อวันวี เพชรคงแก้ว: การลดระดับการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราโดยเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก (ถั่วเน่า) (REDUCTION OF MYCOTOXIN CONTAMINATION LEVEL BY *BACILLUS* spp. ISOLATED FROM THAI FERMENTED SOYBEAN PRODUCT (THUA-NAO).) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก, 208 หน้า.

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงการลดระดับปริมาณสารพิษจากเชื้อราโดยเชื้อบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วหลืองหมัก (ถั่วเน่า)

นอกจากนี้ยังทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการคัดแยกและบ่งชี้ลักษณะของเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษโอคราทอกซินเอ ซึ่งปนเปื้อนในอุ่นที่ได้ทำการเพาะปลูกในประเทศฝรั่งเศสอีกด้วย ผลการทดลองในงานวิจัยส่วนนี้พบว่า แอสเปอร์จิลลัส คาร์บอนาเรียส และ แอสเปอร์จิลลัส ไนเจอร์ เป็นเชื้อราสกุลที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษโอคราทอกซินเอสูงที่สุด รองลงมาคือเชื้อรา แอสเปอร์จิลลัส จาโปนิคัส

จากการแยกและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ถั่วเน่า พบว่าเป็นเชื้อบาซิลลัส 23 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบแอสเปอร์จิลลัส ฟลาวัส สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินด้วยเช่นกัน การศึกษาวิจัยนี้ได้ใช้เชื้อแอสเปอร์จิลลัส เวอร์เทอร์ดิจเกียร์ เป็นสายพันธุ์อ้างอิงสำหรับสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษโอคราทอกซินเอ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการศึกษาถึงความสามารถของเชื้อบาซิลลัสในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราแอสเปอร์จิลลัส ฟลาวัสและแอสเปอร์จิลลัส เวอร์เทอร์ดิจเกียร์ เอ็น อาร์ อาร์ แอล 3174 รวมถึงความสามารถในการกำจัดสารพิษที่สร้างขึ้นจากเชื้อราทั้งสองชนิดนี้

ผลการทดลองพบว่า เชื้อบาซิลลัส ซี เอ็ม 21 ซึ่งจากการทำการบ่งชี้ลักษณะในภายหลังพบคือ เชื้อบาซิลลัส ไลเคนนิฟอร์มิส มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้งสองชนิด นอกจากนี้ยังพบอีกว่า เชื้อบาซิลลัส ดังกล่าวมีความสามารถในการกำจัดสารพิษอะฟลาทอกซิน บีวัน และโอคราทอกซิน เอ ที่สร้างขึ้นจากเชื้อราดังกล่าว โดยความสามารถในการกำจัดสารพิษเท่ากับ 74 เปอร์เซ็นต์และ 92.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบอีกว่าเชื้อบาซิลลัส เอ็ม เฮช เอส 13 ซึ่งได้ทำการบ่งชี้ลักษณะในภายหลังโดยวิธี ITS sequencing คือ เชื้อบาซิลลัส ซับทิลิสก็มีความสามารถดังกล่าวเช่นกัน โดยสามารถกำจัดสารพิษอะฟลาทอกซิน บีวัน ได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์

สุดท้ายนี้ คัลเจอร์ ซูปเปอร์นาแทนและเซลลูล่า เอกแทร็ก จากเชื้อบาซิลลัสทั้งสองสายพันธุ์นี้ได้ถูกนำมาศึกษาถึงความสามารถในการย่อยสลายสารพิษอะฟลาทอกซินและโอคราทอกซิน เอ ทั้งนี้เพื่อที่จะได้ทราบถึงกลไกในการย่อยสลายสารพิษทั้งสองชนิด และทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายสารพิษทั้งสองชนิดโดยเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองสายพันธุ์อีกด้วย ผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าคัลเจอร์ ซูปเปอร์นาแทน จากเชื้อบาซิลลัส ซีเอ็ม 21 มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษโอคราทอกซินเอไปเป็นโอคราทอกซินอัลฟ่า ($p<0.0001$) โดยความสามารถในการย่อยสลายสารพิษดังกล่าวเท่ากับ

97.5 เปอร์เซ็นต์และสภาวะที่เหมาะสมของการทำงานของคัลเจอร์ ซูปเปอร์นาแทน นี้อยู่ที่ พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 24 ชั่วโมงและระยะเวลาในการสัมผัสเท่ากับ 2 ชั่วโมง นอกจากนี้ คัลเจอร์ ซูปเปอร์นาแทน จากเชื้อบาซิลลัส เอ็ม เฮช เอส 13 ก็มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษโอคราทอกซินเอได้เช่นกัน โดยสภาวะที่เหมาะสมอยู่ที่ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 48 ชั่วโมงและระยะเวลาในการสัมผัสเท่ากับ 2 ชั่วโมงซึ่งกลไกในการกำจัดสารพิษโอคราทอกซิน เอ มีความเป็นไปได้ว่าจะเกี่ยวข้องกับเอกทราเซลลูล่าและเอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดส เอ แต่อย่างไรก็ตาม ทั้งคัลเจอร์ ซูปเปอร์นาแทน และเซลลูล่า เอกแทร็กจากเชื้อบาซิลลัสทั้งสองสายพันธุ์ ไม่สามารถย่อยสลาย อะฟลาทอกซิน บีวันได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเป็นกลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์

สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

AWANWEE PETCHKONGKAEW : REDUCTION OF MYCOTOXIN CONTAMINATION LEVEL BY *BACILLUS* spp. ISOLATED FROM THAI FERMENTED SOYBEAN PRODUCT (THUA-NAO). THESIS ADVISOR : ASST.PROF. PIYAWAN GASALUCK, Ph.D. 208 PP.

Aflatoxin/ Ochratoxin A/ Biodegradation/ *Bacillus* spp./ *Aspergillus*/ Thua-Nao.

This thesis deals with the reduction of mycotoxin contamination levels by *Bacillus* spp. isolated strains from Thai fermented soybean product (Thua-Nao).

In addition, isolation, characterization, and ochratoxin A (OTA) production ability of toxigenic fungi from French grapes were also studied. Results of this latter study shows that *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* produce the most ochratoxin A from wine grapes in France. Furthermore, *Aspergillus japonicus* produces minimal ochratoxin A from wine grapes.

According to the isolation and identification of microorganisms from fermented soybean (Thua-Nao), it was found that 23 isolates are *Bacillus* spp. An *Aspergillus flavus* aflatoxin producing strain was also isolated from Thua-Nao whereas an *Aspergillus westerdijkiae* was chosen as an OTA producing reference strain. The objectives were to find an efficient *Bacillus* strain for inhibiting growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus westerdijkiae* NRRL 3174, reducing aflatoxin B_1 production, and detoxifying aflatoxin B_1 and ochratoxin A.

Bacillus CM 21, which was identified later by ITS sequencing as *Bacillus licheniformis,* showed the highest ability to inhibit growth of both *Aspergillus* strains and mycotoxins removal (decrease of 74% of AFB_1 and 92.5% of OTA). Another *Bacillus* strain, MHS 13, inhibiting both *Aspergillus* growth and detoxifying 85% of AFB_1 was identified as *Bacillus subtilis*.

Finally, culture supernatant and cellular extracts from both *Bacillus* strains were tested for aflatoxin B_1 and ochratoxin A degradation ability in order to discover their degradation mechanisms. Studies on the optimal condition for aflatoxin B_1 and ochratoxin A degradation were conducted as well. All results indicated that OTA was significantly degraded by the culture supernatant from *Bacillus licheniformis* CM 21 ($p<0.0001$) in OTalpha. The percentage of OTA degradation was 97.5% and the optimal activity of its culture supernatant was found at pH 7.0 and 37°C with 24 h culture incubation time and 2 h contact time. Moreover, OTA was also significantly degraded by the culture supernatant from *Bacillus subtilis* MHS 13 ($p<0.0017$) at pH 5.0 and 37°C with 48 h culture incubation time and 2 h contact time. The proposed degradation mechanism is extracellular and carboxypeptidase A is probably responsible for this degradation while there is no degradation activity for the intracellular extract. However, AFB_1 could not degraded by either culture supernatant or cellular extract from both of the microorganisms. Hence, the AFB_1 detoxification mechanism may be due to a non-enzymatic mechanism.

School of Food Technology

Academic Year 2007

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____

AWANWEE PETCHKONGKAEW : REDUCTION DU NIVEAU DE MYCOTOXINES PAR *BACILLUS* spp. ISOLE DE SOJA FERMENTÉ THAÏLANDAIS (THUA-NAO). DIRECTEUR DE THESE : PROF. PATRICIA TAILLANDIER, Ph.D. 208 PP.

Aflatoxin/ Ochratoxin A/ Biodegradation/ *Bacillus* spp./ *Aspergillus*/ Thua-Nao.

Cette étude traite de la réduction du niveau de contamination en mycotoxines *Bacillus* spp. isolé de Thaï fermenté produit (produit alimentaire thaïlandais appelé Thua-Nao).

En marge de ce travail, l'isolement et la caractérisation de la capacité à produire de l'ochratoxine A (OTA) a été évaluée chez des champignons toxinogènes isolés de raisins français destinés à la vinification. Les résultats de cette partie ont montré que *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus niger* sont les champignons les plus producteurs en France. Cependant, *Aspergillus japonicus* peut aussi être à l'origine de faibles quantités d'ochratoxine A au niveau des raisins.

En ce qui concerne la principale partie de ce travail, 23 isolats de *Bacillus* spp. ont été obtenus à partir de Thua-Nao thaïlandais. Une souche d'*Aspergillus flavus* productrice d'aflatoxine a aussi été isolée de Thua-Nao tandis qu'une souche d'*Aspergillus westerdijkiae* (ex *ochraceus*) a été choisie comme référence d'*Aspergillus* producteur d'OTA. Les objectifs étaient de trouver des souches de *Bacillus* efficaces pour: inhiber la croissance d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus westerdijkiae* NRRL 3174, limiter la production d'aflatoxine B_1, et détoxifier le milieu en diminuant la teneur en mycotoxines : aflatoxine B_1 (AFB_1) et ochratoxine A (OTA).

Parmi les résultats principaux, *Bacillus* CM 21, ensuite identifiée comme *Bacillus licheniformis* par séquençage des ITS, a montré la meilleure capacité à inhiber la croissance

des 2 souches d'*Aspergillus* ainsi que la meilleure capacité détoxifiante (diminution de 74% d'AFB_1 et 92.5% d'OTA). Une autre souche de *Bacillus*, MHS 13, capable à la fois d'inhiber la croissance des 2 souches d'*Aspergillus* et de diminuer de 85% la teneur en AFB_1 a été identifiée comme *Bacillus subtilis*.

Finalement, le surnageant de culture et l'extrait cellulaire des 2 souches de *Bacillus* ont été testés pour la dégradation de l'AFB_1 et de l'OTA afin de mieux comprendre les mécanismes de la détoxification. Les conditions optimales de la dégradation ont aussi été étudiées. Les résultats montrent que l'OTA était significativement degradée par le surnageant de *Bacillus licheniformis* CM 21 ($p<0.0001$) en OTalpha. Le pourcentage de dégradation d'OTA a été de 97.5% et les conditions optimales d'activités étaient : pH 7.0, 37°C, 24 h de croissance de la bactérie et 2 heures d'incubation avec la solution d'OTA. De même, l'OTA a été degradée à 69% par le surnageant de *Bacillus subtilis* MHS 13 ($p<0.0017$) à pH 5.0, 37°C, 48 h de croissance de la bactérie et 2 heures d'incubation avec la solution d'OTA. Le mécanisme de dégradation proposé est donc la présence d'une carboxypeptidase A extracellulaire. En effet, le contenu intracellulaire des 2 bactéries n'a montré aucune activité détoxifiante.

Par ailleurs l'AFB_1 n'a été dégradée ni par le surnageant de culture, ni par le contenu extracellulaire des 2 bactéries. On peut donc supposer que le mécanisme de détoxification pour l'AFB_1 n'est pas de nature enzymatique.

School of Food Technology

Academic Year 2007

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____