ผลของอุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus niger* และการสร้างสารโอคราทอกซินในผลิตผลเกษตร

Effect of changes in Temperature Moisture and Carbon dioxide Concentrations on *Aspergillus niger* Growth and Ochratoxin Production in Agricultural Commodities

ศุภรา อัคคะสาระกุล[*,1/] บุญญวดี จิระวุฒิ[2/] เนตรา สมบูรณ์แก้ว[2/] สุพี วนศิรากุล[1/]
Suppara Aukkasarakul[*,1/] Boonyawadee Chirawut[2/] Nettra Somboonkaew[2/]
Su-phi Wanasirakul[1/]

ABSTRACT

Climate change impacts to various ecological systems, including contaminated microorganism in agricultural system. *Aspergillus niger* is an important problem of damaged stored agricultural products and can produce ochratoxin, which is classified as a human carcinogen and harmful for consumption. Therefore, impacts of changing temperature, mosisture and carbon dioxide (CO_2) levels by *A. niger* were studied for advantageous information to predict growth and mycotoxin production. Mycelium growth of *A. niger* was tested by grown on yeast extract sucrose agar (YES agar) for 10 days. The optimum conditions for *A. niger* growth were 17-38°C, water activity (a_w) 0.87-0.99 and CO_2 300-1,000 mg/kg. Temperature at 25°C, CO_2 600 mg/kg and aw 0.93, 0.95, 0.99 and 0.90 resulted to the highest growth rates of *A. niger* in 0.85, 0.79, 0.57 and 0.36 cm/day, respectively. Moreover, ochratoxin production was tested by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Aspergillus niger* at 27-36°C, CO_2 800-1,000 mg/kg and a_w 0.90-0.99 were produced ochratoxin higher than 2 µg/kg whereas at 30°C, CO_2 600 mg/kg and a_w 0.95, 0.93, 0.99 and 0.90 showed the highest ochratoxin production at 4.1, 3.5, 3.0 and 1.3 µg/kg, respectively. This fungus could not be grown on YES agar with aw at 0.75-0.85. In addition, ochratoxin production in green coffee beans was tested in the different conditions. At 15°C, CO_2 300, 600 and 1,000 mg/kg with 60% RH, *A. niger* produced low level of ochratoxin at the amount ranging from 0.8 to 1.8 µg/kg in green coffee beans.

Key words: *Aspergillus niger*, temperature, water activity, relative humidity, carbon dioxide, ochratoxin

[1/] กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวพืชไร่, Postharvest Technology in Field Crop
[2/] กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวพืชสวน, Postharvest Technology in Horticulture
กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร, Postharvest and Processing Research and Development Ofce, Department of Agriculture, Bangkok 10900

บทคัดย่อ

สภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงไปในปัจจุบันอาจส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตผลเกษตร เช่น รา *Aspergillus niger* ซึ่งเป็นราที่เข้าทำลายผลิตผลในโรงเก็บ และสามารถสร้างสารโอคราทอกซิน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งด้วย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ต่อการเจริญ และการสร้างสารพิษของ *A. niger* โดยทดสอบการเจริญของเส้นใยเชื้อราบนอาหาร Yeast Extract Sucrose agar (YES agar) เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่า *A. niger* เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 17-38°ซ., a_w 0.87-0.99, CO_2 300-1,000 มก./กก. และมีอัตราการเจริญเฉลี่ยของเส้นใยสูงสุดที่อุณหภูมิ 25°ซ., CO_2 600 มก./กก., a_w 0.93, 0.95, 0.99 และ 0.90 เท่ากับ 0.85, 0.79, 0.57 และ 0.36 ซม./วัน ตามลำดับ และตรวจสอบการสร้างสารโอคราทอกซินโดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ที่ช่วงอุณหภูมิ 27-36°ซ., CO_2 800-1,000 มก./กก. และ a_w 0.90-0.99 พบว่า รา *A. niger* สร้างสารพิษได้มากกว่า 2 ไมโครกรัม/กก. โดยที่อุณหภูมิ 30°ซ. ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 600 มก./กก. a_w 0.95, 0.93, 0.99 และ 0.90 รา *A. niger* สร้างสารโอคราทอกซินสูงสุดเฉลี่ย 4.1, 3.5, 3.0 และ 1.3 ไมโครกรัม/กก. ตามลำดับ แต่ในช่วงปริมาณน้ำอิสระ 0.75-0.85 รา *A. niger* ไม่สามารถเจริญบนอาหาร YES agar ได้ และการทดสอบการสร้างสารโอคราทอกซินโดยรา *A. niger* ในกาแฟสารที่สภาพอุณหภูมิ 15°ซ., CO_2 300, 600 และ 1,000 มก./กก. ความชื้นสัมพัทธ์ 60% รา *A. niger* สร้างสารโอคราทอกซิน 0.8-1.8 ไมโครกรัม/กก. ซึ่งต่ำกว่ามาตรฐานที่ CODEX กำหนด (2 ไมโครกรัม/กก.)

คำสำคัญ : *Aspergillus niger* อุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ ความชื้นสัมพัทธ์ คาร์บอนไดออกไซด์ โอคราทอกซิน เอ

บทนำ

ปัจจัยภูมิอากาศ เช่น ปริมาณน้ำฝน การกระจายของน้ำฝน การทิ้งช่วงของฝน พร้อมทั้งอุณหภูมิเฉลี่ย อุณหภูมิสูงสุด-ต่ำสุด ที่เกิดขึ้นในที่ใด ๆ มีผลต่อที่อยู่อาศัย ชนิด และประชากรของสิ่งมีชีวิตทั้งสิ้น (กัณฑรีย์, 2548) การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ (climate change) ในปัจจุบันเนื่องมาจากการตัดไม้ทำลายป่า การใช้พลังงานเชื้อเพลิงอย่างสิ้นเปลือง และกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจกเพิ่มขึ้นในชั้นบรรยากาศ ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศทั่วทุกภูมิภาค และอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อพืชทั้งก่อนและหลังการเก็บเกี่ยว รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนทั่วไปทั้งในแปลงปลูกและโรงเก็บรักษาผลิตผลเกษตร

รา (Fungi) จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มักพบปนเปื้อนในผลิตผลเกษตร ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการก่อให้เกิดความเสียหายและทำลายคุณภาพผลผลิต นอกจากนี้ ราบางชนิดสามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและสัตว์เลี้ยงด้วย *Aspergillus niger* เป็นราในกลุ่ม *Aspergillus* ที่พบทั่วไปในดิน เศษซากพืช และผลิตผลเกษตร สามารถเจริญได้ทั้งในเขตร้อนชื้นและเขตหนาว มักพบปนเปื้อนได้ในผลิตผลเกษตรหลายชนิด เช่น กาแฟ ถั่วลิสง ข้าวโพด หอมแดง หอมหัวใหญ่ องุ่น และเครื่องเทศ เป็นต้น (EPA, 1997) นอกจากนี้ รา *A. niger* สามารถสร้างสารพิษซึ่งสารทุติยภูมิได้มากมายหลายชนิด เช่น สารพิษ Ochratoxin A และ fumonisin B_2 และ B_4 (Kristian *et al*., 2009) สารพิษจากราเหล่านี้

ถูกจัดอยู่ใน class 2B ที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ในมนุษย์ โดยเฉพาะสาร Ochratoxin A ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อระบบการทำงานของไต (nephrotoxic) และการพัฒนาการเกิดความผิดปกติ (teratogenic)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศในอนาคตด้วยรูปแบบจำลองการคาดการณ์การเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศ พบว่า ในทศวรรษที่ 2100 (ค.ศ. 2091-2100) อุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ยของประเทศไทยสูงขึ้นทุกพื้นที่ และส่วนใหญ่สูงขึ้นประมาณ 4-5°ซ. เมื่อเทียบกับในช่วงทศวรรษที่ 2000 (ค.ศ. 1991-2000) (ศูนย์ภูมิอากาศ, 2553) ซึ่งสอดคล้องกับ IPPC (2007) ที่รายงานว่า อุณหภูมิและคลื่นความร้อนที่เพิ่มขึ้น จะส่งผลต่อภาคการเกษตรและความปลอดภัยของอาหาร ซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละภูมิภาคตามสภาพทางภูมิศาสตร์ เช่น การเปลี่ยนแปลงการเพาะปลูกและผลผลิต ฤดูกาลเพาะปลูกที่เปลี่ยนแปลงไป คุณภาพของดิน การสูญเสียแร่ธาตุในดิน และการเปลี่ยนแปลงในระบบนิเวศน์จุลินทรีย์ดิน โดยรายงานว่า อุณหภูมิจะเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 4°ซ. ภายเวลาใน 100 ปี นอกจากนี้ Paterson (2011) รายงานว่า อุณหภูมิที่สูงขึ้นอาจส่งผลกระทบต่อสารพิษจากรา เช่นเดียวกับการเจริญของราในอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น และการสร้างสารพิษอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มมากขึ้นในภูมิภาคที่มีอากาศหนาว ในขณะที่การสร้างสารพิษจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงในเขตที่มีอากาศร้อนอยู่แล้ว ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ออัตราการเจริญของรา และความสามารถของราในการสร้างสารพิษในผลิตผลเกษตร เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์โดยประเมินอัตราการเจริญของรา *A. niger* และประสิทธิภาพในการสร้างสาร Ochratoxin A ในสภาวการณ์ที่อาจเกิดขึ้นเมื่อสภาพภูมิอากาศเปลี่ยนแปลงไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. คัดเลือกรา *Aspergillus niger* โดยวิธี Direct plating method

1.1 เก็บตัวอย่างเมล็ดกาแฟ จาก อ.แม่ลาน้อย จ.แม่ฮ่องสอน จำนวน 5 ตัวอย่าง นำเมล็ดกาแฟแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) 0.825% นาน 2 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และวางเมล็ดกาแฟลงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-7 วัน จึงตรวจคัดแยกเฉพาะรา *A. niger* โดยดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้อง stereo microscope

1.2 นำ *A. niger* มาแยกเลี้ยงให้บริสุทธิ์บนอาหาร PDA และทดสอบความสามารถในการสร้างสารโอคราทอกซิน โดยหยดสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ของ *A. niger* ที่คัดเลือกได้ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มล. ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร YES medium ปริมาณ 9 มล. บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน

1.3 ดูดเฉพาะส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที หลังจากนั้นดูดเฉพาะส่วนใสกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.2 μm แล้วจึงนำสารสกัดที่ได้ไปตรวจวัดปริมาณสารพิษด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซินสำเร็จรูป (Veratox®) ตามวิธีการในคู่มือ

1.4 คัดเลือกรา *A. niger* ไอโซเลท ที่สร้างสารโอคราทอกซินปริมาณมาก เก็บรักษาในรูปของสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. อัตราการเจริญและการสร้างสารโอคราทอกซิน ของรา *A. niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะจำลองสภาพอากาศ

วางแผนการทดลองแบบ split plot จำนวน 3 ซ้ำ โดย

- main plot คือ ความเข้มข้นของปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 3 ระดับ ได้แก่ 300, 600 และ 1,000 มก./กก.

- sub plot คือ ปริมาณน้ำอิสระ (water activity: a_w) 7 ระดับ ได้แก่ 0.75, 0.80, 0.85, 0.90, 0.93, 0.95 และ 0.99

ทำการทดลองที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 6 ระดับ ได้แก่ 15, 20, 25, 30, 35 และ 40°ซ.

2.1 เตรียมอาหาร YES agar ในจานเลี้ยงเชื้อ ให้มีปริมาณน้ำอิสระแตกต่างกัน 7 ระดับ โดยใช้กลีเซอรอลและน้ำกลั่น ในการปรับค่าปริมาณน้ำอิสระในอาหาร ซึ่งปรับปรุงแก้ไขตามวิธีการของ Dallyn and Fox (1980) และวัดค่าด้วยเครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ

2.2 หยด spore suspension (ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มล.) ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YES agar ที่มี a_w แตกต่างกันแต่ละระดับ และนำจานเลี้ยงเชื้อใส่ในกล่องที่จำลองสภาพอากาศ โดยเติมก๊าซ CO_2 ลงในกล่องที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน และนำไปเก็บที่อุณหภูมิต่าง ๆ เพื่อดูอัตราการเจริญของรา

2.3 บันทึกข้อมูลอัตราการเจริญของรา *A. niger* ที่สภาพอากาศแตกต่างกัน โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของราทุก 2 วัน เป็นเวลา 10 วัน

2.4 ทดสอบความสามารถในการสร้างสารพิษของรา *A. niger* ในอาหาร YES agar ภายใต้การจำลองสภาพอากาศต่าง ๆ ในวันที่ 14 ของการเลี้ยง ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะชิ้นวุ้นอาหารจานละ 5 ชิ้น ใส่ลงใน microtube แล้วนำไปสกัดด้วย methanol หลอดละ 1 มล. เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบ/นาที นาน 1 ชม. ดูดเฉพาะส่วนใสนำไป เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที หลังจากนั้นดูดเฉพาะส่วนใสกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.2 μm แล้วจึงนำสารสกัดที่ได้ไปทดสอบด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซินสำเร็จรูป (Veratox®) ตามวิธีการในคู่มือ

2.5 นำข้อมูลที่ได้จัดทำ contour map แสดงผลของสภาพอากาศจำลองต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารพิษของรา *A. niger* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. การสร้างสารโอคราทอกซิน ของรา *A. niger* บนเมล็ดกาแฟในสภาวะจำลองสภาพอากาศ

วางแผนการทดลองแบบ split plot จำนวน 3 ซ้ำ โดย

- main plot คือ ความเข้มข้นของปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 3 ระดับ ได้แก่ 300, 600, 1000 มก./กก.

- sub plot คือ ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ 3 ระดับ ได้แก่ 60, 70 และ 80%

ทำการทดลองที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 6 ระดับ ได้แก่ 15, 20, 25, 30, 35 และ 40°ซ.

3.1 คัดเลือกเมล็ดกาแฟสารที่กะเทาะเปลือกแล้ว บดให้เป็นกาแฟหยาบ และกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนมาด้วยวิธีการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว นาน 15 นาที

3.2 ปรับค่าความชื้นสัมพัทธ์ในกล่องจำลองสภาพอากาศ ให้มีปริมาณแตกต่างกัน 3 ระดับ โดยการใช้กลีเซอรอลและน้ำกลั่น ในการปรับค่าความชื้นสัมพัทธ์ในกล่องจำลองสภาพอากาศที่ปิดสนิท ซึ่งปรับปรุงแก้ไขตามวิธีการ

Dallyn and Fox (1980) และวัดค่าด้วยวัดเครื่องวัดปริมาณความชื้นสัมพัทธ์

3.3 ชั่งกาแฟสารบดหยาบที่ฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในถ้วยพลาสติก ถ้วยละ 25 ก. ปลูกเชื้อโดยหยด spore suspension ของรา *A. niger* (ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มล.) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนกาแฟสารผสมให้ทั่ว จากนั้นนำไปเก็บรักษาภายใต้การจำลองสภาพอากาศ เป็นเวลา 14 วัน

3.4 ทดสอบความสามารถของ *A. niger* ในการสร้างสารโอคราทอกซิน โดยนำกาแฟสารที่ปลูกเชื้อ *A. niger* ไว้เป็นเวลา 14 วัน มาสกัดโดยเติม 50% methanol ปริมาตร 100 มล. ลงในกาแฟสาร 25 ก. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นนาน 2 นาที แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 หลังจากนั้น นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารโอคราทอกซินด้วยวิธี ELISA ตามคู่มือชุดตรวจสอบโอคราทอกซินสำเร็จรูป

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. คัดเลือกรา *Aspergillus niger* โดยวิธี Direct plating method

จากการคัดเลือกได้รา *A. niger* ที่ปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟ ที่มีลักษณะ conidial head สีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ก้านชูสปอร์ (conidiophore) ผนังเรียบใสไม่มีสี จากการทดสอบการสร้างสารพิษในอาหาร YES medium พบว่า รา *A. niger* ที่คัดเลือกเพื่อใช้ในการทดลองสามารถสร้างสารโอคราทอกซินได้ถึง 10.9 ไมโครกรัม/กก.

2. อัตราการเจริญและการสร้างสารโอคราทอกซินของรา *A. niger* บนอาหารเลี้ยงเชื้อในการจำลองสภาพอากาศ

อัตราการเจริญของเชื้อรา

ผลการทดสอบในสภาวะจำลองสภาพอากาศ ที่อุณหภูมิ 25°ซ. ปริมาณความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 300 มก./กก. พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำอิสระ 0.93, 0.95 และ 0.99 ที่ระยะการเจริญ 2 วัน *A. niger* เริ่มสร้างเส้นใย มีขนาดโคโลนีเฉลี่ย 2.41, 2.38 และ 1.96 ซม. ตามลำดับ ขณะที่อาหารที่มีปริมาณน้ำอิสระ 0.75, 0.80, 0.85, 0.90 ไม่พบการเจริญของเชื้อรา แต่ที่ระยะเวลา 4 วัน ปริมาณน้ำอิสระ 0.90 รา *A. niger* เริ่มมีการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเฉลี่ย 1.84 ซม. ขณะที่ a_w 0.93 0.95 และ 0.99 มีขนาดโคโลนีเฉลี่ย 6.21 6.52 และ 4.16 ซม. ตามลำดับ การทดสอบอัตราการเจริญของเชื้อรา *A. niger* ในสภาพอากาศต่าง ๆ พบว่าอิทธิพลของปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ และปริมาณน้ำอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการเจริญของรา *A. niger* ที่เวลา 10 วัน (Table 1-6)

รา *A. niger* มีอัตราการเจริญเฉลี่ยสูงสุดที่อุณหภูมิ 25°ซ. ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 600 มก./กก. และระดับปริมาณน้ำอิสระ 0.93, 0.95, 0.99 และ 0.90 มีอัตราการเจริญของเส้นใยสูงสุดเฉลี่ย 0.85, 0.79, 0.57 และ 0.36 ซม./วัน ตามลำดับ แต่ที่อุณหภูมิ 15°ซ. ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 300 มก./กก. และระดับปริมาณน้ำอิสระ 0.93, 0.95, 0.99 และ 0.90 รา *A. niger* มีอัตราการเจริญเฉลี่ยต่ำ โดยมีอัตราการเจริญของเส้นใยสูงสุดเฉลี่ย 0.23, 0.21, 0.17 และ 0.16 ซม./วัน ตามลำดับ ส่วนในช่วงปริมาณน้ำอิสระ 0.75-0.85 ที่ทุกระดับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ และทุกระดับอุณหภูมิ

ที่ทำการทดสอบ รา *A. niger* ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ สรุปได้ว่า รา *A. niger* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 20-35°ซ. ปริมาณน้ำอิสระ 0.93 และ 0.95 ที่ระดับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 600 และ 1,000 มก./กก. ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Astoreca *et al.* (2007) ที่รายงานว่า ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของรา *A. niger*, *A. awamori* และ *A. carbonarius* บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมเป็นวัตถุดิบจากอาหารที่แยกได้ (3% w/v substrate extract agar) คือ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และปริมาณน้ำอิสระ 0.97 เชื้อราเจริญได้ดีที่สุด

เมื่อนำข้อมูลที่ได้ทำ contour map เพื่อดูอิทธิพลผลของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของรา *A. niger* พบว่า ในช่วงอุณหภูมิ 17-38°ซ. ปริมาณน้ำอิสระ 0.87-0.99 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 750-1000 มก./กก. รา *A. niger* มีอัตราการเจริญมากกว่า 0.25 ซม./วัน และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 24-32°ซ. ปริมาณน้ำอิสระ 0.89-0.99 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 780-1000 มก./กก. โดยมีอัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 0.35 ซม./วัน (Figure 1)

Table 1 Growth rate (cm/day) of *Aspergillus niger* when conned with different concentration of carbon dioxide and water activity levels at 15°C after 10 days incubation

a_w	CO_2 concentration (mg/kg)			Mean
	300	600	1000	
0.75	0.00 c	0.00 d	0.00 e[1/]	0.00
0.80	0.00 c	0.00 d	0.00 e	0.00
0.85	0.00 c	0.00 d	0.00 e	000
0.90	0.16 b	0.00 d	0.15 d	0.10
0.93	0.23 a	0.33 a	0.35 a	0.30
0.95	0.21 a	0.26 b	0.28 b	0.25
0.99	0.17 b	0.22 c	0.26 c	2.22
Mean	0.11	0.12	0.15	0.13

CV (b) = 8.3% CV (a) = Insufficient error of df

[1/] Mean in the same column, followed by a common letter are not signicantly different at 5% level by DMRT

Table 2 Growth rate (cm/day) of *Aspergillus niger* when conned with different concentration of carbon dioxide and water activity levels at 20°C after 10 days incubation

a_w	CO_2 concentration (mg/kg)			Mean
	300	600	1000	
0.75	0.00 e[1/]	0.00 e[1/]	0.00 e[1/]	0.00
0.80	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00
0.85	0.00 e	0.00 e	0.00 e	000
0.90	0.22 d	0.22 d	0.22 d	0.22
0.93	0.69 a	0.71 a	0.71 a	0.70
0.95	0.63 b	0.64 b	0.64 b	0.64
0.99	0.50 c	0.50 c	0.50 c	0.50
Mean	0.29	0.30	0.30	0.29

CV (b) = 2.2 % CV (a) = Insufficient error of df

[1/] Mean in the same column, followed by a common letter are not signicantly different at 5% level by DMRT

Table 3 Growth rate (cm/day) of *Aspergillus niger* when conned with different concentration of carbon dioxide and water activity levels at 25°C after 10 days incubation

a_w	CO_2 concentration (mg/kg)			Mean
	300	600	1000	
0.75	0.00 d	0.00 e[1/]	0.00 e	0.00
0.80	0.00 d	0.00 e	0.00 e	0.00
0.85	0.00 d	0.00 e	0.00 e	000
0.90	0.26 c	0.36 d	0.37 d	0.33
0.93	0.83 a	0.85 a	0.81 a	0.83
0.95	0.53 a	0.79 b	0.76 b	0.79
0.99	0.53 b	0.57 c	0.51 c	0.54
Mean	0.35	0.37	0.35	0.36

CV (b) = 6.3% CV (a) = Insufficient error of df

[1/] Mean in the same column, followed by a common letter are not signicantly different at 5% level by DMRT

Table 4 Growth rate (cm/day) of *Aspergillus niger* when conned with different concentration of carbon dioxide and water activity levels at 30°C after 10 days incubation

a_w	CO_2 concentration (mg/kg)			Mean
	300	600	1000	
0.75	0.00 d	0.00 e[1/]	0.00 d	0.00
0.80	0.00 d	0.00 e	0.00 d	0.00
0.85	0.00 d	0.00 e	0.00 d	000
0.90	0.28 c	0.33 d	0.56 c	0.39
0.93	0.60 a	0.78 a	0.68 b	0.69
0.95	0.55 a	0.71 b	0.78 a	0.68
0.99	0.45 b	0.47 c	0.71 b	0.55
Mean	0.27	0.33	0.39	0.33

CV (b) = 9.8% CV (a) = Insufficient error of df

[1/] Mean in the same column, followed by a common letter are not signicantly different at 5% level by DMRT

Table 5 Growth rate (cm/day) of *Aspergillus niger* when conned with different concentration of carbon dioxide and water activity levels at 35°C after 10 days incubation

a_w	CO_2 concentration (mg/kg)			Mean
	300	600	1000	
0.75	0.00 e[1/]	0.00 e	0.00 e	0.00
0.80	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00
0.85	0.00 e	0.00 e	0.00 e	000
0.90	0.26 d	0.27 d	0.27 d	0.27
0.93	0.57 a	0.57 a	0.57 a	0.57
0.95	0.54 b	0.53 b	0.53 b	0.53
0.99	0.42 c	0.40 c	0.41 c	0.41
Mean	0.26	0.25	0.25	0.25

CV (b) = 2.7% CV (a) = Insufficient error of df

[1/] Mean in the same column, followed by a common letter are not signicantly different at 5% level by DMRT

Table 6 Growth rate (cm/day) of *Aspergillus niger* when conned with different concentration of carbon dioxide and water activity levels at 40°C after 10 days incubation

a_w	CO_2 concentration (mg/kg)			Mean
	300	600	1000	
0.75	0.00 e[1/]	0.00 d	0.00 e	0.00
0.80	0.00 e	0.00 d	0.00 e	0.00
0.85	0.00 e	0.00 d	0.00 e	000
0.90	0.40 b	0.37 b	0.42 b	0.40
0.93	0.46 a	0.44 a	0.47 a	0.46
0.95	0.39 c	0.37 b	0.37 c	0.38
0.99	0.32 d	0.30 c	0.30 d	0.31
Mean	0.22	0.21	0.22	0.22

CV (b) = 3.2% CV (a) = Insufficient error of df

[1/] Mean in the same column, followed by a common letter are not signicantly different at 5% level by DMRT

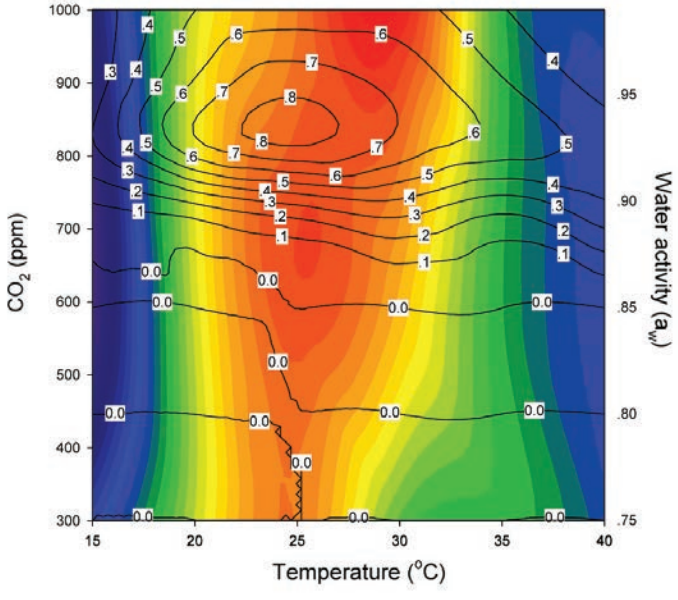

Figure 1 Effects of interaction of temperature, carbon dioxide and water activity level on growth rate of *A. niger* (cm/day)

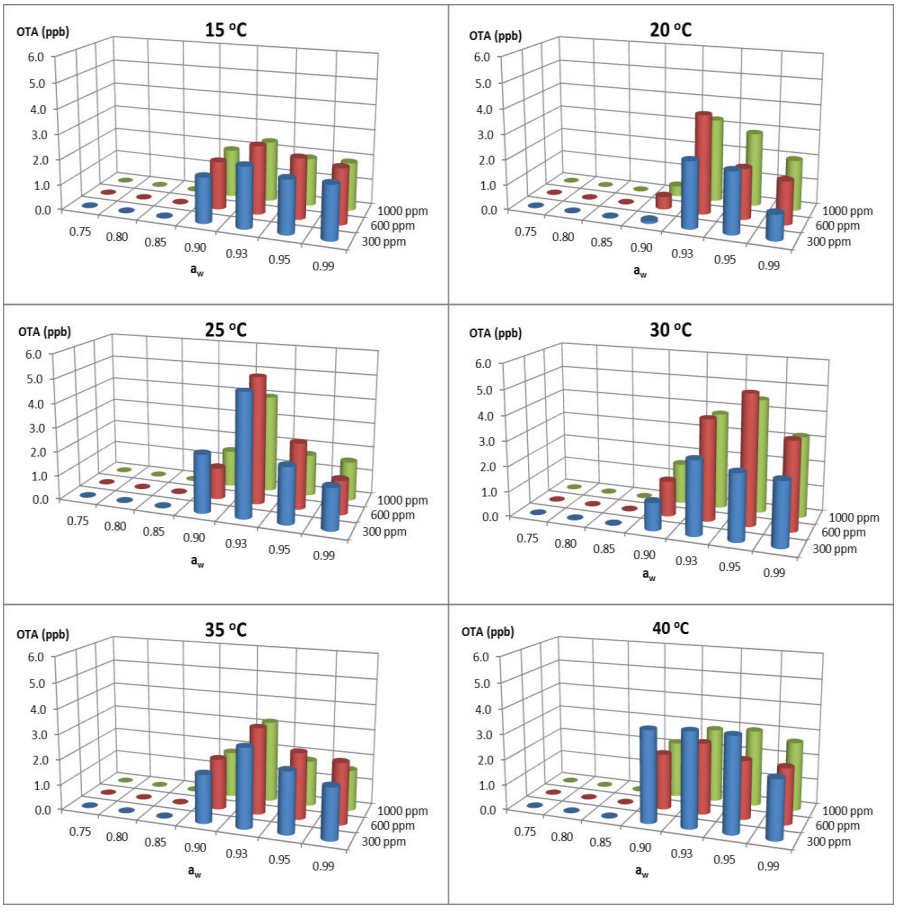

Figure 2 Average of Ochratoxin A production (µg/kg) by *Aspergillus* niger at different temperature, carbon dioxide and water activity levels

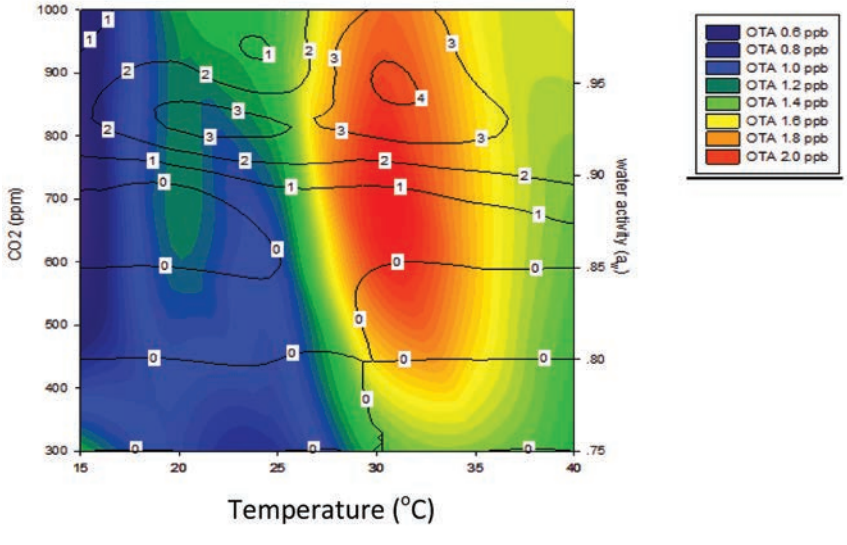

Figure 3 Effects of interaction of temperature, carbon dioxide and water activity level on Ochratoxin A production by *A. niger* (µg/kg)

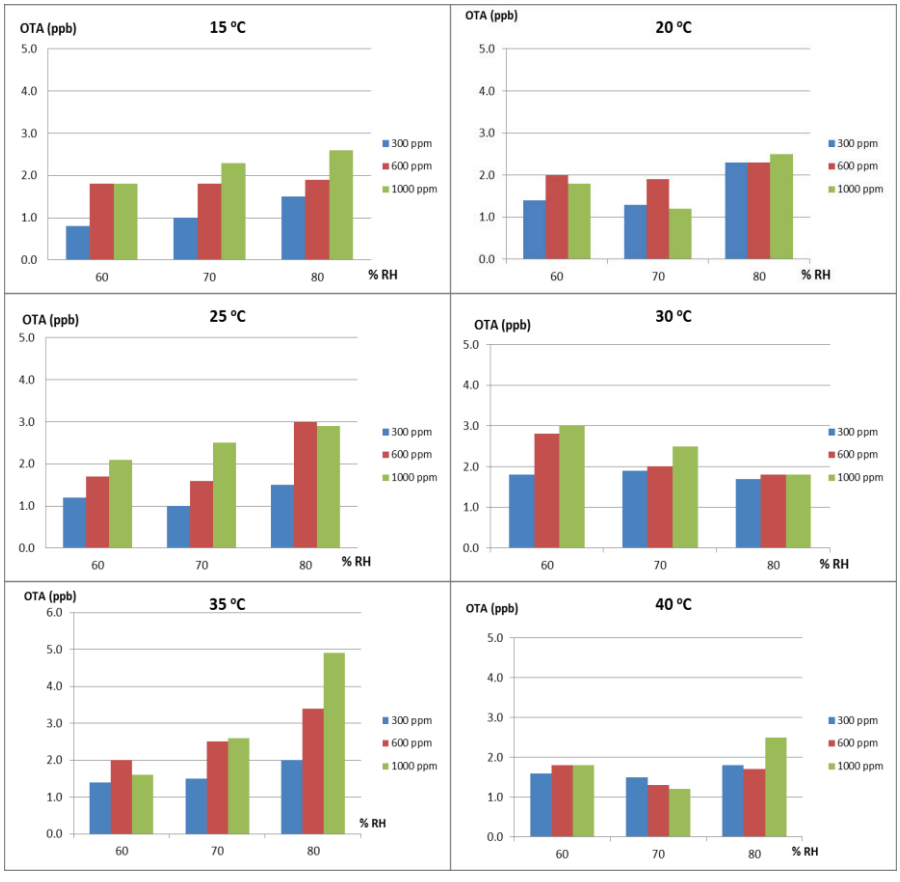

Figure 4 Average of Ochratoxin production (µg/kg) in green coffee beans by *A. niger* at different temperature, carbon dioxide and water activity levels

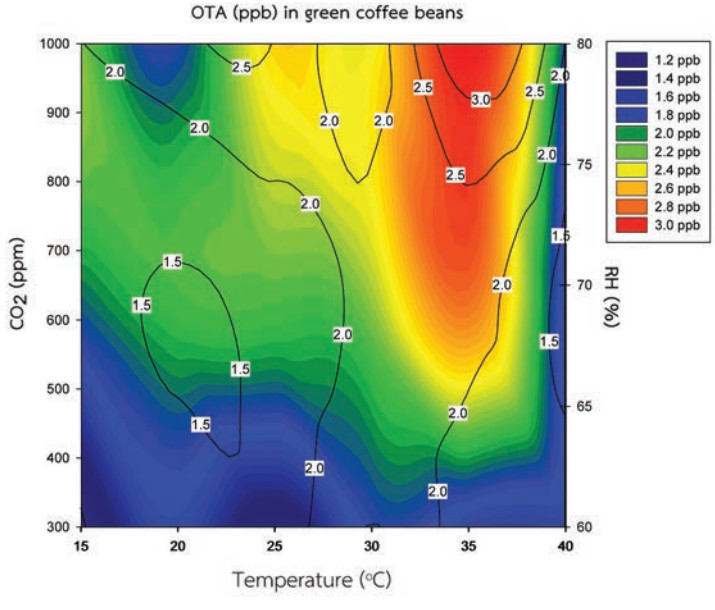

Figure 5 Effects of interaction of temperature, carbon dioxide and water activitry level on Ochratoxin A production on green coffee beans by *A. niger* (µg/kg)

การสร้างสารโอคราทอกซิน

ปริมาณสารโอคราทอกซิน ที่รา *A. niger* สร้างในอาหาร YES agar ที่จำลองสภาพอากาศแตกต่างกัน พบว่า *A. niger* สามารถสร้างสารโอคราทอกซิน ได้ทุกช่วงอุณหภูมิที่ทดสอบ (15-40°ซ.) โดยสร้างสารโอคราทอกซินสูงที่อุณหภูมิ 30°ซ. ปริมาณน้ำอิสระ มีผลต่อการสร้างสารพิษของราเช่นกัน พบว่า ในทุกระดับอุณหภูมิและทุกระดับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ทดสอบ รา *A. niger* สร้างสารพิษได้ที่ระดับปริมาณน้ำอิสระ 0.90-0.99 โดยสร้างสารพิษเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.4-4.1 ไมโครกรัม/กก. (Figure 2) ที่อุณหภูมิ 30°ซ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 600 มก./กก. ปริมาณน้ำอิสระ 0.95, 0.93, 0.99 และ 0.90 รา *A. niger* สร้างสารโอคราทอกซินเฉลี่ย 4.1, 3.5, 3.0 และ 1.3 ไมโครกรัม/กก. ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาอิทธิพลของแต่ละปัจจัย ที่มีผลต่อการสร้างสารโอคราทอกซิน พบว่า รามีการสร้างสารพิษได้ดีที่ช่วงอุณหภูมิ 27-36°ซ. ระดับปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 800-1000 มก./กก. และระดับปริมาณน้ำอิสระ 0.90-0.99 โดยสร้างสารโอคราทอกซิน มากกว่า 2 ไมโครกรัม/กก. (Figure 3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Esteban *et al.* (2006) ที่ศึกษาผลกระทบของปริมาณน้ำอิสระ (a_w 0.82-0.99) ที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารโอคราทอกซิน โดยราในกลุ่ม *A. niger* aggregate ที่เลี้ยงบนอาหาร CYA และ YES เป็นเวลา 30 วัน สามารถสร้างสารโอคราทอกซินได้ในช่วง a_w 0.90-0.99

3. การสร้างสารโอคราทอกซินของรา *Aspergillus niger* บนเมล็ดกาแฟในการจำลองสภาพอากาศ

การทดสอบการสร้างสารโอคราทอกซินของรา *A. niger* ในเมล็ดกาแฟสาร ที่สภาพอากาศแตกต่างกัน พบว่า รา *A. niger* สร้างสารโอคราทอกซินในกาแฟสารได้ในช่วงอุณหภูมิ 15-40°ซ. ที่ระดับความชื้นสัมพัทธ์ 70 และ 80% และ พบว่า สภาพอากาศที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 600 และ 1000 มก./กก. *A. niger* สร้างสารโอคราทอกซินได้มากกว่าที่ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 300 มก./กก. ปริมาณสร้างสารโอคราทอกซิน อยู่ระหว่าง 0.8-4.9 ไมโครกรัม/กก. โดยรา *A. niger* สร้างสารพิษสูงสุดที่อุณหภูมิ 35°ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 80% ที่ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 1000, 600 และ 300 มก./กก. สร้างสารโอคราทอกซินเฉลี่ย 4.9, 3.4 และ 2.0 มค.ก./กก. ตามลำดับ (Figure 4)

จากกราฟ contour map ที่แสดงอิทธิพลของแต่ละปัจจัยต่อการสร้างสารโอคราทอกซินในกาแฟสาร พบว่า *A. niger* สร้างสารพิษได้มากกว่า 2.8 มค.ก./กก. ที่อุณหภูมิ 30-37°ซ. ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 600-1,000 มก./กก. และความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 70% ขึ้นไป (Figure 5) สอดคล้องกับรายงานของ Palacios-Cabrera *et al.* (2004) ที่พบว่าระดับความชื้นสัมพัทธ์ 80%, 87% และ 95% ที่อุณหภูมิ 25°ซ. ในช่วงกลางวัน และ 14°ซ. ในช่วงกลางคืน รา *A. ochraceus* สร้างสารโอคราทอกซินในเมล็ดกาแฟดิบได้ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% และสร้างมากขึ้นที่ความชื้นสัมพัทธ์ 87% โดยอุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลง จะช่วยให้การสร้างสารพิษเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าการที่มีอุณหภูมิคงที่ และจากรายงานของ Mohammadreza and Khatib (2011) พบว่า ปริมาณน้ำอิสระ อาจจะเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุด ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราบนอาหารที่มีสารอาหารที่เหมาะสม และการลดปริมาณน้ำอิสระให้ต่ำกว่า 0.85 เป็นแนวทางแรกที่จะช่วยควบคุมการสร้างสารโอคราทอกซินได้

สรุปผลการทดลอง

สภาพอากาศที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 15°ซ. ปริมาณน้ำอิสระน้อยกว่า 0.85 และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำกว่า 300 มก./กก. ทำให้ *A. niger* มีอัตราการเจริญต่ำ แต่เมื่ออุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ และคาร์บอนไดออกไซด์สูงขึ้น ส่งผลให้ *A. niger* มีการเจริญเพิ่มขึ้น โดยมีอัตราการเจริญเฉลี่ยสูงสุด 0.85 ซม./วัน ที่อุณหภูมิ 25°ซ. ปริมาณน้ำอิสระ 0.93 และ ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 600 มก./กก. ขณะที่ *A. niger* ที่อยู่ภายใต้สภาพอากาศเย็น ปริมาณน้ำอิสระน้อยกว่า 0.90 และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำกว่า 600 มก./กก. ความสามารถในการสร้างสารโอคราทอกซิน อยู่ในระดับต่ำ แต่เมื่อระดับอุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้น ทำให้มีการสร้างสารโอคราทอกซินเพิ่มมากขึ้น เมื่อนำข้อมูลนี้ไปทดสอบการเก็บรักษากาแฟสาร พบว่า สภาพอากาศที่เหมาะสมในการเก็บรักษากาแฟสาร ควรอยู่ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15°ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำกว่า 60% และมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ไม่เกิน 300 มก./กก.

เอกสารอ้างอิง

กัณฑรีย์ บุญประกอบ. 2548. *ความเชื่อมโยงของอนุสัญญาสหประชาชาติว่าด้วยการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศกับอนุสัญญาความหลากหลายทางชีวภาพ.* หน้า 1-17. *ใน:* การประชุมเชิงปฏิบัติการความหลากหลายทางชีวภาพด้านป่าไม้และสัตว์ป่า: ความก้าวหน้าของผลงานวิจัยและกิจกรรม ปี 2548. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

ศูนย์ภูมิอากาศ. 2553. เอกสารวิชาการ ความผันแปรและการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศของประเทศไทยและการคาดการณ์ในอนาคต. กรมอุตุนิยมวิทยา. แหล่งที่มา http://www.tmd.go.th/info/climate__future.pdf เข้าถึงเมื่อ. 12 กุมภาพันธ์ 2561

Astoreca, A., Magnolia, C., Ramirez, M.L., Combina, M. and A. Dalcero. 2007. Water activity and temperature effects on growth of *Aspergillus niger, A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina. *Int. J. of Food Microbiol.* 119: 314-318.

Dallyn, H. and Fox, A. 1980. Spoilage of material of reduced water activity by xerophilic fungi. p. 129-139 *In*: Gould, G. and Corry, E., Eds., Society of Applied Bacteriology Technical Series, Academic Press, London. Edwin R. Palencia, Dorothy M. Hinton, and Charles W. Bacon. 2010. Review The Black *Aspergillus* Species of Maize and Peanuts and Their Potential for Mycotoxin Production. *Toxins* 2, 399-416.

Environmental Protection Agency (EPA). 1997. *Aspergillus niger* Final Risk Assessment. Biotechnology program under the toxic substances control act (TSCA). Available at: http://www.epa.gov/biotech__rule/pubs/fra/fra006.htm. Accessed : Januay 4, 2018

Esteban, A., M.L. Abarca, M.R. Bragulat and F.J. Cabanes. 2006. Effect of water activity on ochratoxin A production by *Aspergillus niger* aggregate species. *Int. J. Food Microbiol.* 108: 188-195.

IPPC. 2007. *Intergovernmental panel on climate change report*. Climate

change 2007: Synthesis Report. 55 p.

Kristian F.N., M.M. Jesper, J. Maria, O.L. Thomas and J.C. Frisvad. 2009. Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Anal Bioanal Chem* 395:1225–1242.

Mohammadreza, K. and N. Khatib. 2011. The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production. *Environ Toxicol Pharmacol* 32: 113-121.

Palacios-Cabrera, H., Taniwaki, M.H., Menezes, H.C. and B.T. Iamanaka. 2004. The production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* in raw coffee at different equilibrium relative humidity and under alternating temperatures. *Food Control* 15: 531-535.

Paterson R.R.M. and N. Lima. 2011. Further mycotoxin effects from climate change. *Food Res. Int.* 44: 2555-2566.