การคัดแยกและตรวจสอบเชื้อราสร้างสารพิษซิตรินินในข้าว

ชนัญญา ช่วยศรีนวล
นักวิจัยปฏิบัติการ
ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทย เป็นวัตถุดิบทางการเกษตรที่สำคัญมีบทบาทต่อสังคมเศรษฐกิจ แม้ว่าข้าวไม่ได้เป็นแหล่งของสารพิษจากเชื้อรา แต่หากเก็บรักษาภายใต้สภาวะที่สนับสนุนการเจริญของเชื้อรา โดยเฉพาะเชื้อราชนิดสร้างสารพิษ ข้าวก็มีโอกาสปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราและส่งผลกระทบต่อสุขภาพคนและสัตว์ การสำรวจความหลากหลายเชื้อราที่สร้างสารพิษดังกล่าว ซึ่งเป็นธัญพืชเศรษฐกิจสำคัญของคนไทยจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

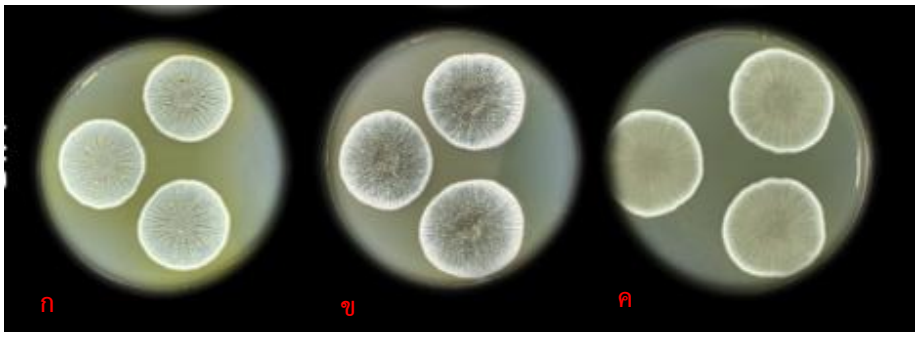
ซิตรินิน (Citrinin) เป็นสารพิษจากเชื้อราที่สร้างจากเชื้อรากลุ่ม *Penicillium, Aspergillus* และ *Monascus* มักพบปนเปื้อนในธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ผลไม้ และถั่ว เป็นต้น ซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1931 โดยสร้างจากเชื้อรา *P. citrinum* นอกจากนี้เชื้อรา *P. verrucosum, A. terreus,* และ *M. ruber* (Bragulat *et al*., 2008) สามารถสร้างสารพิษชนิดนี้ได้ ปัจจุบันองค์กรวิจัยมะเร็งนานาชาติ (International Agency for Research on Cancer; IARC) ได้จัดให้สารพิษซิตรินินเป็นสารก่อมะเร็งกลุ่ม 3 เนื่องจากยังไม่มีหลักฐานเพียงพอว่าก่อให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองหรือในมนุษย์ สารซิตรินินจะมีผลต่อการทำงานของตับและไตของมนุษย์ และสัตว์ อย่างไรก็ตามพบว่าสารดังกล่าวสามารถเสริมฤทธิ์ก่อมะเร็งในสารพิษจากราชนิดอื่นเช่น ออคราทอกซินได้ (Ostry *et al.,* 2013)

1. การแยกเชื้อราจากตัวอย่างข้าวด้วยวิธี Direct plating

สุ่มตัวอย่างข้าวจากแต่ละตัวอย่าง ตัวอย่างละ 30 เมล็ด ทำการแยกเชื้อราจากตัวอย่างเมล็ดข้าวโดยไม่ต้องมีการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่บริเวณผิวของเมล็ดข้าว (surface disinfection) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Dichloran18% Glycerol Agar (DG18) โดยวางเมล็ดข้าว 10 เมล็ดต่อจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนเมล็ดข้าวที่ตรวจพบการเจริญของเชื้อรา คัดเลือกโคโลนีของเชื้อราคาดว่าเป็นเชื้อราในจีนัส *Aspergillus* และ *Penicillium* มาทำให้บริสุทธิ์ โดยตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยพิจารณาจากลักษณะโคโลนี สีและรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เก็บรักษาเชื้อราที่แยกได้โดยเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

2. การทดสอบการสร้างสารซิตรินินของเชื้อราที่คัดแยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

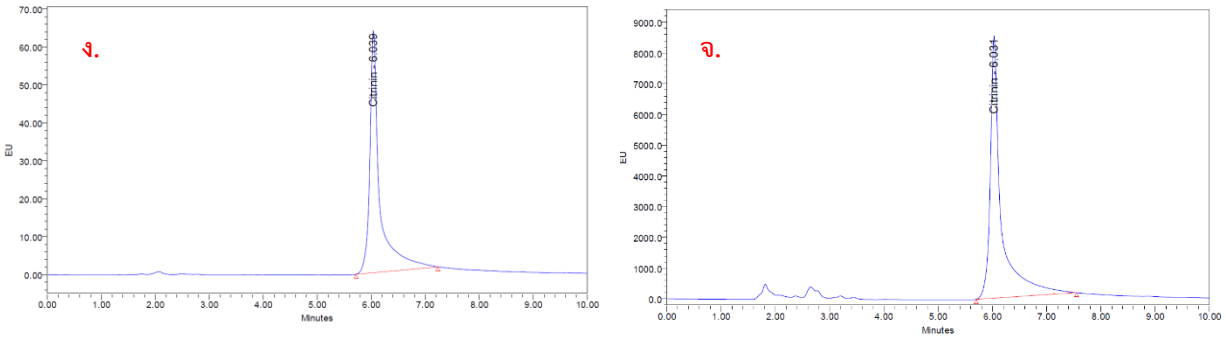
นำเชื้อรา *Aspergillus* หรือ *Penicillium* ที่คัดแยกได้จากข้าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Yeast Extract Sucrose Agar (YES) เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Varga *et al.,* 2011) จากนั้นเจาะชิ้นวุ้นบริเวณโคโลนีของเชื้อรา โดยใช้ชิ้นวุ้น 5 ชิ้น จากนั้นเติมสารละลายเอทานอล (50%, v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วบดชิ้นวุ้นให้ละเอียด แล้วนำไปสกัดด้วยเครื่อง Ultrasonicator เป็นเวลา 60 นาที กรองสารละลายส่วนใสผ่าน 0.45 µm syringe membrane filter แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC



ภาพที่ 1 โคโลนีของเชื้อรา *Penicillium* ก. RC414 ข. RC582 และ ค. RC 621 สายพันธุ์สร้างซิตรินินที่พบปนเปื้อนในข้าวที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด YES

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารซิตรินินที่สร้างโดยเชื้อราที่คัดแยกจากข้าวด้วยเทคนิค HPLC-FLD

วิเคราะห์สารพิษซิตรินินที่เชื้อราสร้างขึ้น โดยฉีดสารสกัดในข้อ 2 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร (Injection) เข้า HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด C18 (250 mm × 4.6 mm × 5.0 µm) เฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย น้ำปราศจากไอออน pH 2.5 (ปรับ pH ด้วยกรดฟอสฟอริก) : อะซีโตไนไตรล์ (50:50) (v/v) อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาวิเคราะห์ 12 นาที โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดสารแบบฟลูออเรสเซนต์ ใช้ความยาวคลื่น Excitation wavelength 331 นาโนเมตร และ Emission wavelength 500 นาโนเมตร สำหรับ HPLC chromatogram ของสารซิตรินินแสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 HPLC chromatogram ของสารมาตรฐานซิตรินิน (ง.) และสารซิตรินินในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด YES ที่สร้างโดยเชื้อรา RC582 ที่พบปนเปื้อนในตัวอย่างข้าว (จ.)

เอกสารอ้างอิง

Bragulat, M. R., E. Martínez, G. Castellá and F. J. Cabañes. 2008. Ochratoxin A and citrinin producing species of the genus *Penicillium* from feedstuffs. **Int J Food Microbiol**. 126:43-8.

Ostry, V., F. Malir and J. Ruprich. 2013. Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin. **Toxins** 5(9):1574-1586

Varga, J., J. C. Frisvad and R. A. Samson. 2011. Two novel aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. **Study in Mycology**. 69: 57-80.