

Modified Mycotoxin

นายไกรวุฒิ นวลขาว

กรรมการกลางสมาคมสารพิษจากเชื้อรา

กลุ่มตรวจสอบคุณภาพอาหารสัตว์ สำนักตรวจสอบคุณภาพสินค้าปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

สารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) เป็นสารพิษระดับทุติยภูมิ (secondary compounds) จะเกิดการสังเคราะห์ได้ภายใต้สภาวะที่มีความจำเพาะเท่านั้น โดยส่วนใหญ่จะถูกสร้างโดยเชื้อรา ซึ่งพบได้ทั่วไปในอาหารสารพิษจากเชื้อราที่รู้จักทั่ว ๆ ไปคือ Aflatoxins, Ochratoxin A (OTA), citrinin, patulin trichothecenes, deoxynivalenol (DON), T-2 toxin (T-2), และ HT-2 toxin (HT-2), fumonisins และ zearalenone (ZEN) ซึ่งที่กล่าวมาทั้งหมดนี้เป็น metabolites ที่เกิดจากเชื้อราหลากหลายชนิด เช่น *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, และ *Alternaria*

Modified mycotoxin ตรวจพบครั้งแรกในช่วงปี ค.ศ. 1980 ตรวจพบในปริมาณสูงทั้งที่ไม่พบสารพิษจากเชื้อราชนิดใดเลย สารพิษที่ตรวจพบดังกล่าวถูกเรียกว่า undetected forms ได้แก่ conjugated mycotoxins ซึ่ง metabolites เหล่านี้ภายหลังได้ถูกเรียกว่า modified mycotoxins โดยตั้งตามโครงสร้าง (structure), ความเป็นขั้ว (polarity), ความสามารถในการละลาย (solubility), และมวลโมเลกุล (molecular mass) ในบางกรณีสามารถถูกสร้างได้จากเชื้อรา (fungi) โดยเกิดในสวน defense mechanism ที่ป้องกันการติดเชื้อในพืชชนิดต่าง ๆ อันมีสาเหตุมาจากความเป็นพิษ นอกจากนี้ modified mycotoxins ยังพบว่าสามารถเปลี่ยนกลับไปเป็น mycotoxins (parent mycotoxins) ภายใต้กระบวนการ metabolism ของคนและสัตว์ได้อีกด้วย ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง Major mycotoxins ที่พบในอาหารและ modified forms ของแต่ละชนิด (Freire et al., 2018)

Free mycotoxin	Major producing fungi	Matrix	Effects on health	modified mycotoxin
DON	<i>Fusarium culmorum</i> ; <i>Fusarium graminearum</i> (Richard, 2012; Bottalico, 1998)	feed (Zhao et al., 2015), oat (Fredlund et al., 2013), cereals (Soleimany et al., 2012a), maize (Souza et al., 2008)	In animal: reduced growth and weight gain, feed refusal and emesis, affects system immune and intestinal functions. In human: nausea, diarrhea and vomiting (Bryden, 2012; Pinton et al., 2012; Pinton et al., 2009; WHO, 2002)	DON-3-glucoside; DON-Hexitol; DON-S-cysteine; DON-S-cysteinyl-glycine; DON-glutathione; DON-di-hexoside; "DON-2H"-glutathione; DON-malonylglucoside; 15-acetyl-DON-3-glucoside; 3-Acetyl-DON; DON-3-sulfate; DON-15-sulfate; 3-epimer-DON; norDON A, B and C; norDON-3-glucoside A, B, C and D; DON-3-glucoside-lactone; de-epoxy DON; DON-glucuronide; de-epoxy DON-3-sulfate; de-epoxy DON-15-sulfate;
ZEN	<i>Fusarium culmorum</i> ; <i>Fusarium graminearum</i> ; <i>Fusarium heterosporum</i> (Gajicka et al., 2011; Hussein and Brasel, 2001)	feed (Zhao et al., 2015), cereals (Soleimany et al., 2012b), breakfast cereals (Ibáñez-Vea et al., 2011), maize (Souza et al., 2008)	precocious pubertal changes, fertility problems and hyper estrogenic (Minervini and Dell'Aquila, 2008; Binder, 2007; IARC, 1993)	ZEN-16-O-β-glucoside; ZEN-14-O-β-glucoside; α-zearalenol; β-zearalenol; α-zearalenol-glucoside; β-zearalenol-glucoside; ZEN-4-glucoside; ZEN-4-sulfate; malonyl-glucosides (ZEN-MalGlc, α-ZEN-MalGlc, β-zearalenol-MalGlc); di-hexose (ZEN-DiHex, α-zearalenol-DiHex, β-zearalenol-DiHex); hexose-pentose disaccharides (ZENHexPent, α-zearalenol-HexPent, β-zearalenol-HexPent); tri-hexose conjugate (β-zearalenol-TriHex); α-zearalenol-Sulfate; α-zearalenol; β-zearalenol
OTA	<i>Aspergillus</i> and <i>Penicillium</i> genera (Freire et al., 2017; Passamani et al., 2012; Serra et al., 2006)	wine (Freire et al., 2017), coffee (Leong et al., 2007), cocoa (Mounjouemou et al., 2008), grapes (Lasram et al., 2007), cereals (Lee and Magan, 2000)	Immunosuppressive effects (Rossiello et al., 2008), teratogenic (Baiaasheh et al., 2007), carcinogenic (Brown et al., 2007), mutagenic (Palms et al., 2007), neurotoxic (Sava et al., 2006) and genotoxic (Tazlovanu et al., 2006).	ochratoxin α; 4S-hydroxyochratoxin A; 4R-hydroxyochratoxin A; hydroxyochratoxin A-β-glucoside; ochratoxin A methyl ester; Ochratoxin α amide; 14-decarboxy-ochratoxin A; Ochratoxin A mono- and disaccharide esters
T2 e HT-2	<i>Fusarium sporotrichioides</i> (Cast, 2003; Brown et al., 2001)	beer (Rubert et al., 2013), corn, wheat, barley, oats (Cast, 2003)	Inhibition protein synthesis and effects immunotoxins (WHO, 2002; Richard, 1991; Niyo et al., 1988).	HT2 toxin-3-glucoside; T-2 toxin-α-glucoside; T-2 toxin-β-glucoside; 15-acetyl-T2-tetraol-glucoside; hydroxy-HT2-glucoside; hydroxy-HT2-malonyl-glucoside; T2-triol-glucoside; dehydro-HT2-glucoside; HT2-diglucoiside; HT2-malonyl-glucoside; 3-acetyl-HT2; 3-acetyl-T2; feruloyl-T2; HT2-sulfate
Fumonisin	<i>Fusarium proliferatum</i> ; <i>Fusarium verticillioides</i> ; <i>Aspergillus niger</i> (Varga et al., 2010; EFSA, 2005; Scott, 1993)	feed (Zhao et al., 2015), beer (Matumba et al., 2014), chili (Yogendrarajah et al., 2014), cereal (Soleimany et al., 2012a)	hepatotoxic, nephrotoxic (Binder, 2007), immunosuppressive (Marin et al., 2006), pulmonary edema in swine and leukoencephalomalacia in horses (IARC, 2002)	hidden fumonisins; N-(carboxymethyl) fumonisina B1; N-Acyl hydrolyzed fumonisin B1; bound hydrolyzed fumonisins

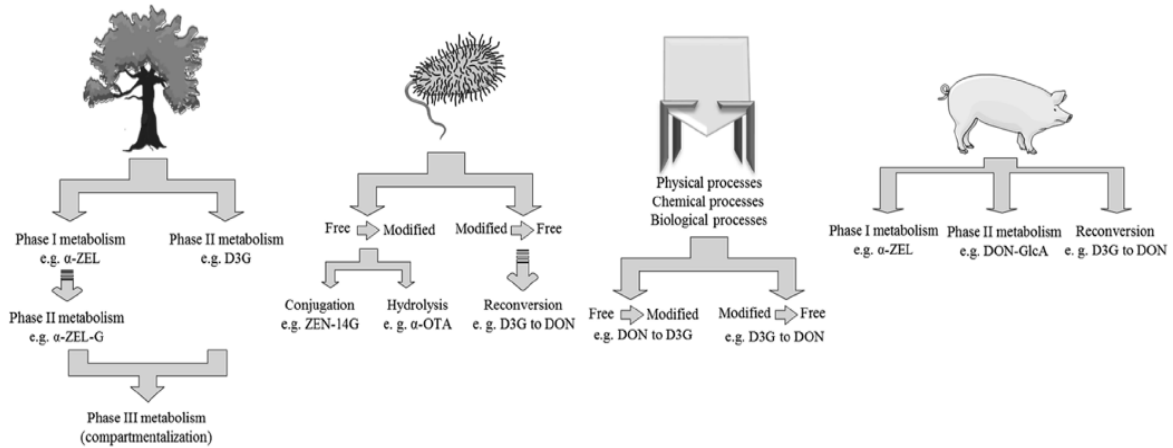
โดยหลัก ๆ แล้วจะพบกับกระบวนการย่อย (derive) สารพิษจากเชื้อราภายในกระบวนการกลไกป้องกันตัวของพืช (plant defense mechanisms) อย่างไรก็ตามบางทีก็มีการเรียก modified mycotoxins เหล่านี้ว่า mycotoxin-derived compounds เพราะมักจะพบว่าเกิดขึ้นจากปฏิกิริยา metabolism ทั้งในสัตว์และพืช และมักจะปรากฏให้เจอพร้อม ๆ กับ free mycotoxins ในบางกรณีความเข้มข้นของสารพิษจากเชื้อราที่ตรวจพบนั้นก็จะเป็นความเข้มข้นที่เกิดจากสารพิษจากเชื้อราหลัก (parent mycotoxins) รวมกับ modified mycotoxins เพราะฉะนั้นการทำความเข้าใจการสร้าง (formation) และการเปลี่ยนแปลง (degradation) ของสารพิษจากเชื้อราจึงจำเป็นมากที่จะต้องมีการศึกษาให้ละเอียด และตรงประเด็นมากที่สุด เพื่อหาวิธีการประเมินความเสี่ยงเกี่ยวกับ modified mycotoxins ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นสุทธิของสารพิษจากเชื้อรา (total mycotoxins) อาจพบว่าเป็น parent mycotoxins เสียส่วนใหญ่ และมี modified mycotoxins ปะปนมาบ้าง หรือในบางกรณีนั้นที่ตรวจพบ mycotoxins แท้จริงแล้วอาจจะเป็น modified mycotoxins ก็เป็นไปได้เนื่องจากมีความใกล้เคียงกันค่อนข้างสูง ความสามารถในการบดบัง (blinds) โดยความสามารถนี้จะทำการบดบังการตรวจพบของ parent mycotoxins ในวัตถุดิบอาหารได้ ซึ่งเกิดจากการที่สารพิษจากเชื้อราทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบในอาหารที่มีพันธะโควาเลนต์ (covalent bonds) ซึ่งเรียกว่า conjugated ซึ่งตัวนี้จะสามารถมองเห็นและตรวจพบได้ ส่วนอีกด้านหนึ่งที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ (noncovalent bonds) หรือเรียกอีกอย่างว่า “physical entrapment” จะเรียกว่า “hidden” ซึ่งการที่จะมองเห็นหรือไม่ขึ้นอยู่กับพันธะจับตัว (bound) ขององค์ประกอบนั้น ๆ (matrix)

ปัจจุบันได้มีคำจำกัดความถึง modified mycotoxins ว่าเป็นสารประกอบ (compounds) ที่มาจาก secondary metabolite ของสารพิษจากเชื้อรา เช่น DON และ ZEN โครงสร้างของ modified mycotoxin จะต้องถูกสร้าง หรือเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการทางเคมี (chemical process) หรือกระบวนการทางชีวภาพ (biological) หมายความว่าเกิดขึ้นในสัตว์ พืช และกิจกรรมของจุลชีพ (microorganism) โดยทั้งหมดต้องเกิดด้วยกรรมวิธีธรรมชาติ หรือการเกิดกระบวนการดังกล่าวข้างต้นภายใต้กระบวนการแปรรูปอาหารอันเกิดขึ้นไปเองตามธรรมชาติ ก็จัดให้เป็น modified mycotoxins ทั้งหมด ซึ่งได้แสดงตัวอย่างการเกิด modified mycotoxin ในอาหารตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงตัวอย่างการเกิด modified mycotoxin ในอาหาร (Freire et al., 2018)

Matrix	Technique	Modified mycotoxin	Levels (µg/Kg)/(µg/L) ^a	References
wheat	LC-MS/MS	D3G	50-200	Berthiller et al. (2005)
corn	LC-MS/MS	D3G	< 20 - 70	
wheat	LC-MS/MS	D3G	76-1070	Berthiller et al. (2009b)
corn	LC-MS/MS	D3G	10-763	
corn products	LC-MS/MS ELISA	bound fumonisins	NR	Dall'Asta et al. (2008)
corn	LC-MS/MS	hidden fumonisins	54-982	Dall'Asta et al. (2009)
beer	LC-MS/MS	D3G	< 2.5-37	Kostelanska et al. (2009)
corn	LC-MS/MS	Total fumonisins	< 25 - 44274	Dall'Asta et al. (2012)
corn	ELISA	Total DON	120-750	Tran et al. (2012)
malt	LC-MS/MS	D3G	12.9-186	Zachariasova et al. (2012)
baked goods	LC-MS/MS	D3G	43-399	
beer	LC-MS/MS	D3G	6-82.1	
beer	LC-MS/MS	D3G	< 3.5-81.3	Varga et al. (2013)
corn	LC-MS/MS	hidden fumonisins	NR	Oliveira et al. (2015)
durum wheat	LC-MS/MS	D3G	< 50 - 850	Palacios et al. (2017)

การพบ modified mycotoxins อาจพบได้ในอาหารซึ่งเกิดในระหว่างปฏิกิริยา detoxification ของ metabolite ในพืช ซึ่งการเกิดนี้สามารถเกิดด้วยทั้งกระบวนการทางกายภาพ และกระบวนการทางเคมี และนับรวมไปถึง modified mycotoxin ที่เกิดจาก metabolism ทั้งของสัตว์และมนุษย์ด้วยแสดงตาม **ภาพที่ 1**



ภาพที่ 1 แสดงการสร้างของ modified mycotoxin โดยพืช, จุลินทรีย์, กระบวนการแปรรูป และสัตว์ (Freire et al., 2018)

Modified mycotoxin โดยพืช

พืชที่ติดเชื้อราจนเกิดความเสียหายและเกิดการสร้างสารพิษจากเชื้อรา ซึ่งในระหว่างที่เชื้อราจู่โจมพืช พืชเองจะมีกลไกในการป้องกันตัวจากการจู่โจมเหล่านั้นด้วยการเกิดปฏิกิริยา conjugation กับ organic molecules หรือเกิดปฏิกิริยา hydrolysis, reduction และ oxidation นอกจากนี้ยังทำให้เปลี่ยนแปลงในขั้ว (polarity) ด้วย การกำจัดพิษของพืช (detoxification) จำแนกออกเป็น 3 เฟส หลัก ๆ ได้แก่ phase I และ phase II ของ metabolism สองเฟสแรกจัดเป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ส่วนเฟส 3 นั้นจัดเป็น compartmentalization โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะส่งผลให้เกิด masked mycotoxin) Phase I ระยะนี้จะมีปฏิกิริยาหลายชนิดเกิดขึ้นกับโมเลกุลของพืช เช่น hydrolysis, reduction หรือ oxidation โดยหลัก ๆ แล้ว phase I นี้จะสร้าง lipophilic xenobiotics เพื่อเตรียมเข้าสู่ phase II ส่วน Hydrophilic xenobiotics ไม่จำเป็นต้องถูก metabolite ใน phase I เตรียมตัวไปสู่ phase II ได้เลย

Phase II จะมีปฏิกิริยา conjugation ที่เกิดจากการกำจัดพิษ (detoxification) ของพืชเอง ตรงกระบวนการนี้จะมีการผูกติด (binding) ระหว่าง hydrophilic biomolecules กับ xenobiotic และจะถูก catalyze ด้วย glycosyl-, malonyl- และ glutathione-S-transferase ทำให้สารประกอบจำพวก glucose, fatty acids, glutathione และ hemicellulose จับกับ mycotoxin molecules ทำให้มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีขึ้น (solubility) ซึ่งหลังจากนี้จะเตรียมเข้าสู่ phase III จะมีการลดความเป็นพิษลงด้วย อย่างไรก็ตาม สารพิษจากเชื้อราบางชนิด (derivatives mycotoxin) จะยังคงมีความเป็นพิษอยู่ และสุดท้ายใน phase III จะ

พบ modified mycotoxin ตกค้างใน vacuole, apoplast หรือผนังเซลล์ ซึ่ง ณ ตรงจุดนี้สารพิษจะหยุดทำร้ายต่อเซลล์พืช สารประกอบที่พบมากที่สุดในระบบกระบวนกลไกนี้ คือ β -linked glucose-conjugates ของ trichothecenes, D3G และ HT-2 toxin-3-glucoside (HT-2-3G) และ zearalenone, zearalenone-14-glucoside (ZEN-14G)

D3G หนึ่งใน modified mycotoxin ที่เปลี่ยนรูปมาจาก DON ในกลไกการป้องกันตัวของพืช (defense mechanism) โดยเอนไซม์ glycosyltransferase ทำการ binding ระหว่าง endogenous glucose molecules กับโมเลกุลคาร์บอน 3 hydroxyl group ของ DON จากการเปลี่ยนแปลง DON ไปเป็น D3G, 3-Acetyl-deoxynivalenol (3-ADON) นั้นจากการสำรวจพบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ในทุกวัตถุประสงค์ ยกตัวอย่างเช่น มีการปนเปื้อน DON ในข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด และข้าวไรย์ ทั้งหมดนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลง DON ไปเป็น modified mycotoxin ชนิดต่าง ๆ แต่แตกต่างกันกับตัวอย่างข้าวโอ๊ต ซึ่งไม่พบว่าการเปลี่ยนแปลง DON ไปเป็น modified mycotoxin เลย ทั้งนี้เกิดจากข้าวโอ๊ตไม่มีกระบวนการ germination เหมือนพืชอื่น ๆ ซึ่งตรงจุดนี้จะมี glucose และ enzyme เข้มข้นสูง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง DON ได้

ZEN เป็นสารพิษจากเชื้อราที่ก่อให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับ hyperestrogenism, ปัญหาการผสมติดยาก การเกิดพิษของ ZEN นี้มาจากการที่ lactone ring และ C-4 hydroxyl group ถูกเปลี่ยนโครงสร้างในระหว่างกลไกการป้องกันพิษ (detoxification process)

ตัวอย่างข้าวบาร์เลย์ (barley) พบว่าการเปลี่ยนแปลงของ ZEN เป็น ZEN-16-glucoside (ZEN-16G) และ ZEN-14G ในส่วนราก (root) ส่วนในข้าวสาลี (wheat) พบว่า ZEN สามารถเปลี่ยนไปเป็น modified mycotoxin ได้เพียง 13% ของ ปริมาณที่ใส่ลงไปในตัวอย่าง โดยเกิดเป็น ZEN glycoside ทั้งนี้ เป็นไปได้ถูกเปลี่ยนไปเป็น metabolite ที่ไม่สามารถตรวจพบได้ เช่น malonyl-glucoside และ diglucoside นอกจากนี้ Berthiller และคณะ ในปี 2006 ที่ทำการทดสอบการก่อตัว (formation) ของ metabolism ทั้ง phase I และ phase II ในตัวอย่างพืช *Arabidopsis thaliana* พบรูปแบบของการก่อตัวของ modified mycotoxin ดังนี้ ZEN, α -zearalenol (α -ZEL), β -zearalenol (β -ZEL), α -zearalenol-glucoside, β -zearalenol-glucoside, ZEN-4-glucoside, ZEN-4-sulfate, malonyl-glucosides (ZEN-MalGlc, α -ZEN-MalGlc, β -ZEL-MalGlc), di-hexose-(ZEN-DiHex, α -ZEL-DiHex, β -ZEL-DiHex), hexose-pentose disaccharides (ZENHexPent, α -ZEL-HexPent, β -ZEL-Hex-Pent) และ tri-hexose conjugate (β -ZEL-TriHex) นอกเหนือจากการก่อตัวของ monoglucoside ใน metabolism phase II แล้วยังสังเกตได้ว่าเกิด malonylglucoside และ disaccharide เกิดขึ้นด้วย

Modified mycotoxin โดยจุลินทรีย์

พืชที่ติดเชื้อ (infected) อันมีสาเหตุมาจากกระบวนการสร้างสารพิษจากเชื้อราโดยเชื้อรา (mycotoxin-producing), strains บางชนิดที่มาจากยีสต์, แบคทีเรีย และ filamentous fungi สามารถก่อให้เกิด modified mycotoxins ได้ โดยเฉพาะ sulfate conjugate และ glucoside ester ที่เกิดในระหว่างเกิดกระบวนการกลไกป้องกันตัวของพืช (plant defense mechanism) และกิจกรรมของเอนไซม์ (enzymatic activity) เป็นไปได้ที่จะเกิดการเปลี่ยนแปลง parent mycotoxin ให้กลายเป็น modified mycotoxin ถึง 50% ซึ่งเกือบทั้งหมดนั้นเกิดจาก microorganism หรือเกิดบนองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเนื้อเชื้อ (culture medium) ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากปฏิกิริยานี้มากมายในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอุตสาหกรรมการหมัก (ferment) เช่น ไวน์ เบียร์ และ โขยู่ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาการเกิด modified mycotoxin ด้วย microorganism นั้นจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาอย่างมีระบบ

Modified mycotoxins โดย ยีสต์

ZEN จะถูก *Saccharomyces cerevisiae* เปลี่ยนให้เป็น α -ZEL, ZEN-14G และ ZEN-16G ยีสต์ *Clonostachys rosea* ก็ยังสามารถเปลี่ยนแปลง ZEN ได้เช่นเดียวกัน โดยอาศัยปฏิกิริยาเอนไซม์ zearalenone lactonohydrolase โดยเอนไซม์ดังกล่าวนี้จะไปจับกับโมเลกุลของ ZEN (1-(3,5-dihydroxy-phenyl)-10'-hydroxy-1'-undecen-6'-one จนทำให้การเกิดพิษของ ZEN ลดน้อยลง

Modified mycotoxin โดย filamentous fungi

metabolism ของเชื้อราบางชนิดสามารถสร้าง modified mycotoxin ได้ เช่น 3-AcDON และ 15-AcDON สามารถพบปนเปื้อนได้ในอาหารสร้างมาจากสายพันธุ์ *Fusarium* ซึ่ง metabolite นั้นก่อตัวจาก (formation) 3,15-diacetyl deoxynivalenol ซึ่งเป็น biosynthetic precursors ของ DON ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา deacetylation เชื้อรา *Rhizopus* spp และ *Aspergillus oryzae* สามารถสร้าง metabolite ของ ZEN ได้ เช่น ZEN-14-sulfate, α -ZEL-sulfate, ZEN-16G, ZEN-14G และ α -ZEL จากการทดสอบเกือบจะทั้งหมดของ ZEN นั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงในวันที่ 3 ของการ incubate ส่วนการดูดซึมของ ZEN เข้าสู่ผนังเซลล์ของรานั้นยังคงต้องพิจารณาศึกษาต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่า การดูดซึมผ่านผนังเซลล์นั้นจะทำให้พิษลดลง 20% อีกด้วย ทั้งนี้เกิดจากทั้งกระบวนการ microorganism ที่ผนังเซลล์ และกระบวนการ transformation process ของ parent mycotoxin จนได้ derivatives

Modified mycotoxin โดยแบคทีเรีย

จุลินทรีย์หลายจำพวก เช่น *Acinetobacter*, *Leadbetterella* และ *Gemmata* ที่พบมากในพืช และดิน มีความสามารถในการเปลี่ยน DON ให้กลายเป็น 3-keto-4-deoxynivalenol ได้ เมื่อทำการบ่ม (incubate) เนื้อเชื้อที่ปนเปื้อนด้วย DON และ 3-epimer-DON ซึ่งเกิดเนื่องมาจากการทำปฏิกิริยากับ epoxide ring

β -glucosidase ที่สร้างโดย *Bifidobacterium adolescentis* สามารถทำปฏิกิริยากับ glucoside ของ DON (D3G), nivalenol (nivalenol-3-glucoside (NIV-3G)) และ HT-2 (HT-2-3G) พบในตัวอย่างธัญพืช และเบียร์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการใช้ประโยชน์จากจุดนี้เพื่อสุขภาพของมนุษย์ เช่น probiotics และเช่นเดียวกันปฏิกิริยานี้อาจมีการเพิ่มของสารพิษจากเชื้อราด้วย

Modified mycotoxin โดยกระบวนการผลิต (processing)

สารพิษจากเชื้อราจัดว่าเป็นสารพิษที่มีความคงตัว (stable) สูง ไม่ว่าจะผ่านกระบวนการทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ การปอก หรือแม้แต่การบด การโม่ หรือกระบวนการทางเคมี เช่น alkali และ acid treatment หรือกระบวนการทางจุลชีววิทยา เช่น การหมัก เป็นต้น ก็ยังคงสามารถรักษาสภาพเป็นสารพิษไว้ได้ ในการลดปริมาณ parent mycotoxin นั้นต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่างระหว่างกระบวนการแปรรูป (processing) เช่น รูป (form) ของสารพิษ, องค์ประกอบของอาหาร และกระบวนการทางกายภาพทั้งหมด

กระบวนการทางเคมี เช่น การใช้ alkali ในกระบวนการ hydrolysis จะทำให้ได้ผลเป็น hydrolyzed Fumonisin (HFB) อย่างไรก็ตามการทดสอบผลกระทบต่อ Fumonisin ด้วยการใช้ความร้อน และ alkali ผลปรากฏว่า ไม่พบข้อมูลที่แน่ชัด อาจเพราะเนื่องจากใช้วิธีการทดสอบที่มีค่า recovery ที่ต่ำมาทำการทดสอบ modified mycotoxin อย่างไรก็ตาม การศึกษา HFB ก็ยังไม่เป็นที่ชัดเจนแต่อย่างใด แม้ว่าจะทำการศึกษาปฏิกิริยา reduction หลังจากกระบวนการ hydrolysis แล้วก็ตาม

การศึกษาจำลองโครงสร้างขององค์ประกอบในอาหาร โดยการใช้ α -D-glucose เป็นน้ำตาล (sugar model), methyl- α -D-glucopyranoside เป็น แป้ง (starch model) และ N- α -acetyl-L-lysine methyl ester และ BOC-L-cysteine methyl ester (กรดอะมิโนที่ได้มาจากการ derivatization) เป็นโปรตีน (protein model) แล้วนำมาทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลง (degradation) ของสารพิษจากเชื้อราที่สร้างจากเชื้อราจำพวก *Fusarium* ผลการศึกษาพบว่ารูปแบบทั้งหมด (model) มีการลดลงของ DON แต่ที่ให้ผลการทดสอบการเปลี่ยนแปลง (degradation) ที่ชัดเจนที่สุดคือรูปแบบ (model) ที่มี N- α -acetyl-L-lysine methyl ester อยู่ด้วย ซึ่งทำการทดสอบภายใต้อุณหภูมิ 150 °C เป็นเวลา 10 นาที การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากการที่ alkali ถูก catalysis โดย ϵ -amino group เนื่องจาก DON ขนาดความเสถียรเมื่ออยู่ในสภาวะ alkali hydrolysis และจากปฏิกิริยานี้ทำให้เกิด 12,13-epoxy group ด้วย อย่างไรก็ตามการทดสอบนี้ก็ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ DON ด้วย

สำหรับกระบวนการการทำเบียร์นั้นก็มีการตรวจพบสารพิษจากเชื้อราเช่นกัน แต่เป็นเรื่องยากที่จะหาแนวโน้มการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราเนื่องจากมีปัจจัยหลาย ๆ ด้าน เช่น ช่วงระยะเวลาการเก็บเกี่ยว วัตถุดิบ ขั้นตอนการผลิต รวมไปถึงการปนเปื้อนมากับวัตถุดิบก่อนการทำเบียร์ด้วย

จากรายงานพบ deoxynivalenol oligo-glucosides ระดับสูง ในมอลต์ระยะ malting และในระหว่างกระบวนการผลิต sweet wort ซึ่งการเกิดนี้ได้ถูกอธิบาย โดยการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity)

ซึ่งมีมากในระยะ (stage) นี้ โดยเอนไซม์จะไปเร่งการสร้างปฏิกิริยา hydrolysis ของ conjugate DON ที่จับกับแป้ง (starch) และ dextrin ด้วยเหตุนี้จึงทำให้อนุญาติให้เกิดปฏิกิริยา DON glycosylation ร่วมกับ glucose forming deoxynivalenol oligo-glucosides จะสังเกตได้ว่าในระยะ malting นั้นมักจะเกิดสารพิษจากเชื้อราได้ดี อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่เกิดขึ้นในระยะ malting นี้สามารถปลดปล่อย DON จาก glucoside ได้เช่นกัน

การตรวจวิเคราะห์

สารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) สามารถจับกับองค์ประกอบในอาหารได้หลากหลาย นอกจากนี้กระบวนการแปรรูป (processing) ยังมีผลโดยตรงต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (structure) ของสารพิษด้วย ซึ่งส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อราในรูปอิสระ (free form) ได้ค่า recovery ที่ต่ำ และพบรายงานการศึกษาวิจัยทางด้านนี้ไม่มากนัก

เมื่อสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) จับกับองค์ประกอบต่าง ๆ ในอาหารด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalently binding) แล้วนั้น modified mycotoxin ที่ได้จะมีความเสถียรมากขึ้นภายใต้สภาวะการสกัด ทำให้สามารถตรวจวัดได้โดยตรง อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับการหา retention time, molecular mass, m/z ratio เหล่านี้จะขาดเสียไม่ได้ เพราะสาเหตุสำคัญของการจับตามอง parameter เหล่านี้คือ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (structure) หรือ รูปแบบ (form) เมื่อสิ่งดังกล่าวเปลี่ยนค่าต่าง ๆ ของ chromatographic parameter ก็จะต้องเปลี่ยนตามไปด้วย ดังนั้น ควรที่จะให้ความสำคัญ และใส่ใจตั้งแต่กระบวนการสกัด (extraction) และการ clean up เพราะขั้นตอนเหล่านี้จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งกับ parent mycotoxin และ modified mycotoxin ซึ่งในปัจจุบันนั้น การวิเคราะห์ส่วนใหญ่จะสามารถทำได้ดีเฉพาะใน parent mycotoxin

ในปัจจุบันวิธีที่ดีที่สุดในการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา และอนุพันธ์ คือ เทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS/MS) เพราะมี selectivity, sensitivity และความแม่นยำในการอ่านโครงสร้างสูงที่สุดในขณะนี้ ร่วมกับแหล่งกำเนิดไอออนที่นิยมใช้ คือ atmospheric pressure electrospray ionization (APESI) และ atmospheric pressure chemical ionization (APCI) ส่วนตัวตรวจวัดมวล (mass analyzer) ที่นิยมใช้ ได้แก่ combination (MS/MS) quadrupole-linear ion trap, quadrupole-time-of-flight และ linear ion trap-Fourier transform ion-cyclotron resonance หรือปัจจุบันกลายมาเป็น triple quadrupoles และ ion traps ผสานเทคนิคกับ isotopic patterns เพื่อตรวจวัดการเกิด modified mycotoxin ในระหว่างกระบวนการแปรรูป (processing) และ กระบวนการ metabolism ในพืช, คน และสัตว์

สรุป

ปัจจุบันมีการตื่นตัวในการศึกษาเกี่ยวกับสารพิษจากเชื้อรา และ modified mycotoxin ทั้งในอาหารในพืช ซึ่งสามารถพบได้ทั้งกระบวนการทางธรรมชาติ หรือพบได้ทั้งในระหว่างกระบวนการแปรรูปต่าง ๆ ทั้งนี้ความรู้ความเข้าใจในอันตรายของสารพิษจากเชื้อราและอนุพันธ์ก็ยังคงจำเป็นที่จะมีการศึกษาต่อไปอย่างต่อเนื่อง เพื่อหาข้อสรุป ข้อมูลที่ถูกต้อง เนื่องจากหลายพื้นที่ในโลกก็ตระหนักถึงอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับสุขภาพของคนและสัตว์ด้วย

กระบวนการแปรรูป กระบวนการผลิตที่มีความหลากหลายนั้น มีผลโดยตรงต่อสารพิษจากเชื้อราและอนุพันธ์ต่าง ๆ นอกจากนี้การปนเปื้อนตามธรรมชาติตั้งแต่เริ่มต้นก็เป็นปัจจัยสำคัญในการศึกษาด้วยปัจจัยที่ทำให้เกิดผลกระทบต่อระดับของสารพิษเหล่านี้ ได้แก่ ปริมาณตั้งต้น (initial level), อุณหภูมิ, ระยะเวลา, ขั้นตอนการหมัก (fermentation), การเติมสิ่งปรุงแต่ง (additives), เอนไซม์, ลักษณะทางกายภาพ และลักษณะทางเคมี, องค์ประกอบ ฯลฯ ล้วนเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อปริมาณ หรือความคงตัว หรือแม้แต่การผันกลับของสารประกอบเหล่านี้ได้

ถึงแม้ว่า modified mycotoxin ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นจากกลไกการป้องกันตัว (defense mechanism) ของพืช หรือ metabolism ของ microorganism แต่อย่างไรก็ตามในสัตว์ หรือมนุษย์เองก็มีการสลายพิษ (detoxification) นั้นทำให้พิษของสารประกอบลดลง หรือแม้แต่เกิดการเปลี่ยนผันกลับไปเป็น parent mycotoxin ก็เป็นไปได้ นอกจากนี้ระบบต่าง ๆ ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตก็ยังเป็นจุดสำคัญที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงมากมายของสารพิษจากเชื้อราและอนุพันธ์

การใช้เทคนิคในการวิเคราะห์ที่ดีที่สุดคือการใช้ high-performance liquid chromatography โดยต่อร่วมกับเครื่องวัดมวลเพื่อให้ความแม่นยำในการตรวจวัด modified mycotoxins อย่างไรก็ตามรายละเอียดในการสกัด ความเหมาะสมของการ clean-up ก็เป็นสิ่งที่สำคัญด้วย ส่วนสารมาตรฐานนั้น ก็ควรที่จะมีการผลิตสารใหม่ ๆ หรือสารประกอบใหม่ ๆ ออกมาเพื่อที่จะใช้ในการยืนยันและระบุปริมาณของสารพิษได้อย่างถูกต้อง ท้ายสุดนี้ ข้อมูลที่ศึกษาที่ถูกต้อง และมากพอจะทำให้การประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพนั้นแม่นยำและเป็นประโยชน์ที่สุด นอกจากนี้ยังจำเป็นที่จะต้องศึกษากระบวนการเปลี่ยนรูป (transformation) กระบวนการผันกลับ (reconvert) ให้กระจ่างแน่ชัดต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Anfossi, L., Giovannoli, C., Baggiani, C., 2016. Mycotoxin detection. **Curr. Opin. Biotechnol.** 37, 120–126.
- Baillie, T.A., 1981. The use of stable isotopes in pharmacological research. **Pharmacol. Rev.** 33, 81–132.
- Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., De Saeger, S., Haesaert, G., Karlovsky, P., Oswald, I.P., Seefelder, W., Speijers, G., Stroka, J., 2013. Masked mycotoxins: a review. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 165–186.
- Berthiller, F., Dall'Asta, C., schuhmacher, R., Lemmens, M., Adam, G., Krska, R., 2005. Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J.Agric. Food Chem.* 53 (9), 3421–3425.
- Berthiller, F., Maragos, C.M., Dall'Asta, C., 2015. Introduction to masked mycotoxin. In, Masked Mycotoxins in Food: Formation, Occurrence and Toxicological Relevance. **RSC Publishing**, London, pp. 1–8.
- Berthiller, F., Schuhmacher, R., Adam, G., Krska, R., 2009a. Formation, determination, and significance of masked and other conjugated mycotoxins. **Anal. Bioanal. Chem.** 395, 1243–1252.
- Berthiller, F., Werner, U., Sulyok, M., Krska, R., Hauser, M.-T., Schuhmacher, R., 2006. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) determination of phase II metabolites of the mycotoxin zearalenone in the model plant *Arabidopsis thaliana*. **Food Addit. Contam.** 23 (11), 1194–1200.
- Binder, E.M., 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. **Anim. Feed Sci. Tech.** 133, 149–166.
- Bourbouloux, A., Shahi, P., Chakladar, A., Delrot, S., Bachhawat, A.K., 2000. Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol.Chem.** 275 (18), 13259–13265.
- Bowles, D., Lim, E.-K., Poppenberger, B., Vaistij, F.E., 2006. Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. **Annu. Rev. Plant Biol.** 57, 567–597.
- Bretz, M., Beyer, B., Cramer, B., Knecht, A., Humpf, H., 2006. Thermal degradation of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol. **J. Agric. Food Chem.** 54, 6445–6451.
- Brodehl, A., Möller, A., Kunte, H., Koch, M., Maul, R., 2014. Biotransformation of the mycotoxin zearalenone by fungi of the genera *Rhizopus* and *Aspergillus*. **FEMS Microbiol. Lett.** 359, 124–130.

- Broekaert, N., Devreese, M., De Baere, S., De Backer, P., Croubels, S., 2015a. Modified Fusarium mycotoxins unmasked: from occurrence in cereals to animal and human excretion. **Food Chem. Toxicol.** 80, 17–31.
- Bullerman, L.B., Bianchini, A., 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 140–146.
- Cirlini, M., Dall'Asta, C., Galaverna, G., 2012. Hyphenated chromatographic techniques for structural characterization and determination of masked mycotoxins. **J. Chromatogr. A** 1255, 145–152.
- Coleman, J.O.D., Blake-Kalff, M.M.A., Davies, T.G.E., 1997. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. **Trends Plant Sci.** 2, 144–151.
- Dall'Asta, C., Galaverna, G., Aureli, G., Dossena, A., Marchelli, R., 2008. A LC/MS/MS method for the simultaneous quantification of free and masked fumonisins in maize and maize-based products. **World Mycotoxin J.** 3, 237–246.
- Dall'Asta, C., Mangia, M., Berthiller, F., Molinelli, A., Sulyok, M., Schuhmacher, R., Krska, R., Galaverna, G., Dossena, A., Marchelli, R., 2009. Difficulties in fumonisin determination: the issue of hidden fumonisins. **Anal. Bioanal. Chem.** 395, 1335–1345.
- De Boevre, M., Di Mavungu, J.D., Landschoot, S., Audenaert, K., Eeckhout, M., Maene, P., Haesaert, G., De Saeger, S., 2012. Natural occurrence of mycotoxins and their masked forms in food and feed products. **World Mycotoxin J.** 5 (3), 207–219.
- De Girolamo, A., Solfrizzo, M., Visconti, A., 2001. Effect of processing on fumonisin concentration in corn flakes. **J. Food Prot.** 64, 701–705.
- El-Sharkawy, S., Abul-Hajj, Y.J., 1988. Microbial transformation of zearalenone. 2.Reduction, hydroxylation, and methylation products. **J. Org. Chem.** 53, 515–519.
- Freire, L and Anderson S. S., 2018. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. **Food Chem. Toxicol.** 11, 189-205.
- Gareis, M., 1994. Maskierte mykotoxine. **Ubers Tierernahrung** 22, 104–113.
- Gelderblom, W.C.A., Cawood, M.E., Snyman, S.D., Vleggaar, R., Marasas, W.F.O., 1993. Structure-activity relationships of fumonisins in short-term carcinogenesis and cytotoxicity assays. **Food Chem. Toxicol.** 31, 407–414.

- Gratz, S.W., Dinesh, R., Yoshinari, T., Holtrop, G., Richardson, A.J., Duncan, G., MacDonald, S., Lloyd, A., Tarbin, J., 2017. Masked trichothecene and zearalenone mycotoxins withstand digestion and absorption in the upper GI tract but are efficiently hydrolyzed by human gut microbiota in vitro. **Mol. Nutr. Food Res.** 61 (4).
- Humpf, H.-U., Voss, K.A., 2004. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. **Mol. Nutr. Food Res.** 48, 255–269.
- Ikunaga, Y., Sato, I., Grond, S., Numaziri, N., Yoshida, S., Yamaya, H., Hiradate, S., Hasegawa, M., Toshima, H., Ito, M., Karlovsky, P., Tsushima, S., 2011. *Nocardioides* sp. strain WSN05-2, isolated from a wheat field, degrades deoxynivalenol, producing the novel intermediate 3-epi-deoxynivalenol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 89, 419–427.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1993. Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring Substances, Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. **IARC Press**, Lyon.
- Kakeya, H., Takahashi-Ando, N., Kimura, M., Onose, R., Yamaguchi, I., Osada, H., 2002. Biotransformation of the mycotoxin, zearalenone, to a non-estrogenic compound by a fungal strain of *Clonostachys* sp. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 66, 2723–2726.
- Kluger, B., Bueschl, C., Lemmens, M., Michlmayr, H., Malachova, A., Koutnik, A., Maloku, I., Berthiller, F., Adam, G., Krska, R., Schuhmacher, R., 2015. Biotransformation of the mycotoxin deoxynivalenol in *Fusarium* resistant and susceptible near isogenic wheat lines. **PLoS One** 10 (3) e0119656.
- Kosawang, C., Karlsson, M., Véléz, H., Rasmussen, P.H., Collinge, D.B., Jensen, B., Jensen, D.F., 2014. Zearalenone detoxification by zearalenone hydrolase is important for the antagonistic ability of *Clonostachys rosea* against mycotoxigenic *Fusarium graminearum*. **Fungal Biol.** 118, 364–373.
- Lamoureux, G.L., Shimabukuro, R.H., Frear, D.S., 1991. Glutathione and glucoside conjugation in herbicide selectivity. In:
- Leonard, K.J., Bushnell, W.R., 2004. *Fusarium* head Blight of Wheat and Barley. **American Phytopathological Society**, St Paul.
- Maul, R., Müller, C., Rieß, S., Koch, M., Methner, F.J., Irene, N., 2012. Germination induces the glucosylation of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol in various grains. **Food Chem.** 131, 274–279.

- Maul, R., Pielhau, R., Koch, M., 2014. Evaluation of an extraction method and spin column cleanup procedure for Fusarium mycotoxins and their masked derivatives from grain matrix. **Food control.** 40, 151–156.
- McCormick, S.P., 2013. Microbial detoxification of mycotoxins. **J. Chem. Ecol.** 39, 907–918.
- Meng-Reiterer, J., Varga, E., Nathanail, A.V., Bueschl, C., Rechthaler, J., McCormick, S.P., Michlmayr, H., Malachová, A., Fruhmann, P., Adam, G., Berthiller, F., Lemmens, M., Schuhmacher, R., 2015. Tracing the metabolism of HT-2 toxin and T-2 toxin in barley by isotope -assisted untargeted screening and quantitative LC-HRMS analysis. **Anal.Bioanal. Chem.** 407, 8019–8033.
- Michlmayr, H., Varga, E., Malachova, A., Nguyen, N.T., Lorenz, C., Haltrich, D., Berthiller, F., Adama, G., 2015. A versatile family 3 glycoside hydrolase from *Bifidobacterium adolescentis* hydrolyzes β -glucosides of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol, nivalenol, and HT-2 toxin in cereal matrices. **Appl. Environ. Microbiol.** 81 (15), 4885–4893.
- Minervini, F., Dell'Aquila, M.E., 2008. Zearalenone and reproductive function in farm animals. **Int. J. Mol. Sci.** 9, 2570–2584.
- Momany, F.A., Sessa, D.J., Lawton, J.W., Selling, G.W., Hamaker, S.A.H., Willett, J.L., 2006. Structural characterization of α -zein. **J. Agric. Food Chem.** 54, 543–547.
- Norred, W.P., Plattner, R.D., Dombink-Kurtzman, M.A., Meredith, F.I., Riley, R.T., 1997. Mycotoxin-induced elevation of free sphingoid bases in precision-cut rat liver slices: specificity of the response and structure-activity relationships. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 147, 63–70.
- Paris, M.P.K., Schweiger, W., Hametner, C., Stückler, R., Muehlbauer, G.J., Varga, E., Krska, R., Berthiller, F., Adam, G., 2014. Zearalenone-16-O-glucoside: a new masked mycotoxin. **J. Agric. Food Chem.** 62, 1181–1189.
- Park, J.W., Scott, P.M., Lau, B.P.-Y., Lewis, D.A., 2004. Analysis of heat-processed corn foods for fumonisins and bound fumonisins. **Food Addit. Contam.** 21, 1168–1178.
- Rychlik, M., Humpf, H.U., Marko, D., Danicke, S., Mally, A., Berthiller, F., Klaffke, H., Lorenz, N., 2014. Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including “masked” mycotoxins. **Mycotoxin Res.** 30, 197–205.
- Schroder, P., Scheer, C.E., Diekmann, F., Stampfl, A., 2007. How plants cope with foreign compounds. Translocation of xenobiotic glutathione conjugates in roots of barley (*Hordeum vulgare*). **Environ. Sci. Pollut. R.** 14, 114–122.

- Stoev, S.D., Denev, S., 2013. Porcine/chicken or human nephropathy as the result of joint mycotoxins interaction. Special issue "Recent Advances in Ochratoxins Research". **Toxins** 5 (9), 1503–1530.
- Vendl, O., Berthiller, F., Crews, C., Krska, R., 2009. Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, and their major masked metabolites in cereal-based food by LC-MS-MS. **Anal. Bioanal. Chem.** 395, 1347–1354.
- Warth, B., Fruhmann, P., Wiesenberger, G., Kluger, B., Sarkanj, B., Lemmens, M., Hametner, C., Fröhlich, J., Adam, G., Krska, R., Schuhmacher, R., 2015. Deoxynivalenol-sulfates: identification and quantification of novel conjugated (masked) mycotoxins in wheat. **Anal. Bioanal. Chem.** 407, 1033–1039.
- Zachariasova, M., Vaclavikova, M., Lacina, O., Vaclavik, L., Hajslova, J., 2012. Deoxynivalenol oligoglycosides: new "masked" Fusarium toxins occurring in malt, beer, and breadstuff. **J. Agric. Food Chem.** 60, 9280–9291.