะ ทำให้เชื้อรา *A. flavus* เข้าทำลายและสร้างอะฟลาทอกซินได้ภายในเวลาเพียง 2 - 3 วัน

จากการเก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดมาวิเคราะห์การเข้าทำลายของเชื้อ *A. flavus* และ วิเคราะห์การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน โดย Wongurai และคณะ (1992) ระหว่างปี 1989 - 1990 พบว่าในการเก็บรักษาของเกษตรกรมีเชื้อ *A. flavus* เข้าทำลาย 0 - 18 % และเชื้อราสร้างอะฟลาทอกซิน 27 % อยู่ในระดับ 1 - 100 ppb ส่วนการเก็บรักษาของพ่อค้าคนกลางในระดับท้องถิ่นและไซโล มีการวัดปริมาณเชื้อราในอากาศพบ *A. flavus* 1 - 300 โคโลนี (colony) ต่อ 30 ลิตรของอากาศ และพบว่าการเข้าทำลายของเชื้อราในเมล็ดข้าวโพด 0 - 100 % เชื้อราสร้างอะฟลาทอกซิน 72 % ปริมาณการสร้างอยู่ในระดับ 1 - 200 ppb แต่ Wattanutchariya (1992) กล่าวว่า การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในตลาดชั้นสุดท้ายก่อนส่งออก และก่อนส่งให้โรงงานอาหารสัตว์ มีการปนเปื้อนมากที่สุด เนื่องจากข้าวโพดที่รวบรวมและส่งมาจากพ่อค้าระดับท้องถิ่น และพ่อค้าขายส่งระดับจังหวัดมีปริมาณความชื้นสูง

4.3 ข้าวฟ่าง

ข้าวฟ่างเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเช่นเดียวกับข้าวโพด และมีปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อรา และอะฟลาทอกซิน เนื่องจากเมล็ดข้าวฟ่างมักจะได้รับความเสียหายจากนก ทำ

ให้เกิดบาดแผลเปิดโอกาสให้เชื้อราเข้าทำลายและสร้างอะฟลาทอกซินได้มากขึ้น จากการศึกษการเข้าทำลายของเชื้อรากับข้าวฟ่างโดย *A. flavus* ของ Usha และคณะ (1994) พบเชื้อ *A. flavus* บนช่อดอกข้าวฟ่างตั้งแต่ระยะที่ช่อดอกยังไม่โผล่ออกจากใบธง การสีข้าวฟ่างเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เมล็ดถูกทำลายและเกิดบาดแผล ทำให้เมล็ดอ่อนแอต่อการติดเชื้อเมื่อแยกไฮสเลตของเชื้อ *A. flavus* จาก 5 สถานที่มาทดสอบการสร้างอะฟลาทอกซินในอาหารเหลวพบว่า 67 % ถึง 82 % ของเชื้อ *A. flavus* สร้างอะฟลาทอกซิน บี 1 ได้ 30 - 4,000 ng/ml และตัวอย่างที่เก็บจากโรงสีมีอะฟลาทอกซิน บี 1 7.25 - 75 $\mu\text{g/g}$ เช่นเดียวกับ Reddy and Nusrath (1986) ศึกษาการปนเปื้อนของสารพิษที่เกิดจากเชื้อราในโรงเก็บข้าวฟ่าง โดยข้าวฟ่าง 6 พันธุ์ เก็บรักษานาน 6 เดือนในโรงเก็บของหมู่บ้านในอินเดีย พบว่ามี การสร้างอะฟลาทอกซินมากที่สุดในบรรดาสารพิษที่สร้างขึ้นจากเชื้อรา โดยตรวจพบอะฟลาทอกซิน บี 1 25 ตัวอย่างจากข้าวฟ่าง 138 ตัวอย่าง และมีอะฟลาทอกซิน บี 1 สูงถึง 565 $\mu\text{g/kg}$ รองลงมาคือ อะฟลาทอกซิน บี2 17 ตัวอย่าง , อะฟลาทอกซิน จี 1 16 ตัวอย่าง , อะฟลาทอกซิน จี 2 14 ตัวอย่าง , Ochratoxin A 8 ตัวอย่าง , T-2 toxin 7 ตัวอย่าง , Zearalenone และ citrinin ชนิดละ 4 ตัวอย่าง

Winn และ Lane (1978) ศึกษาการสร้างอะฟลาทอกซินโดยการปลูก เชื้อ *A. flavus* กับเมล็ดข้าวฟ่าง 3 ลักษณะคือ ข้าวฟ่างบด เมล็ดแตก และเมล็ดคละ (เมล็ดดีกับไม่ดีปนกัน) ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 °C ความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศ 90 % เก็บไว้นาน 48 และ 72 ชั่วโมง พบอะฟลาทอกซินสูงที่สุดในเมล็ดแตกและเมล็ดคละทั้ง 2 อุณหภูมิ เมื่อเก็บไว้ 72 ชั่วโมง

4.4 ข้าว

ข้าวเป็นธัญพืชที่สำคัญและเป็นอาหารหลักของไทยการเก็บรักษาข้าวจะเก็บในลักษณะการบรรจุกระสอบ ในระหว่างการเก็บรักษามักจะประสบปัญหาเรื่องแมลงในโรงเก็บเข้าทำลายเมล็ดข้าว เมื่อมีการใช้สารฆ่าแมลงจะเกิดพิษตกค้างที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคมากกว่าการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อรา แมลงที่เข้าทำลายข้าว เช่น ตัวงวงข้าว (*Sitophilus oryzae*) มอดแป้ง (*Tribolium castaneum*) และผีเสื้อข้าวสาร (*Corcyra cephalonica*) (ฐิติทย์ และคณะ , 2529) ถึงแม้ว่าปัญหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าวจะไม่รุนแรง เนื่องจากข้าวเป็นพืชที่มีความชื้นในเมล็ดต่ำ แต่ก็มีรายงานถึงสาเหตุของการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวอยู่บ้างการปนเปื้อนเกิดขึ้นในขณะที่มีการลดความ

ขึ้นของข้าวเปลือกโดยการนำไปตากและปล่อยให้แห้งเองในลานตาก เมล็ดข้าวที่อยู่ในลานตากมักจะมีการกระทบกระเทือน และเป็นสาเหตุของการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน โดย L' vova และคณะ (1983) รายงานว่าพบอะฟลาทอกซิน ปี 19 - 10 % ของตัวอย่างข้าวที่ใช้วิธีการลดความชื้นแบบนี้ 130 ตัวอย่าง ปริมาณอะฟลาทอกซินที่พบอยู่ในช่วง 16 - 106 $\mu\text{g/kg}$ โดย 67 % ของตัวอย่างที่พบมีอะฟลาทอกซินน้อยกว่า 50 $\mu\text{g/kg}$ และ L' vova และคณะ (1981) และพบว่าเมล็ดข้าวเปลือกที่ถูกทำลายและเมล็ดที่เป็นแผลสามารถสะสมอะฟลาทอกซินได้มากและเร็วกว่าเมล็ดข้าวปกติ โดยพบว่าเมื่อข้าวมาถึงลานตาก จะมีความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน B1 ในตัวอย่าง 5 $\mu\text{g/kg}$ แต่เมื่อปล่อยให้ข้าวแห้งบนลานตากแล้วปริมาณของอะฟลาทอกซินจะเพิ่มขึ้นถึง 70 $\mu\text{g/kg}$ แต่ Shank และคณะ (1972a) กลับพบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในข้าวของไทยอยู่ในระดับที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับที่กล่าวมาแล้ว โดยมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินเพียง 2 % จากข้าว 364 ตัวอย่างที่สุ่มมาตรวจสอบ และมีค่าเฉลี่ยของอะฟลาทอกซินน้อยกว่า 1 $\mu\text{g/kg}$ เท่านั้น

4.5 ถั่วเหลือง

การศึกษาการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในถั่วเหลืองของไทยมีน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับถั่วลิสง แต่มีการรายงานการศึกษาการติดเชื้อราชนิดต่าง ๆ ในโรงเก็บ โดยการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าว ข้าวโพด ถั่วเหลือง ถั่วลิสง และถั่วเขียวจากท้องที่ต่าง ๆ ทั่วประเทศ มาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ malt agar และ salt malt agar (10 % NaCl) พบว่าเมล็ดพืชทุกชนิดทุกตัวอย่างมีการติดเชื้อ *A. glaucus* และ *A. parasiticus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด (อนงค์นุช , 2520)

การศึกษาการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในต่างประเทศ โดย Shatla และคณะ (1980) แยกเชื้อรา *Aspergillus spp.* ชนิดต่างๆ ออกมาจากถั่วเหลือง และตรวจสอบการสร้างอะฟลาทอกซินของ *A. flavus* จำนวน 9 strains ที่แยกได้จาก 3 แห่งในประเทศอียิปต์ โดยการบ่มในอาหารเหลวที่ 18° C 10 วัน แล้วแยกเส้นใยออกมาและวิเคราะห์อะฟลาทอกซินโดยใช้วิธี TLC และมีการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลโดยวิธี Trifluoroacetic acid พบว่ามีเพียง *A. flavus* เท่านั้นที่มีการสร้างอะฟลาทอกซิน ปี 1 ซึ่งมีค่าตั้งแต่ 0.82 - 1.420 mg/100ml ขึ้นกับ strains ของเชื้อ *A. flavus* และมีการศึกษาในทำนองเดียวกันในประเทศอาร์เจนตินา โดย Fernandez และคณะ (1991) รายงานว่าในปี 1986 มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในถั่วเหลือง 5.8 % จากตัวอย่างที่สุ่มเก็บจำนวน 34 ตัวอย่าง และในปี 1987 มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน 11.6 % จากตัวอย่างที่สุ่มเก็บจำนวน 60 ตัวอย่าง แต่ปริมาณ

อะฟลาทอกซินในตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนน้นน้อยมากคืออยู่ในช่วงต่ำ (traces) ถึง 36 $\mu\text{g/kg}$ และมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตของเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* กับ พันธุ์ถั่วเหลืองต่อการสร้างอะฟลาทอกซินโดยใช้เชื้อดังกล่าว 3 ไอโซเลต กับถั่วเหลือง 13 พันธุ์ พบว่าระดับอะฟลาทอกซินที่สร้างขึ้นจากเชื้อราขึ้นกับ ความสามารถในการสร้างสารพิษของตัวเชื้อราเองและพันธุ์ของถั่วเหลืองในสภาพห้องปฏิบัติการนี้ถั่วเหลืองบางพันธุ์อ่อนแอมาก บางพันธุ์ก็อ่อนแอต่อการสร้างสารพิษของเชื้อรา

4.6 ถั่วเขียว

การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในถั่วเขียวของไทยมีการศึกษาโดยอนงคันุช และดารา (2521) ศึกษาปริมาณเชื้อราในโรงเก็บโดยนำเมล็ดถั่วเขียวเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ malt agar และ salt malt agar ผลการทดลองตรวจพบ *A. flavus* , *A. glaucus* และ *Penicillium spp.* จำนวน 1.3 , 4.8 และ 12.5 % ตามลำดับ บน malt agar ส่วน salt malt agar พบเชื้อ *A. flavus* , *A. glaucus* จำนวน 20.8 และ 6.3 % ตามลำดับ สำหรับการ ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและอะฟลาทอกซินในถั่วเขียวที่ขายตามท้องตลาดนั้น ธีรยุทธ และชัยวัฒน์ (2524) รายงานว่าถั่วเขียวที่เก็บเกี่ยวใหม่ มีเชื้อราน้อย หรืออาจจะไม่มีเลย แต่ ได้ตรวจพบเชื้อ *A. flavus* , *A. niger* , *A. ochraceous* , *A. glaucus* , *A. canidus* และ *Penicillium spp.* จำนวน 6 ตัวอย่าง จาก 10 ตัวอย่างที่สุ่มเก็บมาจากตลาด โดยมีอะฟลาทอกซินเฉลี่ย 16 ppb. ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Shank และคณะ (1972 a) ที่ ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินกับการเกิดมะเร็งใน ดับ โดยวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อราในอาหารจากตัวอย่างที่สุ่มจากตลาดในจังหวัดและหมู่บ้านต่างๆของไทยในช่วง กันยายน 2510 ถึง กรกฎาคม 2512 จำนวน 3,057 เป็นตัวอย่างของ พืชอาหาร 170 ชนิด พบว่ามีการปนเปื้อนของ *A. flavus* ในตัวอย่างดังกล่าว ซึ่งมีถั่วเขียว รวมอยู่ด้วย

การศึกษากการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในถั่วเขียวของต่างประเทศนั้น Shank และ คณะ (1972b) ตรวจพบอะฟลาทอกซินในถั่วเขียว 8 ตัวอย่าง จาก 12 ตัวอย่างที่สุ่มเก็บจาก ตลาดในฮ่องกง เช่นเดียวกับ Jaffar และคณะ (1993) ศึกษาการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน ของ ถั่วเขียว และถั่วเขียวผิวดำ โดยเก็บตัวอย่างจากท้องที่ต่าง ๆ ในปากีสถาน พบว่าถั่ว เขียวจาก Peshawar มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน 82.1 $\mu\text{g/kg}$ แต่ Samarajeewa (1984) ไม่พบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในถั่วเขียวและถั่วเขียวผิวดำ จากการวิเคราะห์

การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหารหลายชนิดจำนวน 138 ตัวอย่าง ที่สุ่มเก็บในประเทศศรีลังกา

4.7 พืชน้ำมันอื่น ๆ (ทานตะวัน งา ละหุ่ง และฝ้าย)

เมล็ดพืชน้ำมันทั้ง 4 ชนิดนั้นนอกจากจะใช้บริโภคโดยตรง และสกัดน้ำมันแล้ว กากยังสามารถนำไปเลี้ยงสัตว์ได้ โดยเฉพาะเมล็ดงาที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมประกอบอาหาร ถ้าเก็บไว้ในสภาพที่ไม่เหมาะสม เช่นในที่ที่มีความชื้นสูง หรือมีแมลงเข้าทำลายจะทำให้เกิดเชื้อรา เมื่อบริโภคอาจเกิดอันตรายได้ สำหรับการศึกษากากการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินนั้นมีการศึกษาดังนี้ Dietrich และ Hoffmann (1978) วิเคราะห์อะฟลาทอกซินในตัวอย่างเมล็ดทานตะวัน ฝ้าย และงาจากประเทศเยอรมันพบว่าเมล็ดทานตะวันมีอะฟลาทอกซินเฉลี่ยต่ำกว่า 5 ppb (ค่าที่วิเคราะห์ได้สูงสุด 5 ppb) เมล็ดฝ้ายมีค่าเฉลี่ย 26 ppb (สูงสุด 75 ppb) แต่ไม่พบอะฟลาทอกซินในเมล็ดงา Monacelli และคณะ (1976) ตรวจวัดปริมาณอะฟลาทอกซิน ปี 1 ในเมล็ดทานตะวัน งา และละหุ่ง โดยวิธี TLC พบว่ามีอะฟลาทอกซินในเมล็ดทานตะวัน 2 ตัวอย่าง ปริมาณ 50 และ 90 $\mu\text{g/kg}$ ตามลำดับ เมล็ดงามีอะฟลาทอกซิน 2 ตัวอย่าง ปริมาณ 50 และ 60 $\mu\text{g/kg}$ ตามลำดับ ส่วนเมล็ดละหุ่งไม่พบอะฟลาทอกซิน Hitokoto และคณะ (1975) รายงานว่าพบเส้นใยของเชื้อราในเมล็ดงาที่สุ่มเก็บจากกระบะของพ่อค้าจำนวน 39 กระบะ ในตลาดประเทศญี่ปุ่น และสามารถนับจำนวนได้ตั้งแต่ 1 ถึง 275 โคโลนี ต่อ งา 150 เมล็ด แล้วแยกเชื้อราได้ 1,173 ไอโซเลต ซึ่ง 56.7 % ของ 1,173 ไอโซเลต นี้ประกอบด้วย *A. ruber* *A. chevariele* *A. flavus* *A. candidus* และ *Penicillium spp* สำหรับ *A. flavus* มีทั้งหมด 96 ไอโซเลต เมื่อนำไปเลี้ยงบน SL medium แล้วสามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ โดยมีอยู่ 12 ไอโซเลตที่สร้างอะฟลาทอกซิน ปี 1 ได้สูงถึง 20 - 30 $\mu\text{g/ml}$ แต่กลับไม่พบอะฟลาทอกซินในตัวอย่างเมล็ดงาที่สุ่มเก็บมา

5. ความเสียหายที่เกิดจากการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน

5.1 ความเสียหายที่เกิดกับคุณภาพของถั่วลิสง

เมื่อมีการปนเปื้อนของเชื้อราในผลผลิตถั่วลิสง หรือพืชอื่น ๆ เชื้อราจะใช้อาหารที่อยู่ในเมล็ด เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ในกระบวนการเจริญเติบโตของเชื้อรา ทำให้สารประกอบดังกล่าวลดปริมาณลง จึงมีผลต่อคุณภาพของเมล็ด ซึ่งจะแสดงออกในลักษณะของ น้ำหนักแห้ง และเปอร์เซ็นต์น้ำมันลดลง แต่ปริมาณ fatty acid กลับเพิ่มขึ้น (Etchevery



et al., 1989) ซึ่ง Farag และคณะ (1980) พบว่ามีสหสัมพันธ์ในทางบวกระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. flavus* กับการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ในเมล็ดถั่วลิสง นอกจากนี้เชื้อราที่ติดมากับเมล็ดยังทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพ และมีคุณค่าทางโภชนาการลดลง สำหรับสาเหตุของการเสื่อมคุณภาพ เนื่องจากเมล็ดถั่วลิสงที่ติดเชื้อและมีการสร้างโคโลนี (colonies) ของ *A. flavus* และ *A. parasiticus* นั้นจะทำให้โปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของถั่วลิสงถูกเชื้อราย่อยสลายไปเป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลเล็กลง จึงทำให้คุณภาพของโปรตีนลดลง เชื้อรายังทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป ปริมาณน้ำมันที่ละลายได้ (soluble oil) ลดลง ปริมาณ amino acid เช่น lysine histidine และ arginine ลดลง รวมทั้ง วิตามินที่สำคัญต่าง ๆ ก็ลดลง เช่น thiamine, riboflavin และ niacin เป็นต้น (Cherry et al., 1975; Cherry et al., 1978; Abdel-Rahman, 1983) ในแง่ของเมล็ดพันธุ์ อะฟลาทอกซินทำให้คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ลดลง เนื่องจากอะฟลาทอกซินไปยับยั้งความงอกของเมล็ด โดยอะฟลาทอกซินมีผลต่อการยึดตัวของ hypocotyles และรากของต้นอ่อน และอะฟลาทอกซินยังมีผลต่อการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ของต้นกล้าอีกด้วย (ประภา, 2526)

5.2 ความเสียหายที่เกิดกับมนุษย์

มนุษย์ได้รับอะฟลาทอกซินจากการบริโภคอาหาร เช่น ถั่วลิสง ข้าวโพด และผลิตภัณฑ์ที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินโดยตรง หรือจากการบริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน ผลจากการบริโภคอาหารที่มีอะฟลาทอกซินเข้าไปจะทำให้เกิดมะเร็งในตับ (Wogan and Busby, 1980; Alexopoulos, 1962) และอะฟลาทอกซินยังกระตุ้นให้เกิดโรคตับอักเสบ ซึ่งจะพัฒนาไปเป็นโรคมะเร็งในตับได้ต่อไป (FAO, 1990) ตัวอย่างความเสียหายที่เกิดกับมนุษย์อันเนื่องมาจากอะฟลาทอกซิน เช่น ในปี 1974 พบว่ามีประชาชนในประเทศอินเดียได้รับพิษจากอะฟลาทอกซินประมาณ 400 คน ในจำนวนนี้มีผู้ที่เป็นโรคเกี่ยวกับตับประมาณ 100 คน โดยมีการตรวจพบอะฟลาทอกซินในข้าวโพดที่ใช้เป็นอาหารอยู่ในช่วง 0.25 ถึง 15.6 mg/kg (Rodricks and Pohland, 1981)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าผู้ที่เกี่ยวข้องกับ การเก็บเกี่ยว การเพาะปลูก การบรรจุ กระสอบ การขนส่ง การเก็บรักษา และการคัดแยกเมล็ดที่เป็นราออก อาจจะมีโอกาสสัมผัสกับอะฟลาทอกซิน ทางหายใจเอาฝุ่นที่มีอะฟลาทอกซินเข้าไปในระบบหายใจได้ (Bhat, 1989) ซึ่ง Palmgren (1985, อ้างถึงใน Bhat, 1989) พบ สปอร์ (spores) ของเชื้อราในเมล็ด

ฝุ่นประมาณ 3.5 - 200 ล้าน spores/m³ ของอากาศ ซึ่งส่วนใหญ่เป็น *A. flavus* โดยสอดคล้องกับรายงานการพบ อะฟลาทอกซิน บี 1 ในเนื้อเยื่อปอดของคณงานที่ทำงานในโรงงานถั่วลิสงป่น และมีรายงานจาก Czechoslovakia ว่าคนไข้จำนวน 3 รายที่เป็นคณงานเกษตรทุกคนพบ อะฟลาทอกซิน บี 1 10 - 54 µg/kg ในปอด (Dvorachova and Pichova , 1986 อ้างถึงใน Bhat , 1989) และพบอาการป่วยของเด็กเล็กในประเทศไทยที่เรียกว่า Reye's syndrome อาการของโรคคือคลื่นไส้ ชัก หดสติ อาการทรุดลงอย่างรวดเร็ว และถึงแก่ความตายภายใน 24 - 48 ชั่วโมง จากการตรวจศพพบว่าสมองบวม ดับและไตถูกทำลายจากการเกิดการสะสมไขมันในตับ (fatty degeneration) ซึ่งผู้ป่วยได้รับอะฟลาทอกซินจากอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* (อรุณศรี , 2539) Coulter และคณะ., 1986 และ Hendrickse , 1984 พบว่าตับของเด็กที่ขาดอาหารใน Sudan , Nigeria และ แอฟริกาใต้มีอะฟลาทอกซินอยู่ในช่วง 62 ถึง 33,206 µg/kg

5.3 ความเสียหายที่เกิดกับสัตว์

มีรายงานความเสียหายที่เกิดกับสัตว์ครั้งแรกสุดคือการระบาดของโรคที่เกิดขึ้นกับไก่งวง (Turkey "X") ในอังกฤษ ในปี 1960 ซึ่งสาเหตุของการเกิดโรคนี้คาดว่ามาจากการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินที่สร้างขึ้นจากเชื้อรา *A. flavus* ในอาหารที่มีส่วนประกอบของถั่วลิสงที่ส่งมาจากประเทศบราซิล อาการของโรคคือเบื่ออาหาร เชื่องซึม และตายภายใน 7 วันหลังแสดงอาการ เมื่อผ่าซากดูพบว่าตับของไก่งวงที่เป็นโรคถูกทำลาย Blaney และ Williams (1991) รายงานความเสียหายที่เกิดกับสุกรที่ได้รับพิษจากอะฟลาทอกซิน ในภาคเหนือของรัฐ New South Wales ประเทศ Australia โดยพบว่าสุกรมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง อัตราการแลกเปลี่ยนอาหารลดลง คุณภาพซากต่ำ

อุทัย (2521) ได้สรุปผลของอะฟลาทอกซินต่อสุกร และ ไก่ ดังนี้ อัตราการเจริญเติบโตลดลง ประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำกว่าปกติมาก เบื่ออาหาร อ่อนแอ ไม่เคลื่อนไหว อาจมีเลือดออกตามอุจจาระ ระบบย่อยอาหารผิดปกติ อวัยวะสำคัญเช่นตับถูกทำลาย และตายในที่สุด สัตว์อายุน้อยจะมีความต้านทานต่ออะฟลาทอกซินน้อยกว่าสัตว์ที่โตแล้ว สุกรที่ตั้งท้องจะอ่อนแอต่ออะฟลาทอกซินมากกว่าสุกรที่ไม่ตั้งท้องหรือพ่อพันธุ์ ไก่เล็กอ่อนแอต่ออะฟลาทอกซินมากกว่าไก่ใหญ่ และมีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ สายพันธุ์ สำหรับไก่ไข่ จะทำให้อัตราการไข่ลดลง หากเป็นพ่อพันธุ์จะทำให้ปริมาณของเชื้ออสุจิลดลง

6. การแก้ปัญหการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน

การป้องกันการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงต้องทำทุกขั้นตอนของการผลิตถั่วลิสง ตั้งแต่ระยะปลูก ระยะที่ถั่วลิสงกำลังเจริญเติบโต ก่อนเก็บเกี่ยว หลังเก็บเกี่ยว และในระหว่างการเก็บรักษา แม้ว่าปัญหาการสะสมอะฟลาทอกซินจะสูงขึ้นหลังจากเก็บเกี่ยวแล้วโดยเฉพาะสภาพแวดล้อมในระหว่างการเก็บรักษามักจะเปิดโอกาสให้มีการสะสมอะฟลาทอกซินมากขึ้นก็ตาม แต่เชื้อราที่เป็นสาเหตุแห่งการปนเปื้อนอาจจะติดมากับฝักถั่วลิสงได้ตั้งแต่อยู่ในแปลงปลูก เนื่องจากถั่วลิสงเป็นพืชที่มีการพัฒนาของฝักอยู่ในดิน ซึ่งเป็นแหล่งของจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด เมื่อเก็บเกี่ยวถั่วลิสงจะมีเชื้อชนิดต่าง ๆ ติดมากับฝัก และมีการเจริญเติบโตของเชื้อพร้อมกับสร้างสารพิษขึ้นในโรงเก็บต่อไป ดังนั้นจึงแบ่งการป้องกันหรือควบคุมการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงออกเป็น 2 ลักษณะดังนี้

6.1. การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ *A. flavus* , *A. parasiticus* และอะฟลาทอกซินก่อนเก็บเกี่ยว ส่วนใหญ่จะเป็นวิธีการทางเขตกรรมที่ป้องกันไม่ให้เกิดการติดเชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซินในแปลงปลูกถั่วลิสงตลอดระยะเวลาตั้งแต่ปลูกจนถึงเก็บเกี่ยว ซึ่งพอจะมีแนวทางปฏิบัติได้ดังนี้

6.1.1 การใช้พันธุ์ต้านทาน เป็นวิธีที่ดีที่สุดในการลดการปนเปื้อน สะดวกสำหรับเกษตรกรในการใช้ แต่ปัจจุบันนี้การปรับปรุงพันธุ์ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซินนั้นยังไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากต้องคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา ต้านทานต่อการเจริญของเชื้อ และต้านทานต่อการผลิตสารพิษของเชื้อราอีกด้วย เพราะถ้าพันธุ์ที่คัดเลือกมานั้นมีลักษณะความต้านทานเพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่งก็จะไม่สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนลงได้ ซึ่งลักษณะทั้ง 3 ประการดังกล่าวถูกควบคุมด้วย gene คนละชุดกัน และแต่ละลักษณะไม่มีความสัมพันธ์กัน เช่น สายพันธุ์ (MGS-7 x SM-5)1-6 และ HYQ (CG)S-35 เป็นพันธุ์ที่มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* 70 และ 60 % ตามลำดับ แต่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินต่ำเพียง 1.0 ppb และ ไม่มีการปนเปื้อนเลย (0 ppb) ตามลำดับ ในขณะที่พันธุ์ KUP24D-158 และ (Moket x J 11)-12-2-25 ซึ่งมีเชื้อ *A. flavus* เพียง 5 และ 2 % แต่กลับพบว่าการสะสมสารพิษถึง 28.5 และ 14.5 ppb ตามลำดับ (ทิพย์วรรณ และธรรมศักดิ์, 2531ข)

6.1.2 การเลือกพื้นที่ปลูกที่ไม่เคยมีการเข้าทำลายของ *A. flavus* มาก่อน หรือเลือกพื้นที่ปลูกที่ไม่เคยปลูกถั่วลิสงหรือพืชอื่นที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อ *A. flavus*

6.1.3 การเตรียมดินโดยการไถและตากดินเพื่อทำลายเชื้อรา ทำลายซากต้นถั่วลิสง และเมล็ดที่ยังตกค้างอยู่ในดิน

6.1.4 การเลือกฤดูปลูกและวันปลูกที่เหมาะสมเพื่อกำหนดวันเก็บเกี่ยวไม่ให้ตรงกับช่วงที่มีฝนตกหรือช่วงที่มีความชื้นในอากาศสูง

6.1.5 การป้องกันไม่ให้เกิดภาวะขาดน้ำในถั่วลิสง เนื่องจากถั่วลิสงที่กระทบแล้งและเกิดภาวะเครียด อันเนื่องมาจากการขาดน้ำจะทำให้เชื้อราเข้าทำลายฝักในแปลงปลูกได้มากขึ้น

6.1.6 การปลูกพืชหมุนเวียน เป็นวิธีการควบคุมปริมาณเชื้อราและแมลงในดินได้ดี เนื่องจากเชื้อราและแมลงไม่มีพืชอาศัยที่ปลูกติดต่อกันไปทั้งปีหรือทุกปี Pettit และ Taber (1968) ศึกษาการปลูกพืชตามในเท็กซัส โดยปลูกถั่วลิสงเป็นพืชตาม พบว่าการปลูกถั่วลิสงตามด้วยถั่วลิสงมีปริมาณเชื้อราและการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินมากกว่าการปลูกถั่วลิสงตามข้าวไรน์ ข้าวโอ๊ต แดงโม และมันฝรั่ง และพบว่าตัวอย่างดินที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชตามข้าวโพดหรือถั่วลิสง และปลูกหญ้าหรือข้าวฟ่างตามข้าวโพดหรือถั่วลิสง มีเชื้อรา *A. flavus* น้อยมาก

6.2 การป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ *A. flavus* , *A. parasiticus* และอะฟลาทอกซินหลังเก็บเกี่ยว เป็นการควบคุมไม่ให้เกิดการสร้างอะฟลาทอกซินจากเชื้อราที่ติดมากับฝักหรือเมล็ด โดยการควบคุมไม่ให้เกิดสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา และการสร้างอะฟลาทอกซิน

6.2.1 การใช้วิธีทางกายภาพ เช่น การป้องกันไม่ให้ฝักและเมล็ดเกิดความเสียหายจากเครื่องมือชุด หรือปลิดฝัก การใช้ความร้อน หรือรังสีควบคุมปริมาณเชื้อรา และอะฟลาทอกซิน การควบคุมความชื้นและอุณหภูมิของเมล็ดและโรงเก็บให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา และการคัดแยกเมล็ดเสียที่มีเชื้อราปนเปื้อนอยู่ออกไปเพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนกับเมล็ดดี วิธีการคัดแยกเมล็ดนี้ง่ายต่อการปฏิบัติเนื่องจากเมล็ดที่มีเชื้อราปนเปื้อนอยู่นี้สามารถสังเกตได้ง่ายจากสีของเมล็ดที่เปลี่ยนแปลงไป และจากสปอร์ของเชื้อที่เจริญอยู่บนผิวเมล็ด Read (1989) นำถั่วลิสงฝักแห้งที่มีความชื้นน้อยกว่า 11 % มาตรวจสอบปริมาณอะฟลาทอกซินเพื่อแบ่งกลุ่มถั่วลิสงออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นถั่วที่มีอะฟลาทอกซินต่ำกว่า 16 µg/kg กลุ่มที่ 2 มีอะฟลาทอกซินอยู่ระหว่าง 16 - 400 µg/kg และกลุ่มที่ 3 มีอะฟลาทอกซินมากกว่า 400 µg/kg แต่ละกลุ่มจะมีการคัดคุณภาพ

เอาฝักเสียและฝักเป็นราออก แล้วนำไปกะเทาะเปลือก คัดขนาด แล้วทำการตรวจวัดปริมาณ อะฟลาทอกซินอีกถ้ากลุ่มใดมีปริมาณอะฟลาทอกซินต่ำกว่า 16 $\mu\text{g/kg}$ สามารถส่งขายได้ทันที ส่วนกลุ่มที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินสูงกว่า 16 $\mu\text{g/kg}$ จะเข้าสู่กระบวนการควบคุมคุณภาพใหม่โดยการลอกเปลือกหุ้มเมล็ดออก เอาตัวไปอบใหม่อีกครั้งแล้วคัดแยกเมล็ดที่มีสีผิดปกติออกแล้ววัดปริมาณอะฟลาทอกซินใหม่อีกครั้ง กลุ่มที่มีอะฟลาทอกซินต่ำกว่า 16 $\mu\text{g/kg}$ ก็ส่งขายเป็นถั่วอบที่ลอกเปลือกแล้ว ส่วนกลุ่มที่ยังมีอะฟลาทอกซินสูงกว่า 16 $\mu\text{g/kg}$ ก็กลับเข้าสู่กระบวนการคัดคุณภาพใหม่อีก

6.2.2 การใช้วิธีการทางชีววิทยา ในระหว่างการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับฝักหรือเมล็ดถั่วลิสงอาจจะมียeastและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อต่าง ๆ ที่ติดมากับเมล็ด และขึ้นกับสภาพแวดล้อมว่าเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อชนิดใด Hao และคณะ (1989) ศึกษาการใช้แบคทีเรียชนิด *Flavobacterium aurantiacum* NRRLB-184 ในการกำจัดอะฟลาทอกซิน บี1 ออกจาก peanut milk แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ดีใน nondefatted peanut milk (NDPM) และ partially defatted peanut milk (PDPM) ซึ่งพบว่า *F. aurantiacum* สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินลงได้ 23 % ใน NDPM และ 70 % ใน PDPM ตามลำดับ

6.2.3 การใช้สารเคมี มีการใช้ 2 ลักษณะคือการใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจัดเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* เป็นสารเคมีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดเชื้อราทั่ว ๆ ไป เช่น thiabendazole , benomyl , captan , thiram , carbendazim ในอัตรา 3 g/kg เมล็ดเพื่อลดการติดเชื้อ (Ahmed and Reddy ,1993) แต่ต้องระมัดระวังในการใช้เนื่องจากสารเคมีบางชนิดอาจจะมีพิษตกค้าง อีกลักษณะหนึ่งคือการใช้สารเคมีเพื่อลดความเป็นพิษหรือลดปริมาณอะฟลาทอกซินได้มีการศึกษาการลดปริมาณอะฟลาทอกซินในกากถั่วลิสง (groundnut cake) โดยใช้การอบแอมโมเนียร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้ไอน้ำที่อุณหภูมิ 115^o C ความดัน 15 psi โดยสามารถอบได้ถึง 1 ตัน/ชั่วโมง (Coker et al., 1985) ในทำนองเดียวกันสารฆ่าแมลงบางชนิด เช่น dichlofos สามารถยับยั้งขบวนการสร้าง difurano ring ของอะฟลาทอกซินได้ โดยเกิด O-demethylation ซึ่งมีรายงานว่าพบ demethoxy-aflatoxin ถูกขับออกมาในปัสสาวะของลิง ในรูปอนุภาคอิสระหรือบางครั้งอาจผูกติดอยู่กับ glucuronic acid (ประภา , 2526) สารเคมีชนิดอื่นที่ลดความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินได้ เช่น sodium hydroxide, ammonium hydroxide, sodium bisulfite, propionic

acid , hydrogen peroxide , formaldehyde และ calcium hydroxide (Doyle and Marth , 1978 ; Moerck *et al.*, 1980)

7. การตรวจวัดปริมาณการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน

7.1 การสุ่มตัวอย่าง

การสุ่มตัวอย่างเป็นขั้นตอนที่สำคัญในการตรวจสอบอะฟลาทอกซิน เนื่องจากการกระจายของอะฟลาทอกซินในกองตัวอย่างมักจะไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นควรมีวิธีการสุ่มตัวอย่างที่ได้มาตรฐานเพื่อให้ได้ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของกองเมล็ดพืชนั้นได้ดีที่สุด ซึ่งการสุ่มเก็บตัวอย่างมีหลายวิธีที่ใช้เป็นมาตรฐานและมีความแตกต่างกันในแต่ละประเทศ เช่นวิธีของ International Association of Seed Crushers (IASC) ใช้วิธีสุ่มตัวอย่างจาก 10 จุด ๆ ละ 0.5 กก. ในกรณีที่กองตัวอย่างมีขนาดไม่เกิน 500 ตัน ประเทศเนเธอร์แลนด์และสหรัฐอเมริกาใช้ขนาดของตัวอย่าง 10 กก. โดยแบ่งสุ่มเป็น 4 subsample ขนาด 2.5 กก./subsample ประเทศอังกฤษสุ่มตัวอย่างขนาด 10 - 15 กก. นำมาบดหยาบแล้วจึงแบ่งเป็น subsample ละ 2.5 กก. ก่อนนำเข้าวิเคราะห์ (สนั่น และคณะ , 2539)

7.2 การวิเคราะห์ปริมาณ

การตรวจสอบอะฟลาทอกซินมีหลายวิธีที่มีประสิทธิภาพ การเลือกใช้วิธีการใดขึ้นกับเวลา และความละเอียดของข้อมูลที่ต้องการ เช่น ถ้าต้องการทราบผลอย่างรวดเร็ว และต้องการเพียงค่าประมาณคร่าว ๆ สามารถใช้วิธีการนับจุดเรืองแสง (Bright Greenish Yellow Fluorescence) หรือที่เรียกว่า BGYF และวิธี minicolumn ซึ่งเป็นวิธีที่ปฏิบัติได้ง่าย ใช้เวลาสั้น ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ได้ตั้งแต่ระดับไร่ ผู้ค้าท้องถิ่น ไซโล และในระดับโรงงานอุตสาหกรรม แต่ถ้าต้องการทราบปริมาณโดยละเอียดนั้นก็มีทั้งการวิเคราะห์ทางเคมี และการวิเคราะห์ทางชีววิทยา โดยวิธีวิเคราะห์ทางเคมีจะต้องผ่านขั้นตอนการสกัดอะฟลาทอกซิน และทำให้บริสุทธิ์ก่อนแล้วจึงนำไปผ่านวิธีการแยกชนิดและตรวจสอบปริมาณอะฟลาทอกซิน โดยการวัดความเข้มของการเรืองแสง ซึ่งอาจจะเป็น สีฟ้า สีเขียวปนเหลือง ตามชนิดของอะฟลาทอกซิน วัดปริมาณความเข้มข้นโดยการเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของการเรืองแสงจากอะฟลาทอกซินมาตรฐาน สำหรับการวัดความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินที่สกัดได้จากตัวอย่างมีหลายวิธี เช่น TLC (Thin Layer Chromatography) , HPTLC (High Performance Thin Layer

Chromatography) และ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) สำหรับวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีวิทยาซึ่งใช้ในการศึกษาค้นคว้าโดยละเอียดต่อไป

7.2.1 การตรวจสอบเชื้อราที่สร้างอะฟลาทอกซินโดยวิธีนับจุดเรืองแสง BGYF (Bright Greenish Yellow Fluorescence) ซึ่งมีสีเขียวเหลืองลักษณะไล่สะท้อนแสง สามารถตรวจพบภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตที่ช่วงคลื่น 365 nm จุดเรืองแสงนี้เกิดจากเอนไซม์บางชนิดในเมล็ดพืช เช่นข้าวโพด ฝ้ายทำปฏิกิริยากับกรด Kojic ซึ่งสร้างขึ้นจากเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* การตรวจพบจุดเรืองแสงแสดงว่ามีเชื้อราดังกล่าวปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง แต่ไม่สามารถบอกได้ว่ามีอะฟลาทอกซินหรือไม่ เนื่องจากการปนเปื้อนของเชื้อราและอะฟลาทอกซินอาจจะไม่มีความสัมพันธ์กันจึงต้องนำไปวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินโดยละเอียดต่อไป

7.2.2 การตรวจสอบอะฟลาทอกซินโดยวิธี minicolumn เป็นการวัดความเข้มข้นของการเรืองแสงสีฟ้าภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตของตัวอย่างที่ทำการตรวจวัดปริมาณ อะฟลาทอกซินเปรียบเทียบกับสารละลายอะฟลาทอกซินมาตรฐาน โดยมีสารต่างๆ ในหลอดminicolumn ทำหน้าที่เป็น absorbance ประกอบด้วย silica gel และ florisil เป็นต้น วิธีการนี้ต้องมีการสกัดอะฟลาทอกซินออกจากตัวอย่างโดยใช้ Chloroform : Methanol (97 : 3) แล้วนำ หลอด minicolumn ไปจุ่มลงในสารละลายที่สกัดได้ ถ้ามีอะฟลาทอกซินอยู่เมื่อนำไปตรวจภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตก็จะเรืองแสงสีฟ้า ความเข้มของสีขึ้นกับปริมาณ อะฟลาทอกซินที่มีอยู่ในตัวอย่าง

7.2.3 การตรวจสอบอะฟลาทอกซินโดยวิธี TLC (Thin Layer Chromatography)

วิธีนี้ต้องมีการแยกอะฟลาทอกซินออกมาจากตัวอย่าง และ มีการวัดปริมาณโดยอาศัยคุณสมบัติของอะฟลาทอกซินในการเรืองแสงภายใต้แสง UV ซึ่งขั้นตอนการวิเคราะห์ประกอบด้วย การสุ่มตัวอย่าง (sampling) การสกัดสารอะฟลาทอกซิน (extraction) การทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ (clean-up หรือ purification) การเพิ่มความเข้มข้น (concentration) และ การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณ (quantitative and qualitative assay)

7.2.3.1 การสกัดอะฟลาทอกซิน ตัวทำละลายที่ใช้มี 4 ชนิด คือ Methanol : น้ำ อัตราส่วน 55 : 45 v/v Acetone : น้ำ อัตราส่วน 85 : 15 v/v Acetonitrile : น้ำ อัตราส่วน 9 : 1 v/v หรือ Chloroform : น้ำ อัตราส่วน 250 : 25 v/v

7.2.3.2 การทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ เป็นการขจัดสิ่งปนเปื้อนที่จะไปรบกวนในขั้นตอนการวิเคราะห์ เช่น ใช้ lead acetate เพื่อตกตะกอนสิ่งแปลกปลอมเช่น pigment ของพืช , lipids , fatty acids และสารอื่น ๆ ที่จะทำให้เกิดการรบกวนบน TLC plate ได้ อีกวิธีหนึ่งคือการใช้ Column chromatography แยกอะฟลาทอกซินออกจากตัวทำละลาย และทำตัวอย่างให้บริสุทธิ์ โดยใน column มี silica gel , cellulose , acetic alumina หรือ Florisil ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้ตัวอย่างที่สกัดมาได้บริสุทธิ์ขึ้น

7.2.3.3 การเพิ่มความเข้มข้นเมื่อละลายอะฟลาทอกซินออกจาก Column chromatography แล้ว นำไประเหยตัวทำละลายออกจากตัวอย่างภายใต้สภาพสุญญากาศ โดยมีอุณหภูมิไม่เกิน 45°C จนเหลือสารละลายตัวอย่างตามปริมาณที่ต้องการ

7.2.3.4 วิธีวิเคราะห์อะฟลาทอกซินในตัวอย่าง

นำสารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน ปริมาณ 2 μl มาหยดลงบน silica gel TLC plate ห่างกัน 1 cm นำ plate ไปไว้ในสารละลายของ acetone- CHCl_3 (1+9) ใช้อุณหภูมิ 23 - 250°C นาน 40 นาที เมื่อครบกำหนด นำ plate ไปผ่านเครื่อง TLC Scanner เพื่ออ่านปริมาณอะฟลาทอกซิน ซึ่งจะอ่านเป็นกราฟ และบอกเป็นขนาดของพื้นที่ นำพื้นที่ได้กราฟไปคำนวณหาปริมาณอะฟลาทอกซินโดยเทียบกับพื้นที่ของสารละลายอะฟลาทอกซินมาตรฐาน

7.2.4 การตรวจสอบอะฟลาทอกซินโดยวิธี HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography)

วิธี HPTLC มีขั้นตอนการวิเคราะห์เหมือนวิธี TLC เพียงแต่มีการปรับปรุงข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับวิธี TLC เนื่องจากวิธี TLC มักจะมีความคลาดเคลื่อนระหว่างการหยดตัวอย่างลงบน plate และมีข้อบกพร่องในการแปลผล ทำให้ขาดความแม่นยำ ดังนั้นวิธี HPTLC จึงมีการแก้ไขโดยใช้เครื่องหยดตัวอย่าง ให้หยดลงบนตำแหน่งที่แน่นอน มีการแปลผลออกมาแบบอัตโนมัติโดยการนำเครื่องคอมพิวเตอร์เข้ามาต่อเชื่อมมีการปรับปรุง adsorbent layer บน plate ให้สม่ำเสมอขึ้น และควบคุมสภาพการปั๊ม plate ให้เหมาะสม

7.2.5 การตรวจสอบอะฟลาทอกซินโดยวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

วิธีการเตรียมตัวอย่างเหมือนวิธี TLC แตกต่างกันตรงการวัดชนิดและปริมาณอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง ซึ่งแต่ก่อนมีการใช้ UV ในการวัดปริมาณอะฟลาทอกซิน แต่ปัจจุบันมีการนำเอา fluorospectrometric detectors มาใช้แทน การวัดโดยวิธี HPLC นั้น มี

การพัฒนาโดย Panalaks และ Scott (1977) ซึ่งใช้ silica gel เป็นตัวกลางสำหรับการใช้ fluorospectrometric detectors เพื่อส่งเสริมการเรืองแสง fluorescence และปรับปรุงความไวต่อปริมาณสารพิษ ต่อมา Manabe และคณะ (1978) ใช้ normal phase Silica gel ในการวัดปริมาณ fluorospectrometric detectors และมีการปรับปรุงระบบการวัดให้ดีขึ้น โดยที่ลดการรบกวนใน mobile phase และได้มีการวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซินจากการทำ derivatization ของอะฟลาทอกซิน เนื่องจากตัวอะฟลาทอกซินเองมักจะไปรบกวนระบบของการวิเคราะห์ทำให้ค่าที่ได้คลาดเคลื่อน การเปลี่ยนรูปไปเป็นสารประกอบอื่นจะทำให้ค่าวิเคราะห์ถูกต้องมากขึ้น

8. การตรวจสอบอะฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA

8.1 หลักการของ ELISA

ELISA (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay) เป็นวิธีการตรวจสอบหาปริมาณของสารที่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน (antigen) โดยอาศัยหลักของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (antibody) ซึ่งวิธีนี้จะใช้ในกรณีที่แอนติเจนมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยหรือมีปริมาณน้อยจนไม่สามารถสังเกตเห็นปฏิกิริยาการตกตะกอน (precipitation) แต่จะทราบว่ามีการเกิดปฏิกิริยาขึ้นจากการนำเอาเอนไซม์เชื่อมติด หรือติดฉลาก (label) กับแอนติเจน หรือแอนติบอดี และสามารถตรวจวัดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น ระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีได้จากสีที่เกิดขึ้นเมื่อใส่ ซับสเตรทของเอนไซม์นั้นลงไป โดยซับสเตรทของเอนไซม์ต้องเป็นชนิดที่เกิดสีเมื่อทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ (เบญจะ,2525) จากการเกิดสีทำให้สามารถสังเกตได้ว่าในตัวอย่งนั้นมีแอนติเจนหรือไม่หรืออาจจะใช้การวัดความเข้มของสีจาก spectrophotometer แทน และ เนื่องจากเอนไซม์หนึ่งโมเลกุลสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของซับสเตรทได้หลายโมเลกุลการใช้เอนไซม์เป็นสารติดฉลากจึงช่วยเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีได้มากขึ้น (นภารร,2530)สำหรับสารที่จะมีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนได้ต้องมีโครงสร้างที่ซับซ้อน มีประจุพอเหมาะ มีความแรงแรงดี สามารถย่อยได้ด้วยน้ำย่อยในร่างกาย และมีขนาดโมเลกุลใหญ่

8.2 การผลิตแอนติบอดีเพื่อใช้ตรวจสอบอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินไม่มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจน เนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Chu and Ueno,1977; Chu,1984 ; Chu,1989) อะฟลาทอกซินจึงไม่สามารถกระตุ้นให้ร่างกายคน และสัตว์สร้างแอนติบอดีได้ แต่จะต้องอาศัยโปรตีนเป็นแคริเออร์เพื่อที่จะให้มีคุณสมบัติเป็นแอนติเจนที่สมบูรณ์ในการสร้างแอนติบอดี (Chu and Ueno,1977) ดังนั้นก่อนที่จะทำการผลิตแอนติบอดีต้องนำอะฟลาทอกซินไปผูกเชื่อมกับโปรตีนให้กลายเป็นแฮปเตน (hapten) ก่อน ซึ่งส่วนใหญ่มักจะใช้โปรตีนที่เรียกว่าอัลบูมินจากซีรัมของโค (bovine serum albumin หรือ BSA) ผูกติดกับอะฟลาทอกซินเพื่อกระตุ้นให้สัตว์ทดลองสร้างแอนติบอดี (Gaur et al.,1980; Chu ; Ueno,1977 and Pestka et al.,1980) และแอนติบอดีที่ได้จะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับอะฟลาทอกซินเท่านั้น

การเชื่อมต่อกันระหว่างสารพิษกับโปรตีนนั้นจะใช้ functional groups ที่พบในโมเลกุลของสารพิษ แต่อะฟลาทอกซินเป็นสารที่ไม่มีกลุ่มที่จะทำปฏิกิริยากับโปรตีนได้ เช่น

กลุ่มคาร์บอกซิล (carboxyl) หรือกลุ่มอื่น ๆ จึงต้องมีการนำกลุ่มดังกล่าวเข้าสู่โมเลกุลของอะฟลาทอกซิน เพื่อให้อะฟลาทอกซินสามารถจับกับโปรตีนได้ ตัวอย่างเช่นอะฟลาทอกซิน บี₂เอ หรือ บี₁ dihydrodiol จะถูกเปลี่ยนไปเป็นรูปของ dialdehydic phenolate ion (Gaur *et al.*, 1981 และ Pestka and Chu, 1984) และอะฟลาทอกซิน บี₁ จะต้องใช้ functional moieties เช่นกลุ่ม carboxymethyloxime หรือ hemisuccinate ในการเชื่อมอะฟลาทอกซินกับโปรตีน (Chu and Ueno, 1977) โดยใช้วิธี carbodiimide (Pestka *et al.*, 1980)

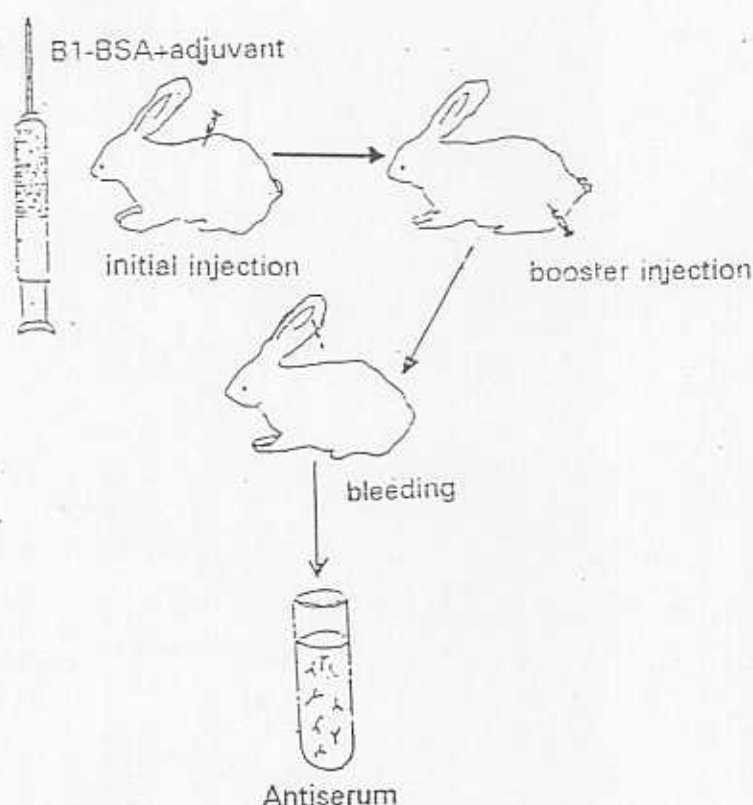
วิธีการที่ใช้กันมากในการผลิตแอนติบอดีคือ การฉีดกระตุ้นด้วยแฮปเตนของอะฟลาทอกซินที่ผูกเชื่อมกับโปรตีน ซึ่งแอนติบอดีที่ได้จากวิธีนี้เรียกว่า polyclonal antibodies ก่อนฉีดอะฟลาทอกซินเข้าสู่กระต่ายต้องผสมกับ Complete Freund's adjuvant (Chu and Ueno, 1977) โดย adjuvant จะทำหน้าที่เป็นสารช่วยเสริมให้ร่างกายของสัตว์ทดลองมีการตอบสนองต่อแอนติเจนได้ดีขึ้น โดยอาจจะยืดเวลาการอยู่ในร่างกายของสัตว์ทดลองของแอนติเจนให้นานขึ้น หรือ กระตุ้นเซลล์ในสัตว์ทดลองที่มีหน้าที่ผลิตแอนติบอดีให้สร้างแอนติบอดีขึ้น adjuvants ที่ใช้กันบ่อย ๆ เช่น Freund's adjuvant (มี 2 ชนิด คือ Incomplete กับ Complete Freund's adjuvant) , Aluminum salts , Methylated bovine serum albumin และ สารพิษจากแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เช่น *Bordetella pertussis* ส่วนการผลิตแอนติบอดีสำหรับอะฟลาทอกซินนั้นนิยมใช้ Complete Freund's adjuvant ซึ่งปริมาณอะฟลาทอกซินที่ใช้กับกระต่ายแต่ละตัวและอัตราส่วนระหว่างอะฟลาทอกซินกับ Complete Freund's adjuvant นั้นขึ้นกับขนาดของกระต่าย (สุรศักดิ์, 2531)

ประวัติ และคณะ (2534) ใช้ความเข้มข้นของ Aflatoxin B₁ - BSA ขนาด 300 µg ต่อกระต่าย 1 ตัว ผสมกับ Complete Freund's adjuvant อัตราส่วน 1 : 3 สำหรับการฉีดครั้งแรก หลังจากนั้น 1 เดือนจึงฉีดกระตุ้น (booster injection) ที่กล้ามเนื้อขาโดยใช้ Aflatoxin B₁ - BSA ขนาด 250 µg ต่อกระต่าย 1 ตัว ผสมกับ Complete Freund's adjuvant อัตราส่วน 1 : 2 ดังรูปที่ 2 ส่วน Gaur และคณะ (1981) ใช้ปริมาณ Aflatoxin B_{2a} - BSA ขนาด 400 µg ผสมกับ Complete Freund's adjuvant อัตราส่วน 1 : 3 และฉีดกระตุ้นที่กล้ามเนื้อขาโดยใช้ Aflatoxin B_{2a} - BSA ขนาด 400 µg ผสมกับ Complete Freund's adjuvant อัตราส่วน 1 : 2 และทำการเจาะเลือดจากใบหูของกระต่ายหลังจากฉีดครั้งแรก 3 สัปดาห์ แล้วสามารถเจาะเลือดกระต่ายได้ทุกสัปดาห์ ซึ่ง Gaur และคณะ

(1980) สามารถเจาะเลือดกระต่ายเพื่อผลิตแอนติบอดีได้ถึง 96 สัปดาห์ นำเลือดกระต่ายมาแยกส่วนที่เป็นอิมมูโนโกลบูลิน G (Immunoglobulin G) โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Hebert *et al.* 1973 ; Chu and Ueno, 1977) Chu และ Ueno, (1977) กล่าวว่ากระต่ายผลิตแอนติบอดีได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 ถึง 8 หลังจากฉีดแอนติเจนครั้งสุดท้าย

8.3 การเตรียมตัวอย่างสำหรับตรวจสอบโดยวิธี ELISA

จากวิธีการของ Anjaliah และคณะ (1989) กระทำโดยนำตัวอย่างถั่วลิสงที่ต้องการตรวจสอบอะฟลาทอกซิน จำนวน 500 กรัม มาแบ่งด้วยเครื่องแบ่งเมล็ดให้ได้ 20 กรัม แล้วนำไปสกัดอะฟลาทอกซินออกจากตัวอย่างโดยบดตัวอย่างด้วยเครื่องบด (blender) กับสารทำละลาย 100 มล. (700 มล. methanol 290 มล. น้ำกลั่น และ 10 มล. dimethylformamide) นาน 2 - 3 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที จึงนำเอาส่วนบนของสารละลายมากรองผ่านกระดาษกรองแล้วนำสารละลายที่กรองได้ไปวิเคราะห์ต่อไป



ภาพที่ 2 แสดงการฉีดแอนติเจน หรืออะฟลาทอกซินให้กับกระต่ายเพื่อผลิตแอนติบอดี
ที่มา : ประวัติ และคณะ, 2534.

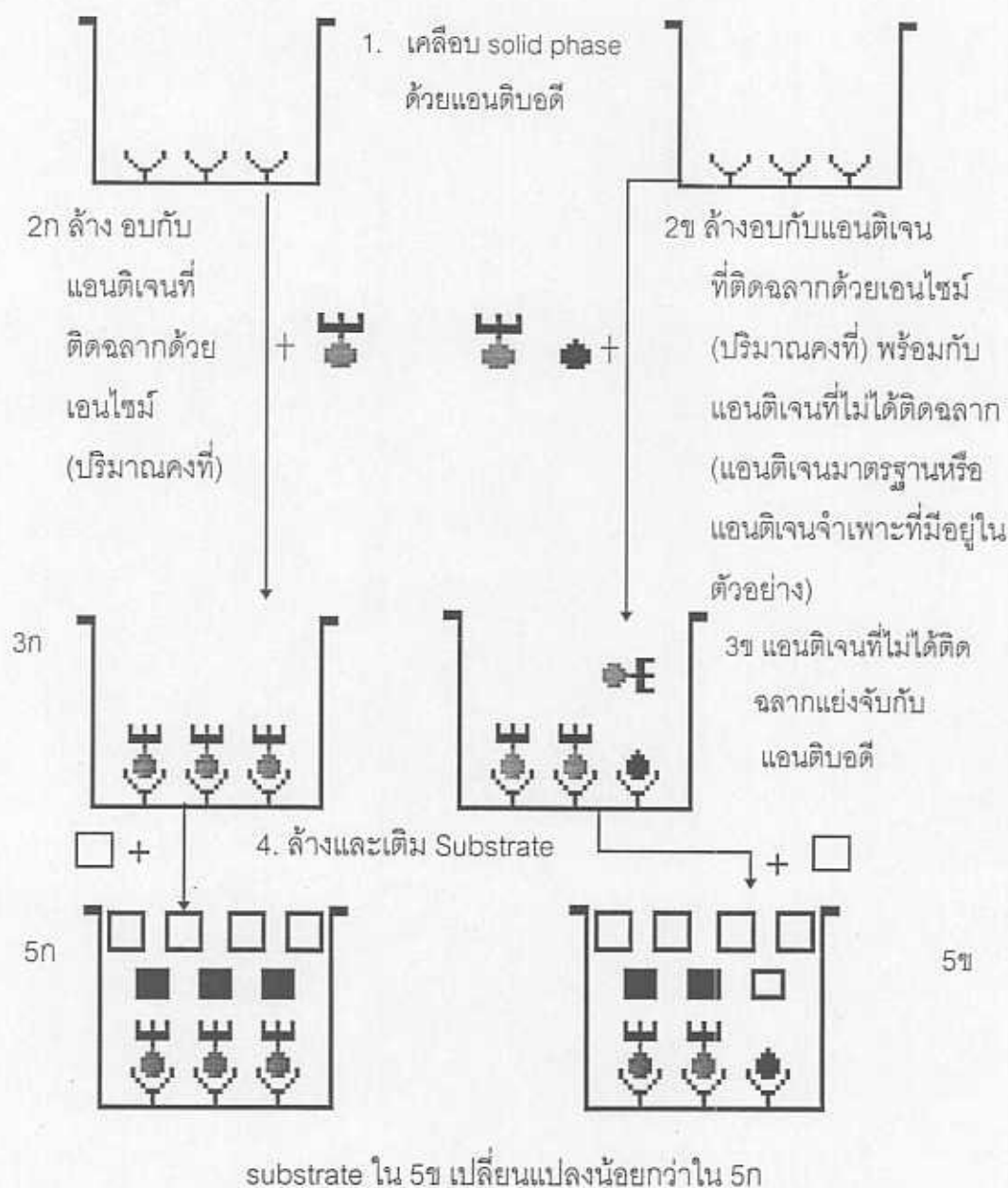
8.4 ชนิดของการตรวจสอบอะฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA

ELISA ที่นิยมใช้วิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินมี 2 ชนิด คือ วิธีการแข่งขันแบบตรง (direct competitive ELISA) และวิธีการแข่งขันแบบอ้อม (indirect competitive ELISA) ทั้ง 2 ชนิดเป็น heterogeneous competitive assays ซึ่งมีหลักการคือ เมื่อให้อะฟลาทอกซิน และแอนติบอดีทำปฏิกิริยากันแล้วจะแยกอะฟลาทอกซิน หรือ แอนติบอดีที่อยู่เป็นอิสระในสารละลายในหลุมของ microtiter plate (liquid phase) โดยวิธีการแข่งขันแบบตรง อาศัยการให้อะฟลาทอกซินที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (aflatoxin - enzyme conjugate) เป็นตัวแข่งขันกับอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง หรืออะฟลาทอกซินมาตรฐานในการเกาะจับหรือทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี ในขณะที่วิธีการแข่งขันแบบอ้อมตัวอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง หรืออะฟลาทอกซินมาตรฐานจะแข่งขันกับอะฟลาทอกซินที่ผูกติดด้วยโปรตีนที่เคลือบอยู่กับ solid phase ในการเกาะจับหรือทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี และมีการใช้แอนติบอดีตัวที่ 2 (secondary antibody) เช่น goat anti - rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ สำหรับเอนไซม์ที่นำมาติดฉลากนั้นส่วนใหญ่ใช้ horse radish peroxidase (HRP) (ประวัติ และคณะ, 2534 ; Pestka *et al.*, 1980 ; El-Nakib *et al.*, 1981 ; Pestka *et al.*, 1982 Chu *et al.*, 1987) แต่เอนไซม์อื่น ๆ ที่เคยใช้ก็มี เช่น alkaline phosphatase (Anjaiah *et al.*, 1989 ; Chu, 1984)

8.4.1 วิธีการแข่งขันแบบตรง (Direct Competitive ELISA)

วิธีการแข่งขันแบบตรงนี้ มีหลักการดังแสดงในภาพที่ 3 กล่าวคือเคลือบหลุม microtiter plate ด้วยแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับอะฟลาทอกซิน เติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบปริมาณอะฟลาทอกซิน หรืออะฟลาทอกซินมาตรฐานพร้อมกับสารพิษที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ แล้วบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 0.5 ถึง 2 ชั่วโมง เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นจนถึงสภาพคงที่ หรืออาจจะแยกบ่มเป็นสองขั้นตอนก็ได้ แล้วล้างส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออก หลังจากนั้นวัดปริมาณเอนไซม์ที่ติดกับผิวของหลุมใน plate โดยการเติมสารละลายซับสเตรทลงไปและบ่มไว้ในช่วงเวลาที่เหมาะสม ผลที่ได้จะเกิดสี ซึ่งวัดโดยใช้ spectrophotometer หรือโดยการสังเกตสีเปรียบเทียบกับสีของอะฟลาทอกซินมาตรฐาน จะพบว่าในหลุมที่มีอะฟลาทอกซินมาตรฐาน หรือหลุมที่สารละลายตัวอย่างมีอะฟลาทอกซินจะมีการเปลี่ยนแปลงของซับสเตรทน้อยกว่าเนื่องจากอะฟลาทอกซินในตัวอย่างแย่งจับกับแอนติบอดีที่เคลือบอยู่บนผิวด้านในของหลุมใน plate ทำให้อะฟลาทอกซินที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์จับกับแอนติบอดีได้น้อยลง ดังนั้นเมื่อเติมซับสเตรทลงไปความเข้มของสีที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของซับสเตรท

จะมีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนมากับตัวอย่างนั้นๆ (นการร,2530 ; อมรา,2536 และ Chu,1989)



ภาพที่ 3 วิธีการแข่งขันแบบตรง ซึ่งใช้อะฟลาทอกซินที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ เมื่อ ก แทนหลุมตรวจสอบที่ไม่มีอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง และข แทนหลุมตรวจสอบที่มีอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง

ที่มา : ดัดแปลงจาก นการร,2530

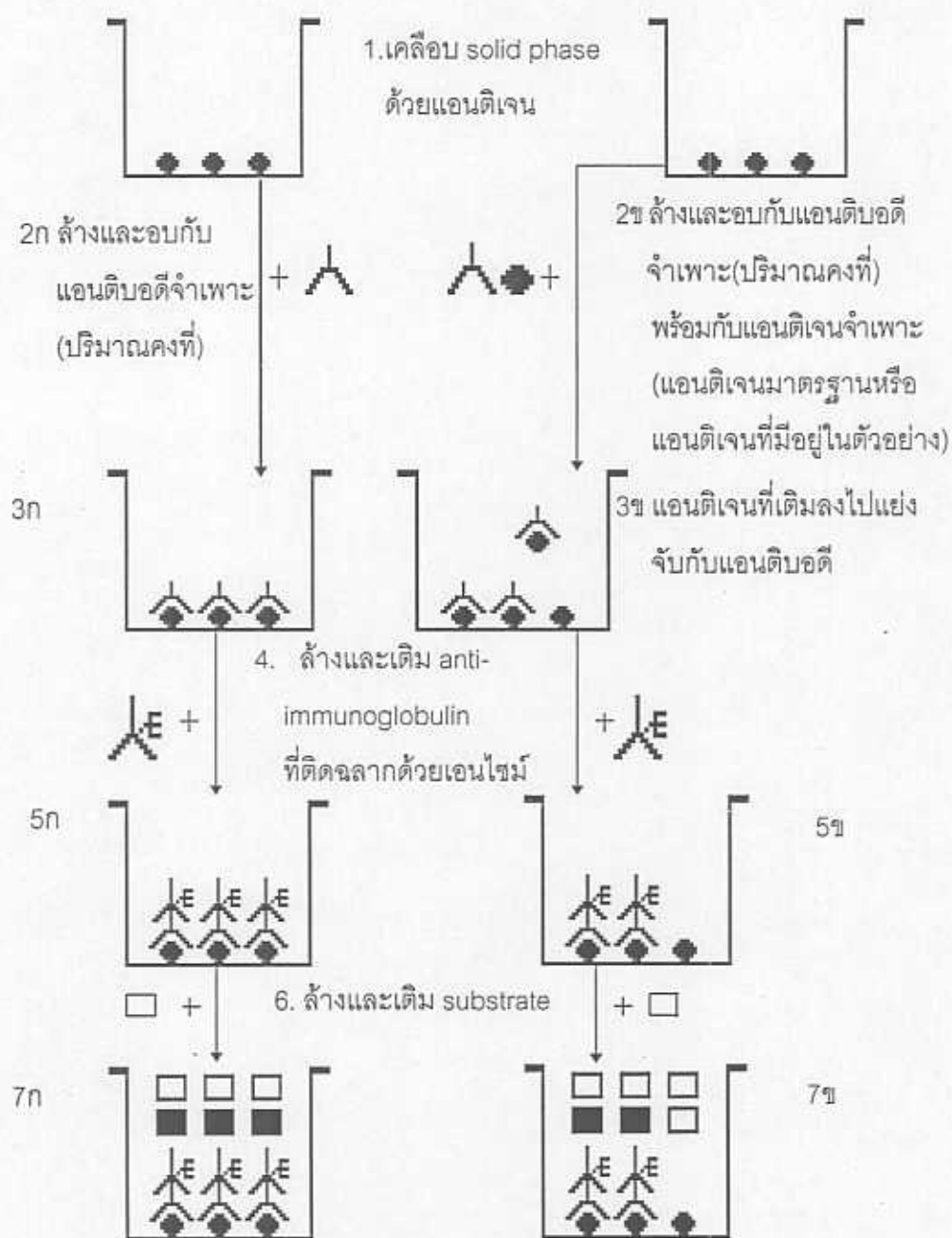
Chu และคณะ (1987) ได้พัฒนาวิธีการแข่งขันแบบตรงสำหรับวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซิน บี 1 ในถั่วลิสงและข้าวโพดโดยใช้ microplate ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่ออะฟลาทอกซิน บี 1 แล้วดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้ (a) หยอด 50 μ l ของอะฟลาทอกซิน บี 1 มาตรฐาน หรือตัวอย่างลงไปในห้อง microplate ตามด้วย 50 μ l ของอะฟลาทอกซินที่เชื่อมกับเอนไซม์ horse radish peroxidase (HRP) และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ($25-28^{\circ}$ C) ประมาณ 30 นาที (b) ล้าง plate ด้วย 300 μ l ของบัฟเฟอร์ 3-5 ครั้ง (c) หยอด 100 μ l ของซับสเตรทลงไปในแต่ละหลุม ตามด้วยการบ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และ (d) หยุดปฏิกิริยาด้วย stopping reagent 100 μ l และวัดปฏิกิริยาด้วย micro ELISA reader ที่ 490 nm ซึ่งปริมาณอะฟลาทอกซินหาได้โดยการทำ standard curve สำหรับค่าความเข้มของสีที่อ่านได้ของตัวอย่างนั้นนำมาเปรียบเทียบกับ standard curve แล้วก็จะได้ความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง ซึ่ง Chu และคณะ สามารถวัดปริมาณอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงและผลิตภัณฑ์ได้ในช่วง 2.5 - 25 pg/ml

ประวัติ และคณะ (2534) ได้ทำการตรวจสอบอะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์ โดยวิธีการแข่งขันแบบตรงของ ELISA ซึ่งมีขั้นตอนการวิเคราะห์เหมือนกับวิธีการแข่งขันแบบตรงที่ทำโดย Chu (1989) ที่กล่าวมาแล้วโดยสามารถตรวจสอบอะฟลาทอกซินได้ต่ำสุดถึง 0.1 ppb Anjaiah และคณะ (1989) รายงานการตรวจสอบการปนเปื้อนของ อะฟลาทอกซิน บี 1 ในเมล็ดถั่วลิสงพันธุ์ J 11 ที่ปลูกในฤดูฝน ปี 1986 ที่ International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT) โดยมีขั้นตอนดังนี้ บ่มแอนติบอดี 200 μ l ในหลุมของ polystyrene microtiter plates เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37° C ล้าง plate 3 ครั้ง ใน PBS-Tween แล้วหยอดสารพิษอะฟลาทอกซินมาตรฐาน หรือตัวอย่างจำนวน 100 μ l ตามลงไปในห้อง ตามด้วย Aflatoxin B1 - oxime - BSA - ALP conjugate 100 μ l บ่ม plate ไว้ 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30° C ต่อจากนั้นล้างด้วย PBS - Tween แล้วเติม p-nitrophenyl phosphate 200 μ l และบ่ม plate ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 3 M sodium hydroxide 50 μ l แล้ววัดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วย micro ELISA reader ที่ 405 nm ค่าความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน บี 1 ในตัวอย่างได้จากการเทียบกับ standard curve

8.4.2 วิธีการแข่งขันแบบอ้อม (Indirect Competitive ELISA)

วิธีการแข่งขันแบบอ้อมมีหลักการดังแสดงในภาพที่ 4 ขั้นตอนแรกคือเคลือบหลุม microtiter plate ด้วยอะฟลาทอกซินที่ผูกติดกับโปรตีน เติมนแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออะฟลาทอกซินที่ไม่ได้ติดฉลากด้วยเอนไซม์ลงไปพร้อมกับสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบปริมาณอะฟลาทอกซิน หรือสารพิษอะฟลาทอกซินมาตรฐาน หรืออาจจะแยกเติมเป็นสองขั้นตอนก็ได้ แต่จะต้องเติมตัวอย่างก่อนเติมนแอนติบอดีในตัวอย่างที่มีอะฟลาทอกซินอยู่ อะฟลาทอกซินในตัวอย่างจะแข่งขันกันจับกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออะฟลาทอกซิน ทำให้อันติบอดีดังกล่าวจับกับอะฟลาทอกซินที่ผูกกับโปรตีนที่เคลือบไว้กับหลุมของ plate ได้น้อยลง ดังนั้นเราสามารถวัดปริมาณแอนติบอดีที่ติดอยู่กับ plate ได้โดยการเติมนแอนติบอดีตัวที่ 2 (secondary antibody) ซึ่งก็คือ goat anti - rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ เมื่อล้างส่วนที่ไม่ได้ทำปฏิกิริยาออกจาก plate แล้วเติมซับสเตรทลงไปที่การเปลี่ยนแปลงของซับสเตรทจะทำให้เกิดสีขึ้น ซึ่งเป็นสัดส่วนกลับกับปริมาณของอะฟลาทอกซินในตัวอย่าง หรืออะฟลาทอกซินมาตรฐานที่เติมลงไป (Chu *et al.*, 1987 และ นารธร, 2530)

Morgan และคณะ (1986, อ้างถึงใน Chu, 1989) ได้ใช้วิธีการแข่งขันแบบอ้อมวิเคราะห์การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในเนยถั่วลิสง (peanut butter) จำนวน 18 ตัวอย่างที่เก็บจากร้านค้าขายปลีก พบว่าระดับของอะฟลาทอกซินอยู่ในช่วงน้อยกว่า 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 8 ตัวอย่าง ส่วนระดับอะฟลาทอกซินในปริมาณที่มากถึง 775 $\mu\text{g}/\text{kg}$ มี 1 ตัวอย่าง ซึ่ง Morgan และคณะ ใช้อะฟลาทอกซิน บี 1 ผูกกับโปรตีน keyhole limpet haemocyanin (KLH) เคลือบในหลุม microtiter plate แล้วป้อนกับตัวอย่าง หรืออะฟลาทอกซินมาตรฐาน ตามด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออะฟลาทอกซิน บี 1 ปริมาณของแอนติบอดีที่เกาะติดกับ microtiter plate ตรวจวัดได้โดยการเติม goat anti - rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase แล้ววัดสีที่เกิดจากการเติม p - nitrophenyl phosphate และปริมาณความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน บี 1 ของตัวอย่างจะวัดได้โดยเทียบกับ standard curve



substrate ใน 7ข เปลี่ยนแปลงน้อยกว่าใน 7ก

ภาพที่ 4 วิธีการแข่งขันแบบอ้อม (Indirect Competitive ELISA)
เมื่อ ก แทนหลุมตรวจสอบที่ตัวอย่างไม่มีอะฟลาทอกซิน
และข แทนหลุมตรวจสอบที่ตัวอย่างมีอะฟลาทอกซิน
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก นภธร,2530.