

# ความแตกต่างของสารทุติยภูมิของเชื้อรา *Aspergillus flavus* กลุ่มที่สร้างและไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

## Differentiation on secondary metabolites of toxigenic and atoxigenic *Aspergillus flavus*

ชัยณรงค์ รัตนกริฑากุล<sup>1\*</sup>, สรรเสริญ รัสสุวรรณ<sup>1</sup>, รัตติยา พงศ์พิสูทธา<sup>1</sup>  
และพิสูทธิ เขียวมณี<sup>1</sup>

Chainarong Rattanakreetakul<sup>1\*</sup>, Sansern Rangsuvan<sup>1</sup>, Ratiya Pongpisutta<sup>1</sup>  
and Pisut Keawmanee<sup>1</sup>

**บทคัดย่อ:** การตรวจสอบสารทุติยภูมิโดยใช้ gas chromatography mass spectrometry (GCMS) เป็นเครื่องมือสำคัญที่ใช้ตรวจสอบชนิดของสารทุติยภูมิที่สิ่งมีชีวิตสร้างขึ้น จึงได้นำมาเปรียบเทียบความแตกต่างในการสร้างสารทุติยภูมิของเชื้อรา *A. flavus* ที่สร้างและไม่สร้างสารอะฟลาทอกซิน จากการคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus flavus* จำนวน 15 ไอโซเลทที่แยกได้จากเมล็ดข้าวโพดในพื้นที่เพาะปลูกจังหวัดนครปฐมและกาญจนบุรี โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ระบุได้ว่าเป็นเชื้อรา *A. flavus* และเมื่อตรวจสอบการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินโดยใช้เทคนิค ELISA คัดเลือกเชื้อราที่แตกต่างกันสองไอโซเลท ได้แก่ *A. flavus* ไอโซเลท 8 ไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ในขณะที่ *A. flavus* ไอโซเลท 17 มีการสร้างสารพิษพร้อมกับการสร้างเม็ด sclerotium ที่มีขนาดเล็ก ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *A. flavus* S strain ทำการตรวจสอบสารทุติยภูมิที่สกัดจากเส้นใยของเชื้อราทั้งสองไอโซเลทด้วยเครื่องมือ GCMS เปรียบเทียบชนิดของสารทุติยภูมิ ตรวจพบสารจำนวนมากมีความใกล้เคียงกับสารที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสลายกลูโคสและการสร้างสาร pyruvate ในส่วนของ tricarboxylic acid cycle โดยมีสาร 9-Octadecenoic acid, (E)-หรือ oleic acid ที่พบเฉพาะสารสกัดจากเชื้อรา *A. flavus* ไอโซเลท 17 ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ซึ่ง oleic acid มีรายงานถึงบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

**คำสำคัญ:** *Aspergillus flavus*, อะฟลาทอกซิน, กรดไขมัน, สารทุติยภูมิ

**ABSTRACT:** Gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) is one of the major equipment for analyzing on the secondary metabolites producing by living cell, in order to compare between the metabolites and related processes. Fifteen isolates of *Aspergillus* spp. were isolated from the maize grain growing in Nakhon Pathom and Kanchanaburi provinces. They were identified by morphological characteristics, ITS-PCR sequencing analysis and aflatoxin production. Both fungal isolates were identified as *A. flavus* and aflatoxin production using ELISA kit, *A. flavus* isolate 8 was an atoxigenic isolate while isolate 17 was a toxigenic isolate with small size sclerotia production grouping into *A. flavus* S strain. The secondary metabolite compounds of the fungal extract from

Received October 10, 2019

Accepted December 18, 2019

<sup>1</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University  
Nakhon Pathom 73140

\* Corresponding author: crattan99@yahoo.com

both isolates were analyzed by using GCMS compared to secondary metabolite compound types. Most compounds similar to the glucose-pyruvate pathway to the tricarboxylic acid cycle. Only 9-Octadecenoic acid, (E)- or oleic acid was discovered in the mycelium extract of the toxigenic *A. flavus* isolate 17. Moreover, oleic acid has reported on plays the crucial role in the aflatoxin production promoting to the aflatoxin in plant.

**Keywords:** *Aspergillus flavus*, aflatoxin, fatty acid, secondary metabolite

## บทนำ

เชื้อรา *Aspergillus flavus* เป็นเชื้อราที่พบบน เป็นอยู่ในผลผลิตทางการเกษตร โดยดำรงชีวิตในดิน แต่เชื้อราสามารถเข้าทำลายหรืออาศัยในพืช สัตว์ และมนุษย์ได้ เชื้อราชนิดนี้พบในตัวอย่างธัญพืชหลายชนิด โดยสารพิษที่เชื้อรา *A. flavus* สร้างขึ้นนั้น ได้แก่ สารพิษอะฟลาทอกซิน (International Agency for Research on Cancer, 2002) นอกจากสารพิษแล้วยังมีรายงานว่าเชื้อรา *A. flavus* ทำให้เกิดโรค aspergillosis ที่ก่อให้เกิดปัญหาทั้งกับมนุษย์ เชื้อราชนิดนี้ติดต่อโดยการหายใจ เมื่อสปอร์เข้าไปในปอดทำให้เกิดติดเชื้อปอด สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อในร่างกายนได้หลายระบบ ได้แก่ หู ตา จมูก และปอด การติดเชื้อราในบางครั้งเชื่อจะลุกลามไปยังกระดูก สมอง เยื่อหุ้มสมอง เช่นเดียวกับเชื้อรา *A. fumigatus* (Hedayati et al., 2007) ที่สำคัญเชื้อรา *A. flavus* สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินตกค้างอยู่ในผลผลิตทางการเกษตร มีรายงานว่า ในสภาพธรรมชาตินั้น สามารถพบเชื้อราได้ทั้งชนิดที่สร้างสารพิษ และชนิดที่สร้างได้น้อย (Chang et al., 2005, Al-Wadai et al., 2013) ลักษณะเด่นที่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของกลุ่มที่สร้างสารพิษ คือ การสร้างเม็ด sclerotium จำนวนมาก พบการสร้างสปอร์ของเชื้อราได้น้อย ในบางครั้งมีการจัดกลุ่มเชื้อรา *A. flavus* ที่มีการสร้างเม็ด sclerotium ขนาดเล็กนี้ให้เป็นกลุ่ม S-strain (Cotty, 1997)

สารพิษอะฟลาทอกซิน เมื่อแบ่งตามโครงสร้างทางเคมี แยกได้เป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มอะฟลาทอกซิน ชนิดบี (Aflatoxin B ที่พบหลักคือ B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) และอะฟลาทอกซิน ชนิดจี (Aflatoxin G ที่พบหลักคือ G<sub>1</sub> และ G<sub>2</sub>) สารอะฟลาทอกซินสร้างความผิดปกติให้กับตับ และสมอง นำตาลในเลือดลดลง สมอวม มีอาการคันของไขมันในอวัยวะภายใน เช่น ตับ ไต หัวใจ และปอด องค์การอนามัยโลก รายงานว่า หากได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินอย่างต่อเนื่องในระดับ 1 ไมโครกรัม สามารถทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์

ของแบคทีเรีย และทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองได้ (World Health Organization, 2018)

การปนเปื้อนของสารพิษอะฟลาทอกซิน พบได้ในผลผลิตทางการเกษตรในอาหารจำพวกแป้ง และผลิตภัณฑ์จากแป้ง เช่น ข้าวโพด ข้าว หรือ ผลิตภัณฑ์จากวัตถุดิบประเภทถั่ว เช่น ถั่วลิสงบด ถั่วลิสงคั่ว หรืออาหารเนยที่ผสมถั่วลิสง นอกจากนี้ยังพบในพริกแห้ง มะพร้าวแห้ง สาเหตุเกิดจากการขาดการดูแลในระยะก่อนการเก็บเกี่ยว รวมไปถึงการจัดการในระยะหลังการเก็บเกี่ยว เชื้อรา *A. flavus* สามารถเจริญเติบโต ในเมล็ดธัญพืชเมื่อมีสภาพความชื้นที่มากกว่า 15% ในระหว่างการเก็บรักษา โดยเชื้อราใช้ประโยชน์จากธาตุคาร์บอนในรูปของน้ำตาล ไนโตรเจนในรูปของกรดอะมิโน รวมไปถึงกรดไขมันในพืช เชื้อรา *A. flavus* สามารถสร้างสารอะฟลาทอกซินได้จากสารอาหารตั้งต้นที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถของเชื้อราในการผันแปรของกระบวนการเมตาบอลิซึม มีผู้วิจัยเพื่อติดตามการสร้างสารพิษของเชื้อรา *A. flavus* โดยใช้เทคนิค multiplex PCR ที่มี primer ver; aflR และ omt (Kim et al., 2011) ผลการตอบสนองปฏิกิริยาดังกล่าวยังไม่ได้ผลเมื่อนำไปใช้ตรวจสอบการสร้างสารอะฟลาทอกซินกับประชากรเชื้อรา *Aspergillus* spp. ต่างกลุ่ม นอกจากนี้ยังมีผู้สนใจศึกษาการจำแนกกลุ่มเชื้อรา *A. flavus* ที่สร้างสารพิษ โดยเปรียบเทียบศักยภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆเพื่อใช้ในการแยกกลุ่มเชื้อรา *A. flavus* ที่สร้างสารพิษ (พิสุทธิ และคณะ, 2558 ; สรรเสริญ และคณะ, 2561 ; สรรเสริญ และคณะ, 2562) การศึกษาเพื่อหาแนวทางสำหรับตรวจติดตามความแตกต่างของกระบวนการผลิตอะฟลาทอกซิน เป็นกระบวนการที่สำคัญ เพื่อให้ทราบถึงปัจจัยที่ส่งเสริมการสร้างสารพิษจากเชื้อรา

ในปัจจุบันการตรวจสอบความแตกต่างของสารทุติยภูมิมีประสิทธิภาพมากขึ้น จากการใช้ gas chromatography mass spectrometry (GCMS)

เพื่อตรวจสอบชนิดของสารทุติยภูมิที่เชื้อรา *A. flavus* สร้างขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโต งานวิจัยนี้จึงได้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการสร้างสารทุติยภูมิของเชื้อรา *A. flavus* ที่สามารถสร้างสารพิษและไม่สามารถสร้างสารพิษ และเปรียบเทียบความแตกต่างของสารทุติยภูมิดังกล่าว อันนำไปสู่การพัฒนาการติดตาม และตรวจสอบเชื้อที่สร้างสารพิษได้แม่นยำมากขึ้น

## วิธีการศึกษา

### การคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus flavus* จากตัวอย่างเมล็ดข้าวโพด

ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราบนเมล็ดข้าวโพดจากจังหวัดกาญจนบุรี และนครปฐม โดยวิธี blotter test (Neergaard, 1977) บ่มจานเพาะเมล็ดที่อุณหภูมิ  $27 \pm 2$  องศาเซลเซียส ภายใต้แสง near UV และ cool white fluoresce 12-16 ชั่วโมง นาน 5 วัน คัดเลือกเชื้อรา *A. flavus* โดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ โคลนนี้มีสีเขียวอมเหลือง ลักษณะของ conidial head และ sterigma ทำการรวบรวมเชื้อ *A. flavus* เพื่อตรวจสอบการสร้างสารพิษ โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ malt extract broth (MEB) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำสปอร์แขวนลอย (conidial suspension) ของเชื้อรา *A. flavus* ที่มีปริมาณโคโคนีเดีย  $10^6$  โคโคนีเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 40 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำน้ำเลี้ยงเชื้อบางส่วนไปตรวจสอบการสร้างสารพิษ ตามวิธีการตรวจของชุดตรวจสารพิษอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin ELISA Test Kit) จากบริษัท สยามอินเตอร์ควอลิตี้ จำกัด

### การระบุชนิดของเชื้อรา *Aspergillus* spp.

การระบุชนิดของเชื้อรา *Aspergillus* spp. โดยใช้เทคนิคทางสัณฐานวิทยา ดัดแปลงมาจาก Raper and Fennell (1965) โดยเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร Czapek Dox Agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิควบคุม  $27 \pm 2$  องศาเซลเซียส ภายใต้แสง near UV และ cool white fluoresce 12 - 16 ชั่วโมง นาน 7 วัน บันทึกลักษณะของโคโคนี รูปปร่างของ conidial head รูปปร่างและ

ลักษณะของ vesicle ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ stereo ยี่ห้อ Olympus รุ่น SZ-PT และกล้องจุลทรรศน์แบบ compound ยี่ห้อ Olympus รุ่น CX31RTSF นำข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยา มาจัดจำแนกชนิดโดยเปรียบเทียบกับหนังสือ Genus *Aspergillus* ของ Raper and Fennell (1965)

การระบุชนิดของเชื้อรา *Aspergillus* spp. โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเชื้อราด้วยชุด Plant Genomic DNA Kit (TIANGEN®) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ นำดีเอ็นเอของเชื้อราที่ได้ทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ด้วยไพรเมอร์ ITS1 (3'-TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG-5') และ ITS4 (3'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC--5') (White et al., 1990) โดยมีส่วนผสมประกอบดังนี้: ใช้ DNA template 1 ไมโครลิตร, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์, 10X Taq buffer 2.5 ไมโครลิตร, MgCl<sub>2</sub> 2.5 มิลลิโมลาร์, Taq DNA polymerase 1U ใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 0.2 ไมโครโมลาร์ และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม Tprofessional Basic Gradient 96 (Biometra®) กำหนดอุณหภูมิดังนี้: pre-denature อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที denature อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที annealing อุณหภูมิ 54 เวลา 30 วินาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 35 รอบ และ final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที ตรวจสอบ PCR product ที่ได้ ด้วย gel electrophoresis บน agarose gel 1.0 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.5X TBE ก่อนนำ PCR product ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI เพื่อระบุชนิดของเชื้อราดังกล่าว

### การสกัดสารทุติยภูมิจากเส้นใยของเชื้อรา *A. flavus*

เลี้ยงเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร Czapek Dox Broth บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิห้อง และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 40 รอบต่อนาที นาน 7 วัน กรองเส้นใยเชื้อราด้วยกระดาษกรอง Whatman® เบอร์ 1 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นหนึ่งชาม เชื้อหนึ่งครั้ง เมื่อเส้นใยแห้ง ชั่งน้ำหนักของเส้นใยเชื้อรา ปริมาณ 1.0 กรัม นำไป

สกัดสารทุติยภูมิที่เชื้อราสร้าง (fungal metabolite) โดยแช่ในตัวทำละลาย methanol ที่มีอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หลังจากการแช่เย็นเป็นเวลา 5 นาที พร้อมเขย่าด้วยเครื่อง vortex นำขวดตัวอย่างไปสกัดต่อด้วยเครื่อง sonicator (Cartivator<sup>®</sup>) แช่ในอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ย้ายสารส่วนใสเก็บไว้ในหลอด vial สีชา เพื่อป้องกันการเสียดสีของสารที่เชื้อราสร้างขึ้น แล้วไปทำให้เกิดสารอนุพันธ์ (derivatize) กับสารที่เชื้อราสร้างขึ้น และแยกวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารในสภาวะก๊าซรวมทั้งวิเคราะห์มวลสารด้วยเครื่อง GCMS

### การทำให้เกิดสารอนุพันธ์ และการตรวจวิเคราะห์สารองค์ประกอบ

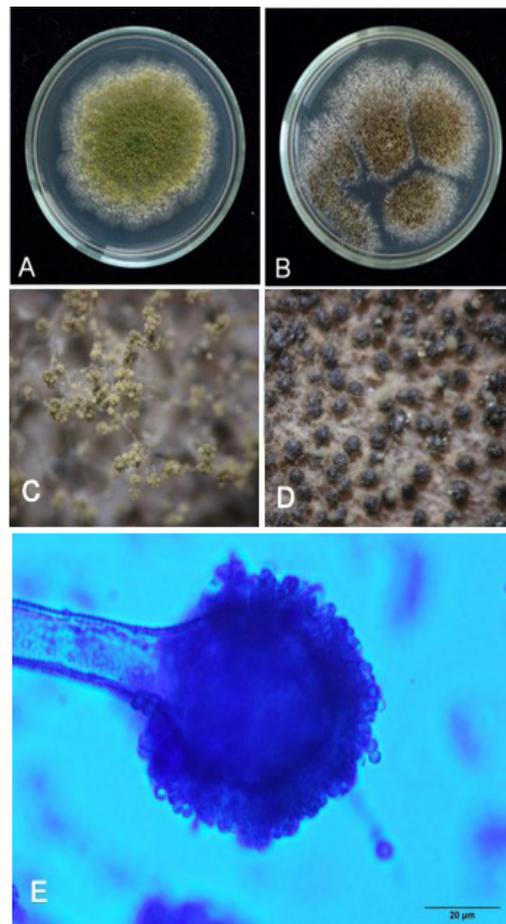
ตามวิธีการของ Madla et al. (2012) เติมสารเคมี O-methylhydroxylamine hydrochloride (Merck) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 120 นาที เขย่าขวดทดลองทุก 5 - 10 นาที นำสารตัวอย่างทดสอบไประเหยแห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน เติมสารเคมี N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (Merck) และสาร pyridine (Fluka) ปริมาตร 100 และ 50 ไมโครลิตร ตามลำดับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที นำตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการดังกล่าว ไปฉีดเข้าเครื่อง GCMS ในส่วนของ GC (Agilent Technology รุ่น GC 7890B, USA) ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร (ตั้ง split ratio เท่ากับ 1: 25) โดยอุณหภูมิส่วนที่ฉีดสาร 280 องศาเซลเซียส ใช้คอลัมน์ชนิด HP 5 MS 30 เมตร x 0.25 มิลลิเมตร ก๊าซฮีเลียมไหลเข้าคอลัมน์ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์เป็นโปรแกรมเริ่มต้นที่ 80 องศาเซลเซียส คงไว้ 2 นาที

เพิ่มขึ้นอัตรา 8 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึงอุณหภูมิ 320 องศาเซลเซียส ให้คงไว้ 3 นาที ส่วนของ MS (Agilent Technology, รุ่น 7000D Triple Quad detector, USA) เป็น MS Quadrupole ที่ต่อกับ GC โดยตรง และอุณหภูมิของ ion source เป็น 250 องศาเซลเซียส ในระบบ electron ionization (EI) ตั้งค่า electron energy 70 eV ตรวจผลการแยกองค์ประกอบเป็น total ion chromatogram (TIC) ในระบบ scan mode ใช้ช่วงของ Mass 40 ถึง 550 AMU (Atomic Mass Unit) ประมวลผลด้วย Agilent MassHunter Unknowns Analysis

### ผลการศึกษาและวิจารณ์

#### การจำแนกเชื้อรา *Aspergillus flavus*

เชื้อรา *A. flavus* ที่ใช้ในการศึกษาได้มาจากการแยกจากตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดในจังหวัดนครปฐม โดย *A. flavus* ไอโซเลท 8 พบการสร้างโคโคนีมีสีเขียวยืด มีการสร้างโคโคนีเดี่ยวปกคลุมผิวหน้าจำนวนมาก (Figure 1A) ส่วน *A. flavus* ไอโซเลท 17 สร้างโคโคนีสีขาว เส้นใยเรียบ พบโคโคนีเดี่ยวบริเวณผิวหน้าบางส่วน นอกจากนี้พบการสร้างเม็ด sclerotium ปริมาณมาก (Figure 1B) เมื่อนำไปตรวจลักษณะด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด compound ทั้ง 2 ไอโซเลท พบการสร้าง vesicle มีรูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม และ sterigma ที่พบมีทั้งแบบชั้นเดียว (uniseriate) และสองชั้น (biseriate) แต่ส่วนใหญ่จะพบแบบชั้นเดียว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Raper and Fennell (1965)



**Figure 1** Morphological characteristics of *Aspergillus flavus* (A-B), Colony patterns on Czapek's Dox agar after 7 days of incubation under near UV and cool white fluoresce for 12 - 16 hr at  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . (A) isolate 8 and (B) isolate 17 (C) conidial heads globose to radiate with yellow green or olive-brown and (D) sclerotia produced by isolate 17 (E) conidial head of *A. flavus*

สำหรับลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* ไอโซเลท 17 พบการสร้างเม็ด sclerotium ที่มีขนาดเล็กกว่า 400 ไมโครเมตรจำนวนมาก (Figure 1D) จัดอยู่ในกลุ่ม S-strain หรือ *A. flavus* (Group IA) พบการสร้างโคนิเดีย จำนวนน้อย เมื่อเทียบกับลักษณะโคโลนีของรา *Aspergillus* spp. สายพันธุ์ที่ไม่สร้างเม็ด sclerotium (Cotty, 1997; Frisvad et al., 2019)

จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 พบว่าเชื้อรา *A. flavus* ไอโซเลท 8 และ *A. flavus* ไอโซเลท 17 เมื่อเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) เข้าถึงข้อมูลเมื่อวันที่ 27 พฤศจิกายน พ.ศ. 2562 พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *A. flavus* isolate G18 ในบริเวณ internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence ทั้งนี้เชื้อรา *A. flavus* ทั้งสองไอโซเลทมีความใกล้เคียงกัน และจากการยืนยันการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในสภาพการเลี้ยงบนอาหารเหลว โดยใช้ชุดตรวจสอบสารพิษอะฟลาทอกซิน พบว่าเชื้อรา *A. flavus* ไอโซเลท 17 สามารถสร้างสารพิษปริมาณมากถึง 120 ppb ในขณะที่เชื้อรา *A. flavus* ไอโซเลท 8 สร้างสารพิษปริมาณเพียง 0.2 ppb

**การวิเคราะห์และจำแนกสารทุติยภูมิจากเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus flavus* ด้วย GCMS**

การวิเคราะห์สารทุติยภูมิที่สกัดได้จากเส้นใยของเชื้อรา *A. flavus* ไอโซเลท 8 ที่ไม่สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน และ *A. flavus* ไอโซเลท 17 ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน โดยใช้ GCMS ทำการรวบรวมข้อมูลของสารทุติยภูมิที่ได้จากการเปรียบเทียบการแตกตัวของสาร และมวลของสารโดยใช้โปรแกรม NIST

สารทุติยภูมิที่สกัดได้จากเส้นใยเชื้อรา *A. flavus* เมื่อนำไปตรวจสอบชนิดของสารประกอบด้วย GCMS ผลดังแสดงไว้ใน Figure 2 (upper) จากเชื้อรา *A. flavus* isolate 8 ที่ไม่พบการสร้างสารพิษ และ Figure 2 (lower) เชื้อรา *A. flavus* isolate 17 ที่สร้างสารพิษ โดยข้อมูลชนิดของสารประกอบที่ตรวจพบได้แสดงใน Table 1 สารประกอบที่พบในเชื้อรา *A. flavus* ทั้งสองไอโซเลทมีความใกล้เคียงกัน ได้แก่ Glycerol, Tromethamine, Dodecanoic acid, Kojic acid, Myristic acid, d-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)- o-methyloxyme, D-Mannitol, Palmitic Acid, 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, 11-Octadecenoic acid, (Z)-, Stearic acid แต่พบความแตกต่างของสารที่วิเคราะห์ได้ที่เวลา 25.3407 นาที พบสาร 9-Octadecenoic acid, (E)- ซึ่งพบเฉพาะในเชื้อรา *A. flavus* ไอโซเลท 17 ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินเท่านั้น ในขณะที่เวลา 25.3486 นาที ตรวจพบสาร 2-Methyloctadeca-7,8-diol bis (trifluoroacetate) ในเชื้อรา *A. flavus* ไอโซเลท 8 ที่ไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน

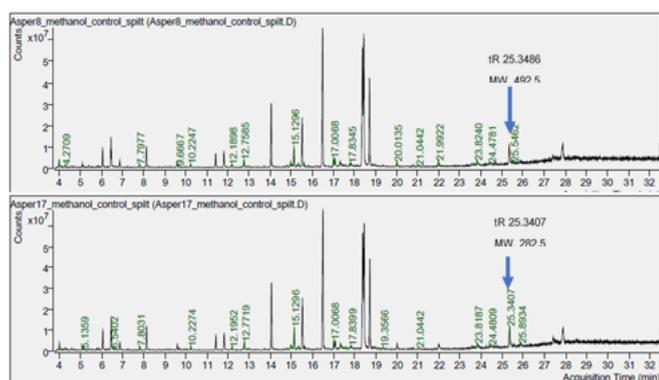


Figure 2 Comparison of total ion count (TIC) from fungal extract, atoxigenic *Aspergillus flavus* isolate 8 (upper) and toxigenic *A. flavus* isolate 17 (lower), arrow is to indicate the position of different substances.

Table 1 Assessment of fungal metabolites compounds from the GCMS profile produced by atoxigenic *Aspergillus flavus* isolate 8 and toxigenic *A. flavus* isolate 17

Retention time	Compounds	<i>A. flavus</i>	
		isolate 8 atoxigenic strain	isolate 17 toxigenic strain
6.049	Glycerol, 3TMS derivative	✓	✓
8.1315	Tromethamine, 3TMS derivative	✓	✓
11.4155	Dodecanoic acid, TMS derivative	✓	✓
11.808	Kojic acid, 2TMS derivative	✓	✓
14.0502	Myristic acid, TMS derivative	✓	✓
15.1296	d-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(trimethylsilyl)-, o-methyloxyme, (1Z)-	✓	✓
15.5195	D-Mannitol, 6TMS derivative	✓	✓
16.4941	Palmitic Acid, TMS derivative	✓	✓
18.3766	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, TMS derivative	✓	✓
18.4514	11-Octadecenoic acid, (Z)-, TMS derivative	✓	✓
18.7184	Stearic acid, TMS derivative	✓	✓
25.3407	9-Octadecenoic acid, (E)-	-	✓
25.3486	2-Methyloctadeca-7,8-diol bis(trifluoroacetate)	✓	-

สารทุติยภูมิที่ตรวจพบจำนวนมากในเชื้อรา *A. flavus* ทั้งสองไอโซเลท มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายตัวของกลูโคส และการสร้างพลังงานของสิ่งมีชีวิต ไปจนถึงวัฏจักร Tricarboxylic acid สารอาหารประเภท แป้ง โปรตีน ไขมัน และธาตุอาหาร มีผลต่อการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซิน รายงานก่อนหน้าของ Zubair et al. (2011) ที่ทดสอบการสร้างสารพิษในเชื้อรา *A. flavus* จากแหล่งต่างๆ ในสภาพที่มีกรดไขมัน พบว่ากรดไขมันชนิด linoleic acid และ oleic acid มีผลในการกระตุ้นการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ในขณะที่กรดไขมันชนิด linolenic acid, palmitic acid และ stearic acid ทำให้เชื้อสร้างสารพิษที่ลดน้อยลง 5 – 10 เท่า เช่นเดียวกับ Beyhan et al. (2011) ที่ยืนยันว่ากรด oleic acid มีผลต่อการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน จากผลการทดลองใน Table 1 ที่ตรวจพบ สาร 9-Octadecenoic acid, (E)-หรือเรียกว่าสาร oleic acid ในตัวอย่างที่สกัดจากเส้นใยของเชื้อรา *A. flavus* ไอโซเลท 17 ที่สร้างสารพิษเท่านั้น เป็นการยืนยันว่า เชื้อรา *A. flavus* มีการใช้ oleic acid ในการสร้างสารพิษ นอกจากนี้ Emara (1997) รายงานพบว่าการศึกษาระบวนการสังเคราะห์อะฟลาทอกซิน ของ *A. parasiticus* มีกรดไขมันชนิด oleic acid ที่มีส่วนช่วยสนับสนุนการสร้างสารพิษของเชื้อราได้ โดยกระบวนการผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินนั้นมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยสลายกลูโคส และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร pyruvate ใน TCA cycle (Falade et al., 2018) จากการทดลองนี้จะพบว่ามีสารในกลุ่มกรดไขมันที่ระบุไว้ใน Table 1 มีรายงานความเกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์อะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* Tiwari et al., (1986) ได้ยืนยันถึงผลของกรดไขมันชนิด linoleic acid, behenic acid และ sebacic acid ที่ทำให้เชื้อรา *A. parasiticus* สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้เพิ่มขึ้น ส่วนกรดไขมันชนิด lauric acid และ palmitic acid มีผลลดการสร้างสารพิษ และอาจมีผลต่อเนื่องไปถึงชนิดของกรดไขมันที่สะสมอยู่ในอัญพิช กรดไขมันบางชนิดนั้นจะมีส่วนกระตุ้นให้เชื้อรา *A. flavus* สร้างสารพิษอะฟลาทอกซินให้เพิ่มขึ้นได้ในพืช

## สรุป

เชื้อรา *A. flavus* ที่จัดอยู่ในกลุ่ม S strain มีความแตกต่างจาก *A. flavus* ที่ปกติ โดยพบว่าเชื้อรา *A. flavus* กลุ่ม S strain นั้นมีการสร้างเม็ด sclerotium ขนาดเล็กปกคลุมผิวหน้าอาหาร และพบการสร้างโคนินเดียน้อย สามารถตรวจพบสารพิษอะฟลาทอกซินสำหรับความแตกต่างของสารสกัดทุติยภูมิจากเส้นใยของเชื้อรา พบว่า สาร 9-Octadecenoic acid, (E)-เป็นสารที่พบเฉพาะในเชื้อรา *A. flavus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน ซึ่งยืนยันความเกี่ยวข้องของกรดไขมันระเหยชนิดนี้ต่อกระบวนการสังเคราะห์สารพิษ

## คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัย และนวัตกรรม กรุงเทพมหานคร

## เอกสารอ้างอิง

- พิสุทธิ เขียวมณี, ชัยณรงค์ รัตนกริชากุล, และรณภพ บรรเจิดเชิดชู. 2558. ประสิทธิภาพของอาหารสูตรดัดแปลงเพื่อตรวจสอบเชื้อราที่สร้างสารพิษปนเปื้อนบนเมล็ดข้าว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 46(พิเศษ): 105-108.
- สรรรเสริญ รังสุวรรณ, ชัยณรงค์ รัตนกริชากุล, และรัตติยา พงศ์พิสุทธิธา. 2562. การประเมินวิธีการตรวจสอบ *Apergillus flavus* ที่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน. วิทยาศาสตร์เกษตร. 50(พิเศษ): 191-194.
- สรรรเสริญ รังสุวรรณ, พิสุทธิ เขียวมณี, ชัยณรงค์ รัตนกริชากุล, และรัตติยา พงศ์พิสุทธิธา. 2561. ศักยภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อราเพื่อตรวจสอบเชื้อราปนเปื้อนในเมล็ดข้าวโพด. วิทยาศาสตร์เกษตร. 49(พิเศษ): 159-162.
- Al-Wadai, A.S., M.R. Al-Othman, M.A. Mahmoud, and A.R.M. Abd El-Aziz. 2013. Mo-

- lecular characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination of wheat grains from Saudi Arabia. *Genet. Mol. Res.* 12: 3335-3352.
- Beyhan, O., N. Yilmaz, S. Bulut, M. Aktas, and E. Ozsoy. 2011. Influence of storage on the aflatoxin and fatty acid composition in Turkish hazelnut (*Coryllus avellana*) varieties. *Int. J. Agric. Biol.* 13: 741–745.
- Chang, P.K., B.W. Horn, and J.W. Dorner. 2005. Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Fungal Genet. Biol.* 42: 914–923.
- Cotty, P. J. 1997. Aflatoxin-producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. *Mycol. Res.* 101: 698–704.
- Emara, H. A. 1997. Production of aflatoxin by *Aspergillus parasiticus* and its control. *Mycotoxin Res.* 13: 51.
- Falade, T.D.O., P.K. Chrysanthopoulos, M.P. Hodson, Y. Sultanbawa, M. Fletcher, R. Darnell, S. Korie, and G. Fox. 2018. Metabolites identified during varied doses of *Aspergillus* species in *Zea mays* grains, and their correlation with aflatoxin levels. *Toxins.* 10: 187.
- Frisvad, J.C, V. Hubka, C.N. Ezekiel, S.-B. Hong, A. Nováková, A.J. Chen, M. Arzanlou, T.O. Larsen, F. Sklenár, W. Mahakamchanakul, R.A. Samson, and J. Houbraken. 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Stud. Mycol.* 93: 1-63.
- Hedayati, M.T., A.C. Pasqualotto, P.A. Warn, P. Bowyer, and D.W. Denning. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology.* 153: 1677–1692.
- International Agency for Research on Cancer. 2002. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 82: 1–556.
- Kim, D.M., S.H. Chung, and H.S. Chun. 2011. Multiplex PCR assay for the detection of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic fungi in meju, a Korean fermented soy-bean food starter. *Int. J. Food. Microbiol.* 28: 1402-1408.
- Madla, S., D. Miura, and H. Wariishi. 2012. Optimization of extraction method for GC-MS based metabolomics for Filamentous fungi. *Microbial Biochem. Technol.* 4: 005-009.
- Neergaard, P. 1977. Seed Pathology. The Macmillian Press Ltd., London, Great Britain.
- Raper, K.B., and D.I. Fennell. 1965. The Genus *Aspergillus*. The William & Wilkins Company: Baltimore.
- Tiwari, R.P., V. Mittal, G. Singh, T.C. Bhalla, S.S. Saini, and D.V. Vadehra. 1986. Effect of fatty acids on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Folia Microbiol.* 31: 120–123.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal RNA gene for phylogenetics. P. 315-322. In: M.A. Innis, D.H. Gelfend, J.J. Sninsky, and T.J. White. PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego.

- World Health Organization. 2018. Aflatoxins. Food safety digest REF. No.: WHO/NHM/FOS/RAM/18.1. Available: [https://www.who.int/foodsafety/FSDigest\\_Aflatoxins\\_EN.pdf](https://www.who.int/foodsafety/FSDigest_Aflatoxins_EN.pdf). Accessed Oct. 1, 2019.
- Zubair, A., Z. Ud-Din, Saleemullah, S.A. Khan, H.U. Shah, B.A. Khan, and E. Ali. 2011. Fatty acid profile and aflatoxin contamination of walnuts (*Juglans regia*). ARPN J. Agric. Biol. Sci. 6: 1-8.