คุณสมบัติการทนความร้อนและความสามารถในการสร้างสารพิษพาทูลินของเชื้อราทนความร้อนที่แยกจากดินไร่สับปะรด

Heat-Resistant Characteristic and Patulin Production Ability of Heat-Resistant Molds Isolated from Pineapple Field Soils

ธนภูมิ มณีบุญ[1, 2, 3] วราภา มหากาญจนกุล[4*] สมศิริ แสงโชติ[5] รัชนี ฮงประยูร[6] และ ชนัญญา ช่วยศรีนวล[3]

Thanapoom Maneeboon[1,2,3], Warapa Mahakarnchanakul[4*], Somsiri Sangchote[5], Ratchanee Hongprayoon[6] and Chananya Chuaysrinule[3]

Received: October 19, 2023

Revised: January 26, 2024

Accepted: January 29, 2024

Abstract: Heat-resistant molds (HRMs) are a group of molds capable of producing ascospores that can withstand heat treatments at temperatures as high as 75°C for at least 30 min. The presence of HRM ascospores presents a significant challenge in the pasteurization of fruit juices. Moreover, some strains of HRMs can produce mycotoxins, which are harmful to consumers. This study aimed to characterize HRMs isolated from pineapple field soils in Chonburi and Kamphaeng Phet provinces, Thailand. The results revealed that HRMs were present in all soil samples. Subsequently, 60 representative isolates were randomly chosen to evaluate their ascospores-producing ability, which included 5 genera namely *Aspergillus* (with a neosartorya morph), *Talaromyces*, *Penicillium* (with an eupenicillium morph), *Hamigera* and *Paecilomyces* (with a byssochlamys morph). Among these isolates, 28 isolates demonstrated the capacity to produce heat-resistant ascospores. Furthermore, this study observed patulin-producing capabilities in *Paec*. *niveus* and *P. setosum* strains, they produced patulin toxin in pineapple juice at higher concentrations, approximately 110 mg/mL. These findings emphasize the significance of the presence of these HRMs in pineapple field soils, as they can produce heat-resistant ascospores, and some strains are capable of producing patulin, which can lead to spoilage in pineapple and other fruit juices.

Keywords: heat-resistant molds, ascospores, patulin, pineapple juice, food safety

[1] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

[1] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140,

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

[2] Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900,

[3] ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[3] Scientific Equipment and Research Division, KURDI, Kasetsart University, Bangkok 10900

[4] ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[4] Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900,

[5] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

[5] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900,

[6] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

[6] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140,

*Corresponding author: fagiwpm@ku.ac.th

บทคัดย่อ: เชื้อราทนความร้อนเป็นกลุ่มของเชื้อราที่ผลิตแอสโคสปอร์ที่ทนอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ได้อย่างน้อย 30 นาที การปนเปื้อนของแอสโคสปอร์เป็นปัญหาสำคัญในกระบวนการพาสเจอร์ไรส์น้ำผลไม้ นอกจากนี้เชื้อราทนความร้อนบางสายพันธุ์ยังผลิตสารพิษซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างดินในไร่สับปะรดของประเทศไทยจากจังหวัดชลบุรี และจังหวัดกำแพงเพชร ผลการทดลองพบว่ามีเชื้อราทนความร้อนในดินทุกตัวอย่าง เมื่อคัดเลือกเชื้อราจำนวน 60 ไอโซเลท ประกอบด้วยเชื้อรา 5 สกุล ได้แก่ *Aspergillus* (with a neosartorya morph), *Talaromyces*, *Penicillium* (with an eupenicillium morph), *Hamigera* และ *Paecilomyces* (with a byssochlamys morph) มาทดสอบการสร้างแอสโคสปอร์ พบว่าเชื้อรา 28 ไอโซเลท สามารถสร้างแอสโคสปอร์ที่ทนความร้อน นอกจากนี้ยังพบว่า *Paec. niveus* และ *P. setosum* สามารถผลิตสารพิษพาทูลินในน้ำสับปะรดได้ในปริมาณสูง ประมาณ 110 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราในดินปลูกสับปะรดสามารถผลิตแอสโคสปอร์ที่ทนความร้อนและบางสายพันธุ์สามารถผลิตสารพิษพาทูลิน อาจเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของน้ำสับปะรดและผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้อื่น ๆ

คำสำคัญ: เชื้อราทนความร้อน, แอสโคสปอร์, พาทูลิน, น้ำสับปะรด, ความปลอดภัยทางอาหาร

คำนำ

เชื้อราทนความร้อน (heat-resistant molds หรือ HRMs) เป็นกลุ่มของเชื้อราที่เป็นสาเหตุการเสื่อมเสียของน้ำผลไม้และผลิตภัณฑ์จากผลไม้ที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน เนื่องจากสามารถสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) ที่มีผนังหนา โดยการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ แอสโคสปอร์สามารถทนต่อความร้อนในกระบวนการพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ได้อย่างน้อย 30 นาที นอกจากนี้ยังทนความดัน และสารเคมีที่ใช้ฆ่าเชื้อต่าง ๆ (Samson *et al*., 2009) กลุ่มของเชื้อราทนความร้อนที่สำคัญ ได้แก่ *Aspergillus* (with a neosartorya morph), *Talaromyces*, *Paecilomyces* (with a byssochlamys morph), *Penicillium* (with an eupenicillium morph) และ *Hamigera* แหล่งของแอสโคสปอร์ของเชื้อราทนความร้อนที่สำคัญ คือ ดินที่ใช้เพาะปลูกพืช ทั้งนี้แอสโคสปอร์จะเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำผลไม้โดยอาศัยดินที่ปนเปื้อนไปกับผลไม้ที่เก็บเกี่ยวไปจากแปลงปลูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลไม้ที่มีผลอยู่ใกล้กับผิวดิน เช่น สับปะรด สตรอเบอรี่ นอกจากนี้ยังมีรายงานการปนเปื้อนของแอสโคสปอร์ในบรรจุภัณฑ์รวมทั้งส่วนประกอบและสารเติมแต่งอื่น ๆ ที่ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มจากผลไม้ (Rico-Munoz, 2017) เมื่อแอสโคสปอร์ปนเปื้อนเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำผลไม้ ความร้อนที่ใช้ในขั้นตอนการฆ่าเชื้อจะกระตุ้นการงอกของแอสโคสปอร์ และเชื้อรายังสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเพคติน (Kikoku, 2006) เกิดการเสื่อมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ทำให้เนื้อสัมผัส กลิ่น และรสชาติเปลี่ยนแปลงไป และก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ

นอกจากนี้ เชื้อราทนความร้อนบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษ (mycotoxin) ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เช่น สารพิษพาทูลิน (patulin) ที่สร้างโดยเชื้อรา *Paecilomyces niveus* (Byssochlamys nivea) และ *Penicillium* หลายสปีชีส์ โดยเป็นอันตรายต่อตับ ม้าม และไต เป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Glaser and Stopper, 2012) สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นผู้ผลิตและส่งออกน้ำผลไม้รายใหญ่ของโลก โดยเฉพาะน้ำสับปะรดเข้มข้น ยังขาดการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเชื้อราในกลุ่มนี้ โดยเฉพาะคุณสมบัติการทนความร้อนและการสร้างสารพิษ งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาคุณสมบัติการสร้างแอสโคสปอร์ที่ทนความร้อนของเชื้อราที่แยกได้จากดินปลูกสับปะรด และความสามารถในการผลิตสารพิษพาทูลินของเชื้อราบางสายพันธุ์ องค์ความรู้นี้จะสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในพัฒนาวิธีการป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราทนความร้อน และสารพิษในกระบวนการผลิตน้ำผลไม้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การแยกเชื้อราทนความร้อน

สุ่มเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกสับปะรดในจังหวัดชลบุรี จำนวน 5 แปลง และจังหวัดกำแพงเพชร จำนวน 4 แปลง โดยในแต่ละแปลงเก็บตัวอย่างให้กระจายหลาย ๆ จุด นำมาผสมรวมกันอย่างน้อย 1 กิโลกรัม จะได้ตัวอย่างดินจำนวน 1 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อราทนความร้อนตามวิธีการของ Rico-Munoz *et al.* (2015) ดังนี้ ชั่งตัวอย่างดิน 10 กรัม เติมลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 240 มิลลิลิตร ที่อยู่ในถุงพลาสติก ปิดปากถุงแล้วนำไปผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 30 นาที นำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ double strength malt extract agar (MEA) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่เติม rose bengal 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ chloramphenicol 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยผสมในขณะที่สารละลายตัวอย่างดินและอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส แบ่งเทสารละลายดังกล่าวลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 14 วัน ตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อรา ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ คัดเลือกโคโลนีที่เป็นตัวแทน โดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะโคโลนีมาทำให้บริสุทธิ์สำหรับใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การระบุชนิดของเชื้อราทนความร้อน

การระบุชนิดของเชื้อราทนความร้อนในระดับสกุลอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MEA, oatmeal agar (OA) และ dichloran glycerol 18 (DG18) agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จัดกลุ่มตามลักษณะและสีของโคโลนี ศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น ลักษณะเส้นใย รูปร่างและลักษณะของโคนีเดีย สำหรับการระบุชนิดของเชื้อราในระดับสปีชีส์อาศัยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 (5'TCCGTAGG TGAACCTGCGG3') และ ITS4 (5'TCCTCCGCT-TATTGATATGC3')

การผลิตแอสโคสปอร์

เพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MEA ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสร้างแอสโคสปอร์ที่ทนความร้อน (Sant'ana *et al.*, 2009) เตรียมสารละลายแอสโคสปอร์ตามวิธีการของ Wyatt *et al.* (2015) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ดังนี้ เติมสารละลาย Tween 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าโคโลนีของเชื้อรา ใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยเพื่อให้แอสโคสปอร์กระจาย นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างแอสโคสปอร์ด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดเชื้อ ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ในขั้นตอนสุดท้ายเติม glass bead ลงในสารละลายดังกล่าว ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่านาน 1 นาที เพื่อให้แอสโคสปอร์หลุดออกจากถุงแอสคัส สำหรับการทำลายเส้นใยเชื้อราและโครงสร้างอื่น ๆ ที่ไม่ทนความร้อนที่อยู่ในสารละลายแอสโคสปอร์ ทำโดยนำสารละลายแอสโคสปอร์ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บรักษาสารละลายแอสโคสปอร์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

คุณสมบัติการทนความร้อนของแอสโคสปอร์

เจือจางสารละลายแอสโคสปอร์ใน glucose buffered solution (12.5 °Brix, pH 3.6) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาณแอสโคสปอร์เริ่มต้นในช่วง 10^4-10^5 แอสโคสปอร์ต่อมิลลิลิตร ขึ้นกับเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ เติมสารละลายดังกล่าวในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ ขนาด 2x4 นิ้ว (Tranquillini *et al.*, 2017) ปิดปากถุงด้วยเครื่องซีลปิดปากถุงด้วยความร้อน โดยให้มีอากาศภายในน้อยที่สุด นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายแอสโคสปอร์ไปเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจนับจำนวนแอสโคสปอร์ที่รอดชีวิตภายหลังการให้ความร้อนเป็นเวลา 30 นาที ($N_{30\ min}$) เปรียบเทียบกับจำนวนแอสโคสปอร์เริ่มต้นที่ได้จากการนำสารละลายแอสโคสปอร์ไปให้ความร้อน

ที่อุณหภูมิเดียวกัน เป็นเวลา 5 นาที ($N_{5\,min}$) เพื่อกระตุ้นการงอกของแอสโคสปอร์ ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

การตรวจสอบการผลิตสารพิษพาทูลิน

ทดสอบการสร้างสารพิษพาทูลินของเชื้อราในสกุล *Paecilomyces* และ *Penicillium* โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด potato dextrose broth (PDB) และน้ำสับปะรด (13°Brix, pH 3.6) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเติมสารละลายสปอร์ของเชื้อราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน ให้มีความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหารทดสอบ นำไปบ่มที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สกัดสารพิษพาทูลินจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยกระบวนการสกัดของเหลว-ของเหลว (liquid-liquid extraction) ตามวิธีการของ Hammami *et al*. (2017) โดยใช้สารละลายผสมระหว่างเอทิลอะซิเตทและกรดฟอร์มิค (อัตราส่วน 200:1) เป็นตัวทำละลายในการสกัด วิเคราะห์ปริมาณสารพาทูลินด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Ascentis® C18 (4.6x250 mm, 5 µm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) สารละลายเฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตไนไทรล์: น้ำ อัตราส่วน 10:90 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วยดีเทคเตอร์ชนิดอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 276 นาโนเมตร เปรียบเทียบความเข้มข้นของสารพาทูลินในตัวอย่างโดยวิธีการสร้างกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารมาตรฐานพาทูลิน (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) ด้วยวิธีการทดสอบ Tukey's honestly significant difference (HSD) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรม Minitab Version 21.1 (Minitab Inc, State College, PA, USA)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจนับจำนวนเชื้อราทนความร้อนในตัวอย่างดิน

ผลการตรวจนับจำนวนเชื้อราในตัวอย่างดินจากแปลงปลูกสับปะรดในจังหวัดชลบุรีและจังหวัดกำแพงเพชร โดยนำตัวอย่างดินไปผ่านขั้นตอน heat treatment เพื่อคัดแยกเฉพาะเชื้อราที่สามารถทนความร้อน แล้วจึงนำไปแยกเชื้อรา พบว่ามีเชื้อราทนความร้อนในดินทุกตัวอย่าง (Table 1) โดยจำนวนเชื้อราที่ตรวจพบอยู่ในช่วง 0.51 – 2.06 Log CFU ต่อกรัมตัวอย่างดิน โดยดินแปลงปลูกสับปะรดจากจังหวัดกำแพงเพชรมีจำนวนเชื้อราทนความร้อนมากที่สุด ทั้งนี้พบเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* ในดินทุกตัวอย่างและพบเป็นสัดส่วนเฉลี่ยมากที่สุด (ร้อยละ 76.12) สำหรับเชื้อราทนความร้อนกลุ่มอื่นที่พบ ได้แก่ *Talaromyces, Penicillium, Hamigera* และ *Paecilomyces* ตามลำดับ ทั้งนี้ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อจำนวนและชนิดของเชื้อราทนความร้อนที่พบในดินแต่ละตัวอย่าง ได้แก่ คุณสมบัติของดิน เช่น ปริมาณธาตุอาหาร pH ความเค็ม และความชื้น (Muneer *et al*., 2021) จากผลการวิจัยของ Graça *et al*. (2021) พบว่า ดินที่มีปริมาณฟอสฟอรัสสูงจะมีเชื้อราในไฟลัม Ascomycota จำนวนมาก ซึ่งเชื้อราทนความร้อนจัดอยู่ในไฟลัมนี้เช่นเดียวกัน

Agricultural Science and Management J. 8 (2) : 45-54 (2025)

Table 1 Total count of fungi and incidence of fungal genera isolated from pineapple field soils using the heat treatment method at 75°C for 30 min.

Location	Province	Total fungal count* (Log CFU/g soil ± SD)	Incidence (%)				
			Aspergillus	*Hamigera*	*Paecilomyces*	*Penicillium*	*Talaromyces*
Pineapple field 1	Chonburi	1.33 ± 0.09 [c**]	67.44	0	0	20.93	11.63
Pineapple field 2	Chonburi	2.04 ± 0.56 [b]	75.00	4.09	0	0	20.91
Pineapple field 3	Chonburi	1.47 ± 0.03 [c]	54.24	10.17	0	32.20	3.39
Pineapple field 4	Chonburi	1.45 ± 0.22 [c]	78.57	0	0	0	21.43
Pineapple field 5	Chonburi	1.80 ± 0.08 [b]	98.59	0	0.31	0.16	0.94
Pineapple field 6	Kamphaeng Phet	2.09 ± 0.21 [a]	99.19	0	0	0.65	0.16
Pineapple field 7	Kamphaeng Phet	1.22 ± 0.34 [c]	85.54	14.46	0	0	0
Pineapple field 8	Kamphaeng Phet	1.01 ± 0.26 [c]	76.47	7.84	0	15.69	0
Pineapple field 9	Kamphaeng Phet	0.51 ± 0.04 [d]	50.00	18.75	0	0	31.25
Overall	-	-	76.12	6.15	0.03	8.70	9.97

* Average ± standard deviation (SD) from two replicates

** Different superscript lowercase letters indicate a statistical difference within column according to Tukey's HSD test ($p < 0.05$).

ชนิดของเชื้อราทนความร้อนที่พบในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ ธิดา และเลขา (2553) ที่ศึกษาเชื้อราทนความร้อนจากดินที่ใช้ทำการเกษตรในประเทศไทย โดยใช้วิธี heat treatment ที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที พบเชื้อราทั้งหมด 23 สกุล 32 สปีชีส์ โดยเชื้อราชนิดที่พบเช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ ได้แก่ *Paec. niveus* (*B. nivea*), *A. spinosus* (Neosartoyar spinosa), *T. macrosporus*, *Penicillium* sp. (with an eupenicillium morph) และ *Hamigera* sp. เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Eamvijarn (2013) ที่ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราในดินที่ใช้เพาะปลูกพืช โดยใช้วิธี heat treatment รายงานว่าเชื้อราส่วนใหญ่ที่พบ คือ *A. siamensis* (*N. siamensis*) และ *A. spinosus* (*N. spinosa*) สำหรับรายงานเกี่ยวกับเชื้อรา *Paecilomyces* ในตัวอย่างดินจากป่าและอุทยานในประเทศไทย โดย Luangsa-ard *et al.* (2004) พบเชื้อรา *Paecilomyces* ส่วนใหญ่ คือ สปีชีส์ *Paec. variotii* (*B. spectabilis*) นอกจากนี้ยังพบ *Paec. niveus* และ *Paec. fulvus* (*B. fulva*) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นไม่ได้ศึกษาการทนความร้อนของแอสโคสปอร์ของเชื้อราที่แยกได้

คุณสมบัติการทนความร้อนของแอสโคสปอร์ของเชื้อราสายพันธุ์ที่คัดเลือก

ได้คัดเลือกเชื้อราจำนวน 60 ไอโซเลท มาระบุชนิดโดยใช้วิธีทางสัณฐานวิทยาร่วมกับวิธีการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พบว่าประกอบด้วยเชื้อราทั้งหมด 5 สกุล 12 สปีชีส์ (Table 2) เมื่อทดสอบการทนความร้อนของแอสโคสปอร์ที่มีอายุ 30 วัน ใน glucose buffered solution (12.5°Brix, pH 3.6) ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ผลการศึกษาพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อราตามความสามารถในการทนความร้อนได้ดังนี้ คือ กลุ่มที่ไม่สามารถรอดชีวิตภายหลังการให้ความร้อน จำนวน 32 ไอโซเลท

(ร้อยละ 53.33) และกลุ่มที่สร้างแอสโคสปอร์ที่ทนความร้อน จำนวน 28 ไอโซเลท แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีจำนวนแอสโคสปอร์ที่ผ่านการให้ความร้อนเป็นระยะเวลา 30 นาที ($N_{30\ min}$) มีค่าน้อยกว่าที่ระยะเวลาการให้ความร้อน 5 นาที ($N_{5\ min}$) จำนวน 13 ไอโซเลท (ร้อยละ 21.67) และกลุ่มที่มีจำนวนแอสโคสปอร์ที่รอดชีวิตที่ระยะเวลาการให้ความร้อน 30 นาที ($N_{30\ min}$) มีค่ามากกว่าระยะเวลาการให้ความร้อน 5 นาที ($N_{5\ min}$) จำนวน 15 ไอโซเลท (ร้อยละ 25) อย่างไรก็ตาม ในการทดลองนี้พบว่ามีเชื้อราจำนวน 4 สปีชีส์ไม่สามารถสร้างแอสโคสปอร์ที่ทนความร้อนได้แก่ *A. denticulatus, P. javanicum, P. setosum* และ *T. brevis*

Table 2 Thermal resistance of ascospores produced from different fungal species after heat treatment at 75°C for 30 min in a glucose buffered solution (12.5°Brix, pH 3.6).

Fungal species	No. of isolates not survived after heat treatment at 75°C for 30 min	No. of isolates survived after heat treatment at 75°C for 30 min	
		$N_{5min} > N_{30min}$	$N_{5min} < N_{30min}$
A. denticulatus	4	0	0
A. fennelliae	6	1	3
A. laciniosus	2	0	3
A. siamensis	0	4	3
A. spathulatus	0	1	0
A. spinosus	3	3	3
H. pallida	5	1	1
P. javanicum	5	0	0
P. setosum	5	0	0
Paec. niveus	0	1	2
T. macrosporus	0	2	0
T. brevis	2	0	0
Overall	32 (53.33%)	13 (21.67%)	15 (25%)

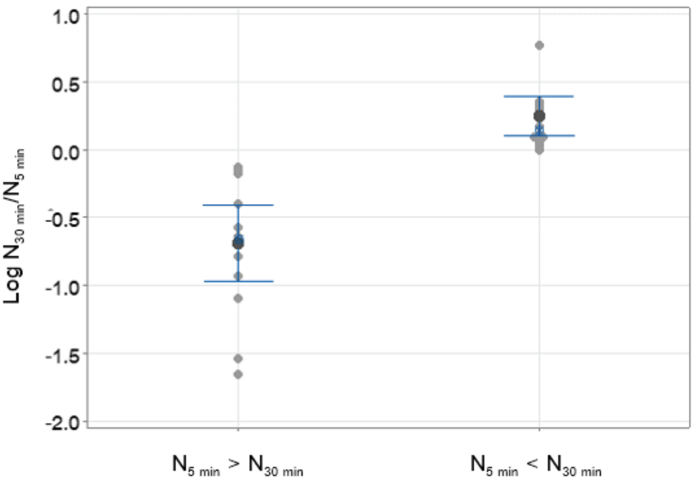

Figure 1 Log ($N_{30\ min}/N_{5\ min}$) of ascospores produced by heat resistant isolates suspended in a glucose buffered solution (12.5°Brix, pH 3.6) after heat treatment at 75°C for 30 min.

ค่า Log ($N_{30\ min}$/$N_{5\ min}$) ของแอสโคสปอร์ของเชื้อรากลุ่มที่รอดชีวิตจากการให้ความร้อนแสดงดัง (Figure 1) จะเห็นได้ว่าเชื้อราที่แยกได้จากดินแต่ละไอโซเลทสามารถสร้างแอสโคสปอร์ที่ทนความร้อนได้แตกต่างกัน ความผันแปรนี้มีสาเหตุจากความสามารถในการสะสมสาร compatible solute ภายในแอสโคสปอร์ ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่ทำหน้าที่ป้องกันโครงสร้างของสารโมเลกุลใหญ่ไม่ให้เสียสภาพเมื่อแอสโคสปอร์อยู่ในสภาวะเครียด เช่น ความร้อน กรณีของแอสโคสปอร์ของเชื้อรากลุ่มนี้พบว่าสาร compatible solute ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดทรีฮาโลส และแมนนิทอล (Dijksterhuis *et al*., 2021)

แอสโคสปอร์ของเชื้อราที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้สามารถรอดชีวิตและเจริญได้แม้ว่าจะผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเนื่องจากกระบวนการพาสเจอร์ไรส์น้ำผลไม้ส่วนใหญ่จะใช้อุณหภูมิไม่เกิน 80 องศาเซลเซียส ระยะเวลาไม่เกิน 30 วินาที (Techakanon and Venkatachalam, 2021) ดังนั้นหากแอสโคสปอร์สามารถผ่านเข้าสู่กระบวนการผลิต จะมีโอกาสรอดชีวิตจากขั้นตอนการพาสเจอร์ไรส์ และก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของน้ำผลไม้ภายในบรรจุภัณฑ์ เนื่องจากเชื้อรากลุ่มนี้สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรากลุ่มที่สร้างแอสโคสปอร์ที่เมื่อผ่านการให้ความร้อนเป็นเวลา 30 นาที มีจำนวนแอสโคสปอร์ที่รอดชีวิต ($N_{30\ min}$) มากกว่าจำนวนแอสโคสปอร์เริ่มต้น ($N_{5\ min}$) ได้แก่ *A. fennelliae, A. laciniosus, A. siamensis, A. spinosus, H. pallida* และ *Paec. niveus* แสดงให้เห็นว่าความร้อนสามารถกระตุ้น (activate) การงอกของแอสโคสปอร์ ดังนั้นเชื้อรากลุ่มนี้จึงมีโอกาสเสี่ยงสูงที่จะเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของน้ำผลไม้

จากที่กล่าวไปข้างต้น รายงานการศึกษาเรื่องคุณสมบัติการทนความร้อนของแอสโคสปอร์ของเชื้อรากลุ่มนี้ในบริบทด้านความปลอดภัยทางอาหารมีอยู่น้อยมาก ปัจจุบันจึงยังไม่มีรายงานการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ในประเทศไทยที่ระบุว่ามีสาเหตุจากเชื้อราทนความร้อน แต่ได้มีรายงานการศึกษาในต่างประเทศที่ระบุว่าเชื้อราชนิดเดียวกับที่พบในงานวิจัยนี้เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์จากผลไม้ เช่น การพบเชื้อรา *Paec. niveus* และ *P. fulvus* ปนเปื้อนในน้ำอ้อยในประเทศอินเดีย (Ayesha and Viswanath, 2006) และการปนเปื้อนเชื้อรา *T. macrosporus* ในโยเกิร์ตและไอศกรีมที่มีผลไม้เป็นส่วนผสมในประเทศบราซิลและประเทศเนเธอร์แลนด์ (Santos *et al*., 2018) เป็นต้น

การสร้างสารพิษพาทูลิน

เนื่องจากมีรายงานว่าเชื้อราทนความร้อนในสกุล *Paecilomyces* รวมทั้งเชื้อราในสกุล *Penicillium* สามารถผลิตสารพิษพาทูลิน (Frisvad, 2018) ดังนั้น การทดลองนี้จึงได้ทดสอบความสามารถในการผลิตสารพิษดังกล่าวเฉพาะเชื้อราในสกุล *Paecilomyces* และ *Penicillium* ที่คัดแยกได้คือ *Paec. niveus, P. javanicum* และ *P. setosum* ผลการทดลองพบว่า *Paec. niveus* ทั้ง 3 ไอโซเลท และ *P. setosum* ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถผลิตสารพิษพาทูลินได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB และในน้ำสับปะรด (Figure 2) โดยปริมาณสารพิษที่สร้างในน้ำสับปะรดจะมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ทั้งนี้เชื้อรา *Paec. niveus* HR 13-3, HR13-8 และ *P. setosum* HR9-5, HR11-1 และ HR11-3 สามารถผลิตสารพิษพาทูลินในน้ำสับปะรดได้สูงสุดในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ในช่วงความเข้มข้น 105.02-115.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเกินกว่าปริมาณสูงสุดของสารพิษพาทูลินในน้ำผลไม้ที่ต้องไม่เกิน 50 พีพีบี หรือ 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร (กระทรวงสาธารณสุข, 2563) สำหรับเชื้อรา *P. javanicum* จำนวน 5 ไอโซเลท พบว่าไม่มีไอโซเลทใดสร้างสารพิษพาทูลินในสภาวะที่ทดสอบ

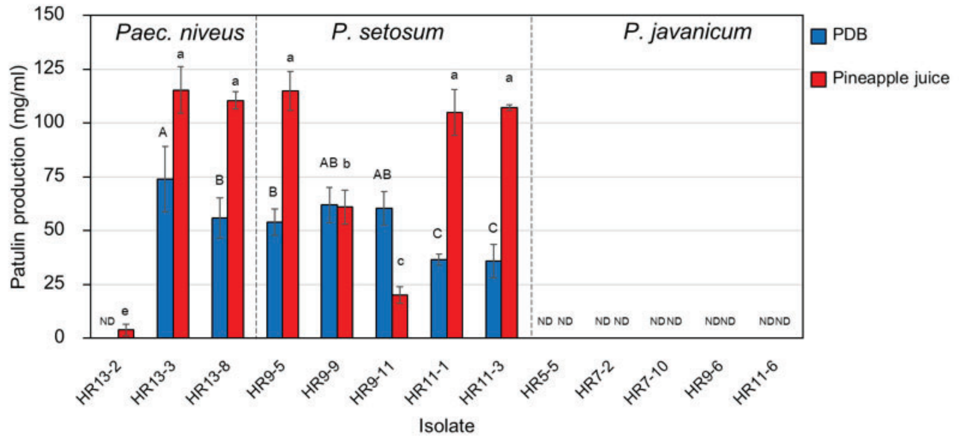

Figure 2 Patulin production in potato dextrose broth (PDB) and pineapple juice by *Paec. niveus*, *P. setosum* and *P. javanicum* strains isolated from pineapple filed soils. Error bars are standard deviations (SD) with n=2. Capital letters indicate a significant difference (p< 0.05) between patulin production in PDB using Tukey's HSD test. Small letters indicate a significant difference (p<0.05) between patulin production in pineapple juice using Tukey's HSD test. (ND = not detected)

แม้ว่าจะมีรายงานการพบเชื้อราในสกุล Paecilomyces ในตัวอย่างดินของไทยดังที่ได้กล่าวในข้างต้น แต่ยังไม่มีรายงานการผลิตสารพิษพาทูลินในเชื้อรา *Paecilomyces* รวมถึงเชื้อราสกุลอื่นๆ ในประเทศไทย ปัจจุบันเชื้อราในสกุล *Paecilomyces* ที่มีการยืนยันว่าผลิตสารพิษพาทูลินได้ คือ *Paec. niveus* และ *Paec. saturatus* (Puel *et al*., 2010) สำหรับเชื้อรา *P. setosum* ที่แยกได้ในงานวิจัยนี้สามารถผลิตสารพิษพาทูลิน สอดคล้องกับการศึกษาของ George *et al*. (2019) ที่พบว่าเชื้อรา *P. setosum* ที่แยกได้จากต้นโสมอินเดีย (*Withania somnifera*) สามารถผลิตสารพิษพาทูลินได้เช่นเดียวกัน

นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังพบว่าเชื้อรา *P. javanicum* (*Eupenicillium javanicum*) ไม่สามารถสร้างแอสโคสปอร์ที่ทนความร้อน แตกต่างจากการศึกษาของ Evelyn *et al*. (2022) ที่รายงานว่าเชื้อราสปีชีส์ดังกล่าวที่แยกได้จากดินในประเทศอินโดนีเซีย สร้างแอสโคสปอร์ที่ทนความร้อนได้ถึง 90 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากอิทธิพลของแหล่งดินที่แตกต่างกัน กรณีของความสามารถในการผลิตสารพิษพาทูลิน ของเชื้อรา *P. javanicum* พบว่า เชื้อราทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ ไม่สามารถผลิตสารพิษพาทูลิน สอดคล้องกับผลการศึกษาสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิที่สร้างโดยเชื้อรา *P. javanicum* ด้วยเทคนิค high-resolution mass spectrometry ที่พบว่าเชื้อรา *P. javanicum* ไม่สามารถผลิตสารพิษดังกล่าวได้ (George *et al*., 2019)

สรุป

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราทนความร้อนมีการแพร่กระจายในตัวอย่างดินในไร่สับปะรด โดยเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้นั้น สร้างแอสโคสปอร์ที่ทนความร้อนได้แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารพิษพาทูลิน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Paec. nivues* ที่สามารถสร้างแอสโคสปอร์ที่ทนความร้อนและสามารถผลิตสารพิษดังกล่าวได้ในปริมาณสูง เชื้อราทนความร้อนเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ของไทยและเป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค เนื่องจากแนวโน้มการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพในปัจจุบันที่ปรับเปลี่ยนไปใช้กระบวนการฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิต่ำเพื่อรักษาคุณภาพของสารอาหารและรสชาติ จึงทำให้มีโอกาสพบการปนเปื้อนของเชื้อราทนความร้อนในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เพิ่มขึ้น ดังนั้นการศึกษาคุณสมบัติและปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทนความร้อนของเชื้อรากลุ่มนี้จะเป็นแนวทางหนึ่งในการลดความเสียหายทางเศรษฐกิจและอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัด กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงสาธารณสุข. 2563. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 414) พ.ศ. 2563 ออกตามความในพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ 118 ง. 13 หน้า.

ธิดา เดชฮวบ และเลขา มาโนช. 2553. การศึกษาเชื้อราที่เจริญในอุณหภูมิสูงและราทนความร้อนจากดินและเศษซากพืชที่เหลือจากการเกษตร, หน้า 523-529. *ใน:* เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 48: (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Ayesha, F. and P.Viswanath. 2006. *Byssochlamys* spp in sugarcane juice and its significance. Journal of Food Science and Technology (India) 43(4): 407-409.

Dijksterhuis, J., T. Wyatt, M. Hanssen, E. Golovina, F. Hoekstra and L. Lugones. 2021. Abundant small protein ICARUS inside the cell wall of stress-resistant ascospores of Talaromyces macrosporus suggests a novel mechanism of constitutive dormancy. Journal of Fungi (Basel) 7(3) :216.

Eamvijarn, A. 2013. *Neosartorya* species: diversity, morphology, phylogeny, antagonistic tests against plant pathogenic fungi and secondary metabolites of *N. pseudofischeri.* Ph.D. Thesis, Kasetsart University.

Evelyn, E., C. Chairul, S. Aryuda, and I. Ainunnisa. 2022. Resistance of *Eupenicillium javanicum* mold spores to the light-emitting diode (LED), LED-assisted thermal and thermal processing in strawberry and apple juices. CRFS 5: 1524-1529.

Frisvad, J.C. 2018. A critical review of producers of small lactone mycotoxins: patulin, penicillic acid and moniliformin. World Mycotoxin Journal 11 (1): 73-100.

George, T.K., D. Devadasan and M.S. Jisha. 2019. Chemotaxonomic profiling of *Penicillium setosum* using high-resolution mass spectrometry (LC-Q-ToF-MS). Heliyon 5 (2019): e02484.

Glaser, N., and H. Stopper. 2012. Patulin: mechanism of genotoxicity. Food and Chemical Toxicology 50: 1796–1801.

Graça, J., K. Daly, G. Bondi, I. Ikoyi, F. Crispie, R. Cabrera-Rubio, P.D. Cotter, and A. Schmalenberger. 2021. Drainage class and soil phosphorus availability shape microbial communities in Irish grasslands. European Journal of Soil Biology 104: 103297.

Hammami, W., R.A Thani, S. Fiori, S. Al-Meer, F.A. Atia, D. Rabah, Q. Migheli and S. Jaoua. 2017. Patulin and patulin producing *Penicillium* spp. occurrence in apples and apple-based products including baby food. The Journal of Infection in Developing Countries 11(4): 343-349.

Kikoku, Y. 2006. Heat activation characteristics of *Talaromyces* ascospores. Journal of Food Science 68: 2331-2335.

Luangsa-ard, J.J., L. Manoch, N. Hywel-Jones, S. Artjariyasripong and R.A. Samson. 2004. Thermotolerant and thermoresistant *Paecilomyces* and its teleomorphic states isolated from Thai forest and mountain soils. Agriculture and Natural Resources 38(1): 94-101.

Muneer, M.A., X. Huang, W. Hou, Y. Zhang, Y. Cai, M.Z. Munir, L. Wu, and C. Zheng. 2021. Response of fungal diversity, community composition, and functions to nutrients management in red soil. Journal of Fungi 7(7): 554.

Puel, O., P. Galtier and I.P. Oswald. 2010. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. Toxins (Basel) 2 (4): 613-31.

Rico-Munoz, E., 2017. Heat resistant molds in foods and beverages: Recent advances on assessment and prevention. Current Opinion in Food Science 17: 75-83.

Rico-Munoz, E., J. Houbraken, and R.A. Samson. 2015. Detection and enumeration of heat resistant moulds, pp. 251–263. *In* Y. Salfinger and M.L. Tortorello, (eds.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Fifth ed. APHA Press. Washington D.C., USA.

Samson, R.A., J. Houbraken, J. Varga and J.C. Frisvad. 2009. Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssochlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. Persoonia 22: 14–27.

Sant'ana, A.S., A. Rosenthal and P.R. Massaguer. 2009. Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssochlamys fulva* ascospores in clarified apple juice. Journal of Applied Microbiology 107 (1): 197–209.

Santos, J.L.P., S. Samapundo, A. Biyikli, J.V. Impe, S. Akkermans, M. Höfte, E.N. Abatih, A.S. Sant'Ana and F. Devlieghere. 2018. Occurrence, distribution and contamination levels of heat-resistant moulds throughout the processing of pasteurized high-acid fruit products. International Journal of Food Microbiology 281: 72-81.

Techakanon, C. and K. Venkatachalam. 2021. The effects of pasteurization conditions and storage time on microbial safety, quality and antioxidant properties of cider from rose apple (*Syzygium agueum* Alston cv. Taaptimjan). Chiang Mai University Journal of Natural Sciences 20 (2): e2021034.

Tranquillini, R., N. Scaramuzza and E. Berni. 2017. Occurrence and ecological distribution of heat resistant moulds spores (HRMS) in raw materials used by food industry and thermal characterization of two *Talaromyces* isolates. International Journal of Food Microbiology 242: 116-123.

Wyatt, T.T., M. Leeuwen, E.A. Golovina, F.A. Hoekstra, E.J. Kuenstner, E.A. Palumbo, N.L. Snyder, C. Visagie, A. Verkennis, J.E. Hallsworth, H.A.B. Wösten and J. Dijksterhuis. 2015. Functionality and prevalence of trehalose-based oligosaccharides as novel compatible solutes in ascospores of *Neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischeri*) and other fungi. Environmental Microbiology 17(2): 395–411.