การปนเปื้อนราสกุล *Aspergillus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอในเมล็ดข้าวไทย

นางสาวโนทัย กิตติกำแหง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

CONTAMINATION OF AFLATOXIN B1- AND OCHRATOXIN A- PRODUCING *Aspergillus* IN THAI RICE GRAINS

Miss Notai Kittikamhaeng

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปนเปื้อนราสกุล *Aspergillus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอในเมล็ดข้าวไทย
โดย	นางสาวโนทัย กิตติกำแหง
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

……... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ)

…… กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

…… กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)

…… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. ปารมี หนูนิ่ม)

โนทัย กิตติกำแหง : การปนเปื้อนราสกุล *Aspergillus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอในเมล็ดข้าวไทย (CONTAMINATION OF AFLATOXIN B1- AND OCHRATOXIN A- PRODUCING *Aspergillus* IN THAI RICE GRAINS) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ, 140 หน้า.

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ ในตัวอย่างเมล็ดข้าวไทย 3 ชนิด (ข้าวเปลือกจากนา ข้าวเปลือกและข้าวสารจากโรงสี) ที่เก็บจากภาคกลางของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2553 ใน 3 ฤดูเก็บเกี่ยวที่แตกต่างกัน (เดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม) และเพื่อศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและปริมาณน้ำอิสระ (water activity, A_w) ต่อการเจริญและการผลิตสารอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอของราดังกล่าว พบว่า 272 ไอโซเลต ของ *Aspergillus* ถูกคัดแยกจากตัวอย่างเมล็ดข้าวทั้งหมด ซึ่งประกอบด้วย ราเขียวอมเหลือง (*Aspergillus* section *Flavi*) 197 ไอโซเลต และราดำ (*Aspergillus* section *Nigri*) 75 ไอโซเลต และพบ *Aspergillus* สูงในตัวอย่างข้าวเปลือกจากโรงสีของทุกฤดูกาลเก็บเกี่ยว โดยพบราเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าวเปลือกจากโรงสีในเดือนตุลาคมมากที่สุด และพบราดำมากที่สุดในตัวอย่างข้าวเปลือกจากโรงสีของเดือนกุมภาพันธ์ สำหรับการผลิตสารพิษจากรา ตัวแทนของรา section *Flavi* 82 ไอโซเลต และตัวแทนของรา section *Nigri* 65 ไอโซเลต ถูกคัดเลือกสำหรับทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ ตามลำดับ พบว่า 10.98 เปอร์เซ็นต์ของไอโซเลตที่คัดเลือกจาก section *Flavi* ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ และ 30.77 เปอร์เซ็นต์ของไอโซเลตที่คัดเลือกจาก section *Nigri* ผลิตโอคราทอกซินเอได้ เมื่อนำตัวแทนของรา section *Flavi* ที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และ section *Nigri* ที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ มาพิสูจน์เอกลักษณ์ทางชีววิทยาระดับโมเลกุลโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S-ITS4 ของ rRNA พบว่า รา section *Flavi* มีเพียงรา 2 ชนิด เท่านั้น คือ *A. flavus* และ *A. tamarii* ซึ่ง *A. flavus* เป็นชนิดที่พบมากที่สุดและผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้มากที่สุด สำหรับ section *Nigri* พบรา 4 ชนิด คือ *A. aculeatus* ซึ่งเป็นราที่พบมากที่สุด, *A. niger*, *A. tubingensis* และ *A. carbonarius* ซึ่งเป็นราที่ผลิตโอคราทอกซินเอได้มากที่สุด สำหรับการศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอของราที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอได้มากที่สุดในอาหารแข็ง PDA และ rice medium พบว่า ทั้ง *A. flavus* และ *A. carbonarius* สามารถเจริญและผลิตสารพิษบนอาหารทั้งสองชนิดได้ที่ A_w 0.95 เท่านั้น การเจริญและการผลิตสารพิษจากราสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และลดลงตามอุณหภูมิที่ลดต่ำลง จากผลการทดลองทั้งหมดนี้ทำให้ทราบว่าข้าวเปลือกจากโรงสีเป็นแหล่งปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอระหว่างกระบวนการผลิตข้าว ดังนั้นการควบคุมปัจจัยสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และ A_w สามารถใช้เป็นแนวทางในการป้องกันและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของราเหล่านี้ในกระบวนการผลิตข้าวไทยได้

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2554 .....

5272387323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: AFLATOXIN B1 / OCHRATOXIN A / *Aspergillus* / RICE

NOTAI KITTIKAMHAENG : CONTAMINATION OF AFLATOXIN B1- AND OCHRATOXIN A- PRODUCING *Aspergillus* IN THAI RICE GRAINS.

ADVISOR : CHEEWANUN DACHOUPAKAN, Ph.D., 140 pp.

The aims of this study were to examine the contamination of *Aspergillus* species producing aflatoxin B_1 (AFB_1) and ochratoxin A (OTA) in 3 types of Thai rice grain samples (paddy rice from field, dried paddy rice and polished rice stored from mill) collected from the central of Thailand in 2010 at 3 different harvest seasons (February, July and October) and to study the combined effect of temperature and water activity (A_w) on their growth and AFB_1 and OTA productions. Two hundred seventy-two isolates of *Aspergillus* were isolated with 197 isolates of yellow-green *Aspergillus* (*Aspergillus* section *Flavi*) and 75 isolates of black *Aspergillus* (*Aspergillus* section *Nigri)*. The high occurrence of *Aspergillus* was found in dried paddy rice samples of all harvest seasons. The isolates of yellow-green *Aspergillus* were most abundant in dried paddy rice samples in October. Black aspergilli were most frequently isolated from dried paddy rice samples in February. For mycotoxin productions, 82 representative isolates of section *Flavi* and 65 representative isolates of section *Nigri* were selected for examination their AFB_1 and OTA productions respectively. The results showed that 10.98% of selected isolate of section *Flavi* produced AFB_1 and 33.77% of selected black *Aspergillus* isolates produced OTA. The highest incidence of mycotoxigenic *Aspergillus* was found in dried paddy rice samples. The maximum level of AFB_1 production was produced by yellow-green *Aspergillus* isolated from dried paddy rice samples in July. Black *Aspergillus* isolated from dried paddy rice samples in February showed the maximum amount of OTA. Representative isolates belonging to section *Flavi* and section *Nigri* with the potential to produce AFB_1 and OTA respectively were confirmed species identity by using the ITS1-5.8S-ITS4 region sequences of rRNA. There were only 2 species of section *Flavi* recovered, *A. flavus* as predominant species and main AFB_1 producer, and *A. tamarii*. For section *Nigri*, 4 species were found; *A. aculeatus* as predominant species, *A. niger*, *A. tubingensis* and *A. carbonarius* as main OTA producer. For the study of the combined effect of temperature and A_w on growth and AFB_1 and OTA productions by the main aflatoxigenic and ochatoxigenic *Aspergillus* on PDA culture and rice medium, the results showed that *A. flavus* and *A. carbonarius* can grow and produce mycotoxins on both medium only at A_w 0.95. The optimal growth and maximal mycotoxin production of both species were obtained at 30°C. Their growth and ability to produce mycotoxins decreased with reducing temperature. These results strongly indicate that dried paddy rice from mill could be the main source of aflatoxigenic and ochratoxigenic fungal contamination during rice production process. Controlling environmental factors as temperature and A_w could be applied for monitoring and preventing this contamination in Thai rice production.

Department : Microbiology Student's Signature .....

Field of Study : Industrial Microbiology Advisor's Signature .....

Academic Year : 2011

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งจาก อาจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ พร้อมทั้งเอาใจใส่ดูแลเป็นที่ปรึกษาในเรื่องต่างๆ ตลอดจนการอบรมสั่งสอนและเป็นกำลังใจที่ดียิ่งเสมอมา อีกทั้งยังกรุณาแก้ไขตรวจทานและปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณในความเมตตาของอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน, อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ และอาจารย์ ดร. ปารมี หนูนิ่ม ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ชาลีดา บรมพิชัยชาติกุล และคุณสุนันท์ รังศรีกาญจน์ส่อง ที่ให้ความสะดวกในการอนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับงานวิจัย ทำให้ผู้วิจัยสามารถทำการวิจัยได้โดยสะดวกเป็นอย่างดีตลอดมา

กราบขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา และนางสาวริณภา พุทธัง ที่ให้ความช่วยเหลือและข้อคิดเห็นต่างๆ ที่มีประโยชน์ต่องานวิจัย และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่น่ารักและสมาชิกห้องวิจัย 448 ทุกคน ที่มีส่วนในการช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาโดยตลอด ทำให้ผู้วิจัยรู้สึกประทับใจ และมีช่วงเวลาที่ดีตลอดเวลาที่ศึกษาอยู่ ณ ภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และน้องที่น่ารัก ที่คอยเป็นที่ปรึกษาอย่างดี คอยสนับสนุน ช่วยเหลือ เป็นแรงใจและให้กำลังใจมาโดยตลอดการทำงานวิจัย จนทำให้วิทยานิพนธ์ของผู้วิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้แต่โดยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฒ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 ปริทัศน์วรรณกรรม..... 6

3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 35

3.1 การสุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดข้าว..... 39

3.2 การคัดแยกและการจัดจำแนกราที่ผลิตสารพิษและหาปริมาณราทั้งหมดที่อยู่ในตัวอย่างเมล็ดข้าว..... 39

3.2.1 การคัดแยกราที่อยู่บนเมล็ดข้าว โดยใช้วิธี direct plating..... 39

3.2.2 การหาปริมาณราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวโดยวิธี Total plate count..... 39

3.2.3 การจัดจำแนกราที่คัดแยกได้ และคัดเลือกราที่คาดว่าน่าจะมีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ..... 40

3.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอของราที่คัดแยกได้..... 40

3.3.1 การผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของราเขียวอมเหลืองและโอคราทอกซินเอของราดำในสกุล *Aspergillus* บนอาหารเลี้ยงรา..... 40

3.3.2 การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษจากอาหารเลี้ยงรา..... 41

3.3.2.1 การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1..... 41

3.3.2.2 การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณโอคราทอกซินเอของราดำ..... 41

3.3.3 การเตรียมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ..... 42

3.3.3.1 การเตรียมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1..... 42

บทที่ หน้า

3.3.3.2 การเตรียมสารมาตรฐานโอคราทอกซินเอ..... 42
3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของราเขียวอมเหลืองที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และราดำที่ผลิตโอคราทอกซินเอ..... 43
3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอของราที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ 43
3.4.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)..... 44
3.4.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส..... 45
3.4.4 การทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์..... 45
3.4.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา..... 46
3.5 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา..... 46
3.5.1 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราบนอาหารแข็ง PDA..... 46
3.5.1.1 การเตรียมอาหารแข็ง PDA..... 46
3.5.1.2 การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอจากอาหารแข็ง PDA ที่มี A_w ตามที่ต้องการ... 46
3.5.2 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการผลิตสารพิษจากราบน rice medium..... 47
3.5.2.1 การเตรียม rice medium..... 47
3.5.2.1.1 การวิเคราะห์ความชื้นของข้าวเริ่มต้น (moisture content initial, M_{Ci})..... 47
3.5.2.1.2 การหาความสัมพันธ์ระหว่างความชื้น (moisture content, M_C) และ A_w..... 48
3.5.2.1.3 การปรับความชื้นของข้าว โดยการหาปริมาณน้ำที่ต้องเติมลงใน rice medium เพื่อให้ได้ A_w ตามที่ต้องการ..... 48

บทที่ หน้า

3.5.2.2 การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอจาก rice medium ที่มี A_w ตามที่ต้องการ..... 49

4 ผลการทดลอง..... 51

4.1 ตัวอย่างเมล็ดข้าว..... 51

4.2 การคัดแยกราที่คาดว่าผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ และหาปริมาณราทั้งหมดที่อยู่ในตัวอย่างเมล็ดข้าว..... 53

4.2.1 การคัดแยกราที่อยู่บนเมล็ดข้าว โดยใช้วิธี direct plating..... 53

4.2.2 การหาปริมาณราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวโดยวิธี Total plate count..... 57

4.2.3 การจัดจำแนกราที่คัดแยกได้ และการคัดเลือกราที่คาดว่าน่าจะมีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ..... 58

4.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอของราที่คัดแยกได้..... 60

4.3.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของราเขียวอมเหลืองที่คัดแยกได้..... 60

4.3.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอของราดำที่คัดแยกได้..... 61

4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของราเขียวอมเหลืองที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และราดำที่ผลิตโอคราทอกซินเอ..... 63

4.4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเขียวอมเหลืองที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1..... 65

4.4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของราดำที่ผลิตโอคราทอกซินเอ..... 65

4.5 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา *A. flavus* M3T8R4G3 และ *A. carbonarius* F3T10R4B1..... 68

4.5.1 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 บนอาหารแข็ง PDA ของ *A. flavus* M3T8R4G3..... 68

บทที่ หน้า

4.5.2 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิต
โอคราทอกซินเอบนอาหารแข็ง PDA ของ *A. carbonarius* F3T10R4B1 70
4.5.3 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิต
อะฟลาทอกซินบี 1 บน rice medium ของ *A. flavus* M3T8R4G3..... 72
4.5.4 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิต
โอคราทอกซินเอบน rice medium ของ *A. carbonarius* F3T10R4B1.... 74
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 76
รายการอ้างอิง..... 82
ภาคผนวก..... 99
ภาคผนวก ก..... 100
ภาคผนวก ข..... 104
ภาคผนวก ค..... 108
ภาคผนวก ง..... 111
ภาคผนวก จ..... 134
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 140

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ประเทศผู้ผลิตข้าวสาร 10 อันดับ ทั่วโลก ในปี พ.ศ. 2553.....	12
2.2	ประเทศผู้ส่งออกข้าวสาร 10 อันดับ ทั่วโลก ในปี พ.ศ. 2553.....	13
2.3	มูลค่าการส่งออกข้าวสารในปี พ.ศ. 2543-2551.....	13
2.4	สารพิษจากราที่ปนเปื้อนในธัญพืช.....	16
2.5	ราในสกุล *Aspergillus* ที่สามารถผลิตสารพิษจากราได้.....	16
2.6	ข้อกำหนดปริมาณการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 สูงสุดในอาหารแต่ละชนิด	23
2.7	ข้อกำหนดปริมาณการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอสูงสุดในอาหารแต่ละชนิด.....	29
3.1	ค่าความชื้นของข้าวที่ได้จากกราฟพฤติกรรมการดูดและคายความชื้นของข้าว	48
4.1	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราเขียวอมเหลือง และราดำ ในตัวอย่างข้าว 3 ชนิด ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	57
4.2	จำนวนไอโซเลตทั้งหมด จำนวนไอโซเลตที่คัดเลือก จำนวนไอโซเลตที่ผลิตและปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของราเขียวอมเหลือง และโอคราทอกซินเอ ของราดำบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	60
4.3	การผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของราเขียวอมเหลืองบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ที่คัดแยกได้จากข้าวเปลือกจากนา, ข้าวเปลือกจากโรงสี และข้าวสารจากโรงสี ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์, กรกฎาคม และตุลาคม ปี 2553.....	61
4.4	การผลิตโอคราทอกซินเอของราดำบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ที่คัดแยกได้จากข้าวเปลือกจากนา, ข้าวเปลือกจากโรงสี และข้าวสารจากโรงสี ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์, กรกฎาคม และตุลาคม ปี 2553.....	62

ตารางที่ หน้า

4.5 ชนิดของราที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ผ่านการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rRNA เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn..... 66

4.6 ชนิดของราที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอที่ผ่านการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rRNA เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn..... 67

ง.1 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวเปลือกจากนา 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 111

ง.2 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวเปลือกจากโรงสี 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 112

ง.3 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวสารจากโรงสี 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 113

ง.4 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวเปลือกจากนา 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 114

ง.5 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวเปลือกจากโรงสี 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 115

ตารางที่ หน้า

ง.6 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวสารจากโรงสี 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 116

ง.7 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวเปลือกจากนา 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 117

ง.8 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวเปลือกจากโรงสี 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 118

ง.9 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวสารจากโรงสี 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 119

ง.10 จำนวนราทั้งหมดในข้าวเปลือกจากนา และข้าวเปลือกจากโรงสี ชนิดละ 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี Total plate count บนอาหารแข็ง PDA ผสมกรดทาร์ทาริก 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 120

ง.11 จำนวนราทั้งหมดในข้าวเปลือกจากนา และข้าวเปลือกจากโรงสีชนิดละ 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี Total plate count บนอาหารแข็ง PDA ผสมกรดทาร์ทาริก 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 121

ง.12 จำนวนราทั้งหมดในข้าวเปลือกจากโรงสี และข้าวเปลือกจากโรงสีชนิดละ 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี Total plate count บนอาหารแข็ง PDA ผสมกรดทาร์ทาริก 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 122

ตารางที่ หน้า

ง.13 การผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของราเขียวอมเหลืองบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 123

ง.14 การผลิตโอคราทอกซินเอของราดำบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 124

ง.15 ขนาดโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 126

ง.16 ปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ผลิตจาก *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 127

ง.17 ขนาดโคโลนีของ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 128

ง.18 ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอที่ผลิตจาก *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 129

ง.19 ขนาดโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบน rice medium โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 130

ง.20 ปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ผลิตจาก *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบน rice mediumโดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 131

ง.21 ขนาดโคโลนีของ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบน rice medium โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 132

ง.22 ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอที่ผลิตจาก *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบน rice medium โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 133

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินบี 1, บี 2, จี 1, จี 2, เอ็ม 1 และเอ็ม 2.....	18
2.2	โครงสร้างทางเคมีของโอคราทอกซินเอและเมแทบอไลต์ของโอคราทอกซินเอ.....	24
4.1	สถานที่ [ก], ลักษณะเมล็ดข้าวเปลือก [ข] และขนาดเมล็ดข้าว [ค] ที่สุ่มเก็บจากนาข้าว.....	51
4.2	สถานที่ [ก], ลักษณะเมล็ดข้าวเปลือก [ข] และขนาดเมล็ดข้าว [ค] ที่สุ่มเก็บจากกองข้าวที่ผ่านการอบแห้งจากโรงสี.....	52
4.3	สถานที่ [ก], ลักษณะเมล็ดข้าวสาร [ข] และขนาดเมล็ดข้าว [ค] ที่สุ่มเก็บจากกระสอบข้าวในโกดัง	53
4.4	คัดแยกราจากตัวอย่างข้าวเปลือกจากนา [ก], ข้าวเปลือกจากโรงสี [ข] และข้าวสารจากโรงสี [ค] โดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	54
4.5	จำนวนไอโซเลตราเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าว 3 ชนิด ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	55
4.6	จำนวนไอโซเลตราดำในตัวอย่างข้าว 3 ชนิด ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	55
4.7	จำนวนไอโซเลตราในสกุลอื่นๆ ในตัวอย่างข้าว 3 ชนิด ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	56
4.8	จำนวนราทั้งหมดในตัวอย่างข้าว 3 ชนิด ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 โดยวิธี Total plate count บนอาหารแข็ง PDA ผสมกรดทาร์ทาริก 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	58

ภาพที่ หน้า

4.9 ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราในสกุล *Aspergillus* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างข้าว, [ก] โคโลนีของราเขียวอมเหลืองบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน, [ข] โคโลนีของราดำบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน, [ค] เวสิเคิลของราเขียวอมเหลืองภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า, [ง] เวสิเคิลของราดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า, [จ] โคนิเดียของราเขียวอมเหลืองภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า และ [ฉ] โคนิเดียของราดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า..... 59

4.10 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเขียวอมเหลือง จำนวน 9 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้..... 63

4.11 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราดำ จำนวน 20 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้..... 64

4.12 ขนาดโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA ณ วันที่ 7 ของการบ่มโดยมีปริมาณอิสระ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 และบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส..... 68

4.13 การผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA โดยมี A_w 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 และบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 69

4.14 ขนาดโคโลนีของ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA ณ วันที่ 7 ของการบ่ม โดยมี A_w 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 และบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส..... 70

4.15 การผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA โดยมี A_w 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 และบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 71

ภาพที่ หน้า

4.16 ขนาดโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบน rice medium ณ วันที่ 7 ของการบ่ม โดยมี A_w 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 และบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส..... 72

4.17 การผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบน rice medium โดยมี A_w 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 และบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 73

4.18 ขนาดโคโลนีของ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบน rice medium ณ วันที่ 7 ของการบ่ม โดยมี A_w 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 และบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส..... 74

4.19 การผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบน rice medium โดยมี A_w 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 และบ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน..... 75

ก.1 กราฟพฤติกรรมการดูดและคายความชื้นของข้าว..... 102

ค.1 กราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1..... 108

ค.2 กราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ..... 108

ค.3 โครมาโทแกรมของอะฟลาทอกซนบี 1 ที่ retention time (RT) ประมาณ 7 นาที... 109

ค.4 โครมาโทแกรมของโอคราทอกซินเอ retention time (RT) ประมาณ 11 นาที..... 109

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าวเป็นอาหารหลักของประชากรกว่าครึ่งโลก และเป็นอาหารของคนเอเชียมาตั้งแต่โบราณ ซึ่งประเทศในทวีปเอเชียปลูกข้าวกว่า 91 เปอร์เซ็นต์ของข้าวทั้งหมดทั่วโลก (FAS, 2011) สำหรับประเทศไทย ข้าวนับได้ว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อประเทศ ในแต่ละปีผลผลิตข้าวที่ได้มีปริมาณมากพอสำหรับการส่งออกและเป็นสินค้าส่งออกอันดับ 1 ของประเทศ ในปี 2552 มูลค่าการส่งออกข้าวของไทยสูงกว่า 170,000 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) ข้าวจึงเป็นพืชเศรษฐกิจที่ต้องให้ความสำคัญและเอาใจใส่เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะเมล็ดข้าวที่ได้หลังจากการเก็บเกี่ยวจะต้องมีการดูแลไม่ให้เกิดความเสียหายในระหว่างการเก็บรักษา เนื่องจากเมล็ดข้าวหลังเก็บเกี่ยวยังคงมีการหายใจ ซึ่งออกซิเจน อุณหภูมิ ความชื้นในบรรยากาศที่เหมาะสมจะเร่งอัตราการหายใจของพืช ทำให้เกิดแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และพลังงานในรูปของความร้อน ทำให้จุลินทรีย์โดยเฉพาะราเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับฤดูกาลในการเก็บเกี่ยว ซึ่งถ้าเป็นช่วงฤดูฝนจะมีปริมาณความชื้นสูงจึงทำให้เกิดการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ได้ง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งรา (กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547) และถ้าลดปริมาณความชื้นลงแต่ยังไม่อยู่ในระดับที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาก็จะส่งผลให้เมล็ดข้าวมีการเข้าทำลายโดยราได้เช่นกัน (Reddy และคณะ, 2008)

สารพิษจากรา (Mycotoxins) เป็นสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) ถูกสร้างขึ้นโดยราที่เข้าทำลายและเจริญอยู่บนเมล็ดพืชหรือชิ้นส่วนของพืช และมีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ (บุญทรัพย์ สูงโคตร และสมนึก อรรคไกรสีห์, 2549) เช่น เป็นพิษต่อตับและไต พิษต่อเซลล์ พิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน พิษต่อระบบประสาท พิษต่อกล้ามเนื้อ และเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์ ก่อให้เกิดการเจ็บป่วยแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง และอาจไม่มีวิธีการรักษาที่ได้ผลดี สารพิษจากราปนเปื้อนในอาหารและผลิตผลทางการเกษตรสำหรับคนและสัตว์ เช่น ธัญพืช เครื่องเทศ ผลไม้ เครื่องดื่ม เนยแข็ง เนื้อสัตว์ รวมทั้งข้าว เป็นต้น (Petzinger และ Weidenbach, 2002) สารพิษจากราที่พบมากในข้าวที่สำคัญ ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี 1 (Aflatoxin B1) โอคราทอกซินเอ (Ochratoxin A) และฟูโมนิซินบี 1 (Fumonisin B1) (Reddy และคณะ, 2008) ซึ่งผลิตจากรา 3

สกุล คือ *Aspergillus* (Reddy และคณะ, 2008), *Penicillium* (Makun และคณะ, 2007) และ *Fusarium* (Abbas และคณะ, 1999) โดยเฉพาะราในสกุล *Aspergillus* เป็นราที่พบว่ามีการปนเปื้อนสูงในข้าวมากที่สุด และมีราหลายชนิดในสกุลนี้ที่สามารถสร้างสารพิษได้หลายชนิด (Park และคณะ, 2005)

อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารพิษจากรา ที่พบการปนเปื้อนในเมล็ดธัญพืชและพืชน้ำมันชนิดต่างๆ เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ถั่วลิสง มะพร้าว และข้าว เป็นต้น (Pittet, 1998) รวมทั้งในผลิตภัณฑ์แปรรูปแทบทุกชนิดที่ใช้วัตถุดิบจากผลิตผลทางการเกษตรที่ปนเปื้อนราอยู่ก่อนแล้ว อะฟลาทอกซินบี 1 มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับสุขภาพของมนุษย์และสัตว์โดยตรง ในปัจจุบันองค์การ International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้จัดอะฟลาทอกซินอยู่ในกลุ่ม 1 ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ถ้าสัตว์ที่ร่างกายอ่อนแอบริโภคสารพิษ 50-100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมอาหารจะเสียชีวิตเนื่องจากเป็นมะเร็งที่ตับ (IARC, 1993a) ทั้งยังมีผลต่อทารกในครรภ์ และภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Jaimez และคณะ, 2000) สารพิษนี้สร้างขึ้นโดยรา *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* และ *Aspergillus pseudotamarii* (Payne, 1998) จากการศึกษาของ Pitt และคณะ (1994) พบว่า *A. flavus* เป็นหนึ่งในราอีกหลายชนิดที่ปนเปื้อนในข้าวเปลือกในประเทศไทย เช่นเดียวกับข้าวสารจากตลาดในประเทศเกาหลีที่พบการปนเปื้อนราในสกุล *Aspergillus* โดยเฉพาะ *A. flavus* มากที่สุด (Park และคณะ, 2005) ในขณะที่ข้าวก่อนการเก็บเกี่ยว (28 ตัวอย่าง), ในระหว่างการเก็บรักษา (84 ตัวอย่าง) และจากตลาด (84 ตัวอย่าง) ในประเทศไนจีเรียมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 อยู่ในช่วง 0-464 (11 ตัวอย่าง), 0-1642 (47 ตัวอย่าง) และ 0-1169 (39 ตัวอย่าง) ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งราที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม *Aspergillus* sp. (Makun และคณะ, 2007) ส่วนข้าวเปลือกระหว่างการเก็บรักษาทั้ง 16 ตัวอย่างในประเทศจีน มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินเฉลี่ย 3.87 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Liu และคณะ, 2006) ข้าวสารจากตลาด 51 ตัวอย่าง ในประเทศเวียดนาม พบว่า 35 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 เฉลี่ย 3.31 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Nguyen และคณะ, 2007)

โอคราทอกซินเอเป็นสารพิษจากราที่พบการปนเปื้อนในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร รวมทั้งเครื่องดื่มหลากหลายชนิด เช่น ธัญพืช เมล็ดกาแฟ โกโก้ ถั่ว เครื่องเทศ ผลไม้แห้ง และไวน์ เป็นต้น (SCOOP European commission, 2002) ความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอส่งผลกระทบต่อทั้งมนุษย์และสัตว์ เช่น เป็นพิษต่อไต (Mantle และ McHuugh, 1993) เป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Petzinger และ Weidenbach, 2002) เกิดความบกพร่องในพัฒนาการของทารกในครรภ์ (Castegnaro และ Pfohl-Leszkowicz, 2002) และโอคราทอกซินเอ ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม 2 บี ซึ่งอาจจะเป็นสารก่อมะเร็งได้ (IARC, 1993b) สารพิษชนิดนี้ถูกสร้างขึ้นโดยรา 2 สกุล คือ *Aspergillus* (*Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* และ *Aspergillus ochraceus*) พบในเขตร้อน และ *Penicillium* (*Penicillium verrucosum* และ *Penicillium nordicum*) ซึ่งพบในเขตอบอุ่น (Mounjouenpou และคณะ, 2008) จากการศึกษาของ Chandra และ Sarbhoy (1997) พบว่าข้าวสารในประเทศอินเดียมีรา *A. niger* ที่ปริมาณสูง ส่วนข้าวสารจากตลาดในประเทศเกาหลี 8 ตัวอย่าง จาก 88 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอ อยู่ในช่วง 2.1-6.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ ส่วนใหญ่เป็นพวก *P. verrucosum* (Park และคณะ, 2005) ในขณะที่ข้าวสารจากตลาด 35 ตัวอย่างในประเทศเวียดนามพบว่า 20 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอเฉลี่ย 0.75 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Nguyen และคณะ, 2007) ในประเทศไนจีเรียพบว่าข้าวก่อนการเก็บ (28 ตัวอย่าง) ในระหว่างการเก็บรักษา (84 ตัวอย่าง) และจากตลาด (56 ตัวอย่าง) มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอ อยู่ในช่วง 0-624 (8 ตัวอย่าง) 0-1164 (40 ตัวอย่าง) และ 0-1164 (20 ตัวอย่าง) ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งราที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอ ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม *Penicillium* sp. (Makun และคณะ, 2007) และข้าวสารจากตลาดในประเทศโมร็อกโก 100 ตัวอย่าง พบว่า 26 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอที่ความเข้มข้นเฉลี่ย 3.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Juan และคณะ, 2008)

อุณหภูมิและ A_w เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา ราแต่ละชนิดสามารถเจริญและสร้างสารพิษได้ที่อุณหภูมิและ A_w ที่เหมาะสมแตกต่างกัน เช่น จากการศึกษาของ Ferna´ndez Pinto และคณะ (1991) พบว่า *A. parasiticus* ที่เจริญบนถั่วเหลืองที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ A_w เท่ากับ 0.95 สามารถเพิ่มการสังเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ได้ ส่วน *A. flavus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง YES (Yeast Extract Sucrose agar) สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ A_w เท่ากับ 0.99 และผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดีที่อุณหภูมิ 25

และ 30 องศาเซลเซียส และ A_w เท่ากับ 0.99 (Heydt และคณะ, 2009) ในขณะที่ *A. carbonarius* ที่เจริญบนองุ่นสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ A_w เท่ากับ 0.965 และผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และ A_w เท่ากับ 0.95-0.98 และ *A. niger* ที่เจริญบนองุ่นสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ A_w เท่ากับ 0.98 และผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และ A_w เท่ากับ 0.95 (Leong และคณะ, 2006)

ปัจจุบันหลายประเทศที่พัฒนาแล้วทั่วโลกได้ให้ความสำคัญอย่างมากกับสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร และได้มีข้อกำหนดของปริมาณสารพิษจากราในระดับสูงสุดที่สามารถยอมรับได้ในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร รวมทั้งอาหารและเครื่องดื่ม เช่น คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) กำหนดให้ระดับการปนเปื้อนสูงสุดของอะฟลาทอกซินบี 1 ในธัญพืช ถั่ว และผลไม้แห้ง ที่ 2, 5 และ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และโอคราทอกซินเอในธัญพืช, ผลไม้แห้ง, ไวน์ และกาแฟสด ที่ 5, 10, 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Regulation (EC) No. 1881/2006) ส่วนในประเทศไทยได้มีประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ข้อ 4(2) ระบุว่าให้พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และประกาศจากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2551 เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร เมล็ดกาแฟอะราบิก้า ข้อ 5 ระบุว่าให้พบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นการใช้มาตรการความปลอดภัยของสินค้าจึงมีความสำคัญ และเป็นมาตรการที่แต่ละประเทศนำมาใช้ในการควบคุมการนำเข้าและส่งออกสินค้าเพื่อให้สอดคล้องกับนโยบายความปลอดภัยด้านอาหาร (บุญทรัพย์ สูงโคตร และสมนึก อรรคไกรสีห์, 2549)

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าในปัจจุบันหลายประเทศมีข้อกำหนดเกี่ยวกับการปนเปื้อนสารพิษจากราในอาหาร และสินค้าเกษตรไว้อย่างชัดเจนและเข้มงวด รวมทั้งผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากข้าวไทยที่ส่งออกไปยังต่างประเทศประสบปัญหาเรื่องการปนเปื้อนสารพิษจากราเป็นอันดับสองรองจากปัญหาด้านสิ่งปลอมปน (ศุภรัตน์ โฆษิตเจริญกุล และคณะ, 2546) อีกทั้งประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อนชื้นที่มีอุณหภูมิและความชื้นเหมาะสมต่อการเจริญของราและการผลิตสารพิษจากราหลายชนิด ปัจจุบันงานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งเน้นศึกษาสารพิษในเมล็ดข้าว แต่การศึกษาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของราที่ผลิตสารพิษซึ่งเป็นสาเหตุการปนเปื้อนของสารพิษนั้น ยังไม่มีการศึกษาอย่างลึกซึ้ง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอในเมล็ดข้าวที่อยู่ในช่วงการเก็บเกี่ยว หลังการเก็บเกี่ยว และระหว่างการเก็บรักษาในช่วงฤดูกาลที่ต่างกันของปี รวมถึงศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราดังกล่าว

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

ความเป็นมาของข้าว

ข้าว (*Oryza sativa*) เป็นพืชล้มลุกใบเลี้ยงเดี่ยว อยู่ในวงศ์เกรมินี (Family Gramineae) จัดเป็นพืชสายพันธุ์เดียวกับหญ้า (เอี่ยม ทองดี, 2538) จากหลักฐานทางภูมิศาสตร์และโบราณคดี ทำให้สันนิษฐานได้ว่าข้าวน่าจะถือกำเนิดในประเทศอินเดีย จากนั้นได้แพร่กระจายไปทางตะวันออกถึงประเทศจีน ทางตะวันตกไปยังแอฟริกาและยุโรปตอนใต้ (Oka, 1987) จากหลักฐานการพบเปลือกข้าวในประเทศจีนอายุประมาณ 3,280 ปีก่อนคริสตกาล ทำให้เชื่อมั่นว่าประเทศจีนเป็นประเทศที่นำวัฒนธรรมและความรู้เกี่ยวกับการปลูกข้าวเข้ามาสู่ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงประเทศไทย (Chang, 1979)

ข้าว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ โดยอาศัยความรู้ด้านอนุกรมวิธาน (taxonomy) ได้แก่ 1) *Oryza glaberrima* ปลูกเฉพาะในแอฟริกาเท่านั้น (Linares, 2002) 2) ข้าวป่า (wild rice) ซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในประเทศต่างๆ ของทุกทวีปที่ปลูกข้าว และ 3) *Oryza sativa* หรือเรียกว่า ข้าวปลูกสายเอเชีย ซึ่งมีแหล่งกำเนิดและนิยมปลูกในทวีปเอเชีย พันธุ์ข้าวที่ปลูกในประเทศไทยจึงอยู่ในกลุ่มนี้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นชนิดอินดิคา (Indica) ที่มีเมล็ดยาวเรียว เจริญเติบโตได้ดีในบริเวณเขตร้อน (Vaughan และคณะ, 2008) คนไทยบริโภคข้าวเป็นอาหารหลักมาตั้งแต่อดีต การปลูกข้าวจึงเป็นวิถีในการดำรงชีวิตตลอดมา ทำให้ข้าวมีความผูกพันระหว่างมนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อมอย่างลึกซึ้ง จากเหตุผลดังกล่าวทำให้ข้าวเป็นพืชศักดิ์สิทธิ์ และก่อให้เกิดการประกอบพิธีกรรมต่างๆ เกี่ยวกับข้าวตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน (เอี่ยม ทองดี, 2538)

สภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการปลูกข้าว

สภาพแวดล้อมทางกายภาพ

สภาพแวดล้อมที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการปลูกข้าว คือ ภูมิอากาศ ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตข้าวทั้งทางตรงและทางอ้อม (บุญหงส์ จงคิด, 2547) เช่น ปริมาณน้ำฝนตลอดฤดูปลูกข้าวจะต้องไม่น้อยกว่า 1,200 มิลลิเมตร ความชื้นมีผลต่อการแพร่กระจายของโรคในช่วงที่อากาศร้อนและมีความชื้นสูง ทำให้เกิดการแพร่กระจายของราและแบคทีเรียบางชนิดได้อย่างรวดเร็ว (จำรัส โปร่งศิริวัฒนา, 2554) อุณหภูมิมีผลอย่างยิ่งต่อระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตเป็นอย่างมาก ซึ่งอุณหภูมิต่ำสามารถยืดอายุการสุกแก่ของเมล็ดข้าวเปลือกได้ ทำให้การสะสมแป้งของเมล็ดมากขึ้น แต่อุณหภูมิที่ต่ำหรือสูงเกินไปส่งผลเสียต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าว เช่น เกิดเมล็ดลีบและเป็นหมันในอัตราที่สูง (Satake และ Yoshida, 1977) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการปลูกข้าวในเขตร้อนอยู่ในช่วง 22-30 องศาเซลเซียส (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่, 2542) ความเข้มของแสงมีบทบาทสำคัญมากต่อการสังเคราะห์แสงของข้าว ความเข้มของแสงที่พืชสามารถนำไปสังเคราะห์แสงได้จะอยู่ในช่วง 380-720 นาโนเมตร นอกจากนี้ความเข้มของแสงมีอิทธิพลต่อการสุกแก่ของรวงข้าว ซึ่งในช่วงฤดูฝนจะมีปริมาณความเข้มแสงต่ำกว่าฤดูแล้ง ดังนั้นการปลูกข้าวในฤดูแล้งจึงให้ผลผลิตข้าวสูงกว่าในฤดูฝน ความยาวของวันมีผลต่อปริมาณพลังงานแสงที่ข้าวได้รับรวมต่อวัน ข้าวเป็นพืชวันสั้น และมีความไวต่อช่วงแสง ฉะนั้นช่วงแสงที่ยาวกว่า 12 ชั่วโมงในเวลากลางวัน ทำให้ข้าวที่ไวต่อช่วงแสงออกดอกช้าหรือไม่ออกดอก ซึ่งในปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์ข้าวไม่ให้มีความไวต่อช่วงแสง (ประพาส วีระแพทย์, 2517) นอกจากนี้ความเร็วลมที่มากกว่า 15 กิโลเมตรต่อชั่วโมง มีผลต่อการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วของโรคข้าวที่เกิดจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากรา (Hill และคณะ, 1985)

สภาพแวดล้อมทางชีวภาพ

สภาพแวดล้อมทางชีวภาพ ได้แก่ โรคข้าวและแมลงศัตรูข้าว ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการขัดขวางการเจริญเติบโตของต้นข้าวและส่งผลกระทบต่อผลผลิตข้าว โรคข้าวอาจมีสาเหตุเกิดจากสิ่งไม่มีชีวิต เช่น โรคขาดธาตุอาหาร โรคที่เกิดจากสภาวะแวดล้อมผิดปกติ และโรคข้าวที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต ได้แก่ รา แบคทีเรีย และไวรัส โรคที่เกิดจากรา เช่น โรคใบไหม้ (blast disease) เกิดจากรา *Pyricularia grisea* อาการคล้ายถูกไฟไหม้ที่ใบ (Wheeler และ Greenblatt, 1988) โรคใบจุดสี

น้ำตาล (brown spot disease) เกิดจากรา *Helminthosporium oryzae* มีจุดสีน้ำตาลกลมหรือรูปไข่ที่ใบหรือที่เปลือกเมล็ดข้าว และโรคกาบใบแห้ง (sheath blight disease) เกิดจากรา *Rhizoctonia solani* อาการกาบใบเหี่ยวแห้ง (Yu และคณะ, 2008) โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย เช่น โรคใบขีดโปร่งแสง (bacterial leaf Streak disease) เกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* อาการของโรคขั้นแรกเห็นเป็นขีดช้ำยาวไปตามเส้นใบ ต่อมาค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองหรือส้ม แสงสามารถทะลุผ่านแผลได้ และโรคขอบใบแห้ง (bacterial leaf blight disease dowson) เกิดจากแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* ใบและกาบใบเหี่ยวแห้ง (Lee และคณะ, 2011) โรคที่เกิดจากไวรัส เช่น โรคใบสีส้ม (yellow orange leaf disease) เกิดจากไวรัสโดยมีเพลี้ยจั๊กจั่นสีเขียวเป็นพาหะ อาการเริ่มต้นใบข้าวจะเริ่มมีสีเขียวสลับเหลือง ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เริ่มจากปลายใบเข้าหาโคนใบ ถ้ารุนแรงในระยะกล้า ต้นข้าวอาจตายได้ ต้นที่เป็นโรคจะเตี้ยแคระแกรน ช่วงลำต้นสั้นกว่าปกติมาก และโรคจู๋ (ragged stunt disease) เกิดจากไวรัสโดยมีเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นพาหะ ข้าวต้นเตี้ย ไม่สูงเท่าที่ควร ใบสีเขียวเข้ม แคบและสั้น ใบใหม่จะแตกช้ากว่าปกติ ปลายใบจะบิดเป็นเกลียวออกรวงช้า รวงไม่สมบูรณ์ และให้เมล็ดลีบเป็นส่วนใหญ่ (Panda และคณะ, 1984)

ส่วนแมลงศัตรูข้าวเป็นพาหะที่นำโรคข้าวที่เกิดจากจุลินทรีย์ต่างๆ ไปสู่ต้นข้าวทำให้ต้นข้าวเกิดโรค หรือเป็นตัวทำลายต้นข้าวโดยตรงด้วยการกัดกินทำลายต้นข้าวได้เช่นกัน แมลงศัตรูข้าวที่พบบ่อย เช่น เพลี้ยไฟ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยกระโดดหลังขาว เพลี้ยจักจั่นสีเขียว หนอนกอข้าว หนอนกระทู้กล้า หนอนกระทู้คอรวง และแมลงดำหนาม นอกจากโรคและแมลงศัตรูข้าวแล้ว สัตว์ศัตรูข้าว เช่น ปูนา หอยเชอร์รี่ หนู และนก เป็นอีกสาเหตุที่ก่อให้เกิดอุปสรรคต่อการเพาะปลูกข้าว ซึ่งสามารถป้องกันและกำจัดได้โดยใช้พันธุ์ข้าวที่ต้านทานต่อแมลงศัตรูข้าวนั้นๆ ใช้สารเคมี และใช้วิธีทางชีววิธี เป็นต้น (บุญหงส์ จงคิด, 2547)

กระบวนการผลิต และวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวข้าว

การเพาะปลูกข้าว

การปลูกข้าวของไทยแบ่งตามฤดูการปลูกข้าวออกเป็น 2 ประเภท คือ ข้าวนาปรัง (off-season rice) เป็นการปลูกข้าวนอกฤดูฝน โดยอาศัยน้ำจากชลประทานที่ได้จากเขื่อนต่างๆ และข้าวนาปี (rained rice) เป็นการปลูกข้าวในฤดูฝน ชาวนาใช้น้ำในฤดูฝนในการปลูกข้าว จึงทำการเพาะปลูกได้เพียง 1 ครั้งต่อปี (วัชระ ภูรีวิโรจน์กุล, 2539) ปัจจุบันชาวนาไทยมีวิธีการปลูกข้าวหลายแบบตามสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต โดยแบ่งออกเป็น 3 วิธี ดังนี้

- การปลูกข้าวไร่ หรือข้าวนาดอน คือ การปลูกข้าวบนที่ดอนในสภาพไร่ อาศัยน้ำฝนตามธรรมชาติในการเจริญเติบโต (งามชื่น คงเสรี, 2539)

- การปลูกข้าวนาดำ หรือเรียกว่า การปักดำ เหมาะกับพื้นที่นาชลประทานที่สามารถควบคุมน้ำได้ มีคันนาเพื่อกักน้ำ ต้องมีการเตรียมต้นกล้าก่อนที่จะย้ายไปปลูกในแปลงนาด้วยวิธีการปักดำ ซึ่งเป็นวิธีการปลูกข้าวที่ประณีต เพราะต้องคัดเลือกต้นกล้าที่แข็งแรงไม่เป็นโรคไปปักดำ ทำให้ได้ผลผลิตดี วิธีการปลูกข้าวแบบนี้จะต้องใช้แรงงานในการถอนกล้าและปักดำ จึงทำให้ต้นทุนการผลิตสูง (ประพาส วีระแพทย์, 2521)

- การปลูกข้าวนาหว่าน เป็นการปลูกข้าวโดยเอาเมล็ดพันธุ์หว่านลงไปในพื้นที่นาที่ได้ไถเตรียมดินไว้แล้ว การปลูกข้าวโดยวิธีหว่านนี้ใช้แรงงานน้อยกว่าการทำนาดำ ทำให้ค่าใช้จ่ายในการทำนาหว่านต่ำกว่าการทำนาดำ และสามารถเก็บเกี่ยวข้าวได้เร็วกว่าการทำนาดำ 7-10 วัน การทำนาหว่านก็มีข้อเสียคือมีปัญหาด้านวัชพืชมาก การควบคุมระดับน้ำในนาหว่านอาจทำได้ยากกว่าในนาดำ เพราะไม่มีคันนาย่อยสำหรับควบคุมระดับน้ำ และการงอกของข้าวอาจไม่สม่ำเสมอในกรณีที่เมล็ดพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์การงอกต่ำ จึงสิ้นเปลืองเมล็ดพันธุ์มากกว่าการทำนาดำ (จำรัส โปร่งศิริวัฒนา, 2534)

การเก็บเกี่ยวข้าว

เมล็ดข้าวจะสุกแก่พร้อมที่จะเก็บเกี่ยวได้ประมาณ 30 วันหลังการออกดอก หรืออาจสังเกตเมล็ดข้าวในรวงจะต้องสุกเหลืองประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และมีปลายใบธงแห้งประมาณครึ่งหนึ่งของใบ ซึ่งเรียกว่า ข้าวอยู่ในระยะพลับพลึง ในระยะนี้เมล็ดข้าวจะสุกแก่เต็มที่ ทำให้ได้เมล็ดที่แข็งแกร่ง น้ำหนักเมล็ดดี ขายได้ราคาสูง เนื่องจากเมื่อนำไปสีจะมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดข้าวหักต่ำ การเก็บเกี่ยวเร็วเกินไปทำให้ได้น้ำหนักของเมล็ดข้าวน้อย และเมื่อนำไปสีจะมีเปอร์เซ็นต์เมล็ดข้าวหักสูง แต่ถ้าเก็บเกี่ยวช้าเกินไปเมล็ดข้าวอาจร่วงหล่นจากรวงทำให้สูญเสียผลผลิต ดังนั้นก่อนการเก็บเกี่ยวควรระบายน้ำออกจากแปลงนาให้แห้งก่อนทำการเก็บเกี่ยวประมาณ 15 วัน เพื่อให้เมล็ดข้าวสุกแก่พร้อมกันทั้งรวง เมล็ดข้าวจะมีความชื้นต่ำและคุณภาพดี และสะดวกในการเก็บเกี่ยว (บุญหงส์ จงคิด, 2547; อรรควุฒิ ทัศน์สองชั้น และนพพร คล้ายพงษ์พันธุ์, 2547) ในอดีตการเก็บเกี่ยวข้าวจะใช้เคียวเกี่ยวทีละหลายๆ รวง เช่น ชาวนาในภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือปฏิบัติกันอยู่ หรือการใช้แกระเก็บเกี่ยวทีละรวงของชาวนาในภาคใต้ หลังจากการเก็บเกี่ยวข้าว จะทำการนวดข้าวให้เมล็ดข้าวหลุดออกจากรวงโดยใช้แรงงานคนหรือสัตว์ และทำความสะอาดเมล็ดข้าวเปลือกเพื่อแยกสิ่งแปลกปลอม เช่น ดิน ทราย หรือฟางข้าว ออกจากเมล็ดข้าวโดยการฝัดในกระด้งหรือการสาดข้าวโดยใช้พลั่ว (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่, 2542) ก่อนที่จะนำเมล็ดข้าวที่ผ่านการนวดและทำความสะอาดเก็บในยุ้งฉางหรือส่งโรงสีข้าวนั้น เมล็ดข้าวเปลือกควรมีความชื้นในเมล็ดไม่เกิน 14 เปอร์เซ็นต์ เพราะความชื้นของเมล็ดข้าวที่ระดับนี้จะช่วยป้องกันการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดข้าวในการงอก และช่วยลดความเสียหายเนื่องมาจากการเข้าทำลายของราหรือแมลงศัตรูในโรงเก็บได้ (Tanaka และคณะ, 2007) วิธีการลดความชื้นในเมล็ดข้าวเปลือกมี 2 วิธี คือ

1. วิธีธรรมชาติ ได้แก่ การใช้แสงอาทิตย์เป็นแหล่งความร้อน เป็นวิธีการที่นิยมใช้กันมากที่สุดเพราะประหยัด ไม่ยุ่งยาก และได้ผลดี แต่มีข้อเสียคือในฤดูฝนไม่สามารถใช้วิธีนี้ได้ ต้องใช้แรงงานและพื้นที่ตากมาก รวมทั้งไม่สามารถควบคุมคุณภาพของข้าวที่ต้องการลดความชื้นได้ และเกิดการสูญเสียสูงในขณะตากจากการทำลายของสัตว์ศัตรูข้าว (อรรควุฒิ ทัศน์สองชั้น และนพพร คล้ายพงษ์พันธุ์, 2547)

2. การใช้เครื่องอบ วิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถปฏิบัติได้ทุกสภาวะอากาศ ไม่ต้องมีลานตาก สามารถควบคุมการลดความชื้นให้อยู่ในระดับที่ต้องการ ใช้ระยะเวลาลดความชื้นไม่มาก แต่มีข้อเสีย คือ เสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง และมีข้อปฏิบัติยุ่งยากกว่าวิธีธรรมชาติ (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่, 2542)

หลังจากที่เมล็ดข้าวเปลือกมีความชื้นที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาแล้ว สถานที่ในการเก็บข้าวเปลือกเป็นสิ่งที่สำคัญ ลักษณะโรงเรือนหรือยุ้งฉางที่เหมาะสมคือป้องกันฝนได้ อากาศถ่ายเทได้สะดวกเพื่อระบายความชื้นและความร้อน และมีการป้องกันศัตรูข้าวหรือจุลินทรีย์โดยเฉพาะรา ไม่ให้เข้าทำลายข้าวเปลือกในโรงเก็บ (Correa และคณะ, 2007) การเก็บรักษาเมล็ดข้าวในระดับอุตสาหกรรมจะต้องอยู่ในสภาพที่สามารถควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศได้ ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถป้องกันและลดความเสียหายของเมล็ดข้าวได้ดี (Bullerman และ Bianchini, 2007)

ซึ่งวิธีการเก็บเกี่ยวข้าวดังที่กล่าว บางขั้นตอนในปัจจุบันไม่นิยมทำ เนื่องจากต้องใช้แรงงานคนจำนวนมาก ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงกว่าการใช้เครื่องจักรซึ่งสะดวกสบาย ชาวนาจึงหันมาใช้เครื่องจักรทุ่นแรง เช่น รถเกี่ยวนวดข้าว ทำให้ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวข้าว การนวดข้าว และการทำความสะอาดเมล็ดข้าวสามารถทำพร้อมกันได้ หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวเปลือกที่เก็บเกี่ยวได้ไปขายให้แก่โรงสีทันที โรงสีจะลดความชื้นในเมล็ดข้าวเปลือก โดยใช้วิธีธรรมชาติและใช้เครื่องอบ และทางโรงสีจะนำข้าวเปลือกไปขัดสีด้วยเครื่องสีข้าวเพื่อให้ได้ข้าวสาร (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่, 2542; บุญหงส์ จงคิด, 2547)

ข้าวกับเศรษฐกิจ

ข้าวเป็นอาหารหลักของมนุษย์ทั่วโลก ผลผลิตข้าวสารทั่วโลกมีประมาณ 46.1 ล้านตัน จาก 111 ประเทศ ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตข้าวอันดับที่ 6 ของโลก โดยในปี 2553 มีปริมาณการผลิตข้าวสาร 20.26 ตัน (FAS, 2011) (ตารางที่ 2.1) และมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวทั้งหมดประมาณ 73 ล้านไร่ ทำให้การปลูกข้าวเป็นอาชีพหลักของเกษตรกรไทย ในปี 2554 มีปริมาณผลผลิตข้าวรวม 2.2 ล้านตันข้าวสาร คิดเป็น 4.6 เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิตข้าวทั่วโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ประเทศไทยมีการบริโภคข้าวประมาณ 52 เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิตที่

ได้ ข้าวจึงเป็นอาหารหลักของคนไทย ปริมาณการบริโภคข้าวโดยเฉลี่ยประมาณคนละ 103 กิโลกรัมต่อปี หรือประมาณวันละ 300 กรัม (FAO, 2010) นอกจากนี้ข้าวยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สร้างรายได้ให้แก่ประเทศไทยจำนวนไม่น้อย เนื่องจากผลผลิตข้าวส่วนที่เหลือจากการบริโภคผลิตเพื่อการส่งออก ซึ่งประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกข้าวอันดับ 1 ของโลก ในปี 2553 โดยมีปริมาณการส่งออกสูงถึง 9,047 แสนตัน รองลงมาคือประเทศเวียดนาม และปากีสถาน มีปริมาณการส่ง 6,734 และ 4,000 แสนตัน ตามลำดับ (FAS, 2012) (ตารางที่ 2.2) ข้าวยังเป็นสินค้าส่งออกอันดับ 1 ของประเทศไทย มีมูลค่าการส่งออกเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ในปี 2551 มูลค่าการส่งออกข้าวสารของประเทศไทยสูงถึง 203,219 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553) (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.1 ประเทศผู้ผลิตข้าวสาร 10 อันดับ ทั่วโลก ในปี พ.ศ. 2553

ประเทศ	การผลิตข้าวสาร (ตัน)
จีน	137
อินเดีย	95.30
อินโดนีเซีย	35.50
บังคลาเทศ	33.20
เวียดนาม	26.30
ไทย	20.26
พม่า	10.75
ฟิลิปปินส์	10.54
บราซิล	9.26
ญี่ปุ่น	7.72

ที่มา: Foreign Agricultural Service (FAS), 2011

ตารางที่ 2.2 ประเทศผู้ส่งออกข้าวสาร 10 อันดับ ทั่วโลก ในปี พ.ศ. 2553

ประเทศ	ปริมาณการส่งออก (แสนตัน)
ไทย	9,047
เวียดนาม	6,734
ปากีสถาน	4,000
สหรัฐอเมริกา	3,856
อินเดีย	2,052
กัมพูชา	1,000
อุรุกวัย	808
จีน	619
อียิปต์	570
พม่า	445

ที่มา: Foreign Agricultural Service (FAS), 2012

ตารางที่ 2.3 มูลค่าการส่งออกข้าวสารในปี พ.ศ. 2543-2551

ปี	มูลค่า (ล้านบาท)
2543	65,516
2544	70,122
2545	70,064
2546	76,699
2547	108,328
2548	92,993
2549	98,179
2550	119,215
2551	203,219

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของ กรมศุลกากร ปี 2553

ปัญหาของข้าวไทยเพื่อการส่งออก

ปัจจุบันประเทศไทยยังประสบปัญหาในเรื่องโครงสร้างพื้นฐานที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตข้าว เช่น การเลือกพื้นที่ปลูกข้าว การเตรียมพื้นที่ปลูก การเลือกพันธุ์ข้าวและการเตรียมเมล็ดพันธุ์ การเลือกช่วงเวลาปลูก วิธีการปลูกข้าว การดูแลรักษาและการอารักขาข้าว การเก็บเกี่ยว และการเก็บรักษาข้าวหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งสาเหตุเหล่านี้ทำให้ผลผลิตข้าวมีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐานไม่เหมาะสมสำหรับการส่งออก และส่งผลต่อราคาข้าวตกต่ำ (บุญหงส์ จงคิด, 2547)

นอกจากนี้เรื่องความปลอดภัยของอาหารเป็นอีกหนึ่งปัญหาของข้าวไทยที่ส่งออกไปต่างประเทศ ปัจจุบันข้าวไทยที่ส่งออกไปยังต่างประเทศประสบปัญหาเรื่องการปนเปื้อนสารพิษจากราเป็นอันดับสองรองจากปัญหาด้านสิ่งปลอมปน (ศุภรัตน์ โฆษิตเจริญกุล และคณะ, 2546) จากเว็บไซด์ Japan times ประเทศญี่ปุ่น ในวันที่ 20 ธันวาคม 2552 รายงานว่า กระทรวงการเกษตรการป่าไม้และการประมงของญี่ปุ่นได้ประกาศว่า มีการตรวจพบอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวสารที่นำเข้าจากประเทศไทย ในเดือนตุลาคม 2552 ซึ่งมีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับความเข้มข้น 0.04 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งไม่เป็นไปตามกฎหมายความปลอดภัยของอาหารในประเทศญี่ปุ่นที่ได้กำหนดไว้ว่าจะต้องไม่พบอะฟลาทอกซินปนเปื้อนอยู่เลย (Japan times, 2009) นอกจากนี้ในปี 2554 สำนักงานส่งเสริมการค้าในต่างประเทศ ณ กรุงโคเปนเฮเกน ประเทศสวีเดน รายงานการตรวจพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าวกล้องหอมมะลิที่นำเข้าจากไทย พบว่าการปนเปื้อนของ อะฟลาทอกซินที่ความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งสูงกว่าระดับสูงสุดที่กำหนดไว้ (2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) (สำนักงานส่งเสริมการค้าในต่างประเทศ ณ กรุงโคเปนเฮเกน ประเทศสวีเดน, 2554) ดังนั้น การปนเปื้อนสารพิษจากราในข้าวไทยจึงเป็นปัญหาที่ต้องตระหนักถึงเป็นอย่างมาก เนื่องจากส่งผลกระทบต่อภาพลักษณ์และเศรษฐกิจของประเทศผู้ส่งออกข้าวอันดับหนึ่งของโลก

สารพิษจากรา (mycotoxins)

คำว่า mycotoxin มาจากภาษากรีกว่า mykes แปลว่า รา (fungus) และ toxicum เป็นภาษาลาติน แปลว่า พิษ (poison) ดังนั้น mycotoxin คือ สารพิษจากรา ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) (Murphy และคณะ, 2006) ที่ได้จากสารเมแทบอลิซึมที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของรา ได้แก่ กรดอะมิโน อะซีเตต และ ไพรูเวต เป็นต้น สะสมอยู่ในปริมาณมากเกินความต้องการ จึงเกิดการผลิตสารพิษจากราขึ้นในช่วง log phase (Hussein และ Brassein, 2001) สารพิษที่ราผลิตขึ้นมีหลายร้อยชนิด แต่ที่เป็นพิษต่อคนและสัตว์มีประมาณ 20-30 ชนิด สารพิษจากราที่พบบ่อยในอาหารและเป็นอันตรายต่อสุขภาพของคนและสัตว์ คือ อะฟลาทอกซิน โอคราทอกซิน ซีราลีโนน (Zearalenone) ดีออกซีนิวาลีนอล (deoxynivalenol) ฟูมอนิซิน พาทูลิน (Patulin) และที-2 ทอกซิน (T-2 toxin) (Steyn, 1995) ซึ่งสารพิษจากราเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ เช่น เป็นพิษต่อตับและไต พิษต่อเซลล์ พิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน พิษต่อระบบประสาท พิษต่อกล้ามเนื้อ และเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์ (Hussein และ Brassein, 2001) ก่อให้เกิดการเจ็บป่วยแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง (Kuiper, 1998) สารพิษจากราปนเปื้อนในผลิตผลทางการเกษตรและอาหารสำหรับคนและสัตว์ เช่น ธัญพืช ผลไม้ นม เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากวัตถุดิบดังกล่าว (Petzinger และ Weidenbach, 2002) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในธัญพืชและผลิตภัณฑ์จากธัญพืช พบการปนเปื้อนสารพิษจากราหลายชนิดในปริมาณที่สูง เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี และข้าว พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน ส่วนข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอต และข้าว พบการปนเปื้อนของโอคราทอกซิน (Bullerman และ Bianchini, 2007) (ตารางที่ 2.4)

สารพิษจากราที่สำคัญที่พบมากในข้าว ได้แก่ อะฟลาทอกซินบี 1 โอคราทอกซินเอ และฟูโมนิซินบี 1 (Reddy และคณะ, 2008) ซึ่งผลิตจากรา 3 สกุล คือ *Aspergillus* (Reddy และคณะ, 2004), *Penicillium* (Makun และคณะ, 2007) และ *Fusarium* (Abbas และคณะ, 1999) โดยเฉพาะราในสกุล *Aspergillus* เป็นราที่พบการปนเปื้อนสูงในข้าวมากที่สุด และมีราหลายชนิดในสกุลนี้ที่สามารถสร้างสารพิษได้หลายชนิด เช่น *A. flavus*, *A. paraciticus* และ *A. nomius* สามารถสร้างอะฟลาทอกซินได้ ในขณะที่ *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. carbonarius* และ *Aspergillus tubingensis* สามารถสร้างโอคราทอกซินได้ (Golan, 2008) (ตารางที่ 2.5) ดังที่กล่าวมาสารพิษจากราพบการปนเปื้อนในผลผลิตและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหลากหลายชนิด ทั้งยังส่งผลกระทบต่อสุขภาพของคนและสัตว์ทั้งในระยะสั้นและระยะยาว ประชาชนส่วนใหญ่หัน

มารักสุขภาพมากขึ้น จึงให้ความสำคัญกับเรื่องนี้เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ ซึ่งเป็นสารพิษจากราที่พบการปนเปื้อนในผลิตผลทางการเกษตรและอาหารอย่างกว้างขวาง และมีความพิษรุนแรงต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์

ตารางที่ 2.4 สารพิษจากราที่ปนเปื้อนในธัญพืช

สารพิษจากรา	แหล่งธัญพืชที่พบ
อะฟลาทอกซิน	ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าว
โอคราทอกซิน	ข้าวสาลี ข้าวโอต ข้าวบาร์เลย์ ข้าว
ซีราลีโนน	ข้าวโพด
ดีออกซีนิวาลีนอล	ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวโอต
ฟูโมนิซิน	ข้าวโพด ข้าว
พาทูลิน	ข้าวสาลี
ที-2 ทอกซิน	ข้าวโพด

ที่มา: Bullerman และ Bianchini, 2007

ตารางที่ 2.5 ราในสกุล *Aspergillus* ที่สามารถผลิตสารพิษจากราได้

ราในสกุล *Aspergillus*	สารพิษจากรา
A. flavus, *A. paraciticus*, *A. nomius*	อะฟลาทอกซิน
A. ochraceus, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. tubingensis*	โอคราทอกซิน
A. niveus	ซิทรินิน
A. sulphureus	กรดเพนิซิลลิก
A. sydowi, *A. ustus*	สเตอริกมาโทซิสทิน
A. terreus	พาทูลิน, ซิทรินิน

ที่มา: Golan, 2008

อะฟลาทอกซินบี 1

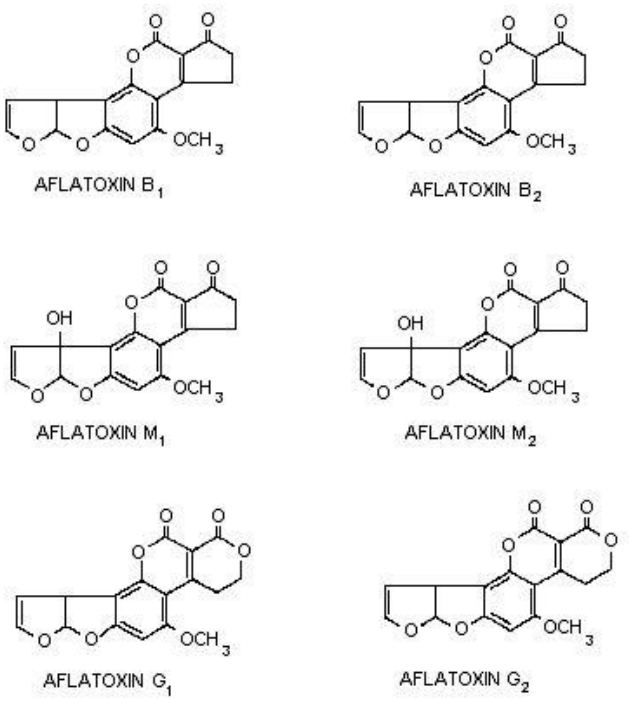
ในปี ค.ศ. 1933 พบการเกิดโรคมะเร็งตับในปลาเทร้าท์ในประเทศสหรัฐอเมริกา แต่ยังไม่พบสาเหตุของการเกิดโรคอย่างแท้จริง (Haddow และ Blake, 1933) จนในปี ค.ศ. 1960 ได้เกิดโรคเอ็กซ์ในไก่งวง (Turkey X disease) ระบาดในประเทศอังกฤษ ทำให้ไก่งวงมีอาการตับเป็นพิษและตายเป็นจำนวนมาก (Blount, 1961) ต่อมาได้พบสาเหตุว่าเกิดจากสารพิษที่สร้างมาจาก *A. flavus* จึงตั้งชื่อสารพิษนี้ว่า อะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) และตั้งชื่อโรคที่เกิดจากสารพิษจากราชนิดนี้ว่า อะฟลาทอกซิโคซิส (Aflatoxicosis) (Stevenson, 1962) จากการค้นพบการปนเปื้อนของสารพิษชนิดนี้ในอาหารคนและสัตว์ ทำให้ประชาชนตระหนักถึงอันตรายของสารดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น (Murphy และคณะ, 2006)

ชนิดของอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซินที่ถูกผลิตขึ้นในธรรมชาติ มี 4 ชนิด คือ อะฟลาทอกซินบี 1, บี 2, จี 1 และจี 2 ซึ่งอะฟลาทอกซินเป็นสารพวกบิส-ฟิวราโน-ไอโซคูมาริน (bis-furano-isocumarin) เชื่อมกับวงแหวนไซโคลเพนตีโนน (cyclopentenone ring) ได้เป็นอะฟลาทอกซินบี 1 และบี 2 ซึ่งเรืองแสงให้สีน้ำเงินภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ในช่วงความยาวคลื่น 256 ถึง 365 นาโนเมตร หรือเชื่อมกับวงแหวนแลคโตน (lactone ring) ได้เป็นอะฟลาทอกซินจี 1 และจี 2 เรืองแสงให้สีเขียวภายใต้แสงในช่วงความยาวคลื่นเดียวกัน (Sargeant, 1963) อะฟลาทอกซินเมื่อเข้าสู่ร่างกายคนและสัตว์เกิดเมแทบอลิซึมในร่างกายทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของสารพิษ ได้เป็นอะฟลาทอกซินชนิดต่างๆ เช่น อะฟลาทอกซิน เอ็ม 1 และอะฟลาทอกซินเอ็ม 2 แยกได้จากน้ำนมของสัตว์ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของอะฟลาทอกซินบี 1 และอะฟลาทอกซินบี 2 ตามลำดับ (Battacone และคณะ, 2009)

โครงสร้างของอะฟลาทอกซินบี 1, บี 2, จี 1, จี 2, เอ็ม 1 และเอ็ม 2 มีโครงสร้างคล้ายคลึงกันดังภาพที่ 2.1 แต่ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยอะฟลาทอกซินบี 1 มีความเป็นพิษสูงกว่าอะฟลาทอกซินเอ็ม 1, จี 1, บี 2, จี 2 และเอ็ม 2 ตามลำดับ (Merwe และคณะ, 1963) อะฟลาทอกซินบี 1 มีความเป็นพิษมากกว่าอะฟลาทอกซินตัวอื่นเนื่องจากอะฟลาทอกซินบี 1 มีพันธะคู่ในวงแหวนที่ 1 และไม่มีกลุ่มแลคโตนในวงแหวนที่ 5 พันธะคู่นี้สามารถถูกเปลี่ยนเป็นอิโพไซด์ (epoxide) ซึ่งอิโพไซด์สามารถจับกับ DNA หรือ RNA และอัลบูมิน ได้ง่าย

โดยจะไปจับกับ DNA ที่ตำแหน่งของกวานีน ทำให้เซลล์โตผิดปกติกลายเป็นเนื้องอกและเป็นมะเร็งในที่สุด (Garner และ Kingfisher, 1979)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของอะฟลาทอกซินบี 1, บี 2, จี 1, จี 2, เอ็ม 1 และเอ็ม 2 (Jaimez และคณะ, 2000)

คุณสมบัติของอะฟลาทอกซินบี 1

อะฟลาทอกซินบี1 มีชื่อ IUPAC คือ (6a*R*,9a*S*)-4-methoxy-2,3,6a,9a-tetrahydrocyclo penta[*c*]furo[3',2':4,5]furo[2,3-*h*]chromene-1,11-dione มีสูตรทางเคมี $C_{17}H_{12}O_6$ น้ำหนักโมเลกุล 312.3 ความหนาแน่น 1.56 กรัมต่อลูกบาศก์เมตร จุดเดือดที่ 528.2 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 760 มิลลิปรอท และจุดหลอมเหลวที่ 268-269 องศาเซลเซียส สารพิษชนิดนี้มีลักษณะเป็นคริสตัลไม่มีสี หรือมีสีเหลืองซีด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Twelfth, 2011) ละลายน้ำได้ที่ 3.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ละลายได้ดีในตัวทำละลายเคมีอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม อะซิโตน และเมทานอล เป็นต้น อะฟลาทอกซินบี 1 ไม่เสถียรในที่มีแสงและอากาศ โดยเฉพาะในตัวทำละลายที่มีขั้ว หรือสารละลายที่มี pH ต่ำกว่า 3 หรือมากกว่า 10 (IARC,

1976a) มีสารเคมีบางชนิดสามารถลดความเป็นพิษหรือทำลายพิษของอะฟลาทอกซินได้เล็กน้อย เช่น แอมโมเนีย ด่างแก่ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น (Murphy และคณะ, 2006) จากการศึกษาของ Park และคณะ (1988) พบว่าแอมโมเนียสามารถดูดซึมอะฟลาทอกซินบี 1 ทำให้ลดความพิษหรือขจัดสารพิษชนิดนี้ในสัตว์ได้ นอกจากนี้การใช้ความร้อนสูง เช่น ข้าวโพดที่ผ่านกระบวนการอบที่อุณหภูมิ 175 และ 200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สามารถลดปริมาณอะฟลาทอกซินลง 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Jackson และคณะ, 1997)

ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซินบี 1

อะฟลาทอกซินเมื่อเข้าสู่ร่างกายคนและสัตว์ จะออกฤทธิ์ทั้งแบบเฉียบพลัน คือการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมากเป็นระยะเวลาน้อยกว่า 24 ชั่วโมง และแบบเรื้อรังคือการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายในปริมาณน้อยติดต่อกันเป็นระยะเวลามากกว่า 3 เดือนขึ้นไป ซึ่งการออกฤทธิ์ทั้งสองแบบส่งผลกระทบต่อเซลล์และออร์แกเนลล์ทำให้การทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกายผิดปกติ (อนงค์ บิณฑวิหค, 2546) ดังที่กล่าวมาอะฟลาทอกซินบี 1 มีพิษรุนแรงมากกว่าอะฟลาทอกซินชนิดอื่นๆ ซึ่งส่งผลกระทบทั้งในคนและสัตว์ เช่น เกิดความผิดปกติในระบบภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาของ Turner และคณะ (2003) พบว่าอะฟลาทอกซินบี 1 มีผลต่อการสร้างอิมมูโนโกลบูลินเอ (Immunoglobulin A, IgA) ในเด็กในประเทศแกมเบียม, หมูที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี 1 ปริมาณ 0.4-0.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 10 สัปดาห์ ทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในการสร้างลิมโฟไซท์ลดลง (Miller และคณะ, 1981) และถ้าหมูได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี 1 ในปริมาณ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จะทำให้หมูตายทันที (Panangala และคณะ, 1986) และที่สำคัญองค์การ International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้จัดอะฟลาทอกซินบี 1 อยู่ในกลุ่ม 1 ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งทั้งในคนและสัตว์ (IARC, 1993a) เช่น จากการศึกษาของ Krishnamachari และคณะ (1975) พบว่าผู้ป่วยในประเทศอินเดีย จำนวน 396 ราย อายุระหว่าง 15-30 ปี บริโภคข้าวโพดที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้น 6.25-15.6 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้ออกฤทธิ์แบบเฉียบพลัน โดยมีอาการอาเจียน เบื่ออาหาร ตับและม้ามโต ตัวซีดเหลือง มีเลือดออกในระบบทางเดินอาหาร และตายทันที จำนวน 106 ราย และมีรายงานในประเทศจีนและแอฟริกาพบการเกิดมะเร็งตับซึ่งมีสาเหตุมาจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ทำให้มีผู้เสียชีวิตถึง 250,000 คนต่อปี (Wild และคณะ, 1992; Wang และคณะ, 2001) จากการศึกษาของ Angsubhakorn และคณะ (1986) พบว่าหนูแรทน้ำหนัก 40-50

กรัม ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี 1 ปริมาณ 2.13 มิลลิกรัมต่อตัว เป็นเวลา 35-65 สัปดาห์ พบการเกิดมะเร็งตับในหนูทดลองทุกตัว ในขณะที่ม้าที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ปริมาณ 58.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ออกฤทธิ์แบบเฉียบพลันทำให้ม้าเป็นมะเร็งที่ตับและไตและตายทันที (Vesonder และคณะ, 1991) และลูกแกะที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ปริมาณ 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของอาหาร ในแต่ละวัน เป็นเวลา 21 วัน พบว่าลูกแกะเป็นมะเร็งที่ตับและไตและตายในที่สุด (Ramos และคณะ, 1996) ซึ่งความรุนแรงของการออกฤทธิ์ในสารพิษชนิดนี้ทั้งในคนและสัตว์แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหาร ระยะเวลาที่ได้รับสารพิษ เพศ อายุ และชนิดสัตว์ (Richard และคณะ, 2007)

การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 มักพบการปนเปื้อนในเมล็ดธัญพืชและพืชน้ำมัน เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ข้าว ถั่วลิสง และมะพร้าว เป็นต้น (Pittet, 1998) รวมทั้งผลิตภัณฑ์แปรรูปจากวัตถุดิบดังกล่าว ตัวอย่างจากการศึกษาของ Zuhri และ Saber (1993) มะพร้าว 5 จาก 25 ตัวอย่าง ในประเทศอียิปต์พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 อยู่ในช่วง 5-25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม, ข้าวสาลีในประเทศตุรกีพบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 42 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด 41 ตัวอย่าง อยู่ในช่วง 10.4-144.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Giray และคณะ, 2007), อาหารเช้าที่มีธัญพืชเป็นส่วนประกอบในประเทศกรีซ 56.3 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด 55 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 โดยมีความเข้มข้นเฉลี่ย 1.42 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Villa และ Markaki, 2009), ถั่วลิสง จำนวน 16 จาก 27 ตัวอย่าง ในประเทศคองโกพบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 อยู่ในช่วง 1.5-390 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Kamika และ Takoy, 2011) และข้าวโพดในเมืองอาร์ดาบิลประเทศอิหร่าน พบการปนเปื้อน อะฟลาทอกซินบี 1 71.4 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด 373 ตัวอย่าง โดยมีความเข้มข้นเฉลี่ย 57.67 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Osboo และคณะ, 2012)

ตัวอย่างการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าว จากการศึกษาของ Breckenridge และคณะ (1986) ข้าวสารในประเทศศรีลังกา 87.94 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด 597 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1, ส่วนข้าวเปลือกจากโรงสีในประเทศอินโดนีเซีย 67.8 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด 1,200 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 โดยมี

ความเข้มข้นเฉลี่ย 38.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Paranagama และคณะ, 2003), ข้าวเปลือกจากโรงสีในประเทศศรีลังกา 92 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด 37 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 อยู่ในช่วง 12-30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Liu และคณะ, 2006), ข้าวสารจากตลาด 51 ตัวอย่าง ในประเทศเวียดนาม พบว่า 35 ตัวอย่าง มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 เฉลี่ย 3.31 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Nguyen และคณะ, 2007), ข้าวเปลือกและข้าวสารจากโรงสีจำนวน 675 และ 525 ตัวอย่าง ตามลำดับ ในประเทศอินเดีย พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวเปลือกจากโรงสี 70.7 เปอร์เซ็นต์ และข้าวสารจากโรงสี 64.1 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 0.1-308 และ 0.5-3.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Reddy และคณะ, 2009) และข้าวสารจากตลาดในประเทศออสเตรเลียที่นำเข้าจากประเทศอินเดีย ปากีสถาน และอียิปต์ 18.52 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมด 81 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 อยู่ในช่วง 0.45-9.86 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Reiter และคณะ, 2010)

การปนเปื้อนของราที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารพิษที่สร้างจากราในสกุล *Aspergillus* (Varga และคณะ, 2003) ราในสกุลนี้มีรูปร่างคล้ายดอกไม้ ที่ปลายก้านชูโคนิเดียพองออกเป็นรูปกระเปาะ สปอร์เกาะกลุ่มกันเป็นจำนวนมากอยู่บนปลายก้านชูโคนิเดีย ซึ่งสปอร์ที่อยู่ส่วนนอกสุดสามารถแพร่กระจายได้ง่าย (Samson และคณะ, 2004) ราในสกุลนี้เจริญเติบโตได้ดีในภูมิอากาศแบบร้อนชื้น โดยส่วนใหญ่อะฟลาทอกซินบี 1 สร้างจากรา *A. flavus*, *A. paraciticus*, *A. psedotamarii*, *Aspergillus bombycis* และ *A. nominus* ซึ่งเป็นราที่มีสปอร์สีเขียวอมเหลือง อยู่ใน section *Flavi* (Varga และคณะ, 2003) ซึ่งพบการปนเปื้อนของราที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ในผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิด โดยเฉพาะในเมล็ดธัญพืชและพืชน้ำมัน (Pittet, 1998)

ตัวอย่างการปนเปื้อนของราที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหลายชนิด จากการศึกษาของ Zohri และ Saber (1993) มะพร้าวในประเทศอิยิปต์พบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ซึ่งราที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ส่วนใหญ่เป็นราในสกุล *Aspergillus* โดยเฉพาะ *A. flavus*, ส่วนข้าวสาลีในประเทศแอลจีเรียจำนวน 108 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของ *Aspergillus* section *Flavi* จำนวน 150 สายพันธุ์ แบ่งเป็น *A. flavus* และ *Aspergillus tamarii* จำนวน 144 และ 6 ไอโซเลต ตามลำดับ ซึ่งสามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ในช่วง 1.21-234.6

ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม บนอาหารแข็ง Czapek Yeast Extract agar (CYA) (Riba และคณะ, 2010) และข้าวบาร์เลย์ในประเทศสเปนพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี ซึ่งราที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ส่วนใหญ่เป็น *Aspergillus* โดยเฉพาะ *A. flavus* และ *A. paraciticus* (Mateo และคณะ, 2011)

ตัวอย่างการปนเปื้อนของราที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าว จากการศึกษาของ Pitt และคณะ (1994) พบว่า *A. flavus* เป็นหนึ่งในราอีกหลายชนิดที่ปนเปื้อนในข้าวเปลือกในประเทศไทย เช่นเดียวกับข้าวสารจากตลาดในประเทศเกาหลีที่พบการปนเปื้อนราในสกุล *Aspergillus* โดยเฉพาะ *A. flavus* มากที่สุด (Park และคณะ, 2005) และข้าวก่อนการเก็บเกี่ยว ข้าวในระหว่างการเก็บรักษา และข้าวจากตลาด ในประเทศไนจีเรียมีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 ซึ่งราที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม *Aspergillus* (Makun และคณะ, 2007)

การควบคุมการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1

อะฟลาทอกซินบี 1 สามารถเกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติและพบการปนเปื้อนในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหลายชนิด อีกทั้งยังผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคทั้งคนและสัตว์ ดังนั้นการกำหนดปริมาณความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี 1 สูงสุดที่อนุญาตให้มีการปนเปื้อนได้นั้นเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งในประเทศไทยได้มีประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ข้อ 4(2) ระบุว่าให้พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน ได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ส่วนข้อกำหนดระหว่างประเทศจะกำหนดตามมาตรฐานสากลขององค์กรต่างๆ ที่แต่ละประเทศเข้าร่วมเป็นสมาชิก เช่น คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) กำหนดให้ระดับการปนเปื้อนสูงสุดของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวโพด ธัญพืช (ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ รวมถึงข้าว) ถั่วลิสง ถั่วเปลือกแข็งต่างๆ ผลไม้แห้ง เครื่องเทศ และผลิตภัณฑ์จากธัญพืชสำหรับเด็กดังตารางที่ 2.6 (Regulation (EC) No. 1881/2006)

ตารางที่ 2.6 ข้อกำหนดปริมาณการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 สูงสุดในอาหารแต่ละชนิด

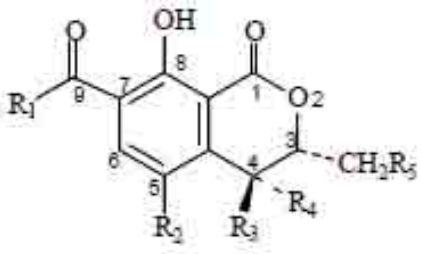
ชนิดของอาหาร	ปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดของอะฟลาทอกซินบี 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
ข้าวโพด	5
ธัญพืช (ข้าวสาลี, ข้าวบาร์เลย์ รวมถึงข้าว)	2
ถั่วลิสง	8
ถั่วเปลือกแข็งต่างๆ	5
ผลไม้แห้ง	5
เครื่องเทศ	5
ผลิตภัณฑ์จากธัญพืชสำหรับเด็ก	0.1

ที่มา: Regulation (EC) No. 1881/2006

โอคราทอกซินเอ

ชนิดของโอคราทอกซิน

โอคราทอกซินค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1965 ประกอบด้วยโอคราทอกซินเอและเมแทบอไลต์ของโอคราทอกซินเอ เช่น โอคราทอกซินบี, ซี, แอลฟา, เบต้า, 4-(R)-ไฮดรอกซีโอคราทอกซินเอ, 4-(S)-ไฮดรอกซีโอคราทอกซินเอ, 10-ไฮดรอกซีโอคราทอกซินเอ, 4-R-ไฮดรอกซีโอคราทอกซินบี, OTHQ, โอคราทอกซินเอเมทิลเอสเทอร์ และโอคราทอกซินบีเมทิลเอสเทอร์ ซึ่งโครงสร้างทางเคมีของโอคราทอกซินแต่ละชนิดจะแตกต่างกันบางส่วน แต่มีส่วนประกอบหลักที่สำคัญ คือ ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) เกาะกับไอโซคูมารินนิวคลีไอ (isocoumarin nuclei) แต่โอคราทอกซินแอลฟาและเบต้า ไม่มีส่วนของฟีนิลอะลานีน (Wu และคณะ, 2011) ดังภาพที่ 2.2



สารประกอบ	R1	R2	R3	R4	R5
โอคราทอกซินเอ	ฟีนิลอะลานีน	Cl	H	H	H
โอคราทอกซินบี	ฟีนิลอะลานีน	H	H	H	H
โอคราทอกซินซี	ฟีนิลอะลานีน	Cl	H	H	H
โอคราทอกซินแอลฟา	ไฮดรอกซิล	Cl	H	H	H
โอคราทอกซินเบต้า	ไฮดรอกซิล	H	H	H	H
4-(R)-ไฮดรอกซีโอคราทอกซินเอ	ฟีนิลอะลานีน	Cl	H	OH	H
4-(S)-ไฮดรอกซีโอคราทอกซินเอ	ฟีนิลอะลานีน	Cl	OH	H	H
10-ไฮดรอกซีโอคราทอกซินเอ	ฟีนิลอะลานีน	Cl	H	H	OH
4-R-ไฮดรอกซีโอคราทอกซินบี	ฟีนิลอะลานีน	Cl	H	OH	H
OTHQ	ฟีนิลอะลานีน	OH	H	H	H
โอคราทอกซินเอเมทิลเอสเทอร์	ฟีนิลอะลานีน, เมทิล เอสเทอร์	Cl	H	H	H
โอคราทอกซินบีเมทิลเอสเทอร์	ฟีนิลอะลานีน, เมทิล เอสเทอร์	H	H	H	H
4-R-ไฮดรอกซีโอคราทอกซินเอ - เบต้า-กลูโคไซด์	ฟีนิลอะลานีน	Cl	H	OGlucopyranosyl	H

ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของโอคราทอกซินเอและเมแทบอไลต์ของโอคราทอกซินเอ (Wu และคณะ, 2011)

คุณสมบัติของโอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเอมีชื่อ IUPAC คือ *N*-{[(3*R*)-5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-3,4-dihydro-1*H*-isochromen-7-yl]carbonyl}-L-phenylalanine สูตรทางเคมี $C_{20}H_{18}ClNO_6$ น้ำหนักโมเลกุล 403.8 จุดหลอมเหลว 169 องศาเซลเซียส ความหนาแน่น 1.37 กรัมต่อลูกบาศก์เมตร (Anli และ Alkis, 2010) โอคราทอกซินเอมีลักษณะเป็นคริสตัลไม่มีสีในที่มีแสงปกติที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสารพิษชนิดนี้ไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลายเคมีอินทรีย์ได้ปานกลาง เช่น คลอโรฟอร์ม เอทานอล เมทานอล และไซลีน โอคราทอกซินเอไม่เสถียรในที่มีแสง โดยเฉพาะในสภาพที่มีความชื้นสูง แต่จะเสถียรในที่มืดในสารละลายเอทานอล (Akorn, 2010; HSDB, 2010) และ

สามารถทนต่อความร้อนสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เมื่อนำผลิตภัณฑ์จากธัญพืชไปนึ่งฆ่าเชื้อ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่ามีโอคราทอกซินเอเหลืออยู่ 35 เปอร์เซ็นต์ (IARC, 1976b) และจากการศึกษาของ Van der Stegen และคณะ (2001) พบว่าในระหว่างการอบกาแฟที่อุณหภูมิ 175 องศาเซลเซียส ปริมาณโอคราทอกซินเอลดลง 70-96 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นความร้อนจากกระบวนการหุงต้มทั่วไปจึงไม่สามารถทำลายพิษของโอคราทอกซินเอได้

ความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเอสามารถออกฤทธิ์ได้ทันแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง ความรุนแรงของการออกฤทธิ์ในสารพิษขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหาร ระยะเวลาที่ได้รับสารพิษ เพศ อายุ และชนิดสัตว์ (Hussein และ Brasel, 2001) ซึ่งส่งผลกระทบทั้งคนและสัตว์ เช่น เป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาของ Bitay และคณะ (1979) ไก่ที่ได้รับอาหารที่มีโอคราทอกซินเอในปริมาณ 0.3-1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของอาหาร เป็นเวลา 7 วัน พบว่าไก่มีอาการซึมเศร้า เบื่ออาหารและตาย เนื่องจากโอคราทอกซินเอมีผลทำให้การทำงานของลิมโฟไซต์ (lymphocyte) ผิดปกติ, เป็นพิษต่อทารกในครรภ์ทำให้เกิดความบกพร่องในพัฒนาการของทารกในครรภ์ จากการศึกษาของ Boorman และคณะ (1992) หนูเพศเมีย น้ำหนัก 175-200 กรัม ที่ตั้งท้องเมื่อได้รับโอคราทอกซินเอในปริมาณ 1.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ลูกหนูในท้องมีรูปร่างผิดปกติ และเป็นพิษต่อตับไต จากการศึกษาของ Krogh และคณะ (1974) หมูที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในปริมาณ 4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 3-4 เดือน พบว่า หมูมีอาการไตบวม ไตอักเสบ และลักษณะของไตผิดปกติ นอกจากนี้โอคราทอกซินเอยังเป็นสาเหตุทำให้เกิดการอักเสบของกรวยไตในคน (Balkan Endemic Nephropathy, BAN) (Krogh, 1978) และที่สำคัญโอคราทอกซินเอถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม 2 บี ซึ่งอาจจะเป็นสารก่อมะเร็งได้ (IARC, 1993b) จากการศึกษาของ Kane และคณะ (1986) พบว่าโอคราทอกซินเอเป็นสารก่อมะเร็งในหนู เมื่อหนูได้รับอาหารที่ปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในปริมาณ 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทุกๆ 48 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ทำให้เกิดมะเร็งที่ตับและไต และตายในที่สุด ถ้าหนูได้รับปริมาณโอคราทอกซินเอสูงถึง 21 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หนูจะตายภายใน 24-72 ชั่วโมง ในขณะที่ในคนโอคราทอกซินเออาจจะเป็นสารก่อมะเร็งยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจน (Hussein และ Brasel, 2001)

การปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

โอคราทอกซินเอปนเปื้อนในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร รวมทั้งเครื่องดื่มหลากหลายชนิด เช่น ธัญพืช เมล็ดกาแฟ โกโก้ ถั่ว เครื่องเทศ ผลไม้แห้ง และไวน์ เป็นต้น (SCOOP European commission, 2002) ตัวอย่างจากการศึกษาของ Riba และคณะ (2008) ข้าวสาลีในประเทศแอลจีเรีย จำนวน 12 จาก 30 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเออยู่ในช่วง 0.21-41.55 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม, ข้าวบาร์เลย์ในประเทศสเปน 58 เปอร์เซ็นต์จากตัวอย่างทั้งหมด 123 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเออยู่ในช่วง 0.21-12.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Vea และคณะ, 2012), เมล็ดกาแฟโรบัสต้าในประเทศไทย 100 เปอร์เซ็นต์จากตัวอย่างทั้งหมด 32 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนโอคราทอกซินเออยู่ในช่วง 1.5-8.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Noonim และคณะ, 2008b), ไวน์ในประเทศฝรั่งเศสจำนวน 13 จาก 38 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเออยู่ในช่วง 10-1,900 ไมโครกรัมต่อลิตร (Majerus และคณะ, 2000) และองุ่นในประเทศเลบานอน จำนวน 15 จาก 18 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเออยู่ในช่วง 0.06-5.85 ไมโครกรัมต่อลิตร (Lasram และคณะ, 2012)

ตัวอย่างการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในข้าว จากการศึกษาของ Scudamore และคณะ (1997) พบว่าข้าวสารในประเทศอังกฤษ จำนวน 3 จาก 20 ตัวอย่าง ปนเปื้อนโอคราทอกซินเออยู่ในช่วง 1-19 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม, ข้าวสารในประเทศอินโดนีเซีย จำนวน 2 ตัวอย่าง จาก 15 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนโอคราทอกซินเออยู่ในช่วง 1.7-2.4 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Weidenboener, 2000), ข้าวสารในประเทศเวียดนามพบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในทุกตัวอย่าง (25 ตัวอย่าง) อยู่ในช่วง 21.3-26.2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Trung และคณะ, 2001), ข้าวสารจากตลาด 35 ตัวอย่างในประเทศเวียดนามพบว่า 20 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอเฉลี่ย 0.75 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Nguyen และคณะ, 2007) และข้าวสารจากตลาดในประเทศโมร็อกโก 26 ตัวอย่างจากตัวอย่างข้าวทั้งหมด 100 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนโอคราทอกซินเออยู่ในช่วง 0.08-47 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (Juan และคณะ, 2008)

การปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

ในปี ค.ศ. 1965 พบว่า *Aspergillus ochraceus* สามารถสร้างโอคราทอกซินเอได้ และต่อมาสารพิษชนิดนี้สามารถสร้างโดยราในสกุล *Aspergillus* หลายชนิด ได้แก่ *A. carbonarius* และ *A. niger* อยู่ใน section *Nigri* ซึ่งเป็นราที่มีสปอร์สีดำ (Varga และคณะ, 2003) และ *Aspergillus sclerotiorum*, *Aspergillus westerdijkiae* และ *Aspergillus steynii* อยู่ใน section *Circumdati* รวมถึง *A. ochraceus* ด้วย (Frisvad และคณะ, 2007) ราในสกุลนี้สามารถสร้างโอคราทอกซินเอ ในประเทศเขตร้อนชื้น (Mounjouenpou และคณะ, 2008) และพบการปนเปื้อนในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร รวมทั้งเครื่องดื่มหลากหลายชนิด เช่น ธัญพืช เมล็ดกาแฟ โกโก้ ถั่ว เครื่องเทศ ผลไม้แห้ง และไวน์ เป็นต้น (SCOOP European commission, 2002) และราอีกหนึ่งสกุล คือ *Penicillium* ได้แก่ *P. verrucosum* และ *P. nordicum* เป็นต้น ซึ่งพบในประเทศเขตอบอุ่นพบการปนเปื้อนเฉพาะในธัญพืชเท่านั้น (Anli และ Alkis, 2010)

ตัวอย่างการปนเปื้อนราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร รวมทั้งเครื่องดื่มหลากหลายชนิด จากการศึกษาของ Magnoli และคณะ (2007) ถั่วลิสงในประเทศอาร์เจนตินา จำนวน 100 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเออยู่ในช่วง 2-24 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งราที่ผลิตโอคราทอกซินเอส่วนใหญ่คือ *A. cabonarius*, *A. niger*, *Aspergillus aculeatus* และ *Aspergillus japonicus*, องุ่นในประเทศเลบานอน จำนวน 77 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus* 95.5 เปอร์เซ็นต์จากตัวอย่างทั้งหมด 510 ตัวอย่าง ได้แก่ *A. cabonarius*, *A. niger* และ *A. japonicus* ซึ่ง *A. cabonarius* สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้สูงที่สุดที่ 8.38 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม บนอาหาร CYA (Czapek Yeast extract Agar) (Khoury และคณะ, 2008) และข้าวสาลี จำนวน 85 ตัวอย่าง ในประเทศแอลจีเรียพบการปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus* จำนวน 135 ไอโซเลต จากจำนวนราที่พบทั้งหมด 158 ไอโซเลต โดย *A. carbonarius* สามารถผลิตโอคราทอกซินเอสูงที่สุดที่ 11.5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม บนอาหารแข็ง CYA (Riba และคณะ, 2008)

ตัวอย่างการปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในข้าว จากการศึกษาของ Chandra และ Sarbhoy (1997) พบว่าข้าวสารในประเทศอินเดียมีรา *A. niger* ที่ปริมาณสูง, ข้าวสารจากตลาดในประเทศเกาหลีพบการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอ ซึ่งราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ ส่วนใหญ่เป็นพวก *P. verrucosum* (Park และคณะ, 2005), ในประเทศไนจีเรียพบว่าข้าวก่อนการเก็บ ข้าวในระหว่างการเก็บรักษา และข้าวจากตลาด มีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอ ซึ่งราที่ผลิตโอคราทอกซินเอส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Penicillium* sp. (Makun และคณะ, 2007)

การควบคุมการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเอก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของคนและสัตว์เป็นอย่างมาก และสารพิษชนิดนี้ไม่สามารถทำลายพิษได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งพบการปนเปื้อนในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหลายชนิด ดังนั้นการกำหนดปริมาณความเข้มข้นสูงสุดของโอคราทอกซินเอที่อนุญาตให้มีการปนเปื้อนได้ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อคนและสัตว์ เพื่อคุ้มครองสุขอนามัยและความปลอดภัยของผู้บริโภคจึงเป็นเรื่องที่จำเป็นอย่างยิ่ง ในประเทศไทยได้มีการประกาศจากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2551 เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร เมล็ดกาแฟอะราบิก้า ข้อ 5 ระบุว่าให้พบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในหลายประเทศที่พัฒนาแล้วทั่วโลกได้ให้ความสำคัญอย่างมากกับสารพิษจากราและมีข้อกำหนดปริมาณสารพิษจากราในระดับสูงสุดที่ยอมรับได้ในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร รวมทั้งเครื่องดื่ม เช่น คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) กำหนดให้ระดับการปนเปื้อนสูงสุดของโอคราทอกซินเอในเมล็ดธัญพืช รวมถึงข้าว ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช อาหารและผลิตภัณฑ์จากธัญพืชสำหรับเด็ก ผลไม้แห้ง องุ่น ไวน์ และเมล็ดกาแฟคั่วและกาแฟสำเร็จรูป ดังตารางที่ 2.7 (Regulation (EC) No. 123/2005)

ตารางที่ 2.7 ข้อกำหนดปริมาณการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอสูงสุดในอาหารแต่ละชนิด

ชนิดของอาหาร	ปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดของโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
เมล็ดธัญพืช รวมถึง ข้าว	5
ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช	3
อาหารและผลิตภัณฑ์จากธัญพืชสำหรับเด็ก	0.5
ผลไม้แห้ง	10
องุ่น	2
ไวน์	2
เมล็ดกาแฟคั่วและกาแฟสำเร็จรูป	5

ที่มา: Regulation (EC) No. 123/2005

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของราที่สำคัญ คือ สารอาหาร ความเป็นกรดด่าง ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิ และ A_w ราสามารถเจริญได้ในสารอาหารที่มีธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน และแร่ธาตุอื่นๆ รวมถึงวิตามินได้แก่ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินบี 6 ไบโอติน กรดแพนโตธินิค และกรดโฟลิค ซึ่งเป็นสารอาหารในการเจริญเติบโตของรา (อนงค์ บิณฑวิหค, 2546) ความเป็นกรดด่างราเจริญได้ในช่วงความเป็นกรดด่างแตกต่างกันในราแต่ละชนิด เช่น *A. flavus* สามารถเจริญได้ดีช่วงความเป็นกรดด่าง 3.5-8 และ *A. ochraceus* สามารถเจริญได้ช่วงความเป็นกรดด่าง 3-10 ซึ่งความเป็นกรดด่างที่ 8 เหมาะสมต่อการเจริญของ *A. ochraceus* ได้ดีที่สุด (Wheeler และคณะ, 1991) ปริมาณออกซิเจน ถ้ามีปริมาณมากส่งเสริมการเจริญของราได้ดี และปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญของรามากที่สุดคือ อุณหภูมิ และ A_w ซึ่งอุณหภูมิ และ A_w ที่เหมาะสมต่อการเจริญของราแต่ละชนิดแตกต่างกัน (Pitt และ Miscamble, 1995)

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญและผลิตสารพิษจากรามีอิทธิพลจากหลายปัจจัย โดยแบ่งออกเป็น 3 ปัจจัย คือ

1. ปัจจัยทางชีวภาพ เป็นปัจจัยที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต เช่น แมลงศัตรูพืช จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ ในพืชและสัตว์ศัตรูพืช (D'mello และ Macdonald, 1997) ในกระบวนการผลิตพืช โดยเฉพาะในระหว่างการเพาะปลูกพบแมลงศัตรูพืชและสัตว์ศัตรูพืชหลายชนิด เช่น เพลี้ย หนอน แมลง นก และหนู เป็นต้น เข้าทำลายต้นพืชโดยการกัดกินต้นพืชทำให้ต้นพืชเกิดบาดแผล และที่สำคัญเป็นพาหะนำจุลินทรีย์ โดยเฉพาะรา เมื่อต้นพืชเกิดบาดแผลเป็นสาเหตุให้ราสามารถเข้าทำลายต้นพืชได้ง่ายทำให้เกิดโรคพืชหลายชนิดขึ้น ซึ่งราที่เป็นสาเหตุนี้บางชนิดอาจจะสามารถผลิตสารพิษจากราได้ (Farrar และ Davis, 1991) จากการศึกษาของ Campbell และ White (1995) พบว่า *A. flavus* เป็นสาเหตุการเกิดโรคฝักเน่าในข้าวโพด ซึ่งพบว่าสาเหตุดังกล่าวทำให้เกิดการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวโพดในปริมาณที่สูงตามปริมาณราที่ทำให้เกิดโรค เช่นเดียวกับ *Fusarium* sp. ที่เป็นสาเหตุของโรคใบไหม้ในข้าวสาลีส่งผลต่อการผลิตดีออกซี-นิวาลีนอลในปริมาณที่สูง (Hope และ Magan, 2003)

2. ปัจจัยทางกายภาพ เป็นปัจจัยที่เกิดจากสิ่งไม่ชีวิต เช่น ระยะเวลา ฤดูกาล อุณหภูมิ และความชื้น (A_w) เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้พบว่ามีผลต่อการผลิตสารพิษจากราในระหว่างการเพาะปลูกและในระหว่างการเก็บรักษา (Moss, 1996) เนื่องจากเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยทางชีวภาพ เช่น ในฤดูฝน มีความชื้นสูง อุณหภูมิต่ำ ทำให้ต้นพืชไม่ได้รับแสงในการสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างสารอาหารต้นพืชจึงอ่อนแอ จึงง่ายต่อการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชและการเจริญของราเป็นอย่างมาก เมื่อราที่สามารถผลิตสารพิษเจริญได้ดีส่งผลให้ปริมาณสารพิษจากราสูงขึ้นตาม (Russell และคณะ, 2010) สอดคล้องกับ Reddy และคณะ (2008) พบว่าข้าวเปลือกที่เก็บเกี่ยวในฤดูฝนพบปริมาณราและปริมาณของอะฟลาทอกซินบี 1 สูงกว่าในฤดูร้อน

3. ปัจจัยทางเคมี ระหว่างการเพาะปลูกจะพบแมลงศัตรูพืชและโรคพืชที่ทำลายผลผลิตทำให้ได้ผลผลิตน้อย คุณภาพต่ำ ดังนั้นวิธีการที่เกษตรกรส่วนใหญ่ใช้ คือ ยาฆ่าแมลงหรือสารฆ่าราในการกำจัดแมลงศัตรูพืชและโรคพืช เนื่องจากได้ผลเร็ว ทำให้ปริมาณการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชและจุลินทรีย์ โดยเฉพาะราลดลงส่งผลต่อการผลิตสารพิษจากราลดลงตาม (D'mello และ Macdonald, 1997) แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Badii และ Moss (1998) พบว่า

การใช้สารฆ่าราในสภาพแวดล้อมเดิมเป็นระยะเวลายาวนาน ส่งผลต่อการกลายพันธุ์ของราทำให้ต้านทานต่อสารฆ่าราชนิดนั้นได้มากขึ้นและการผลิตสารพิษจากราอาจเพิ่มขึ้นได้

ดังที่กล่าวมาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราที่สำคัญ คือ อุณหภูมิ และ A_w ปัจจัยทั้งสองมีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา โดยราแต่ละชนิดและแหล่งอาหารที่ราเจริญได้ ในสภาวะที่เหมาะสมแตกต่างกัน (Murphy และคณะ, 2006)

อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญและการผลิตสารพิษจากราในราแต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น ราในสกุล *Aspergillus* ที่สามารถเจริญและผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ คือ *A. flavus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส (Reiter และคณะ, 2010) ส่วน *A. parasiticus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดีที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 7.5 หรือสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ราทั้งสองชนิดไม่สามารถเจริญได้ (Hill และคณะ, 1985) และราในสกุล *Aspergillus* ที่สามารถเจริญและผลิตโอคราทอกซินเอได้ คือ *A. carbonarius* ที่เจริญบนอาหารแข็งที่มีน้ำองุ่นเป็นส่วนประกอบ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 หรือสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส และผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส (Mitchell และคณะ, 2003) ในขณะที่ *A. carbonarius* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวโพดสามารถเจริญได้ดีอุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ในช่วงอุณหภูมิ 15-35 องศาเซลเซียส (Albunch และคณะ, 2011) และ *A. ochraceus* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวบาร์เลย์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 8-37 องศาเซลเซียส ซึ่งเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส (Marin และคณะ, 1998)

ปริมาณน้ำอิสระ (water activity, A_w)

ปริมาณน้ำที่มีอยู่ในอาหารประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของน้ำที่เกาะติดกับอาหาร หรือถูกใช้สำหรับการสร้างพันธะต่างๆ เช่น พันธะไอออนิก พันธะไฮโดรเจน และอีกส่วนคือ A_w ที่ไม่ได้ถูกนำไปใช้ในการสร้างพันธะใดๆ แต่จะอยู่ภายในช่องว่างของอาหาร ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ดังนั้นปริมาณความชื้น (Moisture Content) คือ ปริมาณน้ำทั้งสองส่วนดังกล่าว (Scott, 1957) A_w จึงเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการผลิตสารพิษจากราโดยตรง เช่น *A. flavus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง YES (Yeast Extract Sucrose agar) สามารถเจริญและผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดีที่ A_w 0.99 (Heydt และคณะ, 2009), *A. parasiticus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA สามารถเจริญและผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดีที่ A_w 0.95 และ 0.99 ตามลำดับ ส่วน *A. ochraceus* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวโพดสามารถเจริญและผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่ A_w 0.98 แต่ไม่สามารถเจริญและผลิตโอคราทอกซินเอได้ที่ A_w 0.8 (Marin และคณะ, 1998), *A. ochraceus* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวบาร์เลย์สามารถเจริญและผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่ A_w 0.98 (Sanchis และ Magan, 2004) และ *A. carbonarius* ที่เจริญบนอาหารแข็งที่มีน้ำองุ่นเป็นส่วนประกอบสามารถเจริญและผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่ A_w 0.93-0.98 (Sanchis และคณะ, 1986)

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาปัจจัยร่วมระหว่างอุณหภูมิและค่า A_w เนื่องจากปัจจัยทั้งสองเป็นปัจจัยที่สำคัญที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหลายชนิด เพื่อเป็นแนวทางในการควบคุมปัจจัยดังกล่าวให้อยู่ในระดับที่ส่งเสริมต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราน้อยที่สุด เพื่อความปลอดภัยของสุขภาพผู้บริโภค จากการศึกษาของ Ferna´ndez Pinto และคณะ (1991) พบว่า *A. parasiticus* ที่เจริญบนถั่วเหลืองที่มีอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และ A_w 0.95 สามารถเพิ่มการสังเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ได้ ส่วน *A. flavus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง YES (Yeast Extract Sucrose agar) สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ A_w 0.99 และผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดีที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส และ A_w 0.99 (Heydt และคณะ, 2009) ในขณะที่ *A. carbonarius* ที่เจริญบนองุ่นสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ A_w 0.965 และผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และ A_w 0.95-0.98 และ *A. niger* ที่เจริญบนองุ่นสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ A_w 0.98 และผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และ A_w 0.95 (Leong และคณะ, 2006), *A. carbonarius* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวโพดสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ

15-35 องศาเซลเซียส และ A_w 0.96 และ 0.98 และผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และ A_w 0.98 และ *A. niger* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวโพดสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส และ A_w 0.96 และ 0.98 และผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และ A_w 0.96 และ 0.98 (Albunch และคณะ, 2011)

ดังที่กล่าวมาสภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้การปนเปื้อนรายังสามารถเกิดขึ้นได้ในระหว่างกระบวนการผลิต การแปรรูป การขนส่ง และการเก็บรักษา หากมีการปนเปื้อนของราและมีการเจริญของราบนผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร จะทำให้เกิดการปนเปื้อนสารพิษจากราได้ (Raddy และคณะ, 2008) วิธีการควบคุมกระบวนการผลิตในแต่ละขั้นตอนเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างมาก เนื่องจากสารพิษจากราไม่สามารถทำลายในระหว่างกระบวนการผลิตได้อย่างสมบูรณ์ วิธีการที่ป้องกันการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร คือ การควบคุมไม่ให้มีการปนเปื้อนราและสารพิษจากรามากขึ้น (Bullerman และ Bianchini, 2007) ปัจจุบันในหลายประเทศที่พัฒนาแล้วให้ความสำคัญกับคุณภาพมาตรฐานและความปลอดภัยของอาหารมากขึ้น ดังนั้นในระดับอุตสาหกรรมการผลิตขนาดใหญ่ และอุตสาหกรรมส่งออกสินค้าทางการเกษตรจึงต้องมีระบบคุณภาพในการจัดการผลิตที่ได้มาตรฐาน (กัลยาณี ดีประเสริฐวงศ์, 2555) เช่น การผลิตทางการเกษตรที่ดีและเหมาะสม (Good Agriculture Practices, GAP) เป็นการจัดการในขั้นตอนการผลิตวัตถุดิบให้มีประสิทธิภาพเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงและขบวนการผลิตจะต้องปลอดภัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภค เช่น การปลูกพืชหมุนเวียน การควบคุมวัชพืช และการใช้ปุ๋ย เป็นต้น (Cruz และคณะ, 2006), แนวทางปฏิบัติด้านการจัดเก็บที่ดี (Good Storage Practice, GSP) เป็นการจัดการในขั้นตอนการเก็บรักษา เช่น ความแข็งแรง ความสะอาดของโรงเรือนในการเก็บรักษา การป้องกันการเข้าทำลายสัตว์ศัตรูพืชและจุลินทรีย์ การควบคุมสภาวะที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาผลิตผลทางการเกษตร รวมถึงขั้นตอนการขนส่ง (Magan และ Lacey, 1988), แนวทางปฏิบัติในการผลิตอาหารที่ดี (Good Manufacturing Practice, GMP) เป็นหลักเกณฑ์ขั้นพื้นฐานที่จำเป็นในการผลิต โดยเน้นการป้องกันความเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นในอาหารไม่ให้เกิดพิษหรืออันตรายที่เกิดขึ้นในอาหารไปสู่ผู้บริโภค (Grob และคณะ, 2009) และระบบวิเคราะห์อันตรายและควบคุมจุดวิกฤต (Hazards Analysis and Critical Control Points, HACCP) โดยจะต้องผ่านระบบคุณภาพ GMP ก่อน ซึ่งระบบ HACCP ป้องกันปัญหาจากอันตรายทางชีวภาพ ซึ่งเป็นอันตรายจากจุลินทรีย์ อันตรายจากสารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิตวัตถุดิบ สารเร่งการเจริญเติบโต สารเคมีกำจัดราและ

ศัตรูพืช และอันตรายทางกายภาพ สิ่งปลอมปนต่างๆ เศษแก้ว เศษกระจก โลหะ เพื่อให้สามารถพิสูจน์ได้ว่าผลิตภัณฑ์นั้นได้ผลิตขึ้นอย่างถูกสุขลักษณะและปลอดภัยต่อผู้บริโภค หรืออาจใช้ระบบคุณภาพหลายๆ ระบบในกระบวนการผลิตหนึ่งๆ เพื่อเพิ่มความปลอดภัยในทุกๆ ด้านให้มากยิ่งขึ้น (Aldred และคณะ, 2004)

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กระจกปิดสไลด์ ขนาด 22×28 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Menzel-GlÄser
2. กระดาษกรอง ขนาด 110 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Whatman No.1
3. กระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ ขนาด 37.5 SQ.FT. ยี่ห้อ Diamond บริษัท Reynolds Consumer Products Company
4. กระบอกฉีดยา (microsyringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร บริษัท Nipro, Thailand
5. ขวดดูแรน (duran) ขนาด 500 และ 1000 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, Germany
6. ขวดวัดปริมาตร (volumetric) 10 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
7. เครื่องชั่ง รุ่น PG6002-5 และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Swietzerland
8. เครื่องตีบดผสมอาหาร (stomarcher) รุ่น NR 397/526 บริษัท Scientific Industries, USA
9. เครื่องตรวจสอบและถ่ายภาพเจล (gel documentation system) รุ่น Gel DOC 2000™ และโปรแกรม Qauntity One Version 4.4.1 บริษัท Bio-Rad Laboratories, USA
10. เครื่องทำน้ำปลอดประจุ (ultra pure water) รุ่น Maxima บริษัท Elga, UK
11. เครื่องทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) รุ่น Mini gel electrophoresis system บริษัท Mupid-2 Advance, Japan
12. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-325 และ ES-315, Japan
13. เครื่องปั่นผสม (vortex) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
14. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (microcentrifuge) บริษัท Bioproduct, UK
15. เครื่องเปลี่ยนอากาศเป็นแก๊สไนโตรเจน ยี่ห้อ Peak
16. เครื่องผสมสาร (vortex-Genie 2) รุ่น G-560E บริษัท Scientific, USA
17. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle) รุ่น 2400 บริษัท Perkin Elmer™ Instruments, USA
18. เครื่องวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอ (nanodrop) รุ่น Nanodrop 2000 บริษัท Scientific, USA
19. เครื่องวัด A_w (water activity) บริษัท Charpa Technocenter, USA

20. จานเลี้ยงเชื้อ (plates) ขนาด 15×100 มิลลิเมตร บริษัท Sac Science-Eng, Thailand
21. ชุดเครื่องไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)
    - ลิควิดโครมาโตกราฟี (liquid chromatography) รุ่น prostar ของบริษัท Varian, USA
    - คอลัมน์ (column) Luna ไมครอน C18 ขนาด 250×4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร บริษัท Phenomenex, USA
    - คอลัมน์ (column) Luna ไมครอน C18 ขนาด 150×4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร บริษัท Phenomenex, USA
22. เดซิกเคเตอร์ (Desiccator) บริษัท Scientific Industries, USA
23. ตู้แช่จุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Sandenintercool, Thailand
24. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Contherm Scientific รุ่น ISSCO
25. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประกอบในประเทศไทย
26. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ New Brunswick Scientific บริษัท Edison, U.S.A.
27. ตู้เย็น (Refrigerator) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส Sandenintercool, Thailand
28. ตู้ลามินาโฟล (laminar flow) รุ่น V6-T ขนาด 2×4 ฟุต บริษัท Lab micro และยี่ห้อ Clean รุ่น Mark II บริษัท Lab service, Thailand
29. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Mammert, Germany
30. ตู้อบลมร้อนของ Memmert รุ่น model 600, Germany
31. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Contherm Scientific, New Zealand
32. ถุงมือยาง ขนาดกลาง ยี่ห้อ SemperGuard รุ่น 0537 บริษัท สยามเซมเพอร์เมจ, Thailand
33. ถุงใส่ตัวอย่างสำหรับเครื่องตีบดผสมอาหาร (stomacher bag) บริษัท Labsystem, Thailand
34. ถ้วยอลูมิเนียมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร สูง 6 เซนติเมตร
35. บีกเกอร์ขนาด 200 และ 1000 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Pyrex, Germany
36. ปิเปตต์แก้วขนาด 1, 5 และ10 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Qualicolor
37. แผ่นพาราฟฟิลม์ บริษัท Menasha

38. แผ่นสไลด์ ขนาด 25.6×76.2 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Sail Brand, China
39. พาสเจอร์ปิเปตแก้ว ขนาด 230 มิลลิเมตร รุ่น D812 บริษัท Volac
40. ฟลาส์ก (Flask) 250 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Pyrex, Germany
41. ไมโครเวฟ ยี่ห้อ Sharp รุ่น R-250
42. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 2.5, 20, 200 และ1000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf, Thailand
43. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 5 มิลลิลิตร บริษัท Mettler, Thailand
44. หัวกรองสำเร็จ (syringe filter) ขนาด 0.22 ไมโครเมตร บริษัท Furtune Scientific, Thailand
45. หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16×150 และ 13×100 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Pyrex, Germany
46. หลอดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR tube) บริษัท Mettler, Thailand
47. หลอดไมโครทิวป์ (microtube) ขนาด 0.6 และ 2.0 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Genuine Axygen Quality รุ่น MCT-0600C
48. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB14 บริษัท Memmert, Germany
49. อ่างอัลตร้าโซนิก (Ultrasonic bath) รุ่น SONOREX RX 100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany
50. ฮีมาไซโตมีเตอร์ (haemacytometer) บริษัท Precicolor, Germany
51. Cork borer ขนาด 5 มิลลิเมตร บริษัท Sac Science-Eng, Thailand

เคมีภัณฑ์

1. กลูโคส (glucose) บริษัท Merck, Germany
2. กรดทาร์ทาริก (tartaric acid) บริษัท Merck, Germany
3. กรดฟอร์มิก (CH_2O_2) บริษัท Merck, Germany
4. กรดอะซิติก (CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
5. คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) บริษัท RCL Labscan, Ireland
6. ชุดสำเร็จสำหรับทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (GoTaq® Green Master Mix) บริษัท Promega, USA
7. ชุดสำเร็จสำหรับทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์ (QIAgen PCR Purification Kit) บริษัท Qiagen, USA
8. ชุดสำเร็จสำหรับสกัดดีเอ็นเอ (MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit) บริษัท Epicentre® Biotechnologies, US
9. น้ำตาลทราย (sucrose) บริษัท Merck, Germany
10. ผงวุ้น (agar) บริษัท Difco Laboratories, USA
11. ผงสกัดจากมอลต์ (malt extract) บริษัท Labscan, Thailand
12. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Bio-Springer, France
13. เพปโทน (peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
14. เมทานอล (CH_3OH) บริษัท Merck, Germany
15. สารมาตรฐานโอคราทอกซินเอ จาก *A. ochraceus* บริษัท Sigma, USA
16. สารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 จาก *A. flavus* บริษัท Sigma, USA
17. ไอโซโพรพานอล (isopropanol) บริษัท Merck, Germany
18. อะซิโตไนไตรล์ (CH_3CN) บริษัท Labscan, Thailand
19. เอธิเดียมโบรไมด์ บริษัท BioExcellence, Thailand
20. อะกาโรสเจล (agarose gel) บริษัท Sigma, USA
21. Dichloran Glycerin (DG 18) Agar บริษัท Merck, Germany
22. Potato Dextrose Agar (PDA Agar) บริษัท Difco Laboratories, USA
23. Tween 80 บริษัท Merck, Germany

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การสุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดข้าว

เก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวนาปรังจาก อ.ไทรน้อย จ.นนทบุรี ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 โดยในแต่ละครั้งจะเก็บตัวอย่างข้าวจำนวน 30 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม แบ่งออกเป็น

1. ข้าวเปลือกจากนาข้าว สุ่มเก็บจากกองข้าวในวันที่ทำการเก็บเกี่ยว จำนวน 10 ตัวอย่าง
2. ข้าวเปลือกจากโรงสี สุ่มเก็บจากกองข้าวที่ผ่านการอบแห้งแล้ว จำนวน 10 ตัวอย่าง
3. ข้าวสารจากโรงสีที่ผ่านการสี สุ่มเก็บจากกระสอบข้าวที่เก็บในโกดัง จำนวน 10 ตัวอย่าง

จากนั้นนำตัวอย่างเมล็ดข้าวทำการทดลองขั้นต่อไปทันที หรือเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วทำการทดลองขั้นต่อไปโดยเร็วที่สุด

3.2 การคัดแยกและจัดจำแนกราที่ผลิตสารพิษและหาปริมาณราทั้งหมดที่อยู่ในตัวอย่างเมล็ดข้าว

3.2.1 การคัดแยกราที่อยู่บนเมล็ดข้าว โดยใช้วิธี direct plating

สุ่มหยิบเมล็ดข้าวจำนวน 50 เมล็ด ต่อ 1 ตัวอย่าง วางบนอาหารแข็ง Dichloran 18% Glycerol agar (DG18) (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) โดยวางเมล็ดข้าว 10 เมล็ดต่อจานเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการปลอดเชื้อ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน บันทึกจำนวนของเมล็ดข้าวที่พบการเจริญของรา เพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราและจำนวนราที่มีโคโลนีสีเขียวอมเหลืองและสีดำ และราชนิดอื่นๆ ในทุกตัวอย่างข้าวที่ทำการทดลอง จากนั้นคัดแยกราที่มีโคโลนีสีเขียวอมเหลืองและสีดำ

3.2.2 การหาปริมาณราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวโดยวิธี Total plate count

ชั่งตัวอย่างข้าว 50 กรัม มาปั่นด้วยเครื่องปั่นนาน 1 นาที ใส่ในถุงใส่ตัวอย่างสำหรับเครื่องตีบดผสมอาหาร และเติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วตีผสมกันด้วยเครื่องตีบดผสมอาหาร นาน 2 นาที จากนั้นนำ

ตัวอย่างเจือจางด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water ที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 1000 เท่า ทำการ spread plate โดยเกลี่ยให้ทั่วจานเลี้ยงเชื้อ บนอาหารแข็ง Potato Dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) ที่ผสมกรดทาร์ทาริก 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ทำสองซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน ตรวจดูลักษณะโคโลนี และนับจำนวนโคโลนี โดยเริ่มนับตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไป แล้วรายงานผลในหน่วยของ Colony Forming Units (CFU) ต่อเมล็ดข้าว 1 กรัม

3.2.3 การจัดจำแนกราที่คัดแยกได้ และคัดเลือกราที่คาดว่าน่าจะมีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ

นำราเขียวอมเหลืองและราดำที่แยกได้จากข้อ 3.2.1 มาจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characterization) ได้แก่ ลักษณะที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (Macroscopic characters) เช่น ลักษณะ ขนาด และสีของโคโลนี และโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic characters) ได้แก่ ลักษณะของ conidia, conidiophores และ conidial heads ตามวิธีของ Samson และคณะ (2004) และ Pitt และ Hocking (2009) คัดเลือกราที่จำแนกอยู่ในสกุล *Aspergillus* เพื่อศึกษาต่อไป

3.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอของราที่คัดแยกได้

3.3.1 การผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของราเขียวอมเหลืองและโอคราทอกซินเอของราดำในสกุล *Aspergillus* บนอาหารเลี้ยงรา

นำราที่จำแนกได้ในข้อ 3.2.3 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บสปอร์โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ผสมกับ Tween 80 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดเชื้อ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) เจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ฮีมาไซโตมีเตอร์ในการนับจำนวนสปอร์ หยดสารแขวนลอยของสปอร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.3.2 การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษจากอาหารเลี้ยงรา

3.3.2.1 การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1

เมื่อบ่มครบ 7 วัน ใช้ cork borer ขนาด 5 มิลลิเมตร เจาะลงตรงกลางโคโลนี จากนั้นนำชิ้นวุ้นจำนวน 3 ชิ้น ใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิท ขนาด 5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักชิ้นวุ้น แล้วเติมเมทานอล ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สกัดอะฟลาทอกซินบี 1 ในอ่างอัลตร้าโซนิก เป็นเวลา 15 นาที กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วระเหยเมทานอลด้วยแก๊สไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเฟสเคลื่อนที่ (น้ำปลอดประจุ:อะซีโตไนไตรล์:เมทานอล (60:20:20)) (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) (Giorni และคณะ, 2008) และกรองสารสกัดที่ได้ด้วยหัวกรองสำเร็จขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วส่งวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ทันที ด้วยวิธีไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) ผ่านคอลัมน์ C18 (150x4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ ความยาวคลื่น excision (λ_{exc}) 365 และ emission (λ_{em}) 435 นาโนเมตร, อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ retention time (RT) ของสารอะฟลาทอกซินบี 1 เท่ากับ 7 นาที (ภาคผนวก ค รูป ค.3)

3.3.2.2 การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณโอคราทอกซินเอ

เมื่อบ่มครบ 7 วัน ใช้ cork borer ขนาด 5 มิลลิเมตร เจาะลงตรงกลางโคโลนี จากนั้นนำชิ้นวุ้นจำนวน 3 ชิ้น ใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิท ขนาด 5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักชิ้นวุ้น แล้วเติมเมทานอลและกรดฟอร์มิกในอัตราส่วน 25:1 (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สกัดโอคราทอกซินเอในอ่างอัลตร้าโซนิก เป็นเวลา 15 นาที กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วระเหยเมทานอลด้วยก๊าซไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเฟสเคลื่อนที่ (อะซีโตไนไตรล์:น้ำปลอดประจุ:กรดอะซิติก (49.5:49.5:1)) (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) (Dachoupakan และคณะ, 2009) และกรองสารสกัดที่ได้ด้วยหัวกรองสำเร็จ ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วส่งวิเคราะห์หาปริมาณโอคราทอกซินเอทันที ด้วยวิธี HPLC ผ่านคอลัมน์ C18 (25x4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ ความยาวคลื่น excision (λ_{exc}) 365 และ emission (λ_{em}) 460 นาโนเมตร, อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 1.0

มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ retention time (RT) ของสารโอคราทอกซินเอ เท่ากับ 11 นาที (ภาคผนวก ค รูป ค.4)

3.3.3 การเตรียมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี1 และโอคราทอกซินเอ

3.3.3.1 การเตรียมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1

เตรียมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมในคลอโรฟอร์ม ให้มีความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) จากนั้นเตรียมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 8 ความเข้มข้น คือ 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 12.5, 25, 50, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,500 ไมโครลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมเฟสเคลื่อนที่ (น้ำปลอดประจุ:อะซีโตไนไตรล์:เมทานอล (60:20:20)) (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) จนครบปริมาตร แล้วส่งวิเคราะห์อะฟลา-ทอกซินบี 1 ทันทีด้วยวิธี HPLC ใช้สภาวะเดียวกับข้อ 3.3.2.1

3.3.3.2 การเตรียมสารมาตรฐานโอคราทอกซินเอ

เตรียมสารมาตรฐานโอคราทอกซินเอความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมในสารละลายที่มีน้ำปลอดประจุผสมกับเมทานอลในอัตราส่วน 1:3 (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) ให้มีความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 9) เตรียมสารมาตรฐานโอคราทอกซินเอ 8 ความเข้มข้น คือ 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 และ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารมาตรฐานโอคราทอกซินเอ ที่ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 12.5, 25, 50, 125, 250, 500, 1,000 และ 2,500 ไมโครลิตร ตามลำดับ ใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่มีน้ำปลอดประจุผสมกับเมทานอลในอัตราส่วน 3:7 (ภาคผนวก ข หมายเลข 10) จนครบปริมาตร แล้วส่งวิเคราะห์โอคราทอกซินเอทันที ด้วยวิธี HPLC ใช้สภาวะเดียวกับข้อ 3.3.2.2

3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของราเขียวอมเหลืองที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และราดำที่ผลิตโอคราทอกซินเอ

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอของราที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ

นำราเขียวอมเหลืองที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และราดำที่ผลิตโอคราทอกซินเอ จากข้อ 3.3 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บสปอร์โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ผสมกับ Tween 80 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดเชื้อ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) เจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ฮีมาไซโตมีเตอร์ในการนับจำนวนสปอร์ หยดสารแขวนลอยของสปอร์ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว Malt Yeast Broth (MY) (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเขย่า เป็นเวลา 3 วัน สำหรับราดำ และ 5 วัน สำหรับราเขียวอมเหลือง จากนั้นกรองสายใยราด้วยชุดกรองบนกระดาษ whatman เบอร์ 1 นำสายใยราไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที หลังจากอบแล้วใส่ในเดซิกเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วชั่งสายใยราให้มีน้ำหนัก 50-60 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บดจนละเอียด จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสำเร็จ MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre® Biotechnologies, US) (ภาคผนวก ข หมายเลข 11) โดยอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอต้องนึ่งฆ่าเชื้อแล้วอบให้แห้ง วิธีการสกัดดีเอ็นเอเริ่มต้นจาก เติมสารละลาย Yeast Cell Lysis ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ RNase A ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครทิวป์ที่บดสายใยราละเอียดแล้ว ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมนานประมาณ 3 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบ 5 นาที เติม MPC Protein Precipitation ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดไมโครทิวป์หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เอียงหลอดไปมา เป็นเวลา 15 วินาที นำไปปั่นแหวงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 12) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นแหวงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2.5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 35 ไมโครลิตร จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการทดลองขั้นต่อไป หรือเก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction, PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.4.1 มาใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') เป็นฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') เป็นรีเวิร์สไพรเมอร์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตรงส่วน ITS1-5.8S-ITS4 (White และคณะ, 1990)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสประกอบด้วยส่วนผสม ดังนี้

GoTaq® Green Master Mix	12.5	ไมโครลิตร
ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์ ITS1 (100 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
รีเวิร์สไพรเมอร์ ITS4 (100 ไมโครโมลาร์)	1	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอแม่แบบ	2	ไมโครลิตร
น้ำปลอดประจุปลอดเชื้อ	8.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุทธิ	25	ไมโครลิตร

ภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle) มีดังต่อไปนี้

Initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	4	นาที
Denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	30	วินาที
Annealing	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	30	วินาที
Extention	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	45	วินาที
Final extention	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา	5	นาที
จำนวนรอบ		25	รอบ

3.4.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

เตรียมเจล 2 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งผงอะกาโรส 2 กรัมลงในขวดสำหรับเตรียมเจล เติมบัฟเฟอร์ 1X TAE (ภาคผนวก ข หมายเลข 13) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ละลายเจลด้วยไมโครเวฟ รอให้อุ่นแล้วเทเจลลงบนถาดสำหรับขึ้นรูปเจล ระวังอย่าให้เกิดฟอง ปล่อยให้เจลแข็งตัว จากนั้นนำเจลที่แข็งตัวแล้ววางลงในเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิส เทบัฟเฟอร์ 1X TAE จนท่วมเจล และโหลดผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ผสมกับสีติดตาม และโหลดดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentus, USA) เปิดเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิสโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 90 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข หมายเลข 14) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเจลแช่ในน้ำกลั่น เพื่อชะเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออก เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องตรวจสอบและถ่ายภาพเจล โดยใช้โปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 (Bio-Rad Laboratories, USA) และบันทึกผล

3.4.4 การทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากข้อ 3.4.2 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จ QIAgen PCR Purification Kit (Qiagen, USA) (ภาคผนวก ข หมายเลข 15) เริ่มจากเติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 150 ไมโครลิตร (5 เท่าของผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอ-ลิเมอเรส) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตต์ดูดขึ้นลง ดูดสารละลายที่ผสมทั้งหมด ใส่ลงใน DNA binding mini column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสที่อยู่ในหลอดด้านล่างทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสที่อยู่ในหลอดด้านล่างทิ้ง ปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง เพื่อกำจัดส่วนใสที่เหลือติดคอลัมน์ ย้ายคอลัมน์ไปยังหลอดไมโครทิวป์หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วชะคอลัมน์ด้วยน้ำปลอดประจุ 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องนาโนดรอปเพื่อวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอ ซึ่งจะต้องมี

ความเข้มข้นสูงกว่า 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และนำตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟ-เรซิสตามข้อ 3.4.3 จากนั้นส่งผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

3.4.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา

นำผลิตภัณฑ์จากข้อ 3.4.4 ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rRNA ตรงส่วน ITS1-5.8S-ITS4 โดยใช้บริการของบริษัท 1^{M} Base (ประเทศมาเลเซีย) จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (http://www.nbci.nlm.nih.gov/) ด้วยโปรแกรม Blastn

3.5 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา

3.5.1 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราบนอาหารแข็ง PDA

3.5.1.1 การเตรียมอาหารแข็ง PDA

เตรียมอาหารแข็ง PDA ให้มี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 โดยการเติมกลีเซอรอลลงในอาหารแข็ง PDA (Lahlalia และคณะ, 2005) 305, 155, 75 และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากทำให้ปลอดเชื้อแล้ว เทลงจานเลี้ยงเชื้อและวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อไม่ให้ไอน้ำเกาะที่ฝาจานเลี้ยงเชื้อ วัด A_w ด้วยเครื่องวัด A_w (Charpa Technocenter, USA) อีกครั้งเพื่อให้แน่ใจว่า A_w สุดท้ายเป็นไปตามที่ต้องการ

3.5.1.2 การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอจากอาหารแข็ง PDA ที่มี A_w ตามที่ต้องการ

นำราเขียวอมเหลืองที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และราดำที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้มากที่สุดจากข้อ 3.3 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บสปอร์โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ผสมกับ Tween 80 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดเชื้อ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) เจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ฮีมาไซโตมีเตอร์ในการนับจำนวนสปอร์ หยดสารแขวนลอยของสปอร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็ง PDA ที่ปรับให้มี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 โดยแต่ละ A_w บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส ทำสามซ้ำ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจวัดการเจริญของราโดยวัดขนาดของโคโลนีในแต่ละวันจนครบ 7 วัน และตรวจวัดการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอโดยสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอจากอาหารเลี้ยงราตามข้อ 3.3.2

3.5.2 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการผลิตสารพิษจากราบน rice medium

3.5.2.1 การเตรียม rice medium

3.5.2.1.1 การวิเคราะห์ความชื้นของข้าวเริ่มต้น (moisture content initial, M_{Ci})

นำข้าวสารหอมมะลิบรรจุถุงชั่งน้ำหนัก 5 กรัม ในถ้วยอลูมิเนียมอบที่อุณหภูมิ 130±3 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นใส่ในเดซิกเคเตอร์ เป็นเวลา 45 นาที (AOAC, 1990) ชั่งน้ำหนักข้าวหลังผ่านการอบ นำค่าที่ได้ไปคำนวณตามสูตร

$$\%M_{ci} = \frac{(E - m) \times 100}{E}$$

โดย M_{ci} คือ ความชื้นของข้าวเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์มาตรฐานเปียก)

E คือ น้ำหนักข้าวก่อนอบ (กรัม)

m คือ น้ำหนักข้าวหลังอบ (กรัม)

3.5.2.1.2 การหาความสัมพันธ์ระหว่างความชื้น (moisture content, M_C) และ A_w

นำค่าความชื้นของข้าวเริ่มต้นที่ได้จากข้อ 3.5.2.1.1 ส่งวิเคราะห์หากราฟพฤติกรรมการดูดและคายความชื้นของข้าว (rice moisture sorption isotherm) โดยใช้บริการจากบริษัทจาร์พา เท็คเซ็นเตอร์ จำกัด (ประเทศไทย) ทำให้ทราบค่าความชื้นของข้าวที่ A_w ต่างๆ ตามที่กำหนดดังตารางที่ 3.1 จากนั้นนำค่าความชื้นของข้าวที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณน้ำที่ต้องเติมลงใน rice medium

ตารางที่ 3.1 ค่าความชื้นของข้าวที่ได้จากกราฟพฤติกรรมการดูดและคายความชื้นของข้าว (ภาคผนวก ก หมายเลข 5)

A_w	ความชื้นของข้าวที่ต้องการ (เปอร์เซ็นต์มาตรฐานเปียก)
0.65	8.86
0.75	9.58
0.85	13.19
0.95	34.75

3.5.2.1.3 การปรับความชื้นของข้าว โดยการหาปริมาณน้ำที่ต้องเติมลงใน rice medium เพื่อให้ได้ A_w ตามที่ต้องการ

นำข้าวสารบรรจุถุงมาชั่งน้ำหนักตามปริมาณที่ใช้สำหรับการทดลอง อบข้าวสาร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เป็นการลดปริมาณความชื้นในเมล็ดข้าวให้ต่ำลง เพื่อง่ายต่อการปรับ A_w ตามที่ต้องการ ชั่งน้ำหนักข้าวหลังผ่านการอบ นำน้ำหนักข้าวก่อนและหลังการอบไปคำนวนหาความชื้นของข้าวเริ่มต้นตามข้อ 3.5.2.1.1 และนำค่าความชื้นของข้าวเริ่มต้นที่คำนวณได้ มาคำนวณหาปริมาณน้ำที่ต้องเตรียมลงในข้าว ตามสูตร

$$w_w = w_f - w_i$$

$$w_f = \left(\frac{1 - M_{ci}}{1 - M_{cf}} \right) w_i$$

โดย w_w คือ ปริมาณน้ำที่ต้องเตรียมลงไป (กรัม)

w_f คือ น้ำหนักข้าวรวมกับน้ำหนักน้ำ (กรัม)

M_{ci} คือ ความชื้นของข้าวเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์มาตรฐานเปียก)

M_{cf} คือ ความชื้นของข้าวที่ต้องการ (เปอร์เซ็นต์มาตรฐานเปียก) (จากตารางที่ 3.1)

w_i คือ น้ำหนักเมล็ดข้าวเริ่มต้น (กรัม)

จากนั้นเติมปริมาณน้ำตามที่คำนวณได้ลงในข้าวที่ผ่านการอบแล้ว คลุกเคล้าให้น้ำกระจายอย่างทั่วถึง ภายในกล่องที่ปิดสนิด นำไปเก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน คลุกข้าวให้เข้ากันทุกวัน เมื่อครบ 7 วัน นำข้าวไปวัด A_w ด้วยเครื่องวัด A_w (Charpa Technocenter, USA) เมื่อได้ A_w ตามที่ต้องการแล้ว แบ่งข้าวใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิท ขนาด 30 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซสเซียส เป็นเวลา 15 นาที และเก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัด A_w ด้วยเครื่องวัด A_w อีกครั้งเพื่อให้แน่ใจว่า A_w สุดท้ายเป็นไปตามที่ต้องการ

3.5.2.2 การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอจาก rice medium ที่มี A_w ตามที่ต้องการ

นำราเขียวอมเหลืองที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และราดำที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้มากที่สุดจากข้อ 3.3 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บสปอร์โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ผสมกับ Tween 80 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดเชื้อ (ภาคผนวก ข หมายเลข 3) เจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ฮีมาไซโตมีเตอร์ในการนับจำนวนสปอร์ หยดสารแขวนลอยของสปอร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบน rice medium ที่ปรับให้มี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 แล้ว

โดยแต่ละค่า A_w บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส ทำสามซ้ำ เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นตรวจวัดการเจริญของราโดยวัดขนาดของโคโลนีในแต่ละวันจนครบ 7 วัน และตรวจวัดการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอโดยใช้ช้อนตักสารที่ปลอดเชื้อตักเมล็ดข้าวสารที่มีราเจริญอยู่ตรงกลางโคโลนี ชั่งน้ำหนักให้ใกล้เคียง 0.2700 กรัม ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยของวุ้นจำนวน 3 ชิ้น ที่เจาะโดยใช้ cork borer ขนาด 5 มิลลิเมตรจากอาหารแข็ง PDA จากนั้นสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอจาก rice medium ตามข้อ 3.3.2

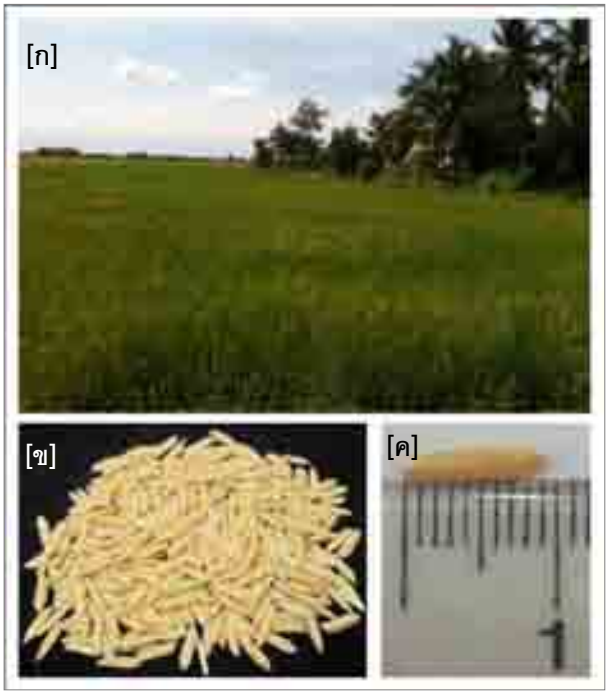
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ตัวอย่างเมล็ดข้าว

ตัวอย่างเมล็ดข้าวนาปรังที่เก็บจาก อำเภอไทรน้อย จังหวัดนนทบุรี ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 ประกอบด้วยข้าวสายพันธุ์ กข 35, สุพรรณบุรี 60, พวงทอง และพิษณุโลก ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยในแต่ละช่วงเดือนสุ่มเก็บตัวอย่างข้าวจำนวน 30 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม แบ่งออกเป็นตัวอย่างข้าว 3 ชนิด คือ

1. ข้าวเปลือกจากนา (10 ตัวอย่าง) ที่ถูกเก็บเกี่ยวโดยรถเกี่ยวข้าว จากนั้นสุ่มเก็บจากกองข้าวในวันที่ทำการเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 4.1 [ก]) ลักษณะเมล็ดข้าวเปลือกมีสีเหลืองอ่อน มีความชื้นสูง มีเศษหญ้า หิน ดิน และแมลงที่ตายแล้ว ปนอยู่กับเมล็ดข้าวเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 4.1 [ข]) เมล็ดข้าวยาวประมาณ 1.0 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.1 [ค])



ภาพที่ 4.1 สถานที่ [ก], ลักษณะเมล็ดข้าวเปลือก [ข] และขนาดเมล็ดข้าว [ค] ที่สุ่มเก็บจากนาข้าว

2. ข้าวเปลือกจากโรงสี (10 ตัวอย่าง) สุ่มเก็บจากกองข้าวที่ผ่านการอบด้วยเครื่องอบแห้งที่อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเมล็ดข้าวมีความชื้น 14 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นข้าวเปลือกถูกกองบนลานซีเมนต์ พร้อมขายหรือนำมาสีเป็นข้าวสารต่อไป (ภาพที่ 4.2 [ก]) ลักษณะเมล็ดข้าวมีสีเหลืองเข้มออกน้ำตาลอ่อนๆ เมล็ดข้าวอวบเต็มเมล็ดมีความยาวประมาณ 1.0 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.2 [ข] และ [ค]) ซึ่งก่อนการอบเมล็ดข้าวจะผ่านการคัดแยกเศษวัสดุต่างๆ ด้วยเครื่องคัดแยก ทำให้มีเศษดิน หิน และแมลงปะปนอยู่เล็กน้อย

ภาพที่ 4.2 สถานที่ [ก], ลักษณะเมล็ดข้าวเปลือก [ข] และขนาดเมล็ดข้าว [ค] ที่สุ่มเก็บจากกองข้าวที่ผ่านการอบแห้งจากโรงสี

3. ข้าวสารจากโรงสีที่ผ่านการสีด้วยเครื่องสีข้าว (10 ตัวอย่าง) จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างจากกระสอบข้าวที่เก็บในโกดังในโรงสี (ภาพที่ 4.3 [ก]) ลักษณะเมล็ดข้าวมีสีขาวใส เมล็ดข้าวยาวประมาณ 0.8 เซนติเมตร ไม่มีเศษวัตถุอื่นๆ ปนอยู่กับเมล็ดข้าวสาร (ภาพที่ 4.3 [ข] และ [ค])

ภาพที่ 4.3 สถานที่ [ก], ลักษณะเมล็ดข้าวสาร [ข] และขนาดเมล็ดข้าว [ค] ที่สุ่มเก็บจากกระสอบข้าวในโกดัง

4.2 การคัดแยกราที่คาดว่าผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอและหาปริมาณราทั้งหมดที่อยู่ในตัวอย่างเมล็ดข้าว

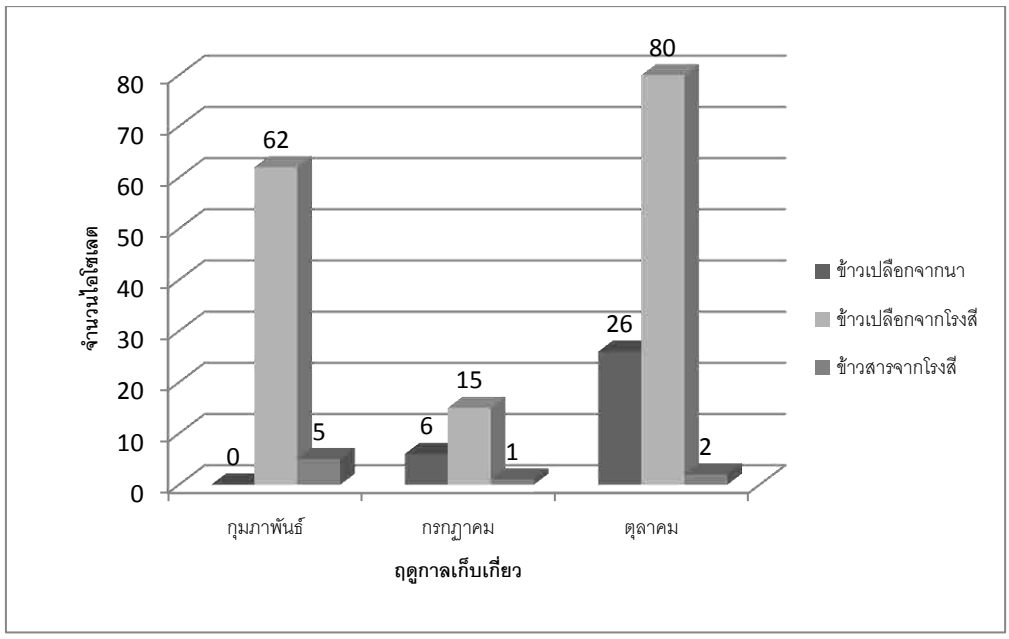
4.2.1 การคัดแยกราที่อยู่บนเมล็ดข้าว โดยวิธี direct plating

จากการสุ่มหยิบเมล็ดข้าวจากตัวอย่างข้าวเปลือกจากนา ข้าวเปลือกจากโรงสี และข้าวสารจากโรงสี ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 ทั้งหมด 90 ตัวอย่าง วางบนอาหารแข็ง DG18 ด้วยวิธี direct plating (ภาพที่ 4.4) สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 1,478 ไอโซเลต เป็นราในสกุล *Aspergillus* 272 ไอโซเลต โดยแบ่งออกเป็นราเขียวอมเหลือง (yellow-green *Aspergillus*) 197 ไอโซเลต, ราดำ (black *Aspergillus*) 75 ไอโซเลต และราในสกุลอื่นๆ 1,206 ไอโซเลต ในตัวอย่างข้าวทั้งสามชนิดพบราเขียวอมเหลืองในเดือนกุมภาพันธ์ 67 ไอโซเลต เดือนกรกฎาคม 22 ไอโซเลต และเดือนตุลาคม 108 ไอโซเลต ตัวอย่างข้าวเปลือกจากโรงสีมีจำนวนไอโซเลตของราเขียวอมเหลืองมากที่สุดในทุกฤดูกาลเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะในเดือนตุลาคมมีจำนวนไอโซเลตสูงถึง 80 ไอโซเลต ในขณะที่ตัวอย่างข้าวสารจากโรงสีพบจำนวนไอโซเลต

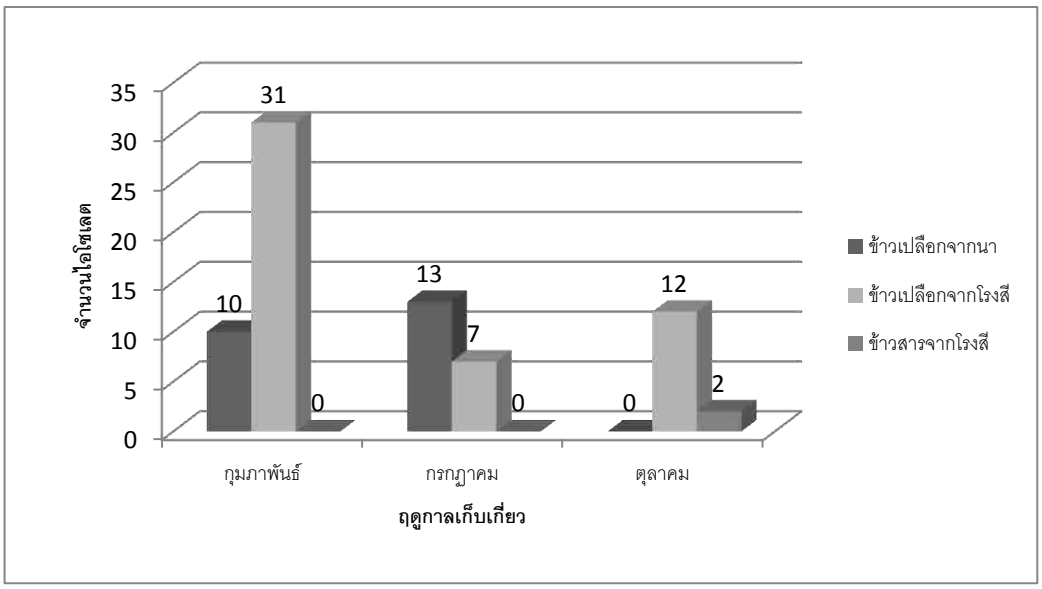
ของราดังกล่าวทั้งสามฤดูกาลเก็บเกี่ยวรวมกันเพียง 8 ไอโซเลต (ภาพที่ 4.5) สำหรับราดำพบในตัวอย่างข้าวทั้งสามชนิด ในเดือนกุมภาพันธ์ 41 ไอโซเลต เดือนกรกฎาคม 20 ไอโซเลต และเดือนตุลาคม 14 ไอโซเลต ตัวอย่างข้าวเปลือกจากโรงสีพบราดำมากที่สุด โดยเฉพาะตัวอย่างข้าวเปลือกที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์มีจำนวนไอโซเลตสูงที่สุด ยกเว้นในเดือนกรกฎาคมที่ตัวอย่างเปลือกจากนามีจำนวนไอโซเลตของราดำสูงกว่าตัวอย่างข้าวเปลือกจากโรงสี (ภาพที่ 4.6) และราในสกุลอื่นๆ ส่วนใหญ่เป็นราในสกุล *Curvularia* *Penicillium* และ *Rhizopus* โดยเฉพาะในเดือนกรกฎาคมพบราในสกุลอื่นๆ มากที่สุดในทุกตัวอย่างข้าว (ภาพที่ 4.7)

ภาพที่ 4.4 คัดแยกราจากตัวอย่างข้าวเปลือกจากนา [ก], ข้าวเปลือกจากโรงสี [ข] และข้าวสารจากโรงสี [ค] โดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

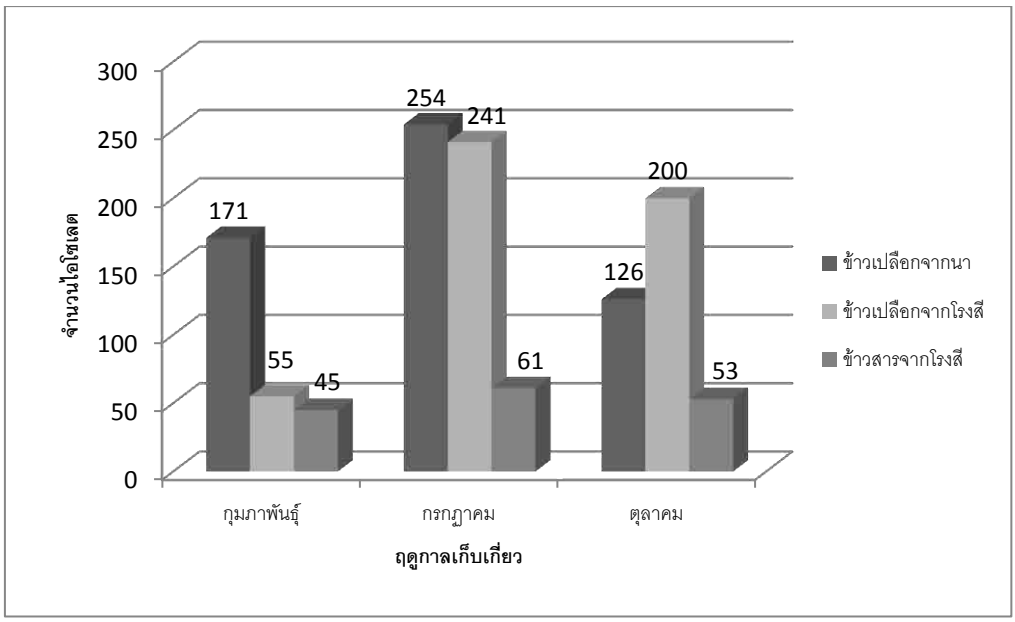
ตัวอย่างข้าวเปลือกจากนาและข้าวเปลือกจากโรงสีมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในทุกฤดูกาลเก็บเกี่ยว 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ข้าวสารจากโรงสีมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดทุกฤดูกาลเก็บเกี่ยวอยู่ในช่วง 19-23.6 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเขียวอมเหลืองและราดำในตัวอย่างข้าวทุกประเภทในทุกฤดูกาลเก็บเกี่ยวมีค่าต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างข้าวเปลือกจากโรงสีในทุกฤดูกาลเก็บเกี่ยวมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเขียวอมเหลือง (16 เปอร์เซ็นต์) สูงกว่าตัวอย่างข้าวประเภทอื่นๆ โดยเฉพาะในเดือนตุลาคม ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราดำในตัวอย่างข้าวสูงสุดเพียง 5.4 เปอร์เซ็นต์ พบในตัวอย่างข้าวเปลือกจากโรงสีในเดือนกุมภาพันธ์ (ตารางที่ 4.1)



ภาพที่ 4.5 จำนวนไอโซเลตราเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าว 3 ชนิด ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 4.6 จำนวนไอโซเลตราดำในตัวอย่างข้าว 3 ชนิด ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



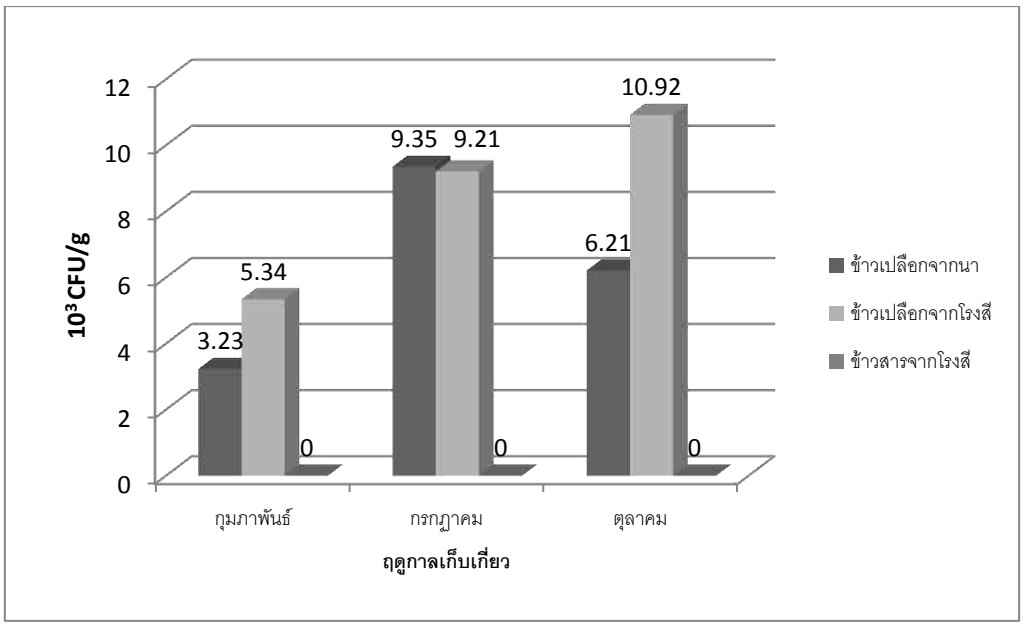
ภาพที่ 4.7 จำนวนไอโซเลตราในสกุลอื่นๆ ในตัวอย่างข้าว 3 ชนิด ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราเขียวอมเหลือง และราดำ ในตัวอย่างข้าว 3 ชนิด ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอย่าง		เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของรา		
		ราทั้งหมด	ราเขียวอมเหลือง	ราดำ
กุมภาพันธ์	ข้าวเปลือกจากนา	100	0	1.8
	ข้าวเปลือกจากโรงสี	100	8	5.4
	ข้าวสารจากโรงสี	22	0.6	0
กรกฎาคม	ข้าวเปลือกจากนา	100	1.2	2.6
	ข้าวเปลือกจากโรงสี	100	3	1.2
	ข้าวสารจากโรงสี	23.6	0.2	0
ตุลาคม	ข้าวเปลือกจากนา	100	5.2	0
	ข้าวเปลือกจากโรงสี	100	16	2
	ข้าวสารจากโรงสี	19	0.4	0.4

4.2.2 การหาปริมาณราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวโดยวิธี Total plate count

จากการนำตัวอย่างข้าวมาหาปริมาณราทั้งหมดโดยวิธี Total plate count พบว่า ข้าวเปลือกจากนามีปริมาณราทั้งหมดในทุกฤดูกาลเก็บเกี่ยวเฉลี่ย เท่ากับ 6.26×10^{3} CFU ต่อข้าว 1 กรัม พบมากที่สุดในเดือนกรกฎาคม เท่ากับ 9.35×10^{3} CFUต่อข้าว 1 กรัม และข้าวเปลือกจากโรงสีมีปริมาณราทั้งหมดสูงในทุกเดือนที่ทำการเก็บเกี่ยว โดยมีค่าเฉลี่ยของจำนวนราทั้งหมดในทุกฤดูกาลเก็บเกี่ยว เท่ากับ 8.49×10^{3} CFU ต่อข้าว 1 กรัม โดยเฉพาะในเดือนตุลาคมพบปริมาณราทั้งหมดสูงที่สุด เท่ากับ 10.92×10^{3} CFU ต่อข้าว 1 กรัม ในขณะที่ข้าวสารจากโรงสีไม่พบราในทุกฤดูกาลเก็บเกี่ยว (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.8 จำนวนราทั้งหมดในตัวอย่างข้าว 3 ชนิด ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 โดยวิธี Total plate count บนอาหารแข็ง PDA ผสมกรดทาร์ทาริก 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4.2.3 การจัดจำแนกราที่คัดแยกได้ และการคัดเลือกราที่คาดว่าน่าจะมีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ

จัดจำแนกราเขียวอมเหลืองที่คาดว่าจะเป็นราในสกุล *Aspergillus* Section *Flavi* และราดำที่คาดว่าจะเป็นราในสกุล *Aspergillus* Section *Nigri* ที่คัดแยกได้จากข้อ 4.2.1 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะที่สามารถมองเห็นด้วยตา ราเขียวอมเหลืองมีโคโลนีสีเขียวอมเหลือง เส้นใยสีขาว (ภาพที่ 4.9 [ก]) และราดำมีโคโลนีสีดำ เส้นใยสีขาว (ภาพที่ 4.9 [ง]) และโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ราเขียวอมเหลืองลักษณะเวสิเคิล (vesicle) มีรูปทรงรี ขนาดความกว้างของเวสิเคิล ประมาณ 15 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.9 [ข]) และโคนิเดีย (conidia) มีสีเขียวอ่อนรูปร่างกลมผนังเรียบ ขนาดประมาณ 4 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.9 [ค]) และราดำลักษณะเวสิ-เคิลมีรูปทรงกลม ขนาดความกว้างของเวสิเคิล ประมาณ 20 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.9 [จ]) และโคนิเดียมีสีน้ำตาลเข้มผนังขรุขระรูปร่างกลม ขนาดประมาณ 9 ไมโครเมตร (ภาพที่ 4.9 [ฉ]) จากนั้นจัดกลุ่มราเขียวอมเหลืองและราดำที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันทางสัณฐานวิทยา คัดเลือกราเขียวอมเหลืองและราดำในแต่ละกลุ่มโดยใช้หลักเกณฑ์ 3 ไอโซเลตที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน เลือก

มา 1 ไอโซเลต เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 สำหรับราเขียวอมเหลืองและโอคราทอกซินเอสำหรับราดำในการทดลองต่อไป

ภาพที่ 4.9 ตัวอย่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราในสกุล *Aspergillus* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างข้าว, [ก] โคโลนีของราเขียวอมเหลืองบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน, [ข] โคโลนีของราดำบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน, [ค] เวสิเคิลของราเขียวอมเหลืองภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า, [ง] เวสิเคิลของราดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า, [จ] โคนิเดียของราเขียวอมเหลืองภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า และ [ฉ] โคนิเดียของราดำภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

4.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอของราที่คัดแยกได้

4.3.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของราเขียวอมเหลืองที่คัดแยกได้

ราเขียวอมเหลืองในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* ที่จัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามข้อ 4.2.3 จำนวน 82 ไอโซเลตจาก 197 ไอโซเลต ถูกสุ่มมาทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ตามวิธีในข้อ 4.2.3 พบ 9 ไอโซเลตที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ คิดเป็น 10.98 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนไอโซเลตทั้งหมดที่คัดเลือกมา โดยมีปริมาณการผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 3.50±0.61 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA และปริมาณการผลิตมากที่สุด ที่ 18.99±1.86 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA (ตารางที่ 4.2) ราเขียวอมเหลืองทั้ง 9 ไอโซเลตที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 แยกได้จากตัวอย่างข้าวเปลือกจากโรงสี จากจำนวนไอโซเลตทั้งหมด 62 ไอโซเลต ในทุกฤดูกาลเก็บเกี่ยวสามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 คิดเป็น 14.52 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลตที่แยกได้จากตัวอย่างดังกล่าวในเดือนกรกฎาคมสามารถผลิตอะฟลา-ทอกซินบี 1 ได้สูงที่สุด ในขณะที่ไอโซเลตที่แยกได้จากตัวอย่างข้าวเปลือกจากนาและข้าวสารจากโรงสีไม่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.2 จำนวนไอโซเลตทั้งหมด จำนวนไอโซเลตที่คัดเลือก จำนวนไอโซเลตที่ผลิต และปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของราเขียวอมเหลือง และโอคราทอกซินเอของราดำบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

รา	จำนวนไอโซเลตทั้งหมด	จำนวนไอโซเลตที่คัดเลือก	จำนวนไอโซเลตที่ผลิต (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณการผลิต ต่ำสุด-สูงสุด (ค่าเฉลี่ย) (ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA)	
				อะฟลาทอกซินบี 1	โอคราทอกซินเอ
เขียวอมเหลือง	197	82	9 (10.98)	0.005-18.99 (3.50±0.61)	
ดำ	75	65	20 (30.77)		0.0002-5.79 (0.31±0.05)

ตารางที่ 4.3 การผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของราเขียวอมเหลืองบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ที่คัดแยกได้จากข้าวเปลือกจากนา ข้าวเปลือกจากโรงสี และข้าวสารจากโรงสี ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี 2553

ตัวอย่าง		ราเขียวอมเหลืองที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1	
		จำนวนไอโซเลต ที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 (ไมโครกรัมต่อกรัม บนอาหารแข็ง PDA)
กุมภาพันธ์	ข้าวเปลือกจากนา	0/0	0
	ข้าวเปลือกจากโรงสี	6/32 (16.22)	0.005-5.18
	ข้าวสารจากโรงสี	0/5	0
กรกฎาคม	ข้าวเปลือกจากนา	0/6	0
	ข้าวเปลือกจากโรงสี	1/7 (7.69)	18.99
	ข้าวสารจากโรงสี	0/0	0
ตุลาคม	ข้าวเปลือกจากนา	0/7	0
	ข้าวเปลือกจากโรงสี	2/23 (6.25)	0.18-2.94
	ข้าวสารจากโรงสี	0/2	0

4.3.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอของราดำที่คัดแยกได้

ราดำในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* ที่ผ่านการจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วตามข้อ 4.2.3 จำนวน 65 ไอโซเลต จาก 75 ไอโซเลต ถูกสุ่มเลือกมาทดสอบความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ พบว่าราดำ 20 ไอโซเลต สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ คิดเป็น 30.77 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนไอโซเลตทั้งหมดที่คัดเลือกมา โดยมีปริมาณการผลิตเฉลี่ย เท่ากับ 0.31±0.05 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA และปริมาณการผลิตมากที่สุด ที่ 5.79±0.84 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA (ตารางที่ 4.2) ราดำทั้ง 20 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอ เป็นราดำที่แยกได้จากข้าวเปลือกจากโรงสี 9 ไอโซเลต จากจำนวนโซเลตทั้งหมด 42 ไอโซเลต (21.43 เปอร์เซ็นต์) และเป็นราดำที่แยกได้จากข้าวเปลือกจากนา 11 ไอโซเลต จากทั้งหมด 23 ไอโซเลต (47.83 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งในทุกฤดูกาลเก็บเกี่ยวตัวอย่างข้าวเปลือก

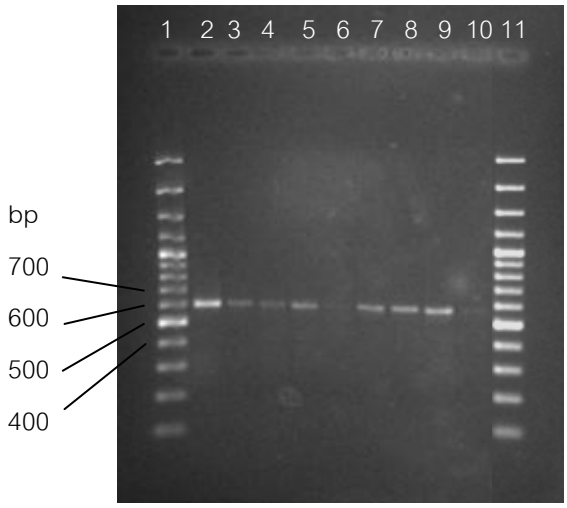
จากโรงสีมีราที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ นอกจากนี้ราดำที่คัดแยกได้จากตัวอย่างข้าวเปลือกจากนาในเดือนกุมภาพันธ์และกรกฎาคมสามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้เช่นกัน โดยเฉพาะในเดือนกรกฎาคมราดำที่แยกได้จากตัวอย่างดังกล่าวสามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้สูงสุด (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 การผลิตโอคราทอกซินเอของราดำบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ที่คัดแยกได้จากข้าวเปลือกจากนา ข้าวเปลือกจากโรงสี และข้าวสารจากโรงสี ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี 2553

		ราดำที่ผลิตโอคราทอกซินเอ	
	ตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตโอคราทอกซินเอ (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA)
กุมภาพันธ์	ข้าวเปลือกจากนา	6/10 (19.35)	0.001-0.006
	ข้าวเปลือกจากโรงสี	5/21 (16.13)	0.0002-0.21
	ข้าวสารจากโรงสี	0/0	0
กรกฎาคม	ข้าวเปลือกจากนา	5/13 (25)	0.001-5.79
	ข้าวเปลือกจากโรงสี	2/7 (10)	0.001-0.002
	ข้าวสารจากโรงสี	0/0	0
ตุลาคม	ข้าวเปลือกจากนา	0/0	0
	ข้าวเปลือกจากโรงสี	2/14 (14.29)	0.01-0.03
	ข้าวสารจากโรงสี	0/0	0

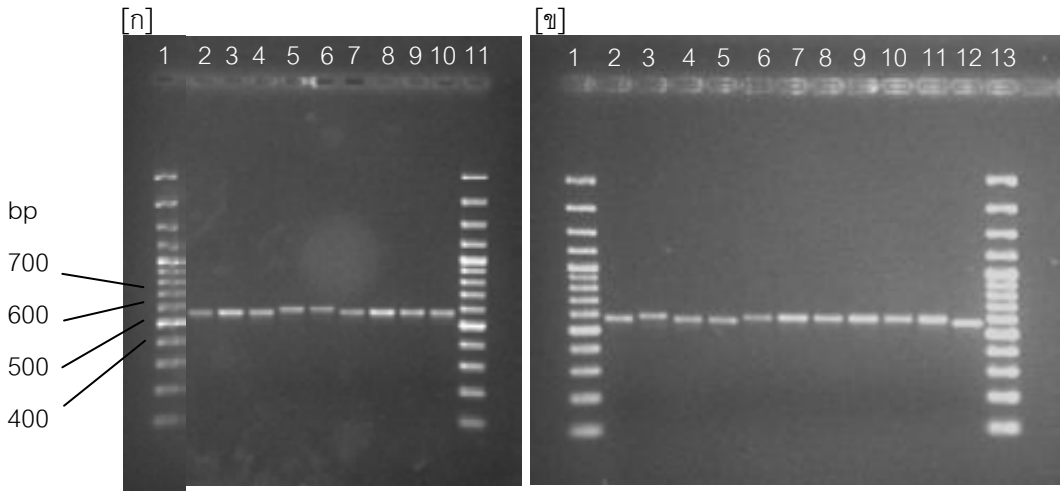
4.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของราเขียวอมเหลืองที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และราดำที่ผลิตโอคราทอกซินเอ

นำราเขียวอมเหลืองที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ทั้ง 9 ไอโซเลต และราดำที่ผลิตโอคราทอกซินเอ ทั้ง 20 ไอโซเลต จากข้อ 4.3 มาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยชุดสำเร็จ MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre® Biotechnologies, US) เพื่อใช้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 และนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้ไปตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส พบว่ามีผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีเพียงขนาดเดียวประมาณ 550-600 คู่เบส แสดงผลดังภาพที่ 4.10 และภาพที่ 4.11



ภาพที่ 4.10 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเขียวอมเหลือง จำนวน 9 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้

ช่องที่ 1 และ 11	100 bp DNA Ledder		
ช่องที่ 2 - 10	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของราเขียวอมเหลือง		
ช่องที่ 2	ไอโซเลต M2T2R4G1	ช่องที่ 7	ไอโซเลต M2T7R2G1
ช่องที่ 3	ไอโซเลต M2T3R3G1	ช่องที่ 8	ไอโซเลต M3T8R4G3
ช่องที่ 4	ไอโซเลต M2T4R1G3	ช่องที่ 9	ไอโซเลต M4T1R2G1
ช่องที่ 5	ไอโซเลต M2T4R3G1	ช่องที่ 10	ไอโซเลต M4T7R4G1
ช่องที่ 6	ไอโซเลต M2T6R4G1		



ภาพที่ 4.11 ภาพอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสของผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของราดำ จำนวน 20 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้

รูป [ก]		รูป [ข]	
ช่องที่ 1 และ 11	100 bp DNA Ledder	ช่องที่ 1 และ 13	100 bp DNA Ledder
ช่องที่ 2 และ 10	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของราดำ	ช่องที่ 2 และ 12	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของราดำ
ช่องที่ 2	ไอโซเลต F2T1R1B1	ช่องที่ 2	ไอโซเลต F3T7R2B1
ช่องที่ 3	ไอโซเลต F2T1R1B2	ช่องที่ 3	ไอโซเลต F3T10R4B1
ช่องที่ 4	ไอโซเลต F2T7R4BY1	ช่องที่ 4	ไอโซเลต M2T1R4B1
ช่องที่ 5	ไอโซเลต F2T9R2BY1	ช่องที่ 5	ไอโซเลต M2T4R2B1
ช่องที่ 6	ไอโซเลต F2T9R4BY1	ช่องที่ 6	ไอโซเลต M2T4R3B1
ช่องที่ 7	ไอโซเลต F2T9R4BY2	ช่องที่ 7	ไอโซเลต M2T4R3B2
ช่องที่ 8	ไอโซเลต F3T1R1B1	ช่องที่ 8	ไอโซเลต M2T7R3B1
ช่องที่ 9	ไอโซเลต F3T1R4B2	ช่องที่ 9	ไอโซเลต M3T4R3B1
ช่องที่ 10	ไอโซเลต F3T2R3B1	ช่องที่ 10	ไอโซเลต M3T6R1B1
		ช่องที่ 11	ไอโซเลต M4T1R4B1
		ช่องที่ 12	ไอโซเลต M4T10R2B1

4.4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของราเขียวอมเหลืองที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จ QIAgen PCR Purification Kit (Qiagen, USA) และตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส แล้วส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rRNA เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของรา เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rRNA ของราเขียวอมเหลืองที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ทั้ง 9 ไอโซเลต ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.nbci.nlm.nih.gov) ด้วยโปรแกรม Blastn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของราเขียวอมเหลืองที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 จำนวน 8 ไอโซเลต มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. flavus* เท่ากับ 99-100 เปอร์เซ็นต์ และอีก 1 ไอโซเลต มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. tamarii* เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก จ) *A. flavus* 8 ไอโซเลต จาก 9 ไอโซเลต (88.89 เปอร์เซ็นต์) ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 อยู่ในช่วง 0.005-18.99 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA ในขณะที่ *A. tamari* 1 ไอโซเลต จาก 9 ไอโซเลต (11.11 เปอร์เซ็นต์) ที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ เท่ากับ 0.14±0.02 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA และพบว่าราเขียวอมเหลืองไอโซเลต M3T8R4G3 ที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้สูงที่สุด (18.99±1.86) คือ *A. flavus* (ตารางที่ 4.5)

4.4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของราดำที่ผลิตโอคราทอกซินเอ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rRNA ของราดำที่ผลิตโอคราทอกซินเอทั้ง 20 ไอโซเลต ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.nbci.nlm.nih.gov/) ด้วยโปรแกรม Blastn พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของราดำที่ผลิตโอคราทอกซินเอได้จำนวน 11 ไอโซเลต มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. aculeatus* เท่ากับ 99-100 เปอร์เซ็นต์, 7 ไอโซเลต มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. niger* เท่ากับ 99-100 เปอร์เซ็นต์, 1 ไอโซเลต มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. tubingensis* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และอีก 1 ไอโซเลต มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A. carbonarius* เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก จ) *A. aculeatus* เป็นราดำที่พบมากที่สุด (55 เปอร์เซ็นต์) แต่ผลิตโอคราทอกซินเอได้ในปริมาณต่ำ อยู่ในช่วง 0.0005-0.03 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม รองลงคือ

A. niger พบ 35 เปอร์เซ็นต์ ผลิตโอคราทอกซินเอได้ในช่วง 0.0002-0.21 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม, *A. tubingensis* พบ 5 เปอร์เซ็นต์ ผลิตโอคราทอกซินเอได้ เท่ากับ 0.009±0.004 และ *A. carbonarius* พบ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นราดำ (ไอโซเลต F3T10R4B1) ที่ผลิตโอคราทอกซินเอได้สูงที่สุด เท่ากับ 5.79±0.85 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA ซึ่งมากกว่าการผลิตโอคราทอกซินเอของราดำชนิดอื่นๆ ถึง 1,000 เท่า (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.5 ชนิดของราที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ผ่านการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rRNA เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

ชื่อไอโซเลต	ปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 (ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA)	แหล่งที่มาของข้าว	ฤดูการเก็บเกี่ยว	ชนิดของรา
M2T2R4G1	0.005±0.001	ข้าวเปลือกจากโรงสี	กุมภาพันธ์	*A. flavus*
M2T3R3G1	0.06±0.03	ข้าวเปลือกจากโรงสี	กุมภาพันธ์	*A. flavus*
M2T4R1G3	5.18±0.47	ข้าวเปลือกจากโรงสี	กุมภาพันธ์	*A. flavus*
M2T4R3G1	2.63±0.59	ข้าวเปลือกจากโรงสี	กุมภาพันธ์	*A. flavus*
M2T6R4G1	1.37±0.86	ข้าวเปลือกจากโรงสี	กุมภาพันธ์	*A. flavus*
M2T7R2G1	0.14±0.02	ข้าวเปลือกจากโรงสี	กุมภาพันธ์	*A. tamarii*
M3T8R4G3	18.20±1.86	ข้าวเปลือกจากโรงสี	กรกฎาคม	*A. flavus*
M4T1R2G1	0.01±0.01	ข้าวเปลือกจากโรงสี	ตุลาคม	*A. flavus*
M4T7R4G1	0.03±0.003	ข้าวเปลือกจากโรงสี	ตุลาคม	*A. flavus*

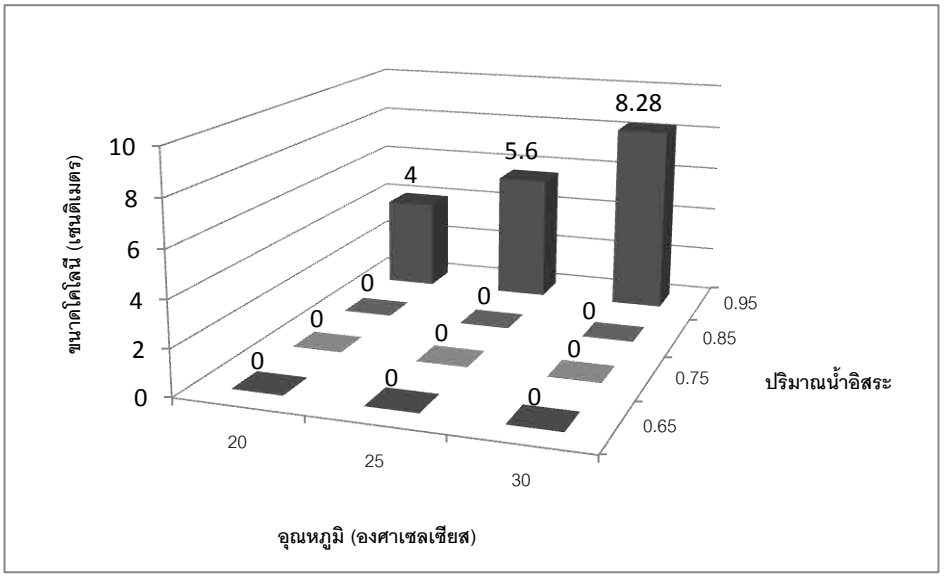
ตารางที่ 4.6 ชนิดของราที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอที่ผ่านการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rRNA เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

ชื่อไอโซเลต	ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA)	แหล่งที่มาของข้าว	ฤดูการเก็บเกี่ยว	ชนิดของรา
F2T1R1B1	0.004±0.003	ข้าวเปลือกจากนา	กุมภาพันธ์	*A. aculeatus*
F2T1R1B2	0.006±0.0004	ข้าวเปลือกจากนา	กุมภาพันธ์	*A. aculeatus*
F2T7R4BY1	0.001±0.0002	ข้าวเปลือกจากนา	กุมภาพันธ์	*A. aculeatus*
F2T9R2BY1	0.002±0.0005	ข้าวเปลือกจากนา	กุมภาพันธ์	*A. aculeatus*
F2T9R4BY1	0.002±0.0008	ข้าวเปลือกจากนา	กุมภาพันธ์	*A. aculeatus*
F2T9R4BY2	0.004±0.003	ข้าวเปลือกจากนา	กุมภาพันธ์	*A. aculeatus*
F3T1R1B1	0.007±0.008	ข้าวเปลือกจากนา	กรกฎาคม	*A. aculeatus*
F3T1R4B2	0.0005±0.0003	ข้าวเปลือกจากนา	กรกฎาคม	*A. aculeatus*
F3T2R3B1	0.006±0.002	ข้าวเปลือกจากนา	กรกฎาคม	*A. aculeatus*
F3T7R2B1	0.002±0.001	ข้าวเปลือกจากนา	กรกฎาคม	*A. aculeatus*
F3T10R4B1	5.79±0.85	ข้าวเปลือกจากนา	กรกฎาคม	*A. carbonarius*
M2T1R4B1	0.003±0.003	ข้าวเปลือกจากโรงสี	กุมภาพันธ์	*A. niger*
M2T4R2B1	0.11±0.012	ข้าวเปลือกจากโรงสี	กุมภาพันธ์	*A. niger*
M2T4R3B1	0.21±0.03	ข้าวเปลือกจากโรงสี	กุมภาพันธ์	*A. niger*
M2T4R3B2	0.0002±0.002	ข้าวเปลือกจากโรงสี	กุมภาพันธ์	*A. niger*
M2T7R3B1	0.009±0.004	ข้าวเปลือกจากโรงสี	กุมภาพันธ์	*A. tubingensis*
M3T4R3B1	0.002±0.0001	ข้าวเปลือกจากโรงสี	กรกฎาคม	*A. niger*
M3T6R1B1	0.003±0.0007	ข้าวเปลือกจากโรงสี	กรกฎาคม	*A. niger*
M4T1R4B1	0.012±0.015	ข้าวเปลือกจากโรงสี	ตุลาคม	*A. niger*
M4T10R2B1	0.03±0.003	ข้าวเปลือกจากโรงสี	ตุลาคม	*A. aculeatus*

4.5 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา *A. flavus* M3T8R4G3 และ *A. carbonarius* F3T10R4B1

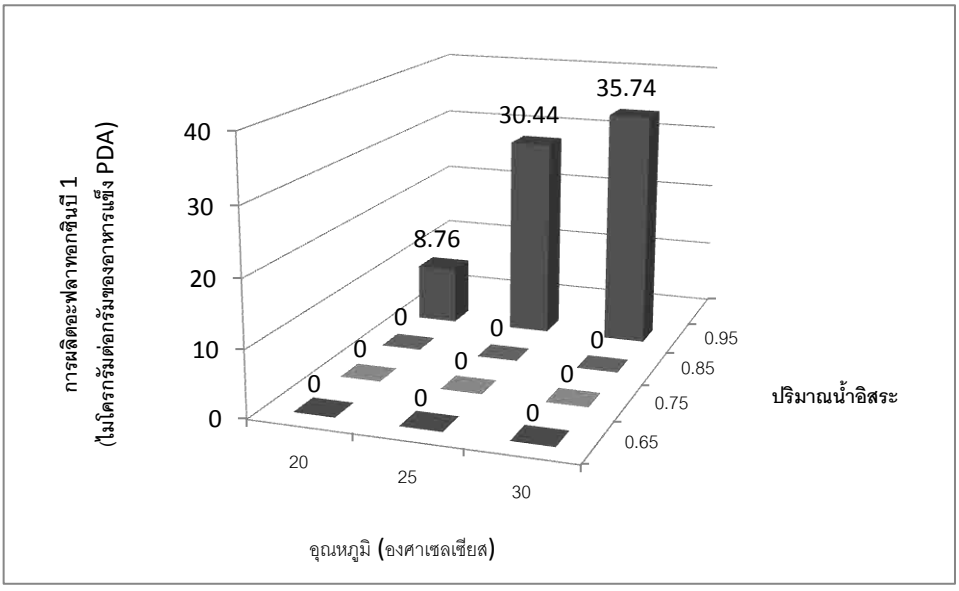
4.5.1 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 บนอาหารแข็ง PDA ของ *A. flavus*

นำ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้มากที่สุด เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่มี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 โดยแต่ละ A_w บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *A. flavus* M3T8R4G3 สามารถเจริญได้ที่ A_w 0.95 เพียงค่าเดียว ของทุกอุณหภูมิที่ใช้ทดลอง โดยขนาดของโคโลนี ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีขนาดเล็กที่สุด เท่ากับ 4 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีขนาดโคโลนี เท่ากับ 5.6 และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีขนาดโคโลนีใหญ่ที่สุด เท่ากับ 8.28 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.12)



ภาพที่ 4.12 ขนาดโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA ณ วันที่ 7 ของการบ่มโดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส

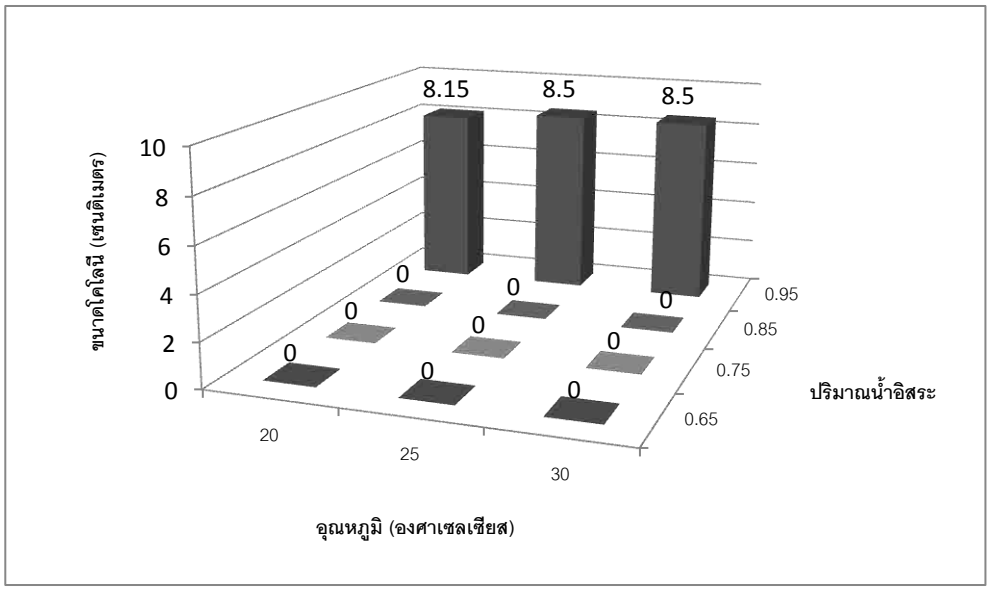
สำหรับการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 แต่ละ A_w บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าราชนิดนี้สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ เมื่อมีการเจริญ นั่นคือที่ A_w 0.95 เพียงค่าเดียว โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ สูงที่สุด เท่ากับ 35.74±5.40 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA รองลงมาที่อุณหภูมิ 25 และ 20 องศาเซลเซียส เท่ากับ 30.44±0.34 และ 8.76±2.78 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA ตามลำดับ (ภาพที่ 4.13)



ภาพที่ 4.13 การผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

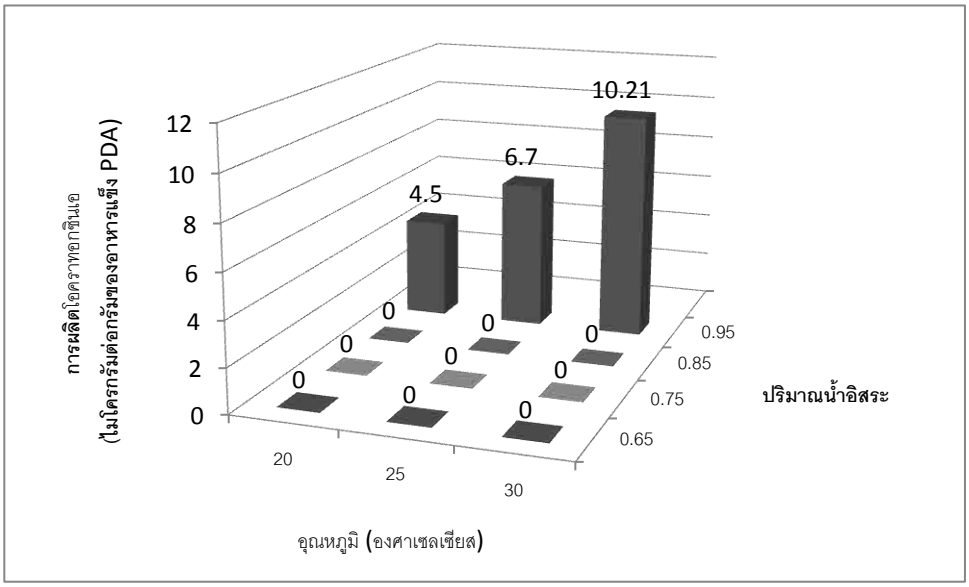
4.5.2 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอบนอาหารแข็ง PDA ของ *A. carbonarius*

นำ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้มากที่สุด เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA ที่มี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 โดยแต่ละ A_w บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *A. carbonarius* F3T10R4B1 สามารถเจริญได้ที่ A_w 0.95 เพียงค่าเดียวของทุกอุณหภูมิที่ใช้ทดลอง การเจริญของราชนิดนี้ในแต่ละอุณหภูมิไม่ต่างกันมากนัก โดยขนาดโคโลนีที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีขนาดเล็กที่สุด เท่ากับ 8.15 เซนติเมตร และที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส มีขนาดโคโลนีเท่ากัน เท่ากับ 8.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.14)



ภาพที่ 4.14 ขนาดโคโลนีของ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA ณ วันที่ 7 ของการบ่ม โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส

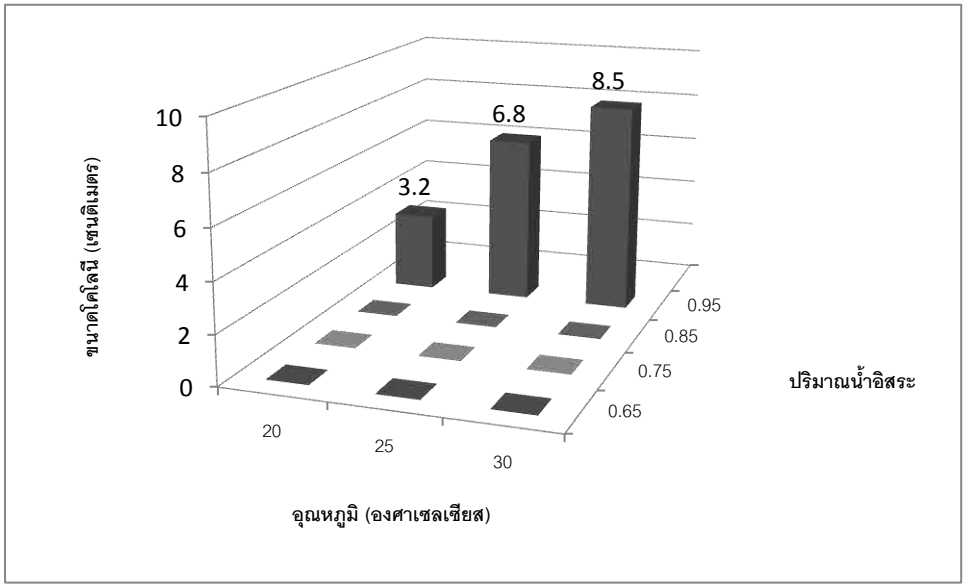
สำหรับการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 แต่ละ A_w บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าราชนิดนี้สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ เมื่อมีการเจริญ นั่นคือที่ A_w 0.95 เพียงค่าเดียว โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้สูงที่สุด เท่ากับ 10.21±5.40 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 และ 20 องศาเซลเซียส สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยสามารถผลิตได้เท่ากับ 6.70±0.25 และ 4.50±0.99 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA ตามลำดับ (ภาพที่ 4.15)



ภาพที่ 4.15 การผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

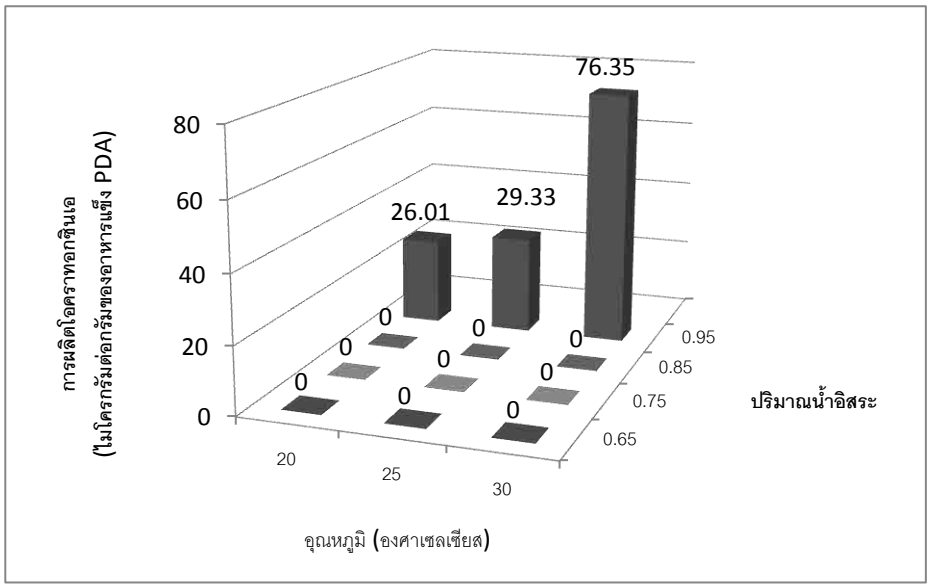
4.5.3 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 บน rice medium ของ *A. flavus*

นำ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้มากที่สุด เลี้ยงบน rice medium ที่มี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 โดยแต่ละ A_w บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า *A. flavus* M3T8R4G3 สามารถเจริญได้ในทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง แต่เจริญได้ที่ A_w 0.95 เพียงค่าเดียวเท่านั้น ในขณะที่ A_w 0.65, 0.75 และ 0.85 ราไม่สามารถเจริญได้ การเจริญของราชนิดนี้จะแปรผันตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ขนาดของโคโลนี ณ วันที่ 7 ของการบ่ม ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีขนาดเล็กที่สุด เท่ากับ 3.2 เซนติเมตร รองลงมาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีขนาดโคโลนี เท่ากับ 6.8 เซนติเมตร และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีขนาดโคโลนีใหญ่ที่สุด เท่ากับ 8.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.16)



ภาพที่ 4.16 ขนาดโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบน rice medium ณ วันที่ 7 ของการบ่ม โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส

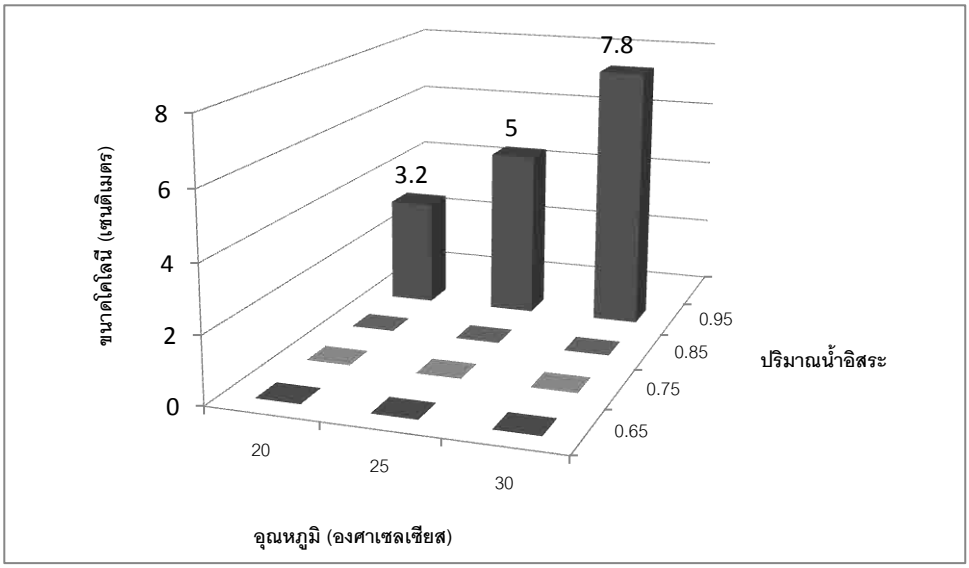
สำหรับการผลิตอะฟลาทอกซินบี1 ของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบน rice medium โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 แต่ละ A_w บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าราชนิดนี้สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ เมื่อมีการเจริญ นั่นคือที่ A_w 0.95 เพียงค่าเดียว โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้สูงที่สุด เท่ากับ 76.35±20.23 ไมโครกรัมต่อกรัมของ rice medium และการผลิตจะลดลงตามอุณหภูมิที่ต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด ที่อุณหภูมิ 25 และ 20 องศาเซลเซียส มีปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 เท่ากับ 29.33±10.16 และ 26.01±5.52 ไมโครกรัมต่อกรัมของ rice medium ตามลำดับ (ภาพที่ 4.17)



ภาพที่ 4.17 การผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบน rice medium โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

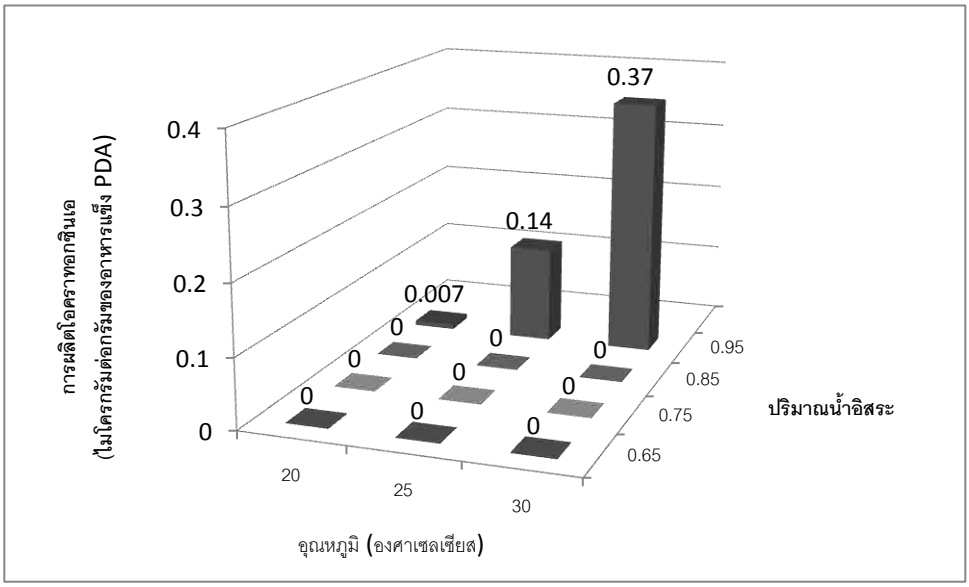
4.5.4 การศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอบน rice medium ของ *A. carbonarius*

นำ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้มากที่สุด เลี้ยงบน rice medium ที่มี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 โดยแต่ละ A_w บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าราชนิดนี้สามารถเจริญได้ทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองและเจริญได้ที่ A_w 0.95 เพียงค่าเดียว ในขณะที่ A_w 0.65, 0.75 และ 0.85 ราไม่สามารถเจริญได้ ขนาดของโคโลนี ณ วันที่ 7 ของการบ่ม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีขนาดโคโลนีใหญ่ที่สุด เท่ากับ 7.8 เซนติเมตร และเมื่ออุณหภูมิลดลงขนาดของโคโลนีลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยที่อุณหภูมิ 25 มีขนาดโคโลนี เท่ากับ 5.0 เซนติเมตร และ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีขนาดโคโลนี เท่ากับ 3.2 เซนติเมตร (ภาพที่ 4.18)



ภาพที่ 4.18 ขนาดโคโลนีของ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบน rice medium ณ วันที่ 7 ของการบ่ม โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส

สำหรับการผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบน rice medium โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 แต่ละ A_w บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ราชนิดนี้สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ เมื่อมีการเจริญ นั่นคือที่ A_w 0.95 เพียงค่าเดียว โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้สูงที่สุด เท่ากับ 0.37±0.14 ไมโครกรัมต่อกรัมของ rice medium และเมื่ออุณหภูมิลดลง ความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอของราชนิดดังกล่าวลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยที่อุณหภูมิ 25 ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอ เท่ากับ 0.14±0.01 ไมโครกรัมต่อกรัมของ rice medium และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอ เท่ากับ 0.007±0.004 ไมโครกรัมต่อกรัมของ rice medium (ภาพที่ 4.19)



ภาพที่ 4.19 การผลิตโอคราทอกซินเอของ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบน rice medium โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสุ่มหยิบเมล็ดข้าวจากตัวอย่างข้าวเปลือกจากนา ข้าวเปลือกจากโรงสี และข้าวสารจากโรงสี ที่เก็บเกี่ยวในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ กรกฎาคม และตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 ใน อ.ไทรน้อย จ.นนทบุรี วางบนอาหารแข็ง DG18 ด้วยวิธี direct plating พบว่าในเดือนกรกฎาคม (598 ไอโซเลต) และตุลาคม (501 ไอโซเลต) มีปริมาณการปนเปื้อนของราทั้งหมดใกล้เคียงกัน ซึ่งสูงกว่าเดือนกุมภาพันธ์ (379 ไอโซเลต) สอดคล้องกับผลการหาปริมาณราทั้งหมดโดยวิธี Total plate count ซึ่งตัวอย่างข้าวในเดือนกรกฎาคมและตุลาคมมีค่าเฉลี่ยของปริมาณราทั้งหมดสูงใกล้เคียงกัน เท่ากับ 9.28×10^{3} และ 8.57×10^{3} CFU ต่อข้าว 1 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าปริมาณราทั้งหมดของตัวอย่างข้าวในเดือนกุมภาพันธ์ (4.23×10^{3} CFU ต่อข้าว 1 กรัม) ประมาณ 2 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากสภาพอากาศของเดือนกรกฎาคมและตุลาคมเป็นฤดูฝน จึงมีฝนตกหนักเป็นระยะๆ โดยมีปริมาณน้ำฝนในปี 2553 ของเดือนกรกฎาคมและตุลาคมใน อ.ไทรน้อย จ.นนทบุรี เท่ากับ 89 และ 209 มิลลิเมตร ตามลำดับ (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2553) สลับกับมีแสงแดดตลอดทั้งวัน โดยมีอุณหภูมิเฉลี่ยของเดือนกรกฎาคมและตุลาคม เท่ากับ 29 และ 27 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2553) ในขณะที่สภาพอากาศของเดือนกุมภาพันธ์อยู่ในช่วงปลายฤดูหนาวต้นฤดูร้อน ไม่มีฝนตกและมีแสงแดดจัดตลอดวัน มีอุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 32 องศาเซลเซียส (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2553) พบการปนเปื้อนของราในปริมาณที่ต่ำ ดังนั้นสภาพอากาศที่มีความชื้นสูงจึงเอื้อต่อการเจริญของราและส่งผลให้การปนเปื้อนของราสูงขึ้น (Reddy และคณะ, 2008) จากการศึกษาของ Pitt และคณะ (1994) พบว่าการเก็บเกี่ยวข้าวในช่วงฤดูฝนพบการเจริญของราที่สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว เช่น *Curvularia* sp. และ *Rhizopus* sp. ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของงานวิจัยนี้ที่พบราในสกุล *Curvularia*, *Penicillium* และ *Rhizopus* ในเดือนกรกฎาคมและตุลาคมสูงกว่าเดือนกุมภาพันธ์

เมื่อพิจารณาถึงจำนวนไอโซเลตและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเขียวอมเหลือง (yellow-green *Aspergillus* หรือ *Aspergillus* section *Flavi*) ที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 พบราในกลุ่มนี้มากที่สุดในเดือนตุลาคม ซึ่งเป็นเดือนที่มีปริมาณน้ำฝนสูง ในขณะที่ราดำ (black *Aspergillus* หรือ *Aspergillus* section *Nigri*) ที่คาดว่าจะผลิตโอคราทอกซินเอพบมากที่สุดในเดือน

กุมภาพันธ์ ซึ่งมีสภาพอากาศแห้งแล้ง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Makun และคณะ (2007) ที่พบการปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* สูงในตัวอย่างข้าวที่เก็บในช่วงฤดูฝน และพบราดำมากในตัวอย่างข้าวที่เก็บในช่วงฤดูแล้ง

เมื่อพิจารณาถึงชนิดของตัวอย่างข้าวทั้งสามชนิดที่นำมาศึกษา พบราเขียวอมเหลืองมากที่สุดในตัวอย่างข้าวเปลือกจากโรงสี เช่นเดียวกับราดำที่พบมากที่สุดในตัวอย่างข้าวเปลือกจากโรงสีเช่นกัน เนื่องจากโรงสีจะนำข้าวเปลือกที่รับซื้อจากชาวนาลดปริมาณความชื้นด้วยเครื่องอบเพื่อให้มีความชื้นอยู่ที่ 14 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความชื้นที่ราไม่สามารถเจริญได้ (Reddy และคณะ, 2008) หลังจากนั้นโรงสีจะนำข้าวเปลือกมากองไว้ที่ลานซีเมนต์ทันที เพื่อรอขายหรือนำไปสีเป็นข้าวสาร ซึ่งในขั้นตอนนี้ภายในกองข้าวเปลือกเป็นบริเวณที่มีความชื้นสะสมอยู่สูงเป็นจุดที่ราสามารถเจริญและแพร่กระจายได้ โดยเฉพาะราในกลุ่ม storage fungi เช่น ราในสกุล *Aspergillus* (Reddy และคณะ, 2008) หรือลานซีเมนต์ไม่สะอาดพอเนื่องจากโรงสีจะหมุนเวียนข้าวเปลือกภายในโรงสีและข้าวเปลือกใหม่ตลอดเวลา ทำให้ไม่สามารถทำความสะอาดลานซีเมนต์ได้มากนัก (ศุภรัตน์ โฆษิตเจริญกุล และคณะ, 2546) หรือเกิดจากแมลงและสัตว์ต่างๆ เช่น นก หนู เป็นต้น ซึ่งก่อให้เกิดการสะสมของราและปนเปื้อนในข้าวเปลือกได้ (Tanaka และคณะ, 2007) จากการศึกษาของ Murphy และคณะ (2006) พบว่าเมล็ดธัญพืชในระหว่างการเก็บรักษามีโอกาสเกิดการปนเปื้อนของราได้สูง ดังนั้นการควบคุมสภาพแวดล้อมในการเก็บรักษาไม่ให้เกิดปนเปื้อนจากราจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง (Magan และ Aldred, 2007) สำหรับข้าวเปลือกจากนาพบปริมาณการปนเปื้อนของราทั้งสองกลุ่มต่ำกว่าข้าวเปลือกจากโรงสี แต่มีการปนเปื้อนของราชนิดอื่นๆ เช่น *Penicillium* sp. และ *Rhizopus* sp. ซึ่งเป็นราในกลุ่มของ field fungi สูงกว่าข้าวเปลือกจากโรงสี ในขณะที่ข้าวสารจากโรงสีมีปริมาณการปนเปื้อนของราน้อยที่สุด เนื่องจากส่วนของเปลือกข้าวที่มีการสะสมของราถูกสีออกจากกระบวนการสีข้าว ทำให้ข้าวสารมีการปนเปื้อนของราเพียงเล็กน้อย (Reddy และคณะ, 2008)

หลังจากจัดจำแนกราเขียวอมเหลืองในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* และราดำในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วสุ่มเลือกราเขียวอมเหลือง 82 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และราดำจำนวน 65 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ พบว่าราเขียวอมเหลืองจำนวน 9 ไอโซเลต จาก 82 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างข้าวเปลือกจากโรงสีในทุกฤดูกาลเก็บเกี่ยว สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 อยู่ในช่วง 0.005-18.99 ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA และเมื่อ

นำราเขียวอมเหลืองทั้ง 9 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 มาพิสูจน์เอกลักษณ์ทางชีววิทยาระดับโมเลกุล โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S-ITS4 ของ rRNA พบว่าราเขียวอมเหลืองมีความใกล้เคียงกับ *A. flavus* และ *A. tamarii* เท่ากับ 99-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งราทั้งสองชนิดนี้เป็นราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* (Varga และคณะ, 2003) โดยพบ *A. flavus* สูงถึง 88.89 เปอร์เซ็นต์ และผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้สูงสุด เท่ากับ 18.99±1.86 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ราชนิดนี้มีรายงานการปนเปื้อนในข้าวเปลือกในประเทศไทย (Pitt และคณะ, 1994) และยังพบการปนเปื้อนสูงในข้าวสารจากตลาดในประเทศเกาหลี (Park และคณะ, 2005) *A. flavus* เป็นสาเหตุสำคัญของการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 (Reddy และคณะ, 2008), ข้าวสาลีในประเทศแอลจีเรียพบการปนเปื้อนของ *Aspergillus* section *Flavi* จำนวน 150 ไอโซเลต ซึ่งเป็นราที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ โดยพบ *A. flavus* และ *A. tamarii* จำนวน 144 และ 6 ไอโซเลต ตามลำดับ (Riba และคณะ, 2010) และข้าวบาร์เลย์ในประเทศสเปนพบราที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ ส่วนใหญ่เป็นราในสกุล *Aspergillus* โดยเฉพาะ *A. flavus* และ *A. paraciticus* (Mateo และคณะ, 2011)

สำหรับการผลิตโอคราทอกซินเอของราดำที่จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* พบ 20 ไอโซเลต จาก 65 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ อยู่ในช่วง 0.0002-5.79 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมของอาหารแข็ง PDA โดยคัดแยกได้จากตัวอย่างข้าวเปลือกจากนา 11 ไอโซเลต และตัวอย่างข้าวเปลือกจากโรงสี 9 ไอโซเลต และเมื่อนำราดำทั้ง 20 ไอโซเลต ที่ผลิตโอคราทอกซินเอมาพิสูจน์เอกลักษณ์ทางชีววิทยาระดับโมเลกุลพบว่า ราดำมีความใกล้เคียงกับ *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. tubingensis* และ *A. carbonarius* เท่ากับ 99-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งราทั้งหมดเป็นสมาชิกในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* (Varga และคณะ, 2003) โดยพบ *A. aculeatus* มากที่สุดถึง 55 เปอร์เซ็นต์ แต่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอต่ำ ในขณะที่ *A. carbonarius* พบเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอสูง จากผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าตัวอย่างข้าวมีการปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* ที่ผลิตโอคราทอกซินเอ ซึ่งราในสกุลนี้เป็นสาเหตุหลักของการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในผลิตผลและผลิตภัณฑ์เกษตรหลายชนิด ดังตัวอย่างการศึกษาของ Chandra และ Sarbhoy (1997) พบว่า *A. niger* ปนเปื้อนในข้าวสารในประเทศอินเดีย, ข้าวสาลีในประเทศแอลจีเรียพบการปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus* เช่นกัน โดยส่วนใหญ่พบ *A. carbonarius* ที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้มากที่สุด (Riba และคณะ, 2008), นอกจากนี้ถั่วลิสงในประเทศอาร์เจนตินาพบ

การปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* ได้แก่ *A. cabonarius*, *A. niger*, *A. aculeatus* และ *A. japonicus* ซึ่งเป็นราที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ (Magnoli และคณะ, 2007) ในประเทศไทยมีรายงานการปนเปื้อนของรากลุ่มนี้ในเมล็ดกาแฟ (Noonim และคณะ, 2008) และในองุ่นไวน์ (Techarat และ Dachoupakan, 2012)

หลังจากพิสูจน์เอกลักษณ์ของราแล้วนำ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่ผลิตโอคราทอกซินเอได้มากที่สุด มาศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราบนอาหารแข็ง PDA และ rice medium พบว่า *A. flavus* M3T8R4G3 ไม่สามารถเจริญและผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้เมื่อ A_w น้อยกว่า 0.95 แต่สามารถเจริญและผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ A_w 0.95 ซึ่ง *A. flavus* M3T8R4G3 สามารถเจริญและผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และการเจริญและการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ลดลงเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง ซึ่งการเจริญบนอาหารแข็ง PDA กับบน rice medium ให้ขนาดโคโลนีใกล้เคียงกัน ในขณะที่การผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 บน rice medium สูงกว่าบนอาหารแข็ง PDA จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า *A. flavus* M3T8R4G3 เจริญและผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ที่อุณหภูมิและ A_w สูงบนซับสเตรทที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Heydt และคณะ (2009) ที่พบว่า *A. flavus* ที่เจริญบนอาหารแข็ง YES (Yeast Extract Sucrose agar) สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส A_w 0.99 และผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดีที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส A_w 0.99 และ *A. flavus* ที่เจริญบนเมล็ดถั่วเหลืองสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ A_w 0.99 และสามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ได้ดีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่ A_w 0.95 (Pinto และคณะ, 1991)

เมื่อนำ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่ผลิตโอคราทอกซินเอได้มากที่สุดมาศึกษาผลร่วมของอุณหภูมิและ A_w ต่อการเจริญและการผลิตโอคราทอกซินเอบนอาหารแข็ง PDA และ rice medium พบว่า *A. carbonarius* ไม่สามารถเจริญและผลิตโอคราทอกซินเอได้เมื่อ A_w น้อยกว่า 0.95 แต่สามารถเจริญและผลิตโอคราทอกซินเอได้ที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ A_w 0.95 เช่นเดียวกับ *A. flavus* M3T8R4G3 ซึ่ง *A. carbonarius* เจริญและผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การเจริญของ *A. carbonarius* จะลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำลง โดยเฉพาะเมื่อเจริญบน rice medium เช่นเดียวกับความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอที่

ลดลงเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง อย่างไรก็ตามการผลิตสารพิษดังกล่าวในอาหารแข็ง PDA สูงกว่าใน rice medium ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *A. carbonarius* ที่แยกได้จากตัวอย่างข้าวสามารถเจริญและผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่อุณหภูมิสูงและ A_w สูงเช่นเดียวกับ *A. flavus* M3T8R4G3 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Esteban และคณะ (2006) พบว่า *A. carbonarius* บนอาหารแข็ง MEA สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส A_w 0.99 และสามารถเจริญและผลิตโอคราทอกซินเอได้ที่สุดอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส A_w 0.99, *A. carbonarius* บนอาหารแข็ง MEA (Malt Extract Agar) สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส A_w 0.98 (Northolt และคณะ, 1979) อย่างไรก็ตามมีหลายงานวิจัยรายงานว่า *A. carbonarius* ผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิต่ำ เช่น การศึกษาของ Leong และคณะ (2006) พบ *A. carbonarius* ที่เจริญบนองุ่นสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ A_w 0.965 และผลิตโอคราทอกซินเอ ได้ดีที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และ A_w 0.95-0.98, และ Alborch และคณะ (2011) พบว่า *A. carbonarius* ที่เจริญบนเมล็ดข้าวโพดสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 15-35 องศาเซลเซียส และ A_w 0.96 และ 0.98 และผลิตโอคราทอกซินเอได้ดีที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และ A_w 0.98

ดังที่กล่าวมาปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราที่สำคัญ คือ สารอาหาร ความเป็นกรดด่าง ปริมาณออกซิเจน โดยเฉพาะอุณหภูมิ และ A_w มีผลต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากราเป็นอย่างมาก ดังนั้นสภาพอากาศที่ร้อนและมีความชื้นสูงจึงง่ายต่อการปนเปื้อนราและสารพิษจากรา ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อนชื้นที่มีอุณหภูมิและความชื้นเหมาะสมต่อการเจริญของราและการผลิตสารพิษจากราหลายชนิด และเนื่องจากสารพิษจากราไม่สามารถทำลายได้อย่างสมบูรณ์ วิธีการควบคุมที่ดีที่สุดคือป้องกันและเฝ้าระวังการปนเปื้อนราในทุกขั้นตอนการผลิตตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยควบคุมสภาพแวดล้อมให้ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารพิษของรา รวมถึงการใช้ระบบคุณภาพในการจัดการการผลิตที่ได้มาตรฐานในแต่ละขั้นตอนการผลิต เช่น GAP, GSP, GMP และ HACCP เพื่อให้ผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรสะอาดและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ดังนั้นผลการวิจัยครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าตัวอย่างข้าวในช่วงการเก็บเกี่ยว หลังการเก็บเกี่ยวและระหว่างการเก็บรักษาในแต่ละฤดูกาลโดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวเปลือกมีการปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus* ที่สามารถผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ ซึ่งราดังกล่าวสามารถเจริญ

และผลิตสารพิษได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิสูงและ A_w สูง ดังนั้นในระหว่างกระบวนการผลิตข้าวหากมีขั้นตอนใดมีอุณหภูมิและความชื้นเหมาะสมกับการเจริญของราแล้วจะทำให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษจากราตามมาในภายหลังได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. คุณภาพและการตรวจสอบข้าวหอมมะลิไทย. กรุงเทพฯ: จิราวัฒน์เอ็กซ์เพรส.

กรมอุตุนิยมวิทยา. 2553. สรุปลักษณะอากาศรายวัน [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.tmd.go.th/climate/climate.php [26 ตุลาคม 2553]

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2551.ประกาศจากกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พ.ศ. 2551 เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร: เมล็ดกาแฟอะราบิก้า ข้อ 5 [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.vet.chula.ac.th/~academic/Vet%20Juris/8.pdf [14 มกราคม 2555]

กระทรวงสาธารณสุข. 2529. ประกาศจากกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ข้อ 4(2) [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://iodinethailand.fda.moph.go.th/food_54/data/announ_moph/P98.pdf [14 มกราคม 2554]

กัลยาณี ดีประเสริฐวงศ์. 2555. ระบบคุณภาพอาหาร: GMP/HACCP [ออนไลน์]. แหล่งที่มา:http://www.iodinethailand.fda.moph.go.th [21 มีนาคม 2555]

คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา. 2542. พืชเศรษฐกิจ. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

งามชื่น คงเสรี. 2539. คุณภาพข้าวและผลิตภัณฑ์. กรุงเทพ: โรงพิมพ์มีเดียเพรส.

จำรัส โปร่งศิริวัฒนา. 2534. ความรู้เรื่องข้าว. กรุงเทพ: สถาบันวิจัยข้าว.

บุญทรัพย์ สูงโคตร และสมนึก อรรคไกรสีห์. 2549. การสำรวจหาปริมาณสารพิษจากเชื้อราโอคราทอกซิน (ochratoxin) และซีราลีโนน (zearalenone) ในข้าวโพด. กรมปศุสัตว์.

บุญหงส์ จงคิด. 2547. ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

ประพาส วีระแพทย์. 2517. ความรู้เรื่องข้าว. กรุงเทพ: โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช.

วัชระ ภูรีวิโรจน์กุล. 2539. พันธุ์ข้าวดีในสถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร ความรู้คู่ชาวนา. กรุงเทพ: โรงพิมพ์มีเดียเพรส.

ศุภรัตน์ โฆษิตเจริญกุล, รัตนา สุทธยาคม และสุขุม ขวัญยืน. 2546. สถานการณ์การเกิดสารพิษจากเชื้อราในข้าวเปลือกและข้าวสาร. งานวิจัยกลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตรกรมวิชาการเกษตร.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. นำเข้าและส่งออกสินค้าที่สำคัญ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php [5 พฤศจิกายน 2553]

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2554. ข้อมูลพื้นฐานทางการเกษตร [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/main.php?filename=index [24 พฤศจิกายน 2554]

สำนักงานส่งเสริมการค้าในต่างประเทศ ณ กรุงโคเปนเฮเกน ประเทศสวีเดน. 2554. รายงานการตรวจพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าวกล้องหอมมะลิไทย [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.mfa.go.th/web/479.php?id=184 [14 ธันวาคม 2554]

อนงค์ บิณฑวิหค. 2546. สารพิษจากรา: อะฟลาทอกซิน. กรุงเทพ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรรควุฒิ ทัศน์สองชั้น และนพพร คล้ายพงษ์พันธุ์. 2547. ข้าว. กรุงเทพ: สำนักพิมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอี่ยม ทองดี. 2538. ข้าว: วัฒนธรรมและการเปลี่ยนแปลง. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์มติชน.

ภาษาอังกฤษ

Abbas, H. K., Cartwright, R. D., Xie, W., Mirocha, C. J., Richard, J. L., Dvorak, T. J., Sciumbato, G. L., and Shier, W. T. 1999. Mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolates from rice with *Fusarium* sheath rot disease. Mycopathologia 147: 97-104.

Akorn. 2010. The chemical database [online]. Available from: http://ull.chemistry.uakron.edu/erd [2012, March 20]

Albunch, L., Bragulat, M.R., Abarca, M.L., and Cabañes, F.J. 2011. Effect of water activity, temperature and incubation time on growth and ochratoxin A production by Aspergillus niger and Aspergillus carbonarius on maize kernels. International Journal of Food Microbiology 147: 53–57.

Aldred, D., Magan, N.,and Olsen, M. 2004. Mycotoxins in food: detect and control. England: Woodhead Publishing Limited.

Angsubhakorn, S., Sathiropas, P., and Bramarapravat, N. 1986. Effect of rodent malaria on aflatoxin B1 induced hepatic neoplasia. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 112: 9-177.

Anli, E., and Alkis, I.M. 2010. Ochratoxin A and brewing technology: A review. Journal of the Institute of Brewing 116: 23-32.

AOAC. 1990. Official method of analysis. Association of official analytical chemists. 15th ed. Washington D.C. : Association of Official Analytical Chemists.

Badii, F., and Moss, M.O. 1998. The effect of the fungicides tridemorph, fenpropimorph and fenarimol on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. Letters in Applied Microbiology 7: 37-39.

Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Mazzette, A., and Pulina, G. 2009. The transfer

of aflatoxin M1 in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. Journal of Dairy Science 92: 4997-5004.

Bitay, F.H., Glavitis, R., and Sellyey, G. 1979. Mycotoxins. Maryar Allatorvosak Lapja 34: 417-422.

Blount, W.P. 1961. Tukey "X" disease. Journal of the British Turkey Federation 9: 52-77.

Boorman, G.A., McDonald, M.R., Imoto, S., and Persing, R.,1992. Renal lesions induce by ochratoxin A exposure in the F344 rat. Toxicologic Pathology 20: 236-245.

Breckenridge, C., Samarajeewa, U., and Arseculeratnen, S.N. 1986. Aflatoxin contamination and moisture levels in Sri Lankan market rice. Journal of the National Science Councilof Sri Lanka 2: 173-180.

Bullerman, L.B., and Bianchini, A. 2007. Stability of mycotoxins during food processing. International Journal of Food Microbiology 119: 140-146.

Castegnaro, M., and Pfohl-Leszkowicz, A. 2002. Les mycotoxines: Contaminations omnipresentes dans l'alimentation animales et humaines. Paris: Lasecurite alimentaire du consommateur.

Campbell, K.W., and White, D.G. 1995. Evaluation of corn genotypes for resistance to *Aspergillus* ear rot, kernel infection and aflatoxin production. Journal of Plant Diseases and Protection 79: 1039-1045.

Chandra, R., and Sarbhoy, A.K. 1997. Production of aflatoxins and zearalenone by the toxigenic fungal isolates obtained from stored food grains of commercial crops. Indian Phytopathology 50: 458-468.

Chang, T.T. 1979. Rice. New York: Longman Publishing Limited.

Correa, P.C., Silva, F.S., Jaren, C., Junior, P.C.A., and Arana, I. 2007. Physical and mechnical properties in rice processing. Journal of Food Engineering79: 137-142.

Cruz, A.G., Cenci, S.A., and Maia, M.C.A. 2006. Good agricultural practices in a Brazilian plant. Food Control 17: 781-788.

Dachoupakan, C., Ratomahenina, R., Martinez, V., Guiraud, J. P., Baccou, J.C., and Schorr-Galindo, S. (2009). Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. International Journal of Food Microbiology 132: 14-23.

D'Mello, J.P.E.,and Macdonald, A.M.C. 1997. Mycotoxins. Animal Feed Science Technology 69: 155-166.

Esteban, A., Abarca, M.L., Bragulat, M.R., and Cabañes, F.J. 2006. Study of the effect of wateractivity and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius*. Food Microbiology 23: 634–640.

FAO. 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Bridging the rice yield gap in Thailand [online]. Available from: http://www.fao.org/docrep/003/x6905e/x6905e0d.htm [2010, October 22]

Farrar, J.J., and Davis, R.M. 1991. Relationships among ear morphology, western flower thrips and *Fusarium* ear rot of corn. Phytopathology 81: 661-666.

FAS. 2011. Foreign Agricultural Service. Rice area yield and production world and selected countries and regions [online]. Available from: http://www.fas.usda.gov [2011, October 23]

FAS. 2012. Foreign Agricultural Service. Current World Production, Markets, and Trade Reports [online]. Available from: http://www.fas.usda.gov/report.asp [2012, January 10]

Ferna´ndez Pinto, V. E., Vaamonde, G., and Montani, M. L. 1991. Influence of water activity, temperature and incubation time on the accumulation of aflatoxin B1 in soybeans. Food Microbiology 8: 195-201.

Frisvad, J.C., Thrane, U., and Samson, R.A. 2007. Mycotoxin producers. Food Mycology 28: 135-159.

Garner, R.C., and Kingfisher, C.N. 1979. Chemical carcinogen and DNA. Biological Chemistry 1: 10-29.

Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A., and Magan, N.2008. Effect of A_w and CO_2 level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moisture maize post-harvest. International Journal of Food Microbiology 122: 109-113.

Giray, B., Girgin, G., Engin, A.B., Aydin, S., and Sahin, G. 2007. Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. Food Control 18: 23-29.

Golan, R.B. 2008. *Aspergillus* mycotoxins. Food Control 17: 70-83.

Grob, K., Stocker, J., and Colwell, R. 2009. Assurance of compliance within the production chain of food control materials by good manufacturing practice and documentation. Food Control 20: 483-490.

Haddow, A., and Blake, I. 1933. Neoplasm in fish: A report of six cases with a summary of the literature. Journal of Pathology and Bacteriology 4: 32-40.

Heydt, M. S., Hadi, A. A., Magan, N., and Geisen R. 2009. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. International Journal of Food Microbiology 135: 231-237.

Hill, R.A., Wilson, D.M., McMilllan, W.W., and Widstrom, N.W. 1985. Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxinfomation in maize and groundnut. International Trichothecelles and Other Mycotoxins 5: 79-95.

Hope, R., and Magan, N. 2003. Two dimensional environmental profiles of growth, deoxynivalenol and nivalenol productor by *Fusarium culmorum* on a wheat-based substrate. Letters in Applied Microbiology 37: 4-70.

HSDB. 2010. Hazardous Substances Data Dank [online]. Available from: http://toxnet.nlm.nih.gor/cgi-bin/sis/htmlgen? HSDB [2012, March 20]

Hussein, H. S., and Brasel, J. M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology 167: 101–134.

IARC. 1976a. Aflatoxins: In some natorally occurring substances. International Agency for Research on cancer 10: 51-72.

IARC. 1976b. Ochratoxin A: In some naturally occurring substances. International Agency for Research on cancer 10: 191-197.

IARC. 1993a. Aflatoxins: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and my cotoxins. International Agency for Research on Cancer 56:245-395.

IARC. 1993b. Some naturally occurring substances: Food items and constituents heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins.International Agency for Research on Cancer 56: 489.

Jackson, L.s., Katta, S.K., Fingerhut, D.D, Devries, J.W., and Bullerman, L.B. 1997. Effects of baking and frying on the aflatoxin B1 content of corn-based foods. Journal Agricultural and Food Chemistry 45: 5-48.

Jaimez, J., Fente, C. A., Vazquez, B. I., Franco, C. M., Cepeda, A., Mahuzier, G., and Prognon, P. 2000. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography

with fluorescence detection in food analysis. Journal of Chromatography 882: 1-10.

Japan times. 2009. Food maker detects aflatoxin in Thai rice, prevents shipment [online]. Available from: http://www.japantimes.co.jp/text/nn20081220a8.html [2011, October3]

Juan,C., Zinedine, A., Idrissi, L., and Manes, J. 2008. Ochratoxin A in rice on the Moroccan retail market. International Journal of Food Microbiology 126: 83-85.

Kamika, I., and Takoy, L.L. 2011. Natural occurrence of aflatoxin B1 in peanut collected from Kinshasa, Democratic Republic of Congo. Food Control 22: 1760-1764.

Kane, A., Creppy, E.E., Roth, A., Roschenthaler, R., and Dirheimer, G. 1986. Distribution of the [^{3}H]-label from low doses of radioactire ochratoxin A and evidence of for DNA single strand breaks caused in the lier and kidneys. Archives of Toxicalogy 58: 219-224.

Khoury, A.E., Rizk, T., Lteif, R., Azouri, H., Delia, M., and Lebrihi, A. 2008. Fungal contamination and ochratoxin A in Lebanese wine-grapes and musts. Food and Chemical Toxicology 48: 2244-2250.

Krishnamachari, K.A., Bhat, R.V., Nagarajan, V., and Tilak, T.B.G. 1975. Investigations into an outbreak of hepatitis inparts of western India. Indian International Journal of Biological and Medical Research 63: 48-103.

Krogh, P. 1978. Causal association of mycotoxic nephropathy. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica 269: 1-28.

Krogh, P., Axelson, N.H., Elling, F., and Hald, B. 1974. Experrimental porcine nephropathy. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica 1: 1-21.

Kuiper, G.T. 1998. Food safety. Toxicology and Food Safety 2: 25-48.

Lahlalia, R., Serrhinib, M.N., and Jijakli, M.H. 2005. Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. International Journal of Food Microbiology 103: 315–322.

Lasram, S., Oueslati, S., Mliki, A., Ghorhorbel, A., Silar, P., and Chebil, S. 2012. Ochratoxin A and Ochratoxigenic black *Aspergillus* species in Tunisian grapes cultivated in different geographic areas. Food Control 25: 75-80.

Lee, S.W., Han, M., Park, C.J., Seo, J.S., Bertley, L.E., and Jeon, J.S. 2011. The molecular mechanisms of rice resistance to the bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae*. Advance in Botanical Research 60: 51-88.

Leong, S. I. L., Hocking, A. D., and Eileen, S.S. 2006. Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *A. carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. International Journal of Food Microbiology 110: 209-216.

Linares, O.F. 2002. African rice *Oryza glaberrima*: History and future potential. Japanese Journal of Genetics 99: 25-57.

Liu, Z., Gao, J., and Yu, J. 2006. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. Journal of Stored Products Research 42: 468-479.

Magan, N., and Aldred, D. 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. International Journal of Food Microbiology 119: 131-139.

Magan, N., and Lacey, J. 1988. Ecological determinants of mould growth in stored grain. International Journal of food Microbiology 7: 245-256.

Magnoli, C., Astoreca, A., Ponsone, M.L., Fernandez-Juri, M.G., Barberis, C., and Dalcero, A.M. 2007. Ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in peanut seeds at different months of storage in Cordoba, Argentina. International Journal of Food Microbiology 119: 213-218.

Majerus, P., Bresch, H., and Ofteneder, H. 2000. Ochratoxin A in wine fruit juices and seasonings. Archir for Lebensmittelhygiene 51: 95-97.

Makun, H. A., Gbodi, T. A., Akanya, H. O., Sakalo, A. E., and Ogbadu, H. G. 2007. Fungi and some mycotoxins contaminating rice (*Oryza sativa*) in Niger state, Nigeria. African Journal of Biotechnology 6: 99-108.

Mantle, P. G., and McHugh, K. M. 1993. Nephrotoxic fungi in foods from nephropathy households in Bulgaria. Mycological Research 97: 205-212.

Marin, S., Sanchis, V., Saenz, R., Ramos, A.J., Vinas, I., and Magan, N. 1998. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. Journal of Applied Microbiology 84: 25-360.

Mateo, E.M., Serna,J.G., Patino, B., and Jimenez, M. 2011. Aflatoxins and ochratoxin A in stored barley grain in Spain and impact of PCR-based strategies to assess the occurrence of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus* spp. International Journal of Food Microbiology 149: 118-126.

Merwe, V.D.K.J., Fourie, K., and Scott, D.B. 1963. The structure of the aflatoxins. Indian Journal of Chemistry 16: 16-60.

Miller, D.M., Stuart, B.P., andCrowel, W.A. 1981. Experimental aflatoxicosis in swine: morphological and clinical pathological results. Canadian Journal of Comparative medicine 45: 343-351.

Mitchell, D., Aldred, D., and Magan, N. 2003. Impact of ecological factors on the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* from different regions of Europe. Aspects of Applied Biology 68: 109-116.

Moss, M.O. 1996. Mode of formation of ochratoxin A. Food Additives Contaminant 13: 5-9.

Mounjouenpou, P., Gueule, D., Fontana-Tachon, A., Guyot, B., Tondje P. R., and Guiraud, J. P. 2008. Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. International Journal of Food Microbiology 121: 234-241.

Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren,C., and Bryant, C.M. 2006. Food mycotoxins: An update. Journal of Food Science 71: 51-65.

Nguyen, M. T., Tozlovanu, T., Tran, T. L., and Leszkowicz, A. P. 2007. Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. Food Chemistry 105: 42-47.

Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C., and Samson, R.A. 2008. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. International Journal of Food Microbiology 128: 197-202.

Northolt, M.D., Van Egmond, H.P., and Paulsch, W.E. 1979. OchratoxinA production by some fungal species in relation to water activity and temperature. Journal of Food Protection 42: 485– 490.

Oka, H.I. 1987. The homeland of *Oryza sativa*. In Origin and Cultivation of Rice 57: 125-143.

Osboo, R.K., Mirabolfathy, M., Kamran, R., and Boushehri, M.S. 2012. Aflatoxin B1 in maize harvested over 3 years in Iran. Food Control 23: 271-274.

Panangala, V.S. Giambrone, J.J., Diener, J.J., Diener, U.L., Davis, N.D., Hoerr, F.J., Mitra, A., schultz, R.D., and Wilt, G.R. 1986. Effect of aflatoxin on the growth, performance, and immune responses of weanling swine. American Journal of Veterinary Research. 47: 2062-2067.

Panda, N., Heinrichs, E.A., and Hibino, H. 1984. Resistance of the rice variety Utri Rajapan to ragged stunt and tungro viruses. Crop Protection 4: 491-500.

Paranagama, P.A., Abeysekera, K.H.T., Abeywickrama, K., and Nugaliyadde, L. 2003. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of cybopogan citrate against *Aspergillusflavus* isolated from stored rice. Letters in Applied Microbiology 37: 86-90.

Park, D.L., Lee, L.S., Price, R.L., and Pohland, A.C. 1988. Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: current status and regulation. Journal of the Association of official Analytical Chemists 71: 685-703.

Park, J. W., Choi, S. Y., Hwang, H. J., and Kim, Y. B. 2005. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. International Journal of Food Microbiology 103: 305-314.

Payne, G.A. 1998. Process of contamination by aflatoxin-producing fungi and their impact on crops. International Journal of Food Microbiology 8: 279-306.

Petzinger, E., and Weidenbach, A. 2002. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. Livestock Production Science 76: 245-250.

Pinto, V.E.F., Vaamonde,G., and Montani, M.L. 1991. Influence of water activity, temperature and incubation time on the accumulation of aflatoxinB1 in soybean. Food Microbiology 8: 195-201.

Pitt, J.I., and Hocking, A. D. 2009. Fungi and food spoilage. The United Kingdom: Aspen Publishers.

Pitt, J.I., Hocking, A.D., Bhudhasamai, K., Miscamble, B.F., Wheeler, K.A., and Tanboon-Ek, P. 1994. The normal mycoflora of commodities from Thailand 2: beans rice small grains and other commodities. International Journal of Food Microbiology 23: 35-53.

Pitt, J., and Miscamble, B. 1995. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. Journal of Food Protection 58: 86-90.

Pittet, A. 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds–an updated review. Revue de Medecine Veterinaire 149: 479-492.

Ramos, J.J., Fernadez, A., Saez, J., Sanz M.C., and Marca, M.C. 1996. Effect of aflatoxicosis on blood mineral constituents of growing lambs. Small Ruminant Research 21: 233-238.

Reddy, K. R. N., Reddy, C. S., Abbas, H. K., Abel, C. A., and Muralidharan, K. 2008. Mycotoxigenic fungi mycotoxins and management of rice grains. Journal of Toxicology Toxins Reviews 27: 287-317.

Reddy, C. S., Reddy, K. R. N., Kumar, R. N., Laha, G. S., and Muralidharan, K. 2004. Exploration of aflatoxins contamination and its management in rice. Journal of Mycology and Plant Pathology 34: 816-820.

Reddy, K.R.N., Reddy, C.S., and Muralidharan, K. 2009. Detection of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in rice in India. Food Microbiology 26: 27-31.

Regulation (EU) No. 1881. 2006. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006: Setting maximum levels for certain contaminates in foodstuffs. Official Journal of The European Union L364/5-L364/21.

Regulation (EU) No. 123. 2005. Commission Regulation (EC) No. 123/2005 of 26January 2005: amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. Official Journal of The European Union L25/3-L25/5.

Reiter, E.V., Vouk, F., Bohm, J., and Fazeli, E.R. 2010. Aflatoxins in rice-A limited survey of products marketed in Austria. Food Control 21: 988-991.

Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., and Lebrihi, A. 2010. *Aspergillus* in Algerian wheat and derived products. Food and Chemical Toxicology 48: 272-277.

Riba, A., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A., and Sabaou, N. 2008. Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. International Journal of Food Microbiology 122: 85-92.

Richard, J. L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. International Journal of Food Microbiology 119: 3-10.

Russell, R., Paterson, M., and Lima, N. 2010. How will climate change affect mycotoxins in food ?. Food Research International 43: 1902-1914.

Samson, R. A., Houbraken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., Frank, J. M., and Frisvad, J. C. 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. Studies in Mycology 50: 45-61.

Sanchis, V., and Magan, N. 2004. Mycotoxins in food: detection and control. England: Woodnead Publishing Limited.

Sanchis, V., Sala, N., Palomes, A., Santamarina, P., and Burdaspal, P. 1986. Occurrence of aflatoxigenic models in foods and feed in Spain. Journal of Food Protection 47: 445-8.

Sargeant, K.C.R.B.A.A.R. 1963. Chemistry and origin of aflatoxins. Chemical Industry 2: 53-55.

Satake, T.U., and Yoshida, S. 1977. High temperature induced sterility in indica rice at flowering. Japanese Journal at Crop Science 47: 16-17.

Scudamore, K.A., Hetmamski, MT., Chan, H.K., and Collins, S. 1997. Occurrence of mycotoxins in cow materials used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. Food Additives and Contamints 14: 157-173.

Steyn, P.S. 1995. The biosynthesis of mycotoxins. Journal of Veterinary Medicine 149: 469-478.

Stevenson, D.E. 1962. Toxicity associated with certanbainbach of groundnuts. British Veterinary Journal 118: 2-531.

SCOOP European commission. 2002. Task 3.2.7. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states. Rome.

Scott, W.J. 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. Advance Food Research 7: 83-127.

Tanaka, K., Sago, Y., Zheng, Y., Nakagawa, H., and Kushiro, M. 2007. Mycotoxin in rice. International Journal of Food Microbiology 119: 59-66.

Techarat, S., and Dachoupakam, C. 2012. Growth and ochratoxin A production of black *Aspergillus* isolated from Thai wine grapes. Asian Journal of Food and Agro-Inductry 5: 172-182.

Trung, T.S., Bailly, J.D., Querin, A., Le Bars, P., and Guerre, P. 2001. Fungal contamination of rice from south Vietnam, mycotoxinogenesis of selected strains and residues in rice. Revue de Medecine Veterinaire 157: 555-560.

Turner, P.C., Moore, S.E., Hall, A.J., Prentice, A.M., and Wild, C.P. 2003. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. Environmental Health Perspectives 111: 20-217.

Twelfth, E. 2011. Report on carcinogens: aflatoxins [online]. Available from: http://ntp.niehs.nih.go/roc12 [2012, March 13]

Van der Stegen, G.H., Essens, P.J., and Van der Lijn, J. 2001. Effect of roasting condition on reduction of ochratoxin A in coffee. Journal Agricultural Food Chemistry 49: 5-13.

Varga, J., Rigo, K., Toth, B., Teren, J., and Kozakiewicz, Z. 2003. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. Food Technology Biotechnology 41: 29-46.

Vaughan, D.A., Lu, B.R., and Tomooka, N. 2008. Was asian rice (*Oryza sativa*) domesticated more than once?. Journal of Plant Diseasesand Protection 1: 16-24.

Vea, M.I., Penas, E.G., Lizarraga, E., and Cerain, A. 2012. Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zeralenone in barley from a northern region of Spain. Food Chemistry 132: 35-42.

Vesonder, R., Haliburton, J., Stubblefield, R., Gilmore, W., and Peterson, S. 1991. *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1, B2 and M1 in corn associated with equine death. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 20: 151-153.

Villa, P., and Markaki, P. 2009. Aflatoxin B1 and ochratoxin A in breakfast cereals from Athens market: occurrence and risk assessment. Food Control 20: 455-461.

Wang, J.S., Huang, Tr., Su, J.J., Liang,F., Wei, Z.L., and Liang, Y.Q. 2001. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Znuqing Village. Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention 10: 6-143.

Weidenboener, M. 2000. Encyclopedia of food mycotoxins. Food Control 4: 218-220.

Wheeler, M.H., and Greenblatt, G.A. 1988. The inhibition of melanin biosynthetic reactions in *pyricularia oryzae* by compounds that prevent rice blast disease. Experimental Mycology 12: 151-160.

Wheeler, K.A., Hurdman, B.F., and Pitt, J.I. 1991. Influence of ptt on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. International Journal of Food Microbiology 12: 141-150.

White, T.J, Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. New York: Academic Press Inc.

Wild, C.P., Hudson, G.J., Sabbioni, G., Chapot, B., Hall, A.J., and Wogan, G.N. 1992. Dietary intake of aflatoxins and the level of aflatoxin in peripheral blood in the Gambian. Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention 1: 229-234.

Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuca, K., Wang, X., Chen, G., and Yuan, Z. 2011. Metabolic pathways of ochratoxin A. Current Drug Metabolism 12: 1-10.

Yu, L.Z., Feng, H.J., and Xiang, T.R. 2008. Characterizing and estimating fungal disease severity of rice brown spot with hyperspectral reflectance data. Rice Science 15: 232-242.

Zohri, A.A., and Saber, S.M. 1993. Filamentous fungi and mycotoxin detected in coconut. Zentralblatt fur Mikrobiologie 148: 22-325.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง DG18 (Dichloran 18% Glycerol agar)

อาหารสำเร็จรูป DG18	31.6	กรัม
กลีเซอรอล	175	มิลลิลิตร

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เตรียมกลีเซอรอล175 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากทำให้ปลอดเชื้อแล้วผสมอาหารสำเร็จรูปกับกลีเซอรอล 85 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน

2. อาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar)

อาหารสำเร็จรูป PDA	39	กรัม
Difco Laboratories, USA		

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.อาหารเหลว MY (Malt Yeast Broth)

ผงสกัดจากมอล์ต (malt extract)	10	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	4	กรัม
กลูโคส (glucose)	4	กรัม

ชั่งส่วนผสมทั้งสามชนิดแล้วละลายสารในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสให้ได้ 5.6±0.1 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. การเตรียมอาหารแข็ง PDA ให้มี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95

การปรับ A_w ในอาหารแข็ง PDA ได้เลือกใช้กลีเซอรอลเพื่อเพิ่มและลด A_w ในอาหารแข็ง PDA ปริมาณของกลีเซอรอลที่ต้องเติมในอาหารแข็ง PDA ได้คำนวณเทียบกับปริมาณการเติมกลีเซอรอลในอาหารแข็ง DG18 ซึ่งเติมกลีเซอรอล 18 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 175 มิลลิลิตร พบว่าจะต้องเติมกลีเซอรอล 305, 155, 75 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารแข็ง PDA (A_w 0.98) เพื่อให้ได้ A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 ตามลำดับ โดยมีวิธีการคำนวณดังนี้

1. A_w 0.65 เติมกลีเซอรอล 305 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารแข็ง PDA

อาหารแข็ง DG18 เติมกลีเซอรอล 18 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 175 มิลลิลิตรต่อลิตร

ถ้าต้องการเติมกลีเซอรอล 305 เปอร์เซ็นต์ จะต้องเติมกลีเซอรอล

$$\frac{175\times305}{18} = 2{,}965.28$$ มิลลิลิตรต่ออาหารแข็ง PDA ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2. A_w 0.75 เติมกลีเซอรอล 155 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารแข็ง PDA

อาหารแข็ง DG18 เติมกลีเซอรอล 18 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 175 มิลลิลิตรต่อลิตร

ถ้าต้องการเติมกลีเซอรอล 155 เปอร์เซ็นต์ จะต้องเติมกลีเซอรอล

$$\frac{175\times155}{18} = 1{,}506.94$$ มิลลิลิตรต่ออาหารแข็ง PDA ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3. A_w 0.85 เติมกลีเซอรอล 75 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารแข็ง PDA

อาหารแข็ง DG18 เติมกลีเซอรอล 18 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 175 มิลลิลิตรต่อลิตร

ถ้าต้องการเติมกลีเซอรอล 75 เปอร์เซ็นต์ จะต้องเติมกลีเซอรอล

$$\frac{175\times75}{18} = 729.17$$ มิลลิลิตรต่ออาหารแข็ง PDA ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

4. A_w 0.95 เติมกลีเซอรอล 5 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารแข็ง PDA

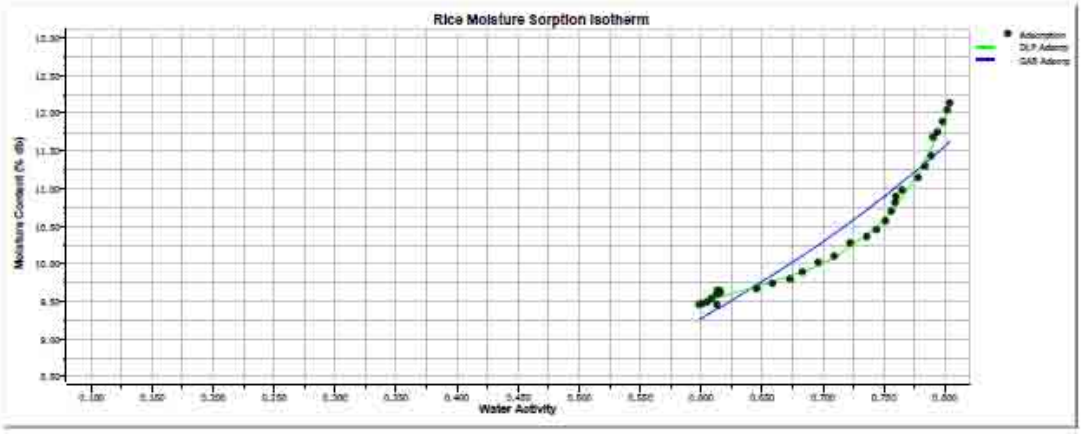
อาหารแข็ง DG18 เติมกลีเซอรอล 18 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 175 มิลลิลิตรต่อลิตร

ถ้าต้องการเติมกลีเซอรอล 5 เปอร์เซ็นต์ จะต้องเติมกลีเซอรอล

$$\frac{175\times5}{18} = 48.61$$ มิลลิลิตรต่ออาหารแข็ง PDA ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียมอาหารแข็ง PDA ให้มี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 ชั่งอาหารแข็ง PDA 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และเตรียมกลีเซอรอลปริมาตรตาม A_w ในแต่ละค่าที่คำนวณได้ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากทำให้ปลอดเชื้อแล้วผสมอาหารแข็ง PDA กับกลีเซอรอล ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน แล้วเทลงเพลท ตั้งทิ้งไว้ให้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัด A_w ด้วยเครื่องวัด A_w อีกครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่า A_w สุดท้ายเป็นไปตามที่ต้องการ

5. การคำนวณหาความชื้นที่ A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 จากกราฟพฤติกรรมการดูดและคายความชื้นของข้าว (Rice Moisture Sorption Isotherm)



รูปที่ ก.1 กราฟพฤติกรรมการดูดและคายความชื้นของข้าว

จากกราฟทำให้ทราบค่าคงที่ $b_0 = 6.61$, $b_1 = -8.8787$, $b_2 = -9.5086$ และ$b_3 = -3.9755$

นำค่าคงที่ที่ได้จากกราฟแทนในสมการ DLP (Double Log Polynomial) เพื่อหาค่าความชื้นที่ A_wตามที่ต้องการจากนั้นนำไปคำนวณปริมาณน้ำที่ต้องเติมลงใน rice medium ในขั้นต่อไป

สูตร DLP = $m = b_3x^3 + b_2x^2 + b_1x + b_0$

m = ค่าความชื้นที่ A_w ต่างๆ (เปอร์เซ็นต์มาตรฐานเปียก)

โดย $x = \ln(-\ln(A_w))$

A_wตามที่ต้องการ คือ	0.65	x = -0.842	m = 8.86 เปอร์เซ็นต์มาตรฐานเปียก
	0.75	x = -1.246	m = 9.58 เปอร์เซ็นต์มาตรฐานเปียก
	0.85	x = -1.817	m = 13.19 เปอร์เซ็นต์มาตรฐานเปียก
	0.95	x = -2.970	m = 34.75 เปอร์เซ็นต์มาตรฐานเปียก

ภาคผนวก ข

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายเพปโทน 0.1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งเพปโทน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. กรดทาร์ทาริก 10 เปอร์เซ็นต์

ชั่งกรดทาร์ทาริก 10 กรัมละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายที่ใช้เตรียมสารแขวนลอยสปอร์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรผสมกับ Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. เฟสเคลื่อนที่สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1

เตรียมน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 600 มิลลิลิตร, อะซีโตไนไตรล์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และเมทานอลปริมาตร 200 มิลลิลิตร ผสมรวมกัน และกรองด้วยชุดกรองผ่านกระดาษกรอง ไล่แก๊สในสารละลายในอ่างอัลตร้าโซนิก เป็นเวลา 15 นาทีก่อนนำไปใช้ในการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 ด้วย เครื่อง HPLC

5. เมทานอลผสมกับกรดฟอร์มิก อัตราส่วน 25:1

เตรียมเมทานอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมกับกรดฟอร์มิก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

6. เฟสเคลื่อนที่สำหรับโอคราทอกซินเอ

เตรียมอะซีโตไนไตรล์ปริมาตร 495 มิลลิลิตร, น้ำปลอดประจุปริมาตร 495 มิลลิลิตรและกรดอะซิติกปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมรวมกัน และกรองด้วยชุดกรองผ่านกระดาษกรอง ไล่แก๊สในสารละลายในอ่างอัลตร้าโซนิก เป็นเวลา 15 นาทีก่อนนำไปใช้ในการวิเคราะห์โอคราทอกซินเอด้วยเครื่อง HPLC

7. สารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

สารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ตั้งต้น 1 มิลลิกรัม เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเตรียมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยดูดสารมาตรฐานอะฟลาทอก-ซินบี 1 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วเติม mobile phase สำหรับอะฟลาทอกซินบี 1 จนครบปริมาตร

8. น้ำปลอดประจุผสมกับเมทานอล อัตราส่วน 1:3

เตรียมน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับเมทานอล ปริมาตร 60 มิลลิลิตร

9. สารมาตรฐานโอคราทอกซินเอความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

สารมาตรฐานโอคราทอกซินเอตั้งต้น 1 มิลลิกรัม เติมน้ำปลอดประจุผสมกับเมทานอล อัตราส่วน 1:3 ปริมาตร1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเตรียมสารมาตรฐานโอคราทอกซินเอความเข้มข้น 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยดูดสารมาตรฐานโอคราทอกซินเอที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุผสมกับเมทานอล อัตราส่วน 1:3 จนครบปริมาตร

10. น้ำปลอดประจุผสมกับเมทอนอล อัตราส่วน 3:7

เตรียมน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผสมกับเมทานอล ปริมาตร 70 มิลลิลิตร

11. ชุดสำเร็จสำหรับสกัดดีเอ็นเอ MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre® Biotechnologies, US)

ประกอบด้วย

Yeast cell lysis

RNase A

MPC protein precipitation

TE buffer

12. เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

นำเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 736.84 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 263.16 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

13. บัฟเฟอร์ 50X TAE

Tris base (C4H11NO3)	121	กรัม
กรดอะซีติกเข้มข้น	28.55	กรัม
สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์	50	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปลอดประจุ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุจนปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

14. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร

ดูดเอธิเดียมโบรไมด์ปริมาตร 10 ไมโครลิตรละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในภาชนะที่ปิดมิดชิดที่พ้นจากแสง

15. ชุดสำเร็จสำหรับทำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้บริสุทธิ์QIAgen PCR Purification Kit (Qiagen, USA)

ประกอบด้วย

DNA binding mini column

Buffer PE

Buffer PB

Buffer EB

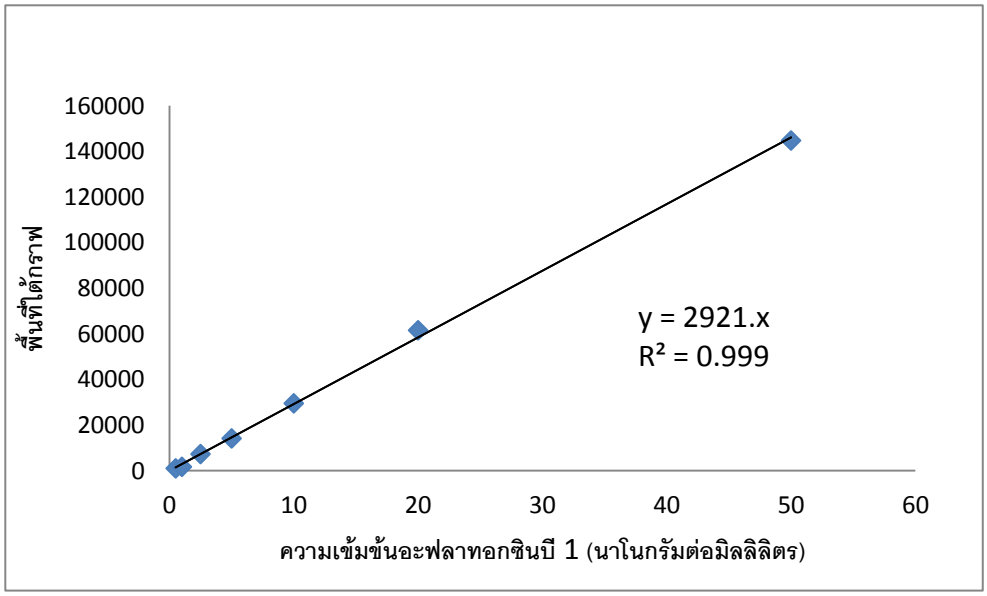
pH Indicator

Collection Tubes

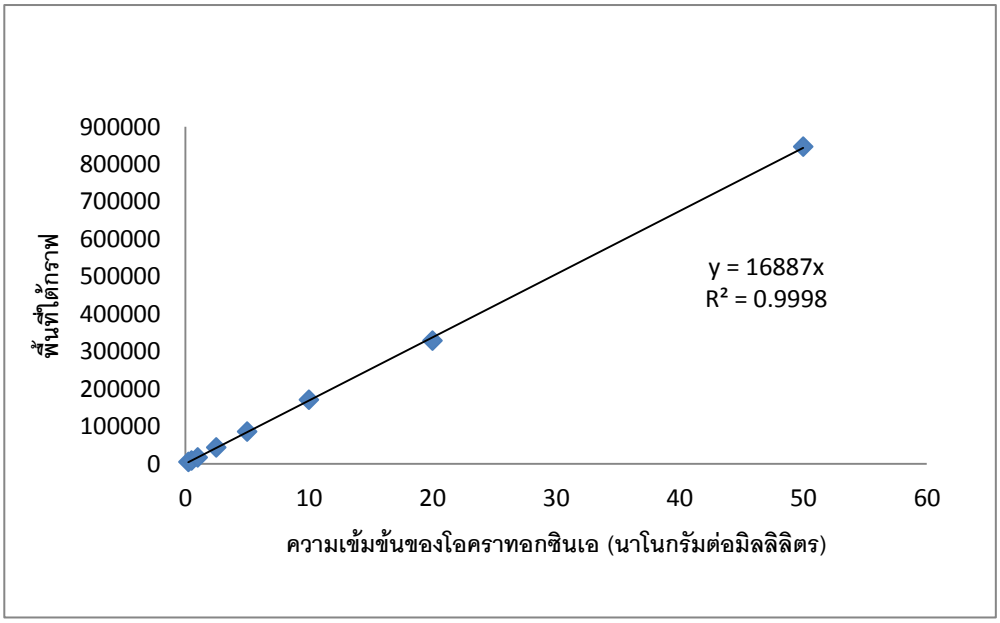
Loading Dye

การใช้ชุดสำเร็จ QIAquick PCR Purification Kitในครั้งแรกต้องเติมเอทานอล (96-100 เปอร์เซ็นต์)ปริมาตร 24 มิลลิลิตร ลงใน Buffer PE

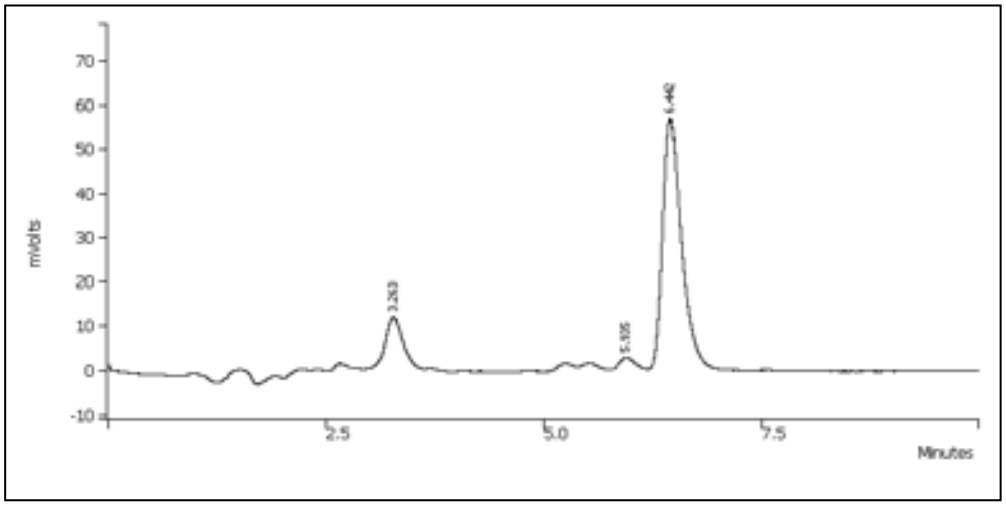
ภาคผนวก ค



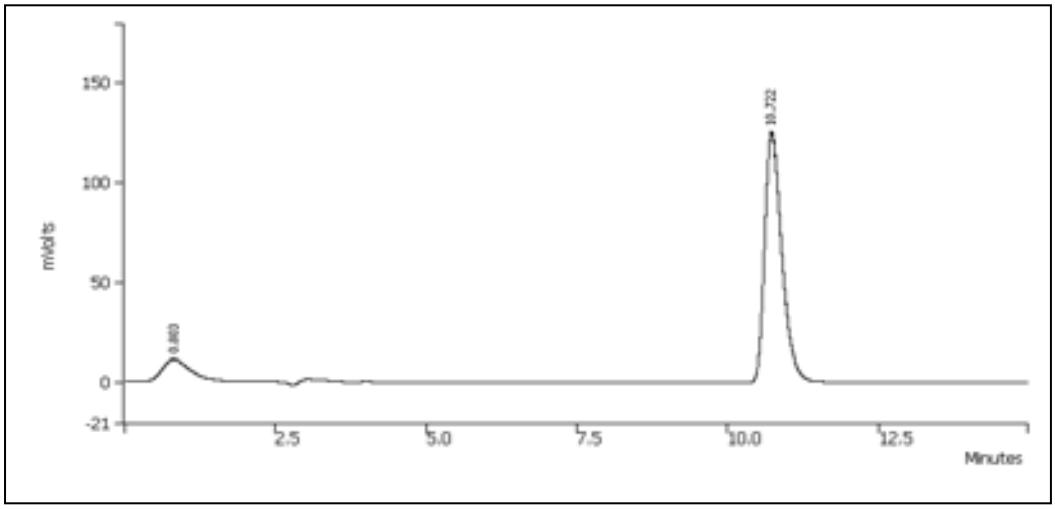
รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ



รูปที่ ค.3 โครมาโทแกรมของอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ retention time (RT) ประมาณ 7 นาที



รูปที่ ค.4 โครมาโทแกรมของโอคราทอกซินเอ retention time (RT) ประมาณ 11 นาที

5. การคำนวณปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 และโอคราทอกซินเอ

$$\text{ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1} = \frac{A}{B \times 2.5 \text{ (ปริมาตรเมทานอลที่ใช้ในการสกัด หน่วยมิลลิลิตร)} \times C \times (1/D)}$$

โดย A คือ พื้นที่ใต้กราฟ

B คือ สัมประสิทธิ์หน้า X ของกราฟมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1

C คือ การเติม mobile phase ลงในอะฟลาทอกซินบี 1 ที่สกัดได้ (เท่า)

D คือ น้ำหนักวุ้น (กรัม)

$$\text{ปริมาณโอคราทอกซินเอ} = \frac{A}{B \times 2.5 \text{ (ปริมาตรเมทานอลผสมกับกรดฟอร์มิกที่ใช้ในการสกัด หน่วยมิลลิลิตร)} \times C \times (1/D)}$$

โดย A คือ พื้นที่ใต้กราฟ

B คือ สัมประสิทธิ์หน้า X ของกราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ

C คือ การเติม mobile phase ลงในโอคราทอกซินเอที่สกัดได้ (เท่า)

D คือ น้ำหนักวุ้น (กรัม)

ภาคผนวก ง

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ง.1 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวเปลือกจากนา 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2553คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอย่างที่	ราดำ	ราเขียวอมเหลือง	ราอื่นๆ
1	2	0	20
2	0	0	13
3	1	0	18
4	0	0	15
5	2	0	13
6	0	0	24
7	1	0	17
8	0	0	20
9	4	0	15
10	0	0	16
รวม	10	0	171

ตารางที่ ง.2 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวเปลือกจากโรงสี 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2553คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอย่างที่	ราดำ	ราเขียวอมเหลือง	ราอื่นๆ
1	3	5	7
2	4	8	5
3	1	4	3
4	4	10	5
5	4	3	5
6	4	8	7
7	4	8	4
8	3	7	13
9	1	5	3
10	3	3	8
รวม	31	62	55

ตารางที่ ง.3 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวสารจากโรงสี 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอย่างที่	ราดำ	ราเขียวอมเหลือง	ราอื่นๆ
1	0	1	1
2	0	1	2
3	0	1	5
4	0	0	4
5	0	0	5
6	0	0	4
7	0	0	3
8	0	0	8
9	0	0	7
10	0	0	6
รวม	0	3	45

ตารางที่ ง.4 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวเปลือกจากนา 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอย่างที่	ราดำ	ราเขียวอมเหลือง	ราอื่นๆ
1	4	1	20
2	2	2	27
3	3	0	26
4	0	0	28
5	0	0	40
6	0	1	28
7	2	0	21
8	0	1	18
9	1	0	26
10	1	1	20
รวม	13	6	254

ตารางที่ ง.5 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวเปลือกจากโรงสี 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอย่างที่	ราดำ	ราเขียวอมเหลือง	ราอื่นๆ
1	0	0	20
2	1	1	21
3	0	3	23
4	1	3	33
5	0	2	23
6	2	0	21
7	0	1	29
8	1	3	20
9	1	1	24
10	0	1	27
รวม	6	15	241

ตารางที่ ง.6 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวสารจากโรงสี 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอย่างที่	ราดำ	ราเขียวอมเหลือง	ราอื่นๆ
1	0	0	2
2	0	0	12
3	0	0	4
4	0	0	12
5	0	0	4
6	0	0	10
7	0	0	1
8	0	1	6
9	0	0	6
10	0	0	4
รวม	0	1	61

ตารางที่ ง.7 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวเปลือกจากนา 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอย่างที่	ราดำ	ราเขียวอมเหลือง	ราอื่นๆ
1	0	5	12
2	0	1	12
3	0	4	20
4	0	1	13
5	0	5	15
6	0	6	16
7	0	0	12
8	0	0	13
9	0	3	5
10	0	1	8
รวม	0	26	126

ตารางที่ ง.8 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวเปลือกจากโรงสี 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอย่างที่	ราดำ	ราเขียวอมเหลือง	ราอื่นๆ
1	2	8	17
2	1	7	19
3	2	4	22
4	1	4	15
5	3	13	16
6	0	10	20
7	1	9	23
8	0	6	23
9	1	2	20
10	4	17	25
รวม	15	80	200

ตารางที่ ง.9 จำนวนไอโซเลตราดำ ราเขียวอมเหลือง และราอื่นๆ ในข้าวสารจากโรงสี 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ตัวอย่างที่	ราดำ	ราเขียวอมเหลือง	ราอื่นๆ
1	0	0	4
2	1	1	7
3	0	0	11
4	0	0	4
5	0	0	3
6	1	0	3
7	0	0	5
8	0	0	4
9	0	0	3
10	0	1	9
รวม	2	2	53

ตารางที่ ง.10 จำนวนราทั้งหมดในข้าวเปลือกจากนา และข้าวเปลือกจากโรงสี ชนิดละ 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกุมภาพันธ์ ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี Total plate count บนอาหารแข็ง PDA ผสมกรดทาร์ทาริก 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

	CFU/g	
ตัวอย่างที่	ข้าวเปลือกจากนา	ข้าวเปลือกจากโรงสี
1	$4.7x10^3$	$7.0x10^3$
2	$3.0x10^3$	$8.75x10^3$
3	$3.45x10^3$	$4.7x10^3$
4	จำนวนราน้อยกว่า 15 โคโลนี	$13.7x10^3$
5	$3.05x10^3$	$4.95x10^3$
6	$3.3x10^3$	$4.3x10^3$
7	$2.95x10^3$	จำนวนราน้อยกว่า 15 โคโลนี
8	$4.35x10^3$	$3.35x10^3$
9	$4.15x10^3$	จำนวนราน้อยกว่า 15 โคโลนี
10	$3.4x10^3$	$6.6x10^3$
เฉลี่ย	$3.23\pm1.29\times10^3$	$5.34\pm4.06\times10^3$

ตารางที่ ง.11 จำนวนราทั้งหมดในข้าวเปลือกจากนา และข้าวเปลือกจากโรงสีชนิดละ 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนกรกฎาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี Total plate count บนอาหารแข็ง PDA ผสมกรดทาร์ทาริก 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

	CFU/g	
ตัวอย่างที่	ข้าวเปลือกจากนา	ข้าวเปลือกจากโรงสี
1	$10.35x10^3$	$7.8x10^3$
2	$10.75x10^3$	$10.0x10^3$
3	$9.05x10^3$	$13.5x10^3$
4	$8.2x10^3$	$17.95x10^3$
5	$9.2x10^3$	$8.0x10^3$
6	$8.7x10^3$	$11.45x10^3$
7	$10.85x10^3$	$6.65x10^3$
8	$9.2x10^3$	$4.65x10^3$
9	$8.1x10^3$	$7.75x10^3$
10	$9.05x10^3$	$4.3x10^3$
เฉลี่ย	$9.35\pm0.98\times10^3$	$9.21\pm4.18\times10^3$

ตารางที่ ง.12 จำนวนราทั้งหมดในข้าวเปลือกจากโรงสี และข้าวเปลือกจากโรงสีชนิดละ 10 ตัวอย่าง (สุ่มตัวอย่างละ 50 เมล็ด) ที่เก็บเกี่ยวในเดือนตุลาคม ปี พ.ศ. 2553 คัดแยกโดยวิธี Total plate count บนอาหารแข็ง PDA ผสมกรดทาร์ทาริก 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

	CFU/g	
ตัวอย่างที่	ข้าวเปลือกจากนา	ข้าวเปลือกจากโรงสี
1	$3.65x10^3$	$11.4x10^3$
2	$4.15x10^3$	$14.05x10^3$
3	$7.55x10^3$	$9.25x10^3$
4	$6.85x10^3$	$9.3x10^3$
5	$5.2x10^3$	$15.15x10^3$
6	$5.35x10^3$	$7.25x10^3$
7	$9.2x10^3$	$11.75x10^3$
8	$7.95x10^3$	$10.2x10^3$
9	$4.5x10^3$	$11.25x10^3$
10	$7.7x10^3$	$9.55x10^3$
เฉลี่ย	$6.21\pm1.88\times10^3$	$10.92\pm2.36\times10^3$

ตารางที่ ง.13 การผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ของราเขียวอมเหลืองบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ชื่อไอโซเลต	ปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินบี1 (ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA)	ปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินบี1 เฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
M2T6R4G1 (R1)	1.98	1.37	0.86
M2T6R4G1 (R2)	0.76		
M2T4R3G1 (R1)	2.22	2.63	0.59
M2T4R3G1 (R2)	3.05		
M2T4R1G3 (R1)	5.51	5.18	0.47
M2T4R1G3 (R2)	4.84		
M2T7R2G1 (R1)	0.15	0.14	0.02
M2T7R2G1 (R2)	0.13		
M2T3R3G1 (R1)	0.08	0.06	0.03
M2T3R3G1 (R2)	0.04		
M2T2R4G1 (R1)	0.004	0.005	0.001
M2T2R4G1 (R2)	0.006		
M3T8R4G3 (R1)	17.67	18.99	1.86
M3T8R4G3 (R2)	20.31		
M4T7R4G1 (R1)	4.01	2.94	1.51
M4T7R4G1 (R2)	1.88		
M4T1R2G1 (R1)	0.27	0.18	0.13
M4T1R2G1 (R2)	0.09		

*หมายเหตุ R1 และ R2 ด้านหลังชื่อตัวอย่าง คือการสกัดครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ ง.14 การผลิตโอคราทอกซินเอของราดำบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ชื่อไอโซเลต	ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA)	ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอเฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
F2T7R4BY1 (R1)	0.001	0.001	0.0003
F2T7R4BY1 (R2)	0.008		
F2T9R2BY1 (R1)	0.001	0.002	0.0004
F2T9R2BY1 (R2)	0.002		
M2T4R2B1 (R1)	0.96	0.11	0.018
M2T4R2B1 (R2)	0.12		
M2T1R4B1 (R1)	0.006	0.003	0.003
M2T1R4B1 (R2)	0.001		
M2T4R3B2 (R1)	0.004	0.0002	0.0002
M2T4R3B2 (R2)	0.00004		
M2T7R3B1 (R1)	0.01	0.009	0.003.84
M2T7R3B1 (R2)	0.006		
F2T9R4BY1 (R1)	0.006	0.004	0.003
F2T9R4BY1 (R2)	0.002		
F2T9R4BY2 (R1)	0.006	0.006	0.0004
F2T9R4BY2 (R2)	0.006		
F2T1R1B1 (R1)	0.002	0.002	0.0008
F2T1R1B1 (R2)	0.003		
F2T1R1B2 (R1)	0.005	0.004	0.003
F2T1R1B2 (R2)	0.002		
M2T4R3B1 (R1)	0.23	0.21	0.03
M2T4R3B1 (R2)	0.18		
M3T4R3B1 (R1)	0.001	0.001	0.0007

ตารางที่ ง.14 การผลิตโอคราทอกซินเอของราดำบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ชื่อไอโซเลต	ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA)	ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอเฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
M3T6R1B1 (R1)	0.003	0.002	0.0007
M3T6R1B1 (R2)	0.002		
F3T1R1B1 (R1)	0.012	0.007	0.008
F3T1R1B1 (R2)	0.001		
F3T1R4B2 (R1)	0.0006	0.0005	0.0003
F3T1R4B2 (R2)	0.0003		
F3T2R3B1 (R1)	0.0005	0.0006	0.002
F3T2R3B1 (R2)	0.0008		
F3T7R2B1 (R1)	0.001	0.002	0.001
F3T7R2B1 (R2)	0.003		
F3T10R4B1 (R1)	6.39	5.79	0.85
F31041B (R2)	5.19		
M4T10R2B1 (R1)	0.03	0.03	0.003
M4T10R2B1 (R2)	0.03		
M4T1R4B1 (R1)	0.02	0.01	0.015
M4T1R4B1 (R2)	0.002		

*หมายเหตุ R1 และ R2 ด้านหลังชื่อตัวอย่าง คือการสกัดครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ ง.15 ขนาดโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	A_w	ขนาดโคโลนีเฉลี่ยวันที่ (เซนติเมตร)						
		1	2	3	4	5	6	7
20	0.65	0	0	0	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0	0	0	0
	0.95	0	0.7	1.2	1.7	2.2	3.2	4.0
25	0.65	0	0	0	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0	0	0	0
	0.95	0	0.8	1.6	2.4	3.7	4.7	5.6
30	0.65	0	0	0	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0	0	0	0
	0.95	0	1.4	2.5	3.4	6.2	7.7	8.3

ตารางที่ ง.16 ปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ผลิตจาก *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	A_w	ปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 (ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA)		ปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 เฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		R1	R2		
20	0.65	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0
	0.95	10.73	6.79	8.76	2.78
25	0.65	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0
	0.95	30.67	30.20	30.44	0.34
30	0.65	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0
	0.95	31.92	39.55	35.74	5.40

*หมายเหตุ R1 และ R2 ด้านหลังชื่อตัวอย่าง คือการสกัดครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ ง.17 ขนาดโคโลนีของ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	A_w	ขนาดโคโลนีเฉลี่ยวันที่ (เซนติเมตร)						
		1	2	3	4	5	6	7
20	0.65	0	0	0	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0	0	0	0
	0.95	0	0.8	1.3	3.0	4.8	6.6	8.2
25	0.65	0	0	0	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0	0	0	0
	0.95	0	0.8	2.2	4.7	6.4	8.3	8.5
30	0.65	0	0	0	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0	0	0	0
	0.95	0	2.2	4.9	6.5	7.7	8.3	8.5

ตารางที่ ง.18 ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอที่ผลิตจาก *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	A_w	ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA)		ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอเฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		R1	R2		
20	0.65	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0
	0.95	3.80	5.20	4.50	0.99
25	0.65	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0
	0.95	6.52	6.87	6.69	0.25
30	0.65	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0
	0.95	9.22	11.20	10.21	1.40

*หมายเหตุ R1 และ R2 ด้านหลังชื่อตัวอย่าง คือการสกัดครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ ง.19 ขนาดโคโลนีของ *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบน rice medium โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	A_w	ขนาดโคโลนีเฉลี่ยวันที่ (เซนติเมตร)						
		1	2	3	4	5	6	7
20	0.65	0	0	0	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0	0	0	0
	0.95	0	0.5	1.0	1.5	2.2	3.0	3.3
25	0.65	0	0	0	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0	0	0	0
	0.95	0	1.0	2.5	3.5	4.5	5.3	6.3
30	0.65	0	0	0	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0	0	0	0
	0.95	0	1.5	3.8	5.2	7.3	8.3	8.5

ตารางที่ ง.20 ปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ผลิตจาก *A. flavus* M3T8R4G3 ที่เจริญบน rice medium โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	A_w	ปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 (ไมโครกรัมต่อกรัมของ rice medium)		ปริมาณการผลิตอะฟลาทอกซินบี 1เฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกรัมของ rice medium)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		R1	R2		
20	0.65	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0
	0.95	29.91	22.10	26.01	5.52
25	0.65	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0
	0.95	22.15	36.51	29.33	10.15
30	0.65	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0
	0.95	90.66	62.04	76.35	20.24

*หมายเหตุ R1 และ R2 ด้านหลังชื่อตัวอย่าง คือการสกัดครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ ง.21 ขนาดโคโลนีของ *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบน rice medium โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	A_w	ขนาดโคโลนีเฉลี่ยวันที่ (เซนติเมตร)						
		1	2	3	4	5	6	7
20	0.65	0	0	0	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0	0	0	0
	0.95	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.1
25	0.65	0	0	0	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0	0	0	0
	0.95	0	1.0	1.8	2.4	3.0	4.5	5.0
30	0.65	0	0	0	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0	0	0	0
	0.95	0	1.5	3.0	4.0	5.0	6.8	7.8

ตารางที่ ง.22 ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอที่ผลิตจาก *A. carbonarius* F3T10R4B1 ที่เจริญบน rice medium โดยมี A_w เท่ากับ 0.65, 0.75, 0.85 และ 0.95 บ่มที่อุณหภูมิ 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	A_w	ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกรัมของ rice medium)		ปริมาณการผลิตโอคราทอกซินเอเฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกรัมของ rice medium)	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
		R1	R2		
20	0.65	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0
	0.95	0.004	0.009	0.007	0.004
25	0.65	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0
	0.95	0.14	0.15	0.14	0.01
30	0.65	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0
	0.85	0	0	0	0
	0.95	0.47	0.27	0.37	0.14

*หมายเหตุ R1 และ R2 ด้านหลังชื่อตัวอย่าง คือการสกัดครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ภาคผนวก จ

1. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rRNA ของราเขียวอมเหลืองเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

ไอโซเลต M3T8R4G3

Aspergillus flavus culture-collection MUM:10.209 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=914

```
 Score = 1029 bits (557),  Expect = 0.0
 Identities = 560/561 (99%), Gaps = 1/561 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  6    GTAGGGTT-CTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGC  64
            |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  166  GTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGC  225

Query  65   GGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACA  124
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  226  GGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACA  285

Query  125  CCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACT  184
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  286  CCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACT  345

Query  185  TTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTA  244
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  346  TTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTA  405

Query  245  GTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGT  304
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  406  GTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGT  465

Query  305  ATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTT  364
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  466  ATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTT  525

Query  365  GGGTCGTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCG  424
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  526  GGGTCGTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCG  585

Query  425  ATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAAC  484
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  586  ATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAAC  645

Query  485  GCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG  544
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  646  GCAAATCAATCTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG  705

Query  545  CATATCAATAAGCGGAGGAAA  565
            ||||||||||||||||||||
Sbjct  706  CATATCAATAAGCGGAGGAAA  72
```

ไอโซเลต M2T7R2G1

Aspergillus tamarii isolate NRRL 4911 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1155

```
 Score = 1024 bits (554), Expect = 0.0
 Identities = 566/571 (99%), Gaps = 3/571 (1%)
 Strand=Plus/Plus

Query  9    GTAGGGTT-CTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTAACCTTAGTTGCTTCGG  67
            |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  18   GTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTTACTGTAACCTTAGTTGCTTCGG  77

Query  68   CGGGCCCGCCGTTTACGGCCGCCGGGGGGCATCAGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGA  127
            |||||||||| |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  78   CGGGCCCGCC-TTTAAGGCCGCCGGGGGGCATCAGCCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGGAGA  136

Query  128  CACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAA  187
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  137  CACCACGAACTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAA  196

Query  188  CTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAC  247
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  197  CTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAC  256

Query  248  TAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTG  307
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  257  TAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTG  316

Query  308  GTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTG  367
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  317  GTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTG  376

Query  368  TTGGGTCGTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTC  427
            |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  377  TTGGGTCGTCGTCCCCTCTTCGGGGGGGACGGGCCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTC  436

Query  428  CGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGA  487
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  437  CGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGA  496

Query  488  ACGCAAAACAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACT  547
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  497  ACGCAAAACAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACT  556

Query  548  TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAACAGAAA  578
            |||||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct  557  TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAA-AGAAA  586
```

2. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18S rRNA ของราดำเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

ไอโซเลต F3T10R4B1

Aspergillus carbonarius strain CBS 111.26 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=594 Score = 1003 bits (543), Expect = 0.0
Identities = 551/556 (99%), Gaps = 1/556 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  20   GGGTNCTTTGGG-CCNNCCTCCCACCCGTGTCTATTGTACCTGTTGCTTCGGCGGGCCCG  78
            |||| ||||||| ||  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  39   GGGTCCTTTGGGCCCAACCTCCCACCCGTGTCTATTGTACCTGTTGCTTCGGCGGGCCCG  98

Query  79   CCGCTTGTCGGCCGCCgggggggCATCTCTGCCCCTCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACAC  138
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  99   CCGCTTGTCGGCCGCCGGGGGGGGCATCTCTGCCCCTCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACAC  158

Query  139  CAACACGAACACTGTCTGAAATCGTGAAGTCTGAGTCGATTGTTTTCAATCAGTTAAAAC  198
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  159  CAACACGAACACTGTCTGAAATCGTGAAGTCTGAGTCGATTGTTTTCAATCAGTTAAAAC  218

Query  199  TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACT  258
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  219  TTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACT  278

Query  259  AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGG  318
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  279  AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGG  338

Query  319  TATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTT  378
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  339  TATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTT  398

Query  379  GGGTCGCCGTCCCCCTGTCTGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCG  438
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  399  GGGTCGCCGTCCCCCTGTCTGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCG  458

Query  439  ATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACA  498
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  459  ATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACA  518

Query  499  ACTCCAACCttttttCCATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG  558
            |||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  519  ACTCCAACCTTTTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAG  578

Query  559  CATATCAATAAGCGGA  574
            ||||||||||||||||
Sbjct  579  CATATCAATAAGCGGA  594
```

ไอโซเลต M2T4R3B2

Aspergillus niger strain CBS 112.32 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=596 Score = 1024 bits (554), Expect = 0.0
Identities = 557/558 (99%), Gaps = 1/558 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  12   GGGT-CTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCC  70
            |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  39   GGGTCCTTTGGGCCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCC  98

Query  71   GCCGCTTGTCGGCCGCCgggggggCGCCTCTGCCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACC  130
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  99   GCCGCTTGTCGGCCGCCGGGGGGGCGCCTCTGCCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACC  158

Query  131  CCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAA  190
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  159  CCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAA  218

Query  191  CTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAC  250
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  219  CTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAC  278

Query  251  TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTG  310
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  279  TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTG  338

Query  311  GTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGT  370
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  339  GTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGT  398

Query  371  TGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCC  430
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  399  TGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCC  458

Query  431  GATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGAC  490
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  459  GATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGAC  518

Query  491  GTTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA  550
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  519  GTTTTCCAACCATTCTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA  578

Query  551  AGCATATCAATAAGCGGA  568
            |||||||||||||||||
Sbjct  579  AGCATATCAATAAGCGGA  596
```

ไอโซเลต F3T2R3B1

Aspergillus aculeatus strain CBS 172.66 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=572

Score = 935 bits (506), Expect = 0.0
Identities = 522/529 (99%), Gaps = 3/529 (1%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  27   TTCGGGG-CCAACCTCCCACCCGTGCTTACCGTACCCTGTTGCTTTCGGCGGGCCCGCCT  85
            ||||||| |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  46   TTCGGGGCCCAACCTCCCACCCGTGCTTACCGTACCCTGTTGC-TTCGGCGGGCCCGCCT  104

Query  86   TCGGGCGGCCCGGGGCCTGCCCCCGGGACCGCGCCCGCCGGAGACCCCAATGGAACACTG  145
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  105  TCGGGCGGCCCGGGGCCTGCCCCCGGGACCGCGCCCGCCGGAGACCCCAATGGAACACTG  164

Query  146  TCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTCGATTGATACCAATCAGTCAAAACTTTCAACAATGGAT  205
            |||||||||||||||||||| |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  165  TCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGATACCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGAT  224

Query  206  CTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAG  265
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  225  CTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAG  284

Query  266  AATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCA  325
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  285  AATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCA  344

Query  326  TGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTCCCCTCCAGCCCCGCTGGTTGTTGGGCCGCGccccccc  385
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  345  TGCCTGTCCGAGCGTCATTTCTCCCCTCCAGCCCCGCTGGTTGTTGGGCCGCGCCCCCCC  404

Query  386  GGGGGCGGGCCTCGAGAGAAACGGCGGCACCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGTTCTGT  445
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct  405  GGGGGCGGGCCTCGAGAGAAACGGCGGCACCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTCTGT  464

Query  446  CACCCGCTCTATGGGCCCGGCCGGGGCTTGCCTCGACCCCCAATCTTCTCAGATTGACCT  505
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  465  CACCCGCTCTATGGGCCCGGCCGGGGCTTGCCTCGACCCCCAATCTTCTCAGATTGACCT  524

Query  506  CGGATCATGTATGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGA  554
            ||||||| ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  525  CGGATCAGGTA-GGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGA  572
```

ไอโซเลต M2T7R3B1

Aspergillus tubingensis strain CBS 107.55 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene,and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=596 Score = 1000 bits (541), Expect = 0.0
Identities = 541/541 (100%), Gaps = 0/541 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  20   CCTCCCATCCGTGTCTATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGTCGGCCGCC  79
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  56   CCTCCCATCCGTGTCTATTATACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTTGTCGGCCGCC  115

Query  80   gggggggCGCCTTTGCCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTC  139
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  116  GGGGGGGCGCCTTTGCCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTC  175

Query  140  TGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCT  199
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  176  TGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCT  235

Query  200  CTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAA  259
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  236  CTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAA  295

Query  260  TTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATG  319
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  296  TTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATG  355

Query  320  CCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCT  379
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  356  CCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCT  415

Query  380  CTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGG  439
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  416  CTCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGG  475

Query  440  GGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTT  499
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  476  GGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTT  535

Query  500  TCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG  559
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  536  TCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG  595

Query  560  A  560
            |
Sbjct  596  A  596
```

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวโนทัย กิตติกำแหง เกิดวันที่ 27 กันยายน พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดจันทบุรี ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในปีการศึกษา 2551 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิตสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552 ที่อยู่ปัจจุบัน 95/34 หมู่ 9 ตำบลจันทนิมิต อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี 22000

ผลงานเผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ “TSB 2011: The 23st Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology” ระหว่างวันที่ 1-2 กุมภาพันธ์ 2555 ณ โรงแรมอิมพิเรียลควีนปาร์ค ในหัวข้อ เรื่อง Contamination of aflatoxigenic and ochratoxigenic *Aspergillus* in Thai rice ร่วมกับอาจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ