



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟอาราบิก้า
ในช่วงต้นของกระบวนการผลิตหลังการเก็บเกี่ยว

ชื่อนิสิต นางสาววันทิณี เบญจมงคลสกุล เลขประจำตัว 5832347223

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงการงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงการงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด

The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)

are the senior project authors' files submitted through the faculty.

หัวข้อโครงการ

การปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟอาราบิก้า
ในช่วงต้นของกระบวนการผลิตหลังการเก็บเกี่ยว

โดย

นางสาววันทิณี เบญจมงคลสกุล รหัสนิต 5832347223

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญ

ปีการศึกษา


2561


ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงการวิทยาศาสตร์


 หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิช)

คณะกรรมการสอบโครงการ

 อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุญ)

 กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุตันน์ เจริญพรวัฒนา)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุขาดา จันทรประทีป นภาธร)

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟอาราบิก้า
ในช่วงต้นของกระบวนการผลิตหลังการเก็บเกี่ยว

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชีวานันท์ เดชอุปกาล ศิริสมบูรณ์

นิสิตในโครงการ

นางสาววันทิณี เบญจมงคลสกุล รหัสนิสิต 5832347223

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2561

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ : การปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟอาราบิก้าในช่วงต้นของกระบวนการผลิตหลังการเก็บเกี่ยว

นิสิตในโครงการ : นางสาววันทิณี เบญจมงคลสกุล เลขประจำตัวนิสิต 5832347223

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. ชีวานันท์ เดชอุปการ ศิริสมบุรณ์

บทคัดย่อ

กาแฟเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมในการบริโภคอย่างแพร่หลายทั่วโลก การปนเปื้อนของราที่เกิดจากกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวที่ไม่เหมาะสมอาจส่งผลทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารพิษจากราตามมา โดยเฉพาะอย่างยิ่งโอคราทอกซินเอ ที่ถูกจัดเป็นสารที่อาจก่อมะเร็งในมนุษย์ ซึ่งข้อมูลการปนเปื้อนเหล่านี้ยังมีรายงานไม่มากนักในประเทศไทย ดังนั้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอและปริมาณของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟอาราบิก้าจากช่วงต้นของกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียกหลังการเก็บเกี่ยว ได้แก่ ผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และเมล็ดกาแฟกะลา จากศูนย์วิจัยโครงการหลวงสามแห่งในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย จากการศึกษาพบว่า ผลกาแฟสุกและเมล็ดกาแฟหมักมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเฉลี่ย 96 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยรากุ่มหลักที่พบปนเปื้อนเป็นยีสต์ และราสายใยอื่นๆ ในสกุล *Rhizopus* และ *Curvularia* เป็นต้น ในขณะที่เมล็ดกาแฟกะลาพบการปนเปื้อนของราดำและราเหลืองในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* และ *Circumdati* มากที่สุด รากุ่มหลักที่พบปนเปื้อนในเมล็ดกาแฟกะลาสายพันธุ์อาราบิก้า คือ *Aspergillus* section *Circumdati* ซึ่งจัดจำแนกได้ทั้งหมด 4 กลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา นอกจากนี้ ยังพบความหลากหลายของ *Aspergillus* section *Nigri* มากถึง 12 กลุ่ม และเมื่อนำตัวแทนของราดำในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* และราเหลืองในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* ที่คัดแยกและจัดจำแนกได้มาทดสอบความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ พบว่าไอโซเลตราดำและราเหลืองที่ผลิตโอคราทอกซินเอได้สูงสุดอยู่ที่ 64.57 ± 12.51 และ 74.69 ± 9.28 นาโนกรัมต่อกรัมอาหารเลี้ยงเชื้อแห้งตามลำดับ สำหรับการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟหมักและกาแฟกะลา พบว่ามีปริมาณโอคราทอกซินเอปนเปื้อนต่ำอยู่ในช่วง น้อยกว่า 0.1-2.0 และ 0.1-10.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

Project title : Contamination of ochratoxigenic fungi in Arabica coffee beans in early steps of post-harvest processing

Investigator : Miss Wantinee Benjamongkolsakul ID 5832347223

Advisor : Cheewanun Dachoupan Sirisomboon, Assistant Professor, Ph.D.

Abstract

Coffee is the most widely consumed beverage in the world. Fungal contamination in coffee associated with poor post-harvest condition leads to mycotoxin contamination, mainly ochratoxin A (OTA) which is probably carcinogenic to humans. Information on the presence of fungal and OTA contamination in Thai coffee beans is limited. Therefore, the objective of this study was to investigate the contamination of ochratoxigenic fungi and OTA levels in arabica coffee beans from early steps of wet process. Cherry coffee, fermented coffee and parchment coffee were collected from 3 stations of Royal project Foundation, Chiangmai, Thailand. This study found that the average percentage of fungal contamination in cherry coffee and fermented coffee were 96 and 100%, respectively. The predominant species were yeast and filamentous fungi such as *Rhizopus* sp. and *Curvularia* sp. On the other hand, parchment coffee was highly contaminated from *Aspergillus* section *Nigri* and *Circumdati*. *Aspergillus* section *Circumdati* was predominant species which can be classified into 4 morphological groups. Moreover, the high diversity of *Aspergillus* section *Nigri* was found with 12 morphological groups. Representative isolates of section *Nigri* and section *Circumdati* were examined for their OTA production. The result show that maximum OTA levels of representative isolates of section *Nigri* and section *Circumdati* were 64.57 ± 12.51 and 74.69 ± 9.28 ng/g of agar, respectively. OTA levels in coffee bean samples were analyzed. The fermented coffee beans and parchment coffee beans show low contamination with OTA in level of <0.1 - 2.0 and 0.1 - 10.3 ppb, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี อันเนื่องมาจากความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชิวานันท์ เดชอุปกุล ศิริสมบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้ความรู้ คำแนะนำ คำปรึกษาและข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการตลอดระยะเวลาของการทำวิจัย ตลอดจนความอนุเคราะห์ในการปรับปรุงแก้ไขโครงการการเรียนการสอนเสริมประสบการณ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความรู้และคำแนะนำ อันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยและต่อตัวผู้วิจัยเองในอนาคต

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีในงานวิจัย

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมสร้างประสบการณ์ ฝ่ายวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้อนุเคราะห์เงินทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่จากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ศูนย์วิจัยโครงการหลวงตีนตก และศูนย์วิจัยโครงการหลวงป่าเมี่ยง ที่อำนวยความสะดวกเป็นอย่างดีในการเก็บตัวอย่างกาแฟในโครงการนี้

ขอขอบพระคุณ คุณสุนันท์ รังสีกาญจน์ส่อง จากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารสถาบัน 2 สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเครื่องมือและอุปกรณ์ในโครงการนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ และเพื่อนๆ สมาชิกห้องวิจัย 1904/14 ทุกคนที่คอยแนะนำ และสอนเทคนิคต่างๆ รวมทั้งพี่ๆ และเพื่อนๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความช่วยเหลือเสมอมา โดยเฉพาะนางสาวบุญยานุช สุภัทรกุล นางสาวชุติมณฑน์ แซ่ไคว้ และเพื่อนๆ ในกลุ่มที่ไม่ได้กล่าวถึงทุกคนที่คอยให้คำปรึกษาและการช่วยเหลือตลอดจนเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้การสนับสนุน ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดจนเป็นกำลังใจที่สำคัญให้แก่ผู้วิจัยเสมอมา

ด้วยความเคารพอย่างสูง

วันทีณี เบญจมงคลสกุล

สารบัญ

หัวข้อ	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการทดลอง	17
บทที่ 3 ผลการทดลอง	24
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผล	40
รายการอ้างอิง	44
ภาคผนวก	50

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ปริมาณการส่งออกเมล็ดกาแฟดิบ เมล็ดกาแฟคั่ว และกาแฟสำเร็จรูปของไทยในปี 2558-2561	2
1.2	ราและสารพิษจากราที่สำคัญต่อความปลอดภัยของอาหาร	6
1.3	ปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดที่ยอมรับได้ในอาหารและผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด	9
1.4	การปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟชนิดต่างๆ	10
1.5	การปนเปื้อนของราในสกุล <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> และ section <i>Nigri</i> ในเมล็ดกาแฟสาร	14
2.1	ตัวอย่างกาแฟอะราบิกาที่สุ่มเก็บในการทดลอง	20
3.1	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราเหลือง และราดำ ของตัวอย่างกาแฟแต่ละชนิด	26
3.2	จำนวนไอโซเลตในแต่ละกลุ่มของราดำและราเหลืองที่จัดจำแนก ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา	36
3.3	การผลิตโอคราทอกซินเอ ของรา <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> และ <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> ที่คัดแยกได้	38
3.4	ปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟหมักและเมล็ดกาแฟกะลา	39
จ.1	จำนวนราสายใยทั้งหมดของตัวอย่างกาแฟทั้ง 3 ชนิด จากศูนย์วิจัยโครงการหลวง ทั้ง 3 แห่งบนอาหารแข็ง DG18	56
จ.2	จำนวนไอโซเลตราเหลือง ราดำและราอื่นๆ ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟทั้ง 3 ชนิด จากศูนย์วิจัยโครงการหลวงทั้ง 3 แห่ง	57
จ.3	การผลิตโอคราทอกซินเอบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ของ <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i>	58
จ.4	การผลิตโอคราทอกซินเอบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ของ <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>	59

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	ภาพแสดงส่วนประกอบต่างๆ ของผลกาแฟ [ก] ภาพจำลองผลกาแฟ [ข] ภาพตัดขวางผลกาแฟ	3
1.2	กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบแห้ง และแบบเปียก	4
1.3	ชนิดของกาแฟที่ได้ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ [ก] กาแฟเซอรัรี, [ข] เมล็ดกาแฟกะลา, [ค] เมล็ดกาแฟสาร, [ง] เมล็ดกาแฟคั่ว	5
1.4	โครงสร้างทางเคมีของโอคราทอกซินเอ	7
1.5	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราในสกุล <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> (<i>A. westerdijkiae</i>) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CYA และ MEA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	12
1.6	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราในสกุล <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> (<i>A. carbonarius</i>) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CYA และ MEA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	13
2.1	วิธีการเจาะวุ้นจากโคโลนีเพื่อนำมาสกัดโอคราทอกซินเอในการวิเคราะห์	22
3.1	ตัวอย่างกาแฟอะราบิกาทั้ง 3 ชนิด [ก] ผลกาแฟสุก (cherry coffee) [ข] เมล็ดกาแฟหมัก [ค] เมล็ดกาแฟกะลา	24
3.2	ตัวอย่างการคัดแยกราดำและราเหลืองบนเมล็ดกาแฟกะลาด้วยวิธี direct plating บนอาหารแข็ง DG18 และ MEA ที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	25
3.3	จำนวนราทั้งหมดในตัวอย่างกาแฟ 3 ชนิด จากศูนย์วิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ตีนตง และป่าเมี่ยง ด้วยวิธี total plate count บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	27
3.4	ตัวอย่างลักษณะ conidial head ของราดำและราเหลืองที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสง กำลังขยาย 400 เท่า	28

รูปที่		หน้า
3.5	ลักษณะสัณฐานวิทยาของราในสกุล <i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i> ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟบนอาหาร CYA และอาหาร MEA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	31
3.6	ลักษณะสัณฐานวิทยาของราในสกุล <i>Aspergillus</i> section <i>Circumdati</i> ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟบนอาหาร CYA และอาหาร MEA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	35
ค.1	กราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ	53
ค.2	โครมาโทแกรมของโอคราทอกซินเอ retention time (RT) ประมาณ 11 นาที	53

บทที่ 1

บทนำ

1. กาแฟ

กาแฟเป็นพืชวงศ์เข็ม (Family Rubiaceae) สกุลกาแฟ (*Genus Coffea*) มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม หรือไม้ยืนต้น แต่เดิมมีแหล่งเพาะปลูกอยู่ในแถบทวีปแอฟริกา รวมไปถึงหมู่เกาะมาดากัสกา และยังมีการเพาะปลูกในประเทศเขตร้อน เช่น ประเทศอินเดีย ประเทศอินโดนีเซีย และประเทศบราซิล (Farah และคณะ, 2015)

กาแฟเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในปัจจุบันจึงเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจโลกเนื่องจากในหลายๆ ประเทศทั่วโลกมีการปลูกกาแฟและส่งเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญ (สำนักงานพัฒนาการวิจัยทางการเกษตร องค์การมหาชน, 2558) กาแฟอะราบิกา (Arabica Coffee: *Coffea arabica*) และกาแฟโรบัสตา (Robusta Coffee: *Coffea canephora* var. *Robusta*) เป็นกาแฟสายพันธุ์ที่สำคัญในทางเศรษฐกิจ ส่วนกาแฟชนิดอื่นๆ มักถูกใช้เป็นแหล่งในการศึกษาทางพันธุกรรม เช่น กาแฟลิเบอริกา (Liberica coffee: *Coffea liberica*) เป็นต้น (Batista และคณะ, 2016)

กาแฟโรบัสตาเจริญได้ดีในที่ราบต่ำที่มีอากาศร้อนชื้น ลำต้นมีลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก ผลกลมรีและใช้เวลาในการออกผลประมาณ 11 เดือน เมล็ดภายในมีลักษณะกลมรี มีความทนทานต่อโรคมกกว่ากาแฟอะราบิกา และเมื่อเจริญเต็มที่จะให้ผลผลิตมาก กาแฟอะราบิกาเจริญได้ดีในเขตพื้นที่สูงที่มีอากาศเย็นมีอุณหภูมิเฉลี่ย 15-25 องศาเซลเซียส ลำต้นมีลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดใหญ่ ผลกลมรีและใช้เวลาในการออกผลประมาณ 7-9 เดือน เมล็ดกลมรีขนาดใหญ่กว่ากาแฟโรบัสตา กาแฟอะราบิกาเป็นสายพันธุ์ที่ต้องการการดูแลและให้ผลผลิตน้อยเมื่อเจริญเต็มที่จึงส่งผลให้กาแฟอะราบิกามีราคาสูงกว่ากาแฟโรบัสตา (Noonim และคณะ, 2008; Batista และคณะ, 2016)

1.1 สถานการณ์การผลิตและการค้าเมล็ดกาแฟ

นอกจากกาแฟจะเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของโลกแล้ว กาแฟยังเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับเกษตรกรไทยปีละประมาณ 5,500 ล้านบาท ซึ่งสายพันธุ์กาแฟที่ปลูกในไทยส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์อะราบิกา และโรบัสตา กาแฟอะราบิกามีแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญอยู่ในภาคเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย และแม่ฮ่องสอน ในขณะที่กาแฟโรบัสตา มีแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญในภาคใต้ ได้แก่ ชุมพร ระนอง สุราษฎร์ธานี และกระบี่ (สถาบันอาหาร, 2558) สำหรับผลผลิตปี 2561 มีประมาณ 34,894 ตัน เพิ่มขึ้นจากปี 2560 ซึ่งมีปริมาณ 24,742 ตัน หรือเพิ่มขึ้นร้อยละ 41.03 (กองส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร, 2561)

สำหรับการส่งออกเมล็ดกาแฟดิบของไทยลดลงจาก 450 ตันเหลือ 382 ตัน เนื่องจากความต้องการบริโภคกาแฟภายในประเทศเพิ่มมากขึ้นจึงส่งผลให้การส่งออกลดลง ในขณะที่เมล็ดกาแฟคั่วมีการส่งออกเพิ่มขึ้นมากในปี 2560 มีการส่งออกเมล็ดกาแฟคั่วสูงถึง 1,871 ตัน และกาแฟสำเร็จรูปมีการส่งออกลดลงจาก 7,595 ตัน เป็น 2,806 ตัน (กองส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร, 2561) (ตารางที่ 1.1)

ตารางที่ 1.1 ปริมาณการส่งออกเมล็ดกาแฟดิบ เมล็ดกาแฟคั่ว และกาแฟสำเร็จรูปของไทยในปี 2558-2561

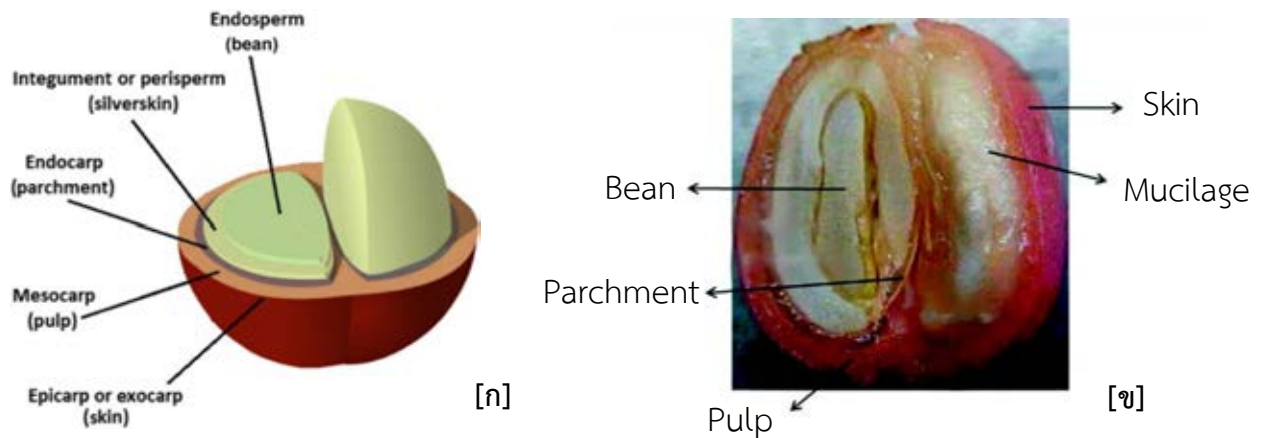
ปี	เมล็ดกาแฟดิบ	เมล็ดกาแฟคั่ว	กาแฟสำเร็จรูป	กาแฟสำเร็จรูปอื่นๆ
2558	450	203	7,595	38,546
2559	334	187	6,915	18,879
2560	305	1,871	4,247	26,650
2561	382	113	2,806	16,775

หมายเหตุ ปริมาณเป็น ตัน

ที่มา: ดัดแปลงจากกองส่งเสริมการค้าสินค้าเกษตร, 2561

1.2 องค์ประกอบของผลกาแฟ

ผลกาแฟ (cherry coffee) มีลักษณะกลมรีหรือกลมขึ้นกับสายพันธุ์ของกาแฟ โดยทั่วไปเมื่อโตเต็มที่ผลกาแฟจะมีขนาดยาว 10-15 มิลลิเมตร ซึ่งบรรจุเมล็ดกาแฟ (Coffee bean) อยู่ภายใน ผลกาแฟประกอบด้วยเนื้อเยื่อหลายชั้น (รูปที่ 1.1) ได้แก่ (1) ผนังผลชั้นนอก (epicarp หรือ exocarp) เป็นชั้นนอกสุดมีสารเคลือบขี้ผึ้ง (wax) เคลือบอยู่ช่วยในการป้องกันผลกาแฟ โดยผนังผลชั้นนอกมีสีเขียวในตอนแรก จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และสีแดงเมื่อผลสุกเต็มที่ (2) ผนังผลชั้นกลาง (mesocarp หรือ pulp) เป็นชั้นที่มีเนื้อผล และมีลักษณะเป็นเมือก (mucilage) ซึ่งเกาะติดอยู่กับผนังผลชั้นใน (3) ผนังผลชั้นใน (endocarp หรือ parchment) มีลักษณะบางและสลายตัวได้ง่าย (4) Silverskin เป็นส่วนที่ห่อหุ้มเมล็ด ซึ่งมีส่วนประกอบหลักคือพอลิแซ็กคาไรด์ โดยเฉพาะเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส และ (5) เมล็ดจริง (bean หรือ seed หรือ endosperm) ประกอบด้วยเมล็ดที่มีลักษณะรูปทรงคล้ายไข่ 2 เมล็ด (Farah และคณะ, 2015; Batista และคณะ, 2016)



รูปที่ 1.1 ภาพแสดงส่วนประกอบต่างๆ ของผลกาแฟ [ก] ภาพจำลองผลกาแฟ (Farah และคณะ, 2015), [ข] ภาพตัดขวางผลกาแฟ (Batista และคณะ, 2016)

1.3 กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ

กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวเพื่อให้ได้เป็นเมล็ดกาแฟสาร (green coffee bean) โดยทั่วไปมี 2 กระบวนการ ดังนี้

1. กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบแห้ง (dry process) (รูปที่ 1.2 ก) เป็นการนำผลกาแฟสุกหลังการเก็บเกี่ยว (cherry) มาตากแห้งโดยใช้ความร้อนจากแสงอาทิตย์ทำให้แห้งบนพื้นปูนคอนกรีตขนาดใหญ่ และเกลี่ยเมล็ดกาแฟเพื่อให้แห้งอย่างสม่ำเสมอ จนเมล็ดกาแฟมีปริมาณความชื้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจใช้เวลาในการตากประมาณ 4 อาทิตย์ ขึ้นกับภาวะสภาพภูมิอากาศ จากนั้น กะเทาะเปลือกออกด้วยเครื่องสีกาแฟ เพื่อให้ได้เมล็ดกาแฟสาร (green coffee bean) กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบแห้งมักใช้กับกาแฟโรบัสตา (Batista และคณะ, 2016)

2. กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียก (wet process) (รูปที่ 1.2 ข) เป็นการนำผลกาแฟสุกหลังการเก็บเกี่ยวมาปอกเปลือกโดยเครื่องปอกเปลือก จะได้เมล็ดกาแฟที่ยังมีเมือกที่ติดกับผนังผลชั้นใน จึงกำจัดเมือกโดยการนำเมล็ดกาแฟที่ปอกเปลือกแล้วไปหมักในถังหมักขนาดใหญ่ ใช้เวลาในการหมักโดยทั่วไปประมาณ 24-36 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความหนาของชั้นที่เป็นเมือก และความเข้มข้นของเอนไซม์ จากนั้น นำเมล็ดหลังจากผ่านกระบวนการหมักไปล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วตากแดดจนแห้ง ระหว่างการตากแดดควรมีการเกลี่ยเมล็ดกาแฟเพื่อให้มีความแห้งสม่ำเสมอ เมล็ดกาแฟหลังจากผ่านขั้นตอนเหล่านี้แล้วเรียกว่า เมล็ดกาแฟกะลา (parchment coffee) หลังจากนั้นเมล็ดกาแฟกะลาจะถูกบรรจุไว้ในกระสอบ เพื่อรอการสีเป็นเมล็ดกาแฟ

สาร (green coffee bean) ต่อไป กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียกมักถูกใช้กับกาแฟอาราบิกา (Batista และคณะ, 2016)



[ก]



[ข]

รูปที่ 1.2 [ก] กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแห้ง, [ข] กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียก
ที่มา: <https://ravecoffee.co.uk/pages/coffee-processing-natural>
ที่มา: <https://legacy.sweetmarias.com/library/node/8756>
(สืบค้นเมื่อวันที่ 29 เมษายน 2561)

ชนิดของกาแฟที่ได้ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ แบ่งได้ 4 ชนิด (รูปที่ 1.3) ดังนี้

- (1) กาแฟเชอร์รี่ (cheery coffee) คือ ผลกาแฟสุกที่มีลักษณะเป็นสีแดง
- (2) กาแฟกะลา (parchment coffee) คือ เมล็ดกาแฟที่มาจากผลกาแฟสุกผ่านการตากแห้งแล้วทำการเอาเนื้อผลออก แต่ยังคงเหลือผนังผลชั้นในอยู่
- (3) กาแฟสาร (green coffee) คือ เมล็ดกาแฟกะลาที่ผ่านการกำจัดผนังผลชั้นในออกโดยการสีแล้ว
- (4) กาแฟคั่ว (roasted coffee) คือ กาแฟสารที่นำมาคั่วจนเป็นสีน้ำตาล มีกลิ่นหอม และสามารถนำไปบดเป็นผงเพื่อชงดื่มต่อไป



รูปที่ 1.3 ชนิดของกาแฟที่ได้ในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟ [ก] กาแฟเชอร์รี่, [ข] เมล็ดกาแฟกะลา, [ค] เมล็ดกาแฟสาร, [ง] เมล็ดกาแฟคั่ว

ที่มา: <https://image.shutterstock.com/image-photo/parchment-coffee-bean-260nw-1185369094.jpg>

ที่มา: <https://sc01.alicdn.com/kf/UT829fyXp4XXXagOFbXM/COFFEE-BEANS-ARABICA-BBB.jpg>

ที่มา: <http://cf.jiraygroup.com/cherry-coffee/>

ที่มา: <https://pixabay.com/photo-532613/>

(สืบค้นเมื่อวันที่ 7 เมษายน 2562)

2. สารพิษจากรา

สารพิษจากรา (mycotoxin) คือ สารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีความเป็นพิษ ถูกผลิตจากราสายใยในฟิลัมแอสโคไมโคตา (Alshannaq และคณะ, 2017) ที่พบปนเปื้อนในอาหารสัตว์และอาหารของมนุษย์ในช่วงหลังการเก็บเกี่ยวหรือระหว่างการเก็บรักษา ราที่มีความสามารถในการผลิตสารพิษ ได้แก่ ราในสกุล *Aspergillus*, *Penicilium*, *Alternaria* และ *Fusarium* (Patriarca และคณะ, 2017) สารพิษจากรา ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ได้อย่างเฉียบพลันและเรื้อรัง โดยส่งผลกระทบต่ออวัยวะและระบบสำคัญภายในร่างกาย เช่น ระบบทางเดินอาหาร ระบบภูมิคุ้มกัน ระบบประสาท และยังส่งผลเสียต่อทารกในครรภ์มารดา นอกจากนี้ สารพิษจากรายังถูกจัดเป็นสารก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ด้วย (Vettorazzi และคณะ, 2016) สารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารและส่งผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์ที่ต้องมีการควบคุมปริมาณ ได้แก่ อะฟลาทอกซิน (aflatoxins) โอคราทอกซินเอ (ochratoxin A) ฟูโมนิซิน (fumonisins) ซีราลีโนน (zearalenone) ดีออกซี

นิวาลินอล (deoxynivalenol) เออร์กอท อัลคาลอย (ergot alkaloid) และพาทุลิน (patulin) (ตารางที่ 1.2) (Alshannaq และคณะ, 2017)

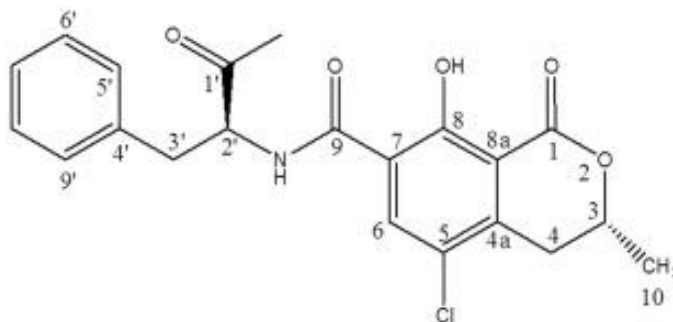
ตารางที่ 1.2 ราและสารพิษจากราที่สำคัญต่อความปลอดภัยของอาหาร

สารพิษจากรา	ชนิดของรา	อ้างอิง
โอคราทอกซินเอ	<i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. niger</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i>	Paterson และคณะ (2018)
อะฟลาทอกซิน	<i>A. parasiticus</i> , <i>A. flavus</i>	Paterson และคณะ (2018)
ฟูโมนิซิน	<i>A. niger</i> , <i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Logrieco และคณะ(2009), Alshannaq และคณะ (2017)
ซีรานีโนน	<i>F. graminearum</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. equiseti</i>	Alshannaq และคณะ (2017), Paterson และคณะ (2018)
ดีออกซินิวาลินอล	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. tricinctum</i>	Patriarca และคณะ (2017)
เออร์กอท	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. fusiformis</i> ,	Marin และคณะ (2013)
อัลคาลอย	<i>C. africana</i> , <i>Neotyphodium</i> spp.	
พาทุลิน	<i>P. expansum</i>	Paterson และคณะ (2018)

3. โอคราทอกซินเอ

Van Der Merwe และคณะ (1965) ได้ค้นพบสารโอคราทอกซินเอ (ochratoxin A, OTA) เป็นครั้งแรก ซึ่งมีการรายงานว่ามีโอคราทอกซินที่พบผลิตมาจาก *Aspergillus ochraceus* และต่อมามีรายงานการค้นพบว่ามีราสายใยอีกหลายชนิดในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* ที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ (Pitt, 1987)

โอคราทอกซินเอมีสูตรโมเลกุล คือ $C_{20}H_{18}ClNO_6$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 403.815 กรัมต่อโมล มีโครงสร้างเป็น pentaketide ของ L- β -phenylalanine สองโมเลกุลจับกันด้วยพันธะเอไมด์ (รูปที่ 1.3) (Toa และคณะ, 2018) และมีชื่อ IUPAC คือ L-phenylalanine-N-[(5-chloro-3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-1H-2-benzopyrane-7-yl)carbonyl]-(R)-isocoumarin โอคราทอกซินเอเป็นกรดอินทรีย์อ่อน ลักษณะเป็นก้อนผลึกไม่มีสี มีจุดหลอมเหลวที่ 169 องศาเซลเซียส และละลายน้ำได้เล็กน้อย (El khoury และคณะ, 2010; National Center for Biotechnology Information, 2018)



Ochratoxin A (OTA)

รูปที่ 1.4 โครงสร้างทางเคมีของโอคราทอกซินเอ (Toa และคณะ, 2018)

3.1 ความเป็นพิษของโอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเอเป็นพิษโดยตรงต่อไต (nephrotoxic) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ส่งผลทำให้เกิดการเสียชีวิตจากโรคไตอักเสบเรื้อรังในประชากรแถบทวีปยุโรป ได้แก่ โคเอเชีย บอสเนีย บัลแกเรีย และโรมาเนีย (Visconti และคณะ, 1999; Ribelin และคณะ, 1978)

Soleas และคณะ (2001) รายงานว่า โอคราทอกซินเอส่งผลกระทบต่อระบบประสาท (neurotoxic) โดยทำให้ระบบประสาทส่วนกลางของหนูพิการเมื่อได้รับโอคราทอกซินเอเป็นเวลานาน โอคราทอกซินเอเป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immunotoxic) โดยสามารถกดภูมิคุ้มกันในร่างกาย ทำลายเซลล์เม็ดเลือดขาว และยับยั้งการหลั่งไซโตไคน์ (Lea และคณะ, 1989) และยังเป็นพิษต่อทารกในครรภ์มารดาด้วย (teratogenic) (Holzhauser และคณะ, 2003) นอกจากนี้ โอคราทอกซินเอยังถูกจัดให้เป็นสารก่อมะเร็งในกลุ่ม 2B (Group 2B carcinogen) ซึ่งอาจเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ (IARC, 1983)

3.2 ราที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ

โอคราทอกซินเอเป็นสารเมแทบอลิต์ทุติยภูมิที่ผลิตโดยราสายใยในสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* เป็นหลัก ซึ่งพบปนเปื้อนในอาหารแปรรูปและผลิตผลทางการเกษตรที่สำคัญ (Amézqueta และคณะ, 2012) ราสายพันธุ์หลักที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอในสกุล *Penicillium* คือ *P. verrucosum* ส่วนใหญ่พบปนเปื้อนในธัญพืช และผลิตภัณฑ์จากธัญพืชโดยเฉพาะในประเทศทางเหนือของยุโรปที่มีอากาศค่อนข้างเย็น (Alvindia และคณะ, 2016) นอกจากนี้ ยังมี *Penicillium nordicum* ที่ผลิตโอคราทอกซินเอในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น แฮม ซาลามิ (Sonjak และคณะ, 2011)

ราในสกุล *Aspergillus* ที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ *Aspergillus* section *Circumdati* และ section *Nigri* ราในกลุ่ม section *Circumdati* ที่เป็นสาเหตุหลักของการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอ ได้แก่ *A. westerdijkiae* *A. ochraceus* และ *A. steynii* ส่วนมากพบ

ปนเปื้อนในผลไม้แห้งและธัญพืช เช่น องุ่น โกโก้ และกาแฟ เป็นต้น (Amézqueta และคณะ, 2012) และราในกลุ่ม section *Nigri* หรือราดำ ที่เป็นสาเหตุหลักของการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอ ได้แก่ *A. carbonarius* และ *A. niger* aggregate มักพบปนเปื้อนมากในองุ่น (Dachoupan และคณะ, 2009) *A. carbonarius* เป็นสายพันธุ์ที่สำคัญเนื่องจากมีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินได้สูงกว่า *A. niger* เป็นอย่างมาก

3.3 การปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในอาหาร

โอคราทอกซินเอถูกพบปนเปื้อนในผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด เช่น ข้าวโพด ธัญพืช กาแฟ ข้าว และถั่ว รวมถึงผลิตภัณฑ์แปรรูปจากองุ่น เช่น ไวน์ น้ำองุ่น และองุ่นอบแห้ง นอกจากนี้ ยังพบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินในผลิตภัณฑ์ที่มาจากเนื้อสัตว์และนม เช่น แฮม และซาลามิ เป็นต้น (Magnoli และคณะ, 2007; Slove, 2013) Freire และคณะ (2017) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากองุ่น ได้แก่ ไวน์แดง และไวน์ขาว พบว่าร้อยละ 16.7 ของตัวอย่างไวน์แดง และร้อยละ 50 ของตัวอย่างไวน์ขาวมีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ โดยมีปริมาณเฉลี่ยอยู่ที่ 0.29 และ 0.02 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ Ozden และคณะ (2012) ศึกษาการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในผลิตภัณฑ์จากธัญพืชในประเทศตุรกี พบว่าร้อยละ 21.62 ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารเข้าจากธัญพืชมีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอ โดยมีปริมาณเฉลี่ย 0.32 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

สำหรับในประเทศไทยตรวจพบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด ได้แก่ ตัวอย่างกาแฟคั่ว และข้าวโพด มีปริมาณโอคราทอกซินเออยู่ในช่วง 1.0-4.6 และ 0.0-4.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในผลไม้อบแห้งที่จำหน่ายในตลาด เช่น ลูกเกดดำ ลูกเกดเหลือง มะขามหวาน พุทราจีน พ룬 (สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร, 2555)

3.4 ข้อกำหนดการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในอาหาร

โอคราทอกซินเอเป็นสารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหารแปรรูปและผลผลิตทางการเกษตร ส่งผลกระทบต่อสุขภาพมนุษย์และสัตว์ จึงต้องมีการตรวจสอบและควบคุมปริมาณโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร (Alshannaq และคณะ, 2017) โดยมีหลายหน่วยงานที่ออกข้อกำหนดปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดที่ยอมรับได้ในอาหารแต่ละชนิด เช่น สหภาพยุโรป (European Union) มีการออกข้อกำหนดปริมาณโอคราทอกซินเอในอาหารแต่ละชนิด เช่น ธัญพืช ผลไม้แห้ง ผลิตภัณฑ์แปรรูปจากผลไม้ กาแฟคั่ว โกโก้ และเครื่องเทศ (ตารางที่ 1.3) (European Commission, 2005)

ตารางที่ 1.3 ปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดที่ยอมรับได้ในอาหารและผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด

ชนิดอาหาร	ปริมาณสูงสุดที่ยอมรับได้ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
เมล็ดธัญพืชที่ไม่ผ่านกระบวนการ	5.0
ผลิตภัณฑ์จากธัญพืชทุกชนิด	3.0
ผลไม้แห้ง (ลูกเกด องุ่นแห้ง)	10.0
เครื่องดื่มจากองุ่น	2.0
ผลิตภัณฑ์ธัญพืชสำหรับทารกและเด็ก	0.5

ที่มา: ดัดแปลงจาก European Commission, 2005

4. โอคราทอกซินเอในกาแฟ

กาแฟเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์หลักที่มีมูลค่าในตลาดการค้าโลก การผลิตเมล็ดกาแฟส่งผลให้เกิดอาชีพในผู้คนหลายล้านคนทั่วโลก ดังนั้น การเกิดปัญหาต่อเมล็ดกาแฟอย่างการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟนั้น มีผลกระทบเชิงลบที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของประชากรแถบชนบทในหลายๆ ประเทศ และส่งผลต่อเศรษฐกิจการค้าเมล็ดกาแฟ นอกจากนี้ ยังส่งผลต่อสุขภาพต่อผู้บริโภคกาแฟ (FAO, 2005) โอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟถูกตรวจพบครั้งแรกในเมล็ดกาแฟสารจากเมืองแองโกลา ประเทศแอฟริกาโดย Levi และคณะ (1974) พบการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอมีค่าน้อยกว่า 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และพบว่าการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในกาแฟมีสาเหตุสำคัญมาจากการปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟ ต่อมาในหลายๆ ประเทศได้มีการศึกษาการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสารทั้งในกาแฟอะราบิกาและกาแฟโรบัสต้าที่ใช้สำหรับการค้าภายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ ไม่เพียงแต่เมล็ดกาแฟสารเท่านั้นที่มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ กาแฟในแต่ละขั้นตอนของกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟนั้นสามารถเกิดการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอได้เช่นกัน Suarez-Quiroz และคณะ (2005) ศึกษาปริมาณการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอของกาแฟอะราบิกาหลังการเก็บเกี่ยวจากขั้นตอนต่างๆ ของกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียก พบว่า กาแฟเชอร์รี่หรือผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และเมล็ดกาแฟกะลา มีปริมาณโอคราทอกซินเอปนเปื้อนอยู่ที่ 0.20 ± 0.01 , 0.15 ± 0.03 และ 0.15 ± 0.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ตัวอย่างรายงานการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในกาแฟชนิดต่างๆ จากหลายประเทศทั่วโลกแสดงในตารางที่ 1.4

ตารางที่ 1.4 การปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟชนิดต่างๆ

ชนิดของกาแฟ	ประเทศ	ปริมาณโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	อ้างอิง	
กาแฟเชอร์รี่	ฝรั่งเศส	0.20	Suarez-Quiroz และคณะ (2005)	
	บราซิล	0.1-5.0	Batista และคณะ (2009)	
	เอธิโอเปีย	0.10-22.90	Geremew และคณะ (2016)	
กาแฟหมัก	ฝรั่งเศส	0.15	Suarez-Quiroz และคณะ (2005)	
	บราซิล	0.1-5.0	Batista และคณะ (2009)	
กาแฟกะลา	ฝรั่งเศส	0.15	Suarez-Quiroz และคณะ (2005)	
	อินเดีย	0.1	Velmourougane และคณะ (2011)	
	เอธิโอเปีย	0.12-22.64	Geremew และคณะ (2016)	
กาแฟสาร	อะราบิกา	บราซิล	0.2-47.8	Leoni และคณะ (2000)
		สหรัฐอเมริกา	<0.1-27.7	Pardo และคณะ (2004)
		ไทย	<0.6-55	Noonim และคณะ (2008)
โรบัสต้า	เวียดนาม	0.4-1.8	Leong และคณะ (2007)	
	ไทย	1.3-8.9	Noonim และคณะ (2008)	
	อินเดีย	0.20-4.30	Gopinandhan และคณะ (2008)	
กาแฟคั่ว	ญี่ปุ่น	2.75	Aoyama และคณะ (2010)	
	ชิลี	0.84	Galarce-Bustos และคณะ (2014)	
กาแฟสำเร็จรูป	ญี่ปุ่น	4.23	Aoyama และคณะ (2010)	
	ชิลี	6.43	Galarce-Bustos และคณะ (2014)	

นอกจากนี้ ยังพบว่ามีกรปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟคั่ว หรือแม้แต่กาแฟสำเร็จรูป เนื่องจากกระบวนการแปรรูปเมล็ดกาแฟสามารถช่วยลดปริมาณโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณโอคราทอกซินเอปนเปื้อนเริ่มต้น (Ferraz และคณะ, 2010) Aoyama และคณะ (2010) ศึกษาการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟคั่วและกาแฟสำเร็จรูปในประเทศญี่ปุ่น พบว่าร้อยละ 36.7 ของตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่ว และร้อยละ 95.5 ของตัวอย่างกาแฟสำเร็จรูปมีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอสูงที่สุดถึง 2.75 และ 4.23 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และ Galarce-Bustos และคณะ (2014) ได้

ศึกษาการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟคั่วและกาแฟสำเร็จรูปในประเทศชิลี พบว่า ตัวอย่างเมล็ดกาแฟคั่วและตัวอย่างกาแฟสำเร็จรูปมีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอสูงสุดถึง 0.84 และ 6.43 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ อีกทั้ง กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียกและแบบแห้งยังมีการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอแตกต่างกัน กาแฟที่ผ่านกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบแห้งมีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอสูงกว่าการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียก Geremew และคณะ (2016) ศึกษาการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียกและแบบแห้ง พบว่า กาแฟที่ผ่านกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบแห้งมีปริมาณโอคราทอกซินเอปนเปื้อนเฉลี่ยสูงถึง 3.37 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมากกว่ากาแฟที่ผ่านกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียกซึ่งมีปริมาณโอคราทอกซินเอปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ที่ 0.01 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

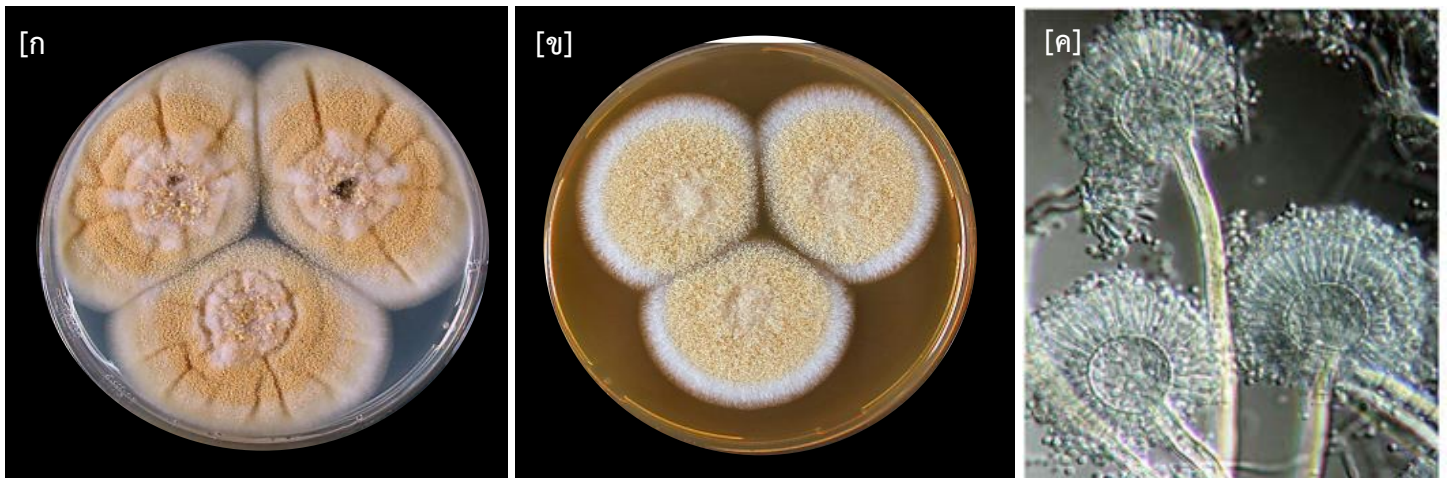
4.1 ข้อกำหนดการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในกาแฟ

จากที่กล่าวไปข้างต้นถึงความสำคัญของเมล็ดกาแฟและอันตรายของการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟ จึงมีหลายหน่วยงานตั้งข้อกำหนดปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดที่สามารถพบปนเปื้อนได้ในเมล็ดกาแฟ ซึ่งหน่วยงานต่างๆ ในแต่ละประเทศนั้นกำหนดปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดที่สามารถพบปนเปื้อนได้ในเมล็ดกาแฟแตกต่างกันออกไป เช่น สหภาพยุโรป กำหนดปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดที่สามารถปนเปื้อนได้ในเมล็ดกาแฟคั่ว และกาแฟผงสำเร็จรูปเท่ากับ 5.0 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (European Commission, 2010) สำหรับในประเทศไทย สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กำหนดปริมาณโอคราทอกซินเอสูงสุดที่สามารถปนเปื้อนได้ในเมล็ดกาแฟสาร สายพันธุ์อะราบิกาเท่ากับ 10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (มกษ. 5701-2561) และเมล็ดกาแฟสาร สายพันธุ์โรบัสต้าเท่ากับ 10.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (มกษ. 5700-2561)

4.2 ความหลากหลายของราที่พบในกาแฟ

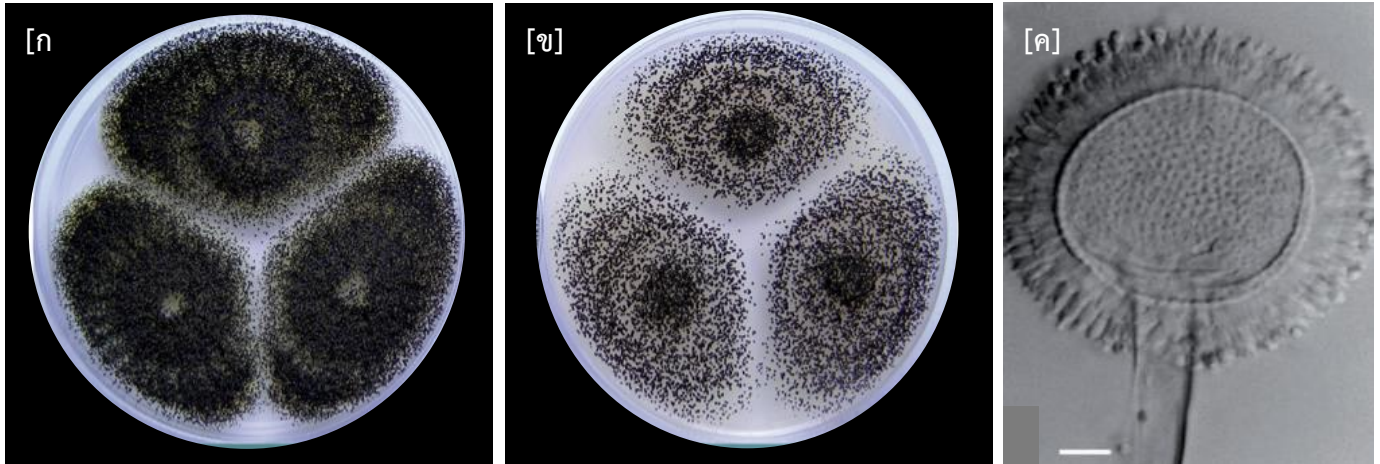
สำหรับประชากรราที่พบในผลและเมล็ดกาแฟมีจำนวนกว่า 215 สายพันธุ์ ตัวอย่างราที่พบในกาแฟ เช่น ราในสกุล *Rhizopus*, *Mucor*, *Curvularia*, *Penicillium* และ *Aspergillus* เป็นต้น ซึ่งประชากรราที่พบมากกว่าร้อยละ 40 เป็นราในกลุ่มแอสโคไมโคตา ได้แก่ ราในสกุล *Penicillium* และ *Aspergillus* โดยราในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* และ *Aspergillus* section *Nigri* เป็นกลุ่มสำคัญที่พบปนเปื้อนบริเวณผิวเมล็ดกาแฟ และภายในเมล็ดกาแฟที่ได้รับความเสียหาย และยังเป็นสาเหตุหลักของการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟ (Vaughan และคณะ, 2015)

ราในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Macroscopic characters) แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์โดยทั่วไปมีลักษณะโคโลนีสีเหลือง ผิวหน้าฟู (floccose) บนอาหาร Czapek's yeast autolysate agar (CYA) (รูปที่ 1.5 ก) และ Malt extract agar (MEA) (รูปที่ 1.5 ข) ที่ 7 วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และสำหรับลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic characters) คือ ผนังของก้านชูสปอร์ขรุขระ ปลายของก้านชูสปอร์ (conidiophore) พองออกเป็นเวสซิเคิล (vesicle) บนเวสซิเคิลมีสเตอริกมา (sterigma) สองชั้น (biseriate) มีโคนิเดียสีเหลืองจนถึงสีเหลืองออกน้ำตาล ขนาดโคนิเดียประมาณ 2-3.5 ไมโครเมตร (รูปที่ 1.5 ค) สายพันธุ์สำคัญที่พบปนเปื้อนมากในเมล็ดกาแฟและมีการผลิตโอคราทอกซินเอ ได้แก่ *A. ochraceus* และ *A. westerdijkiae* (Taniwaki และคณะ, 2014; Visagie และคณะ, 2014)



รูปที่ 1.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* (*A. westerdijkiae*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CYA และ MEA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน [ก] ลักษณะโคโลนีบนอาหาร CYA [ข] ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MEA [ค] ลักษณะ conidial head (Fridvas และคณะ, 2004)

ราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* หรือราดำ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Macroscopic characters) แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์โดยทั่วไปมีโคโลนีสีน้ำตาลจนถึงสีดำ เส้นใยสีขาว บนอาหาร CYA (รูปที่ 1.6 ก) และ MEA (รูปที่ 1.6 ข) ที่ 7 วัน อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic characters) คือ มีผนังของก้านชูสปอร์เรียบ ไม่มีสี ปลายของก้านชูสปอร์ (conidiophore) พองออกเป็นเวสซิเคิลทรงกลม (vesicle) บนเวสซิเคิลมีสเตอริกมา (sterigma) หนึ่งชั้น (uniseriate) หรือสองชั้น (biseriate) มีโคนิเดียสีน้ำตาลไปจนถึงสีดำ โคนิเดียมีขนาดหลากหลายตั้งแต่ 2.5-10 ไมโครเมตร (รูปที่ 1.6 ค) ขึ้นกับสายพันธุ์ของรา สายพันธุ์สำคัญที่พบปนเปื้อนมากในเมล็ดกาแฟและมีการผลิตโอคราทอกซินเอ ได้แก่ *A. carbonarius* และ *A. niger* (Silva และคณะ, 2011; Alvindia และคณะ, 2016)



รูปที่ 1.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* (*A. carbonarius*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง CYA และ MEA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน [ก] ลักษณะโคโลนีบนอาหาร CYA [ข] ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MEA [ค] ลักษณะ conidial head (Pitt และ Hocking, 2009)

จากการศึกษาการปนเปื้อนของราในกาแฟทั้งกาแฟอาราบิก้าและกาแฟโรบัสต้า ในประเทศต่างๆ พบว่ามีการปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* โดยเฉพาะ *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. foetidus* และ *A. japonicus* ซึ่งราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* มักพบปนเปื้อนในกาแฟโรบัสต้ามากกว่ากาแฟอาราบิก้า และสำหรับการปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* พบ *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. sclerotiorum* และ *A. melleus* ปนเปื้อนมากในเมล็ดกาแฟอาราบิก้า (Batista และคณะ, 2009; Taniwaki และคณะ, 2014; Alvindia และคณะ, 2016) สำหรับประชากรราที่พบในกาแฟของประเทศไทย มีการรายงานไม่มากนักโดย Noonim และคณะ (2008) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอใน

กาแพอะราบิกจากภาคเหนือและกาแพโรบัสตาจากภาคใต้ของประเทศไทย พบว่า การปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอในกาแพอะราบิกา ส่วนใหญ่เป็นราในสกุล *Aspergillus* ทั้ง section *Nigri* โดยเฉพาะ *A. niger* และ section *Circumdati* โดยเฉพาะ *A. westerdijkiae* สำหรับปริมาณโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อนในเมล็ดกาแพสารของกาแพอะราบิกาและกาแพโรบัสตาของประเทศไทยอยู่ในช่วง 0.6-5.5 และ 1.5-8.9 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ตัวอย่างการศึกษาการปนเปื้อนของราในเมล็ดกาแพสารแสดงในตารางที่ 1.5

ตารางที่ 1.5 การปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* และ section *Nigri* ในเมล็ดกาแพสาร

สายพันธุ์กาแพ	ประเทศ	สายพันธุ์ราในสกุล <i>Aspergillus</i> ที่ปนเปื้อน		อ้างอิง
		section <i>Circumdati</i>	section <i>Nigri</i>	
อะราบิกา	บราซิล	<i>A. ochraceus</i> (93)	<i>A. niger</i> (58)	Batista และคณะ (2009)
		<i>A. melleus</i> (2)	<i>A. foetidus</i> (25)	
		<i>A. sclerotiorum</i> (1)		
	เอธิโอเปีย	<i>A. ochraceus</i> (67)	<i>A. niger</i> (69)	Geremew และคณะ (2016)
		<i>A. westerdijkiae</i> (31)	<i>A. niger</i> aggregate (31)	
		<i>A. steynii</i> (2)		
	ไทย	<i>A. westerdijkiae</i> (41)	<i>A. niger</i> (44)	Noonim และคณะ (2008)
		<i>A. melleus</i> (46)	<i>A. foetidus</i> (28)	
		<i>A. steynii</i> (13)	<i>A. tubingensis</i> (19)	
		<i>A. aculeatinus</i> (9)		
โรบัสต้า	ไทย	<i>A. westerdijkiae</i> *	<i>A. carbonarius</i> (35)	Noonim และคณะ (2008)
			<i>A. niger</i> (28)	
			<i>A. tubingensis</i> (17)	
			<i>A. aculeatinus</i> (15)	
	ฟิลิปปินส์	<i>A. ochraceus</i> (40)	<i>A. carbonarius</i> (7)	Alvindia และคณะ (2016)
		<i>A. westerdijkiae</i> (34)	<i>A. niger</i> (86)	
		<i>A. sclerotiorum</i> (26)	<i>A. japonicus</i> (7)	

หมายเหตุ : () = เปอร์เซ็นต์ของจำนวนไอโซเลตภายใน section และ * = พบเพียง 1 ไอโซเลต

ปัจจัยที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของราและการสะสมโอคราทอกซินเอในกาแฟ ได้แก่ (1) สิ่งแวดล้อม เช่น สภาพอากาศ อุณหภูมิ ปริมาณแสงแดด ปริมาณน้ำฝน และคุณภาพน้ำที่ใช้ในกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวที่ต่างกัน (2) การเลือกใช้กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว (3) การจัดการคุณภาพภายในพื้นที่เพาะปลูก และ (4) สภาวะการเก็บรักษาเมล็ดกาแฟ ซึ่งกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของราและการสะสมโอคราทอกซินเอในกาแฟ เนื่องจากการจัดการที่ไม่เหมาะสมนั้นส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอและส่งผลให้เกิดการสะสมโอคราทอกซินเอตามมาได้ง่ายมากขึ้น นอกจากนี้ เมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบแห้งพบการปนเปื้อนของราที่มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอสูงกว่าเมล็ดกาแฟที่ผ่านกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียก เนื่องจากเมล็ดกาแฟที่ใช้กระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบแห้งถูกตากบนพื้นปูนคอนกรีตหรือลานดินขนาดใหญ่ผิวของเมล็ดกาแฟที่สัมผัสกับพื้นดินโดยตรงมีโอกาสสูงในการปนเปื้อนราที่ผลิตโอคราทอกซินเอ และการตากแดดที่ไม่เพียงพอหรือการได้รับน้ำฝนหลังจากการตากแห้งแล้วส่งผลให้เมล็ดกาแฟมีความชื้นที่เหมาะสมกับการเจริญของราที่ปนเปื้อนอยู่ในเมล็ดกาแฟ (Noonim และคณะ, 2008; Batista และคณะ, 2009; Geremew และคณะ, 2016)

4.2 ผลกระทบของการปนเปื้อนราและสารพิษจากราในกาแฟ

การปนเปื้อนราและสารพิษจากราในกาแฟถือเป็นปัญหาหลักที่ต้องคำนึงถึง เนื่องจากการปนเปื้อนของราในกาแฟส่งผลกระทบต่อปริมาณผลผลิตจากการเพาะปลูก อายุการเก็บรักษา คุณภาพ รสชาติ ราคา และความปลอดภัยของผู้บริโภค กาแฟมักถูกทำลายจากศัตรูพืชซึ่งนำไปสู่การปนเปื้อนของราในกาแฟตั้งแต่ในแปลงเพาะปลูก ทำให้ผลผลิตจากพื้นที่เพาะปลูกและอายุการเก็บรักษาของเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวลดต่ำลง (Taniwaki และคณะ, 2014; Geremew และคณะ, 2016) จากการศึกษาของ Lamanaka และคณะ (2014) พบว่าการปนเปื้อนของราในเมล็ดกาแฟ โดยเฉพาะราในสกุล *Aspergillus* ส่งผลกระทบต่อรสชาติของกาแฟ คือ ทำให้กาแฟมีรสเปรี้ยว และมีกลิ่นคล้ายดินซึ่งเป็นรสชาติของเครื่องดื่มกาแฟที่ไม่ได้คุณภาพตามมาตรฐาน

เมล็ดกาแฟที่ได้รับความเสียหายจากการปนเปื้อนของรารวมถึงสารพิษที่ราผลิตโดยเฉพาะโอคราทอกซินเอถือเป็นเมล็ดกาแฟคุณภาพต่ำ ไม่เป็นที่ต้องการของผู้ผลิตและผู้บริโภค เนื่องจากจำหน่ายได้ในราคาถูกและเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค นอกจากนี้ กาแฟเป็นสินค้าส่งออกสำคัญต่อเศรษฐกิจทั้งในไทยและต่างประเทศคุณภาพของกาแฟที่ต่ำลงจากการปนเปื้อนของราและสารพิษในกาแฟส่งผลกระทบต่อมูลค่าและเศรษฐกิจการค้าเมล็ดกาแฟโลกตามไปด้วย (Levi และคณะ, 1974; Taniwaki และคณะ, 2014)

ดังที่กล่าวมาแล้วว่าการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราส่งผลกระทบต่อทั้งสุขภาพของผู้บริโภค และต่อเศรษฐกิจการค้ากาแฟ อีกทั้งในปัจจุบันหลายประเทศมีข้อกำหนดอย่างชัดเจนเกี่ยวกับการปนเปื้อนสารพิษจากราในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรอย่างโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟ แต่การศึกษาการปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอและปริมาณการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในกาแฟของประเทศไทยยังมีการรายงานไม่มากนัก ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอและปริมาณการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในกาแฟอาราบิก้าที่ได้จากขั้นตอนในช่วงต้นของกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟหลังการเก็บเกี่ยวในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทยซึ่งเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตกาแฟอาราบิก้าภายในประเทศ โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการหาวิธีป้องกันและการควบคุมการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในเมล็ดกาแฟจากประเทศไทยต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของราที่ผลิตโอคราทอกซินเอและการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟอาราบิก้าที่ได้จากขั้นตอนในช่วงต้นของกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียกหลังการเก็บเกี่ยว

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. กระจกปิดสไลด์ ขนาด 22x28 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Menzel-GlÄser
2. กรวยแก้ว ขนาด 50 มิลลิลิตร บริษัท Pyrex, Germany
3. กระดาษกรอง ขนาด 110 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Whatman No.1, USA
4. กระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร บริษัท Nippo, Thailand
5. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง บริษัท Olympus Optical, Japan
6. ขวดดูแรน ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร บริษัท SCHOTT, Germany
7. เครื่องชั่ง รุ่น PG6002-5 และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
8. เครื่องตีบดผสมอาหาร (stomacher) รุ่น NR 397/526 บริษัท Bacthai, Thailand
9. เครื่องทำน้ำปลอดประจุ (ultra-pure water) รุ่น Maxima บริษัท Alga, UK
10. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-325 และ ES-315, Japan
11. เครื่องปั่นผสม (vortex) รุ่น Gene 2 บริษัท Scientific Industries, USA
12. เครื่องเปลี่ยนอากาศเป็นแก๊สไนโตรเจน ยี่ห้อ Peak Scientific
13. เรืองวัดค่าความเป็นกรด-เบส
14. จานเลี้ยงเชื้อแก้ว (petri dish) ขนาด 15x100 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, England
15. ชุดกรองสูญญากาศ XX10 047 00 บริษัท Merck Millipore, USA
 - กรวยแก้ว เส้นผ่านศูนย์กลาง 47 มิลลิเมตร ปริมาตร 300 มิลลิลิตร
 - ขวดแก้ว ขนาดปริมาตร 1000 มิลลิลิตร
 - ที่จับยึดกรวยแก้ว
 - จุกแก้วสำหรับปิด
 - เครื่องปั๊ม
 - กระดาษกรอง ขนาด 0.45 มิลลิเมตร
16. ชุดโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)
 - ลิควิดโครมาโทกราฟี (liquid chromatography) รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA

- คอลัมน์ (column) Luna ไมครอน C18 ขนาด 250x4.60 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร ยี่ห้อ Phenomenex, USA
 - เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนส์ (Fluorescence detector) รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
 - เครื่องป้อน autosampler รุ่น Prostar บริษัท Varian, USA
17. ตู้ปลอดเชื้อแบบไปโอฮาซาด ขนาด 2x4 ฟุต รุ่น V6-T บริษัท Lab Micro, Thailand
 18. ตู้ปลอดเชื้อแบบไปโอฮาซาด รุ่น Mark II ยี่ห้อ Clean บริษัท Lab Service
 19. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Sandenintercool
 20. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประกอบในประเทศไทย
 21. ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บริษัท Sandenintercool, Thailand
 22. ตู้อบแห้ง (oven) บริษัท Conthem Scientific, New Zealand
 23. ถัง stomacher บริษัท White group, Thailand
 24. ถังมือยาง ขนาดเล็ก บริษัท Sri Trang Glove, Thailand
 25. ปีกเกอร์ บริษัท Pyrex, England
 26. ปีเปตต์แก้วขนาด 1 มิลลิเมตร บริษัท Qualicolor
 27. แผ่นพาราฟิล์ม บริษัท Menasha, Thailand
 28. ฟลาสก์ตุดกรองขนาด 1000 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, England
 29. ไมโครปีเปตต์ (micropipette) ขนาด 2.5, 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร บริษัท Eppendorf, Germany
 30. ไมโครปีเปตต์ (micropipette) ขนาด 5000 ไมโครลิตร บริษัท Mettler, Thailand
 31. สไลด์ ขนาด 25.6x76.2 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Sail Brand, China
 32. หัวกรองสำเร็จ ชนิด PTFE ขนาด 0.22 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร บริษัท Fortune Scientific, Thailand
 33. หลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 16x150 และ 13x100 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex, England
 34. หลอดไมโครเซนทริฟิวก์ ขนาด 1.5 มิลลิเมตร บริษัท Axygen, USA
 35. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ Memmert
 36. อ่างอัลตราโซนิก รุ่น SONOREX RX 100 บริษัท Bandelin Electronic, Germany
 37. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemocytometer) ยี่ห้อ Boeco, Germany

2.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. กรดฟอร์มิก (CH_2O_2) บริษัท Merck, Germany
2. กรดอะซิติก (CH_3COOH) บริษัท Merck, Germany
3. ชุดวิเคราะห์โอคราทอกซิน (Veratox) บริษัท Neogen, USA ชุดวิเคราะห์โอคราทอกซิน ประกอบด้วย
 - โอคราทอกซินเอกซ์บอนด์ (conjugate solution)
 - สารละลายซับสเตรต (substrate solution)
 - สารละลายหยุดปฏิกิริยา (stop solution)
 - สารมาตรฐานโอคราทอกซินเอ ความเข้มข้น 0, 2, 5, 10 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
4. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
5. ผงวุ้น (agar) บริษัท Himedia, India
6. ผงสกัดจากมอลต์ (malt extract) บริษัท Himedia, India
7. เพปโตน (peptone) บริษัท Himedia, India
8. เมทานอล (CH_3OH) บริษัท Merck, Germany
9. สารมาตรฐานโอคราทอกซินเอ บริษัท Sigma, USA
10. อะซิโตนไนไตรล์ (MeCN) บริษัท Labscan, Thailand
11. Dichloran 18% Glycerol agar (DG18) บริษัท Merck, Germany
12. Potato Dextrose Agar (PDA) บริษัท Difco Laboratories, USA
13. Tween 80 บริษัท Scharlab, Spain

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างเมล็ดกาแฟ

สุ่มเก็บตัวอย่างกาแฟอะราบิกา ได้แก่ ผลกาแฟสุก (cherry coffee) เมล็ดกาแฟหมัก (fermented coffee) และเมล็ดกาแฟกะลา (parchment coffee) โดยสุ่มเก็บในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2561 ซึ่งเป็นช่วงต้นของฤดูกาลเก็บเกี่ยวผลกาแฟ จากศูนย์วิจัยโครงการหลวง 3 แห่งในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่

- 1.) สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ตั้งอยู่ในอำเภอแม่แตง บนพื้นที่บริเวณเชิงเขาและที่ราบระหว่างหุบเขา มีความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 600-1000 เมตร อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 28 องศาเซลเซียส
- 2.) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงป่าเมี่ยง ตั้งอยู่ในอำเภอดอยสะเก็ด บนพื้นที่ลาดชันและมีภูเขาสลับซับซ้อน มีความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 650-1500 เมตร อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 23 องศาเซลเซียส
- 3.) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตก ตั้งอยู่ในอำเภอแม่ฮ่องสอน บนพื้นที่บริเวณที่ราบเชิงเขา มีความสูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 750-1300 เมตร อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 23 องศาเซลเซียส

รวมทั้งหมดจำนวน 16 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม โดยแบ่งออกเป็น ผลกาแฟสุก 6 ตัวอย่าง เมล็ดกาแฟหมัก 6 ตัวอย่าง เมล็ดกาแฟกะลา 4 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2.1) จากนั้น นำตัวอย่างเมล็ดกาแฟทำการทดลองขั้นต่อไปทันที หรือเก็บรักษาไว้ในถุงซิปล็อคปิดสนิทที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วทำการทดลองขั้นต่อไปโดยเร็วที่สุด

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างกาแฟอะราบิกาที่สุ่มเก็บในการทดลอง

ชนิดกาแฟ	ศูนย์วิจัย	จำนวนตัวอย่าง	ชื่อตัวอย่าง
ผลกาแฟสุก	แม่หลอด	3	MC1-3
	ตีนตก	2	TC1-2
	ป่าเมี่ยง	1	PC
เมล็ดกาแฟหมัก	แม่หลอด	4	MF1-4
	ตีนตก	1	TF
	ป่าเมี่ยง	1	PF
เมล็ดกาแฟกะลา	แม่หลอด	3	MK1-3
	ตีนตก	1	TK

2. การศึกษาการปนเปื้อนของราที่คาดว่าสามารถผลิตโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟ

2.1) วิธี direct plating

สุ่มหยิบเมล็ดกาแฟจำนวน 50 เมล็ดต่อ 1 ตัวอย่าง วางบนอาหารแข็ง Dichloran 18% Glycerol agar (DG18) (ภาคผนวก ก.1) และ Malt extract agar (MEA) (ภาคผนวก ก.2) โดยวางเมล็ดกาแฟ 5 เมล็ดต่อจานเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (aseptic technique) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน บันทึกจำนวนของเมล็ดกาแฟที่พบการเจริญของรา เพื่อนำไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (%infection) ในทุกตัวอย่างเมล็ดกาแฟที่ทำการทดลอง ตามวิธีของ Noonim และคณะ (2008) จากนั้น คัดแยกราที่มีโคโลนีสีดำและสีเหลืองที่คาดว่าเป็ราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* และ section *Circumdati* ตามลำดับ ซึ่งเป็นราที่สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้

2.2) วิธี total plate count

ชั่งตัวอย่างเมล็ดกาแฟ 50 กรัม ใส่ในถุงใส่ตัวอย่างสำหรับเครื่องตีบดอาหาร และเติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water (ภาคผนวก ข.1) ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วตีผสมกันด้วยเครื่องตีบดผสมอาหาร นาน 2 นาที จากนั้น นำตัวอย่างเจือจางด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water ให้มีความเข้มข้น 100, 1,000 และ 10,000 เท่า นำแต่ละค่าความเจือจางมา 0.1 มิลลิลิตร แล้ว spread plate โดยเกลี่ยทั่วจานเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง Dichloran 18% Glycerol agar (DG18) และ Malt extract agar (MEA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-7 วัน โดยทำการทดลองสองซ้ำ จากนั้น ตรวจสอบดูลักษณะโคโลนี และนับจำนวนโคโลนี โดยรายงานผลเป็นหน่วยของ Colony Forming Unit (CFU) ต่อเมล็ดกาแฟ 1 กรัม

2.3) การคัดแยกและจัดจำแนกราคัดแยกได้

นำราดำและราเหลืองที่แยกได้จากเมล็ดกาแฟจากข้อ 2.1 และ 2.2 มาจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าบนอาหาร Czapek's yeast autolysate agar (CYA) (ภาคผนวก ก.4) และ MEA ได้แก่ ลักษณะ ขนาด และสีของโคโลนี และโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ ลักษณะของ conidia, conidiophores และ conidial heads ตามวิธีของ Samson และคณะ (2004) และ Pitt และ Hocking (2009) คัดเลือกราดำและราเหลืองที่จำแนกในสกุล *Aspergillus* แล้วจัดกลุ่มราที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันทางสัณฐานวิทยา จากนั้น คัดเลือกราดำและราเหลืองแต่ละกลุ่ม โดยใช้หลักเกณฑ์ 3 ไอโซเลตที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน เลือกมา 1 ไอโซเลต เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอในการทดลองขั้นต่อไป

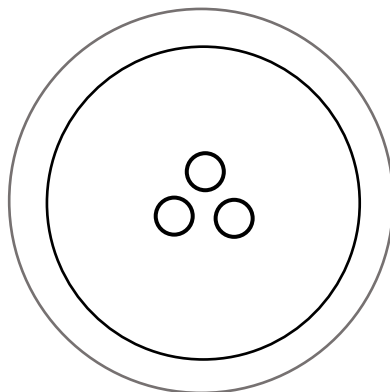
3. การทดสอบความสามารถของราในการผลิตโอคราทอกซินเอบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

3.1) การผลิตโอคราทอกซินเอบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

นาร่าที่จำแนกได้ในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* และ section *Circumdati* จากข้อ 2.3 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก.3) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น เก็บสปอร์โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ tween 80 0.01 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ (ภาคผนวก ข.2) เจือจางให้ได้ความเข้มข้นของสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ในการนับจำนวนสปอร์ จากนั้น หยดสารแขวนลอยของสปอร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงบริเวณตรงกลางของอาหารแข็ง PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.2) การสกัดและวิเคราะห์หาปริมาณโอคราทอกซินเอ

เมื่อบ่มครบ 7 วัน ใช้พาสเจอร์ปีเปตเจาะวัน 3 ชั้นบริเวณกลางโคโลนี (รูปที่ 2.1) ต่อการสกัด 1 ครั้ง (ตัวอย่างรา 1 ไอโซเลตสกัด 2 ครั้ง) จากนั้น นำชิ้นวันจำนวน 3 ชิ้น ใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิท ชั่งน้ำหนักชิ้นวัน แล้วเติมเมทานอลและกรดฟอร์มิกในอัตราส่วน 25:1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข.3) สกัดโอคราทอกซินในอ่างอัลตราโซนิก เป็นเวลา 15 นาที กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วระเหยเมทานอลด้วยก๊าซไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้น เติมเฟสเคลื่อนที่ (อะซิโตนไนโตรล:น้ำ ปลอดประจุ:กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 49.5 : 49.5 : 1 (ภาคผนวก ข.4)) และกรองสารสกัดที่ได้ด้วยหัวกรองสำเร็จ ขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วส่งวิเคราะห์หาปริมาณโอคราทอกซินเอที่ศูนย์เครื่องมือวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาคารสถาบัน 2 ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ผ่านคอลัมน์ C18 (250x4.60 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ที่มี excitation wavelength เท่ากับ 333 นาโนเมตร และ emission wavelength เท่ากับ 477 นาโนเมตร และควบคุมให้มีอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิเมตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ retention time (RT) เท่ากับ 10 นาที



รูปที่ 2.1 วิธีการเจาะวันจากโคโลนีเพื่อนำมาสกัดโอคราทอกซินเอในการวิเคราะห์

4. การวิเคราะห์ปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟ

ชั่งตัวอย่างกาแฟที่บดละเอียด 10 กรัม แล้วนำมาสกัดโอคราทอกซินเอโดยเติมสารละลายเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:4 จากนั้น เขย่าเป็นเวลา 3 นาที แล้วกรองสารสกัดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้น เจือจางด้วยสารละลายเมทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบตามความสามารถในการตรวจวัดของชุดทดสอบ คือ 2-25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโอคราทอกซิน ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้ชุดวิเคราะห์โอคราทอกซิน (Neogen's Verotox® for ochratoxin, USA) นำสารสกัดที่ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารคอนจูเกตระหว่างโอคราทอกซินกับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโอคราทอกซินเอ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้น เทสารผสมออกจากหลุมแล้วล้างหลุมด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง แล้วเคาะน้ำที่อยู่ในหลุมออกจนหมด แล้วเติมสารละลายซับสเตรตปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่านาน 10 วินาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้น เติมสารละลายหยุดปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับซับสเตรตปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วอ่านค่าความเข้มแสงผ่านเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลต (micro plate reader) (Neogen, USA/Canada) ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เปรียบเทียบความเข้มแสงของตัวอย่างกับชุดควบคุม (สารมาตรฐานโอคราทอกซินเอ ความเข้มข้น 0, 2, 5, 10 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) ทำการทดลองตัวอย่างละ 2 ซ้ำ โดยปริมาณต่ำสุดที่สามารถตรวจสอบได้ของชุดทดสอบ (lower limit of detection; LOD) คือ 1 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และช่วงความสามารถในการตรวจวัดปริมาณของชุดทดสอบอยู่ในช่วง 2-25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

บทที่ 3

ผลการทดลอง

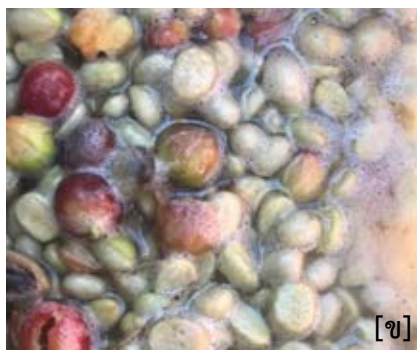
3.1 การเก็บตัวอย่าง

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างกาแฟอาราบิก้าในช่วงต้นของการผลิตเมล็ดกาแฟ คือ ผลกาแฟสุก (cherry coffee) เมล็ดกาแฟหมัก (fermented coffee bean) และเมล็ดกาแฟกะลา (parchment coffee bean) (รูปที่ 3.1) ในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2561 ซึ่งเป็นฤดูกาลเก็บเกี่ยวผลกาแฟ จากโครงการหลวง 3 แห่งในจังหวัดเชียงใหม่ ได้แก่ สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ศูนย์วิจัยโครงการหลวงป่าเมี่ยง และศูนย์วิจัยโครงการหลวงตีนตก เก็บตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม ทั้งหมด 16 ตัวอย่าง เป็นผลกาแฟสุก 6 ตัวอย่าง เมล็ดกาแฟหมัก 6 ตัวอย่าง และเมล็ดกาแฟกะลา 4 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างกาแฟแต่ละชนิดมีลักษณะ ดังนี้

1. ตัวอย่างผลกาแฟสุก มีลักษณะเป็นทรงกลมรี สีแดง และมีใบไม้ปนอยู่กับตัวอย่างเล็กน้อย
2. ตัวอย่างเมล็ดกาแฟหมัก มีลักษณะรี สีเขียวอ่อน เมล็ดเปียกและมีเมือกติดอยู่ที่เมล็ดเป็นจำนวนมาก
3. ตัวอย่างเมล็ดกาแฟกะลา มีลักษณะรี สีน้ำตาลอ่อน และแห้ง โดยตัวอย่างเมล็ดกาแฟกะลาจากศูนย์วิจัยโครงการหลวงตีนตกมีเศษฝุ่น และแมลงปนอยู่เป็นจำนวนมาก



[ก]



[ข]



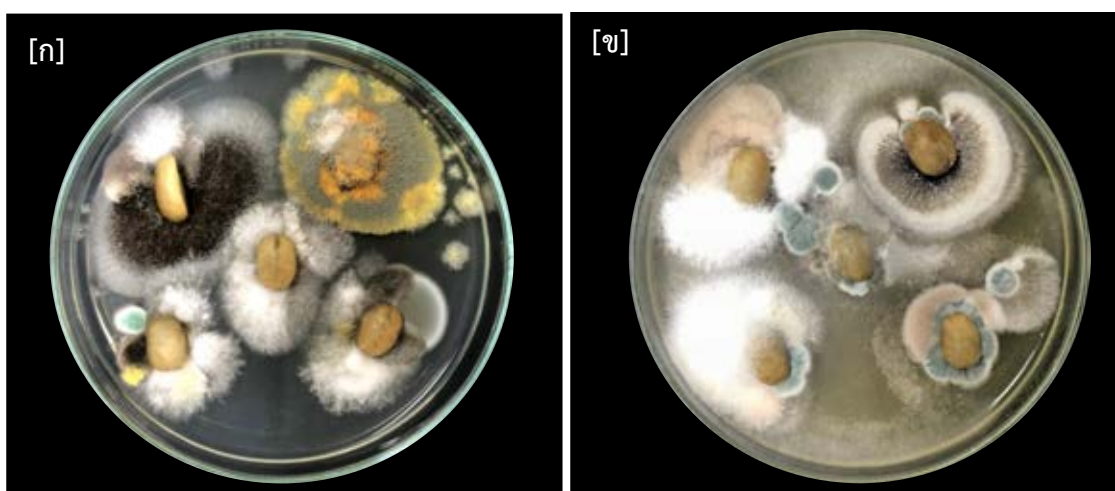
[ค]

รูปที่ 3.1 ตัวอย่างกาแฟอาราบิก้าทั้ง 3 ชนิด [ก] ผลกาแฟสุก (cherry coffee) [ข] เมล็ดกาแฟหมัก [ค] เมล็ดกาแฟกะลา

3.2 การปนเปื้อนของราที่คาดว่าจะมีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ และปริมาณราทั้งหมดในตัวอย่างกาแฟ

3.2.1 วิธี Direct plating

ผลจากการสุ่มหยิบผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และเมล็ดกาแฟกะลา ตัวอย่างละ 50 เมล็ด วางบนอาหารแข็ง Dichloran 18% glycerol (DG18) 25 เมล็ด (วางจานละ 5 เมล็ด จำนวน 5 จานเลี้ยงเชื้อ) และวางบนอาหารแข็ง Malt extract agar (MEA) 25 เมล็ด (วางจานละ 5 เมล็ด จำนวน 5 จานเลี้ยงเชื้อ) (รูปที่ 3.2) ตัวอย่างกาแฟทั้ง 3 ชนิด เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (% infection) ของราทั้งหมดพบว่า ตัวอย่างกาแฟแต่ละชนิดที่ได้จากสถานีวิจัยที่ต่างกันให้ค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดไม่แตกต่างกัน ตัวอย่างผลกาแฟสุกและเมล็ดกาแฟหมักมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเฉลี่ยเท่ากับ 96 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยราที่พบปนเปื้อนส่วนใหญ่เป็นยีสต์และราสายใยอื่นๆ สำหรับเมล็ดกาแฟกะลามีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดเฉลี่ย 100 เปอร์เซ็นต์ โดยราที่พบปนเปื้อนเป็นราสายใยสีเหลือง ดำ และราสายใยอื่นๆ สำหรับผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราดำและราเหลืองจากตัวอย่างกาแฟทั้ง 3 ชนิดพบว่า กาแฟกะลามีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราดำและราเหลืองเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 8.00 ± 5.57 และ 17.50 ± 2.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับเมล็ดกาแฟหมักไม่พบการปนเปื้อนของราเหลือง แต่พบการปนเปื้อนของราดำโดยมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราดำเฉลี่ยเท่ากับ 2.67 ± 5.12 เปอร์เซ็นต์ และผลกาแฟสุกไม่พบการปนเปื้อนของราดำและราเหลือง (ตารางที่ 3.1)



รูปที่ 3.2 ตัวอย่างการคัดแยกราดำและราเหลืองบนเมล็ดกาแฟกะลาด้วยวิธี direct plating [ก] บนอาหารแข็ง DG18 และ [ข] บนอาหารแข็ง MEA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

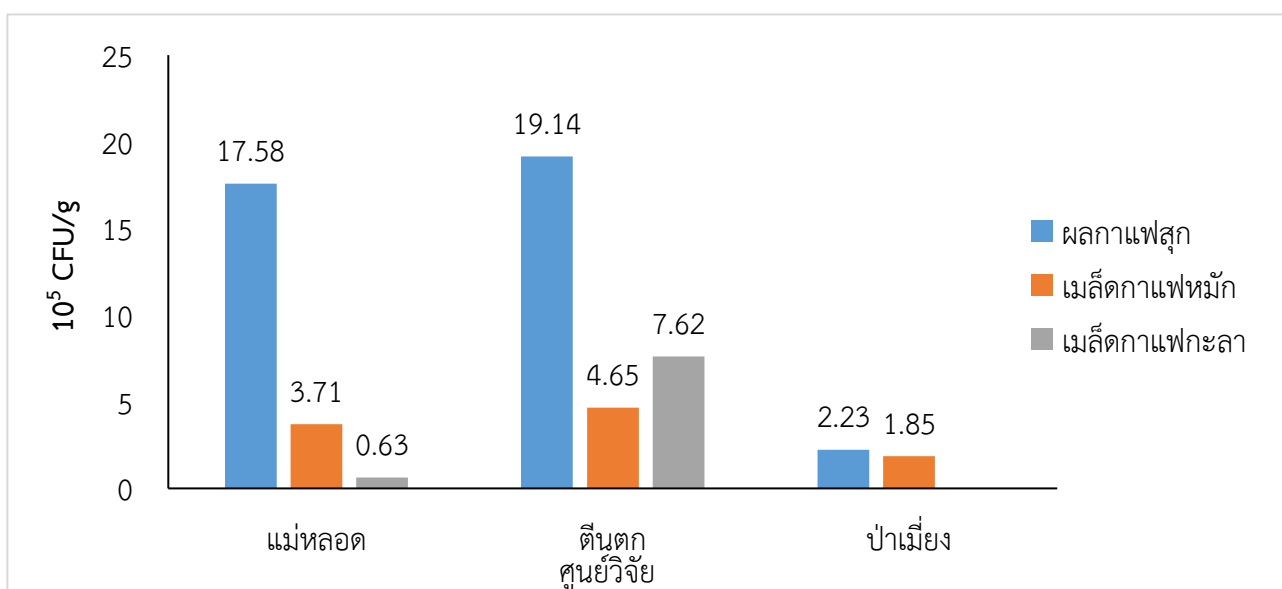
ตารางที่ 3.1 เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมด ราเหลือง และราดำ ของตัวอย่างกาแฟแต่ละชนิด

ชนิดกาแฟ	ตัวอย่าง (ศูนย์)	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ		
		ราทั้งหมด	ราเหลือง	ราดำ
ผลกาแฟสุก	MC1-3 (แม่หลอด)	92	0	0
	TC1-2 (ตีนตก)	100	0	0
	PC (ป่าเมี่ยง)	100	0	0
	เฉลี่ย	96 ± 7.30	0.00±0.00	0.00±0.00
เมล็ดกาแฟหมัก	MF1-4 (แม่หลอด)	100	0	0.50
	TF (ตีนตก)	100	0	0
	PF (ป่าเมี่ยง)	100	0	14
	เฉลี่ย	100 ± 0.00	0.00±0.00	2.67±5.12
เมล็ดกาแฟกะลา	MK1-3 (แม่หลอด)	100	17.33	5.33
	TK (ตีนตก)	100	18	16
	เฉลี่ย	100 ± 0.00	17.50±2.18	8.00±5.57

สำหรับการคัดแยกจากตัวอย่างกาแฟทั้ง 3 ชนิด จำนวนทั้งหมด 16 ตัวอย่างสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 120 ไอโซเลต สามารถจัดจำแนกเบื้องต้นได้เป็นราในสกุล *Aspergillus* 45 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็นราดำ (black *Aspergillus*) 21 ไอโซเลต ราเหลือง (yellow *Aspergillus*) 24 ไอโซเลต และพบราสกุลอื่นๆ 75 ไอโซเลต ซึ่งส่วนใหญ่เป็นราในสกุล *Penicillium*, *Curvularia* และ *Rhizopus* โดยในตัวอย่างผลกาแฟสุกคัดแยกสายใยได้จำนวน 13 ไอโซเลต ซึ่งเป็นราในสกุลอื่นๆ ทั้งหมด ตัวอย่างเมล็ดกาแฟหมักคัดแยกได้ทั้งหมด 28 ไอโซเลต เป็นราในสกุล *Aspergillus* 6 ไอโซเลต และราในสกุลอื่นๆ 22 ไอโซเลต และตัวอย่างเมล็ดกาแฟกะลาสามารถคัดแยกได้มากที่สุดจำนวน 79 ไอโซเลตเป็นราในสกุล *Aspergillus* 42 ไอโซเลต และราสกุลอื่นๆ 37 ไอโซเลต

3.2.2 วิธี total plate count

จากการนำตัวอย่างกาแฟมาหาปริมาณราสายใยทั้งหมดด้วยวิธี total plate count บนอาหารแข็ง MEA พบว่า ตัวอย่างผลกาแฟสุกและเมล็ดกาแฟหมักมีปริมาณราสายใยปนเปื้อนน้อยกว่า 15 โคโลนี โดยพบยีสต์เจริญบนอาหารเป็นจำนวนมาก และตัวอย่างเมล็ดกาแฟกะลามีปริมาณราสายใยปนเปื้อนน้อยกว่า 15 โคโลนี สำหรับการหาปริมาณราสายใยทั้งหมดบนอาหารแข็ง DG18 พบว่า ในตัวอย่างกาแฟทั้ง 3 ชนิด ตัวอย่างผลกาแฟสุกมีปริมาณราสายใยปนเปื้อนเฉลี่ยสูงที่สุดเท่ากับ $1.55 \pm 1.5 \times 10^6$ CFU ต่อกรัมของกาแฟ และตัวอย่างเมล็ดกาแฟหมักและเมล็ดกาแฟกะลามีปริมาณราสายใยปนเปื้อนเฉลี่ยใกล้เคียงกันเท่ากับ $3.55 \pm 1.83 \times 10^5$ และ $2.38 \pm 3.03 \times 10^5$ CFU ต่อกรัมของกาแฟ ตามลำดับ โดยตัวอย่างกาแฟแต่ละชนิดที่มีปริมาณราปนเปื้อนสูงที่สุดมาจากศูนย์วิจัยโครงการหลวงตีนตกมีปริมาณราปนเปื้อนเฉลี่ยในผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และเมล็ดกาแฟกะลาสูงถึง $1.91 \pm 0.01 \times 10^6$ $4.65 \pm 1.85 \times 10^5$ และ $7.62 \pm 0.03 \times 10^5$ CFU ต่อกรัมของกาแฟ ตามลำดับ (รูปที่

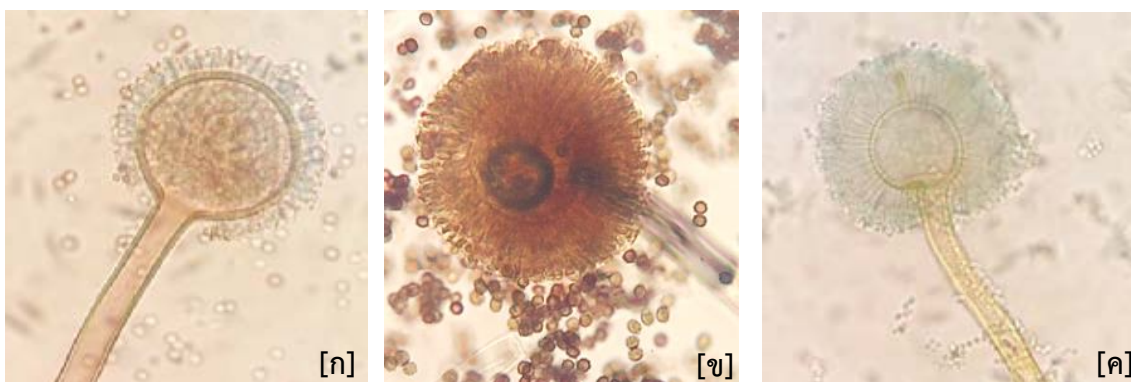


3.3)

รูปที่ 3.3 จำนวนราสายใยทั้งหมดในตัวอย่างกาแฟ 3 ชนิด จากศูนย์วิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ตีนตก และป่าเมี่ยง ด้วยวิธี total plate count บนอาหารแข็ง DG18 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.2.3 การจัดจำแนกและคัดเลือกราดำและราเหลืองที่คาดว่าผลิตโอคราทอกซินเอ

จัดจำแนกราดำที่คาดว่าเป็ราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* ทั้งหมด 21 ไอโซเลต และราเหลืองที่คาดว่าเป็ราในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* ทั้งหมด 24 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2.1 โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic characters) และลักษณะที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Macroscopic characters) เมื่อพิจารณาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราดำและราเหลืองที่คัดแยกได้ พบว่า ราดำที่คาดว่าเป็ราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* มีลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คือ ที่ปลายก้านชูสปอร์สปอร์พองออกเป็นเวสซิเคิล (vesicle) มีสเตอริกมา (sterigma) ชั้นเดียว (uniseriate) (รูปที่ 3.4 ก) หรือ สองชั้น (biseriate) (รูปที่ 3.4 ข) สำหรับราเหลืองที่คาดว่าเป็ราในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* พบลักษณะปลายก้านชูสปอร์สปอร์พองออกเป็นเวสซิเคิล (vesicle) มีสเตอริกมา (sterigma) สองชั้น (biseriate) (รูปที่ 3.4 ค) ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็ลักษณะเด่นของราในสกุล *Aspergillus* ดังนั้น ราดำและราเหลืองที่คัดแยกจัดเป็ราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* และ section *Circumdati* ตามลำดับ



รูปที่ 3.4 ตัวอย่างลักษณะ conidial head ของราดำและราเหลืองที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 400 เท่า [ก] Uniseriate *Aspergillus* section *Nigri* [ข] Biseriate *Aspergillus* section *Nigri* [ค] Biseriate *Aspergillus* section *Circumdati*

จากนั้น จัดจำแนกราคำ ในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* ตามลักษณะลักษณะที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าบนอาหาร CYA และ MEA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสามารถจัดจำแนกได้ 12 กลุ่ม (รูปที่ 3.5) โดยแต่ละกลุ่มมีลักษณะ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 โคลนีสีน้ำตาลดำ เส้นใยสีขาว มีรอยยับที่ผิวโคโลนีเล็กน้อย สร้างสปอร์ขนาดเล็กสีดำจำนวนมากทั่วทั้งโคโลนี ใต้โคโลนีมีสีครีม และมีขนาดโคโลนีประมาณ 3.8 เซนติเมตร บนอาหาร CYA (รูปที่ 3.5 ก) และบนอาหาร MEA โคลนีสีดำ ไม่มีรอยยับ เส้นใยสีขาว สร้างสปอร์ขนาดเล็กสีดำเป็นจำนวนมากทั่วทั้งโคโลนี พบการสร้างสเคอโรเทียสีขาวครีม ใต้โคโลนีมีสีครีม และมีขนาดโคโลนีประมาณ 2.5 เซนติเมตร (รูปที่ 3.5 ข)

กลุ่มที่ 2 โคลนีสีดำ เส้นใยสีขาว มีรอยยับอย่างเห็นได้ชัดที่ผิวโคโลนี สร้างสปอร์ขนาดเล็กสีดำตรงบริเวณกลางโคโลนี มีความหนาแน่นของสปอร์น้อย และใต้โคโลนีมีสีครีม ขนาดโคโลนีประมาณ 4.5 เซนติเมตร บนอาหาร CYA (รูปที่ 3.5 ค) และบนอาหาร MEA โคลนีสีดำ มีรอยยับเล็กน้อย เส้นใยสีขาว สร้างสปอร์เล็กน้อย สปอร์มีขนาดเล็กสีดำบริเวณกลางโคโลนี ใต้โคโลนีมีสีครีม และมีขนาดโคโลนีประมาณ 4.3 เซนติเมตร (รูปที่ 3.5 ง)

กลุ่มที่ 3 โคลนีสีน้ำตาลดำ เส้นใยสีขาวฟู ไม่มีรอยยับผิวโคโลนี สร้างสปอร์สีน้ำตาลดำ มีความหนาแน่นของสปอร์ค่อนข้างสูง และใต้โคโลนีมีสีเหลือง ขนาดโคโลนีประมาณ 7 เซนติเมตร บนอาหาร CYA (รูปที่ 3.5 จ) และบนอาหาร MEA มีโคลนีสีดำ เส้นใยสีขาวฟู ไม่มีรอยยับผิวโคโลนี สร้างสปอร์เล็กน้อย สปอร์มีขนาดเล็กสีดำบริเวณกลางโคโลนี ใต้โคโลนีมีสีเหลืองอ่อนและมีขนาดโคโลนีประมาณ 5.3 เซนติเมตร (รูปที่ 3.5 ฉ)

กลุ่มที่ 4 โคลนีสีน้ำตาล เส้นใยสีขาว โดยตรงกลางโคโลนีมีสปอร์ขนาดเล็กสีเขียวขี้ม้า และสีของโคโลนีในชั้นที่ถัดออกมา (color of colony layer) เป็นสีน้ำตาลและสีครีม ตามลำดับ มีรอยยับเล็กน้อยที่ผิวหน้าโคโลนี ใต้โคโลนีมีสีครีมและมีขนาดโคโลนีประมาณ 8 เซนติเมตร บนอาหาร CYA (รูปที่ 3.5 ช) และบนอาหาร MEA ลักษณะโคโลนีสีน้ำตาลเทา เส้นใยสีขาว สร้างสปอร์ขนาดเล็กสีเขียวขี้ม้าบริเวณกลางโคโลนี และสีของโคโลนีในชั้นที่ถัดออกมา (color of colony layer) เป็นสีเทาและน้ำตาล ตามลำดับ ไม่มีรอยยับผิวโคโลนี ใต้โคโลนีสีเหลืองอ่อน และมีขนาดโคโลนีประมาณ 5.2 เซนติเมตร (รูปที่ 3.5 ซ)

กลุ่มที่ 5 มีโคลนีสีน้ำตาล เส้นใยสีขาว โคลนีสีมีรอยยับจำนวนมาก สร้างสปอร์สีน้ำตาลขนาดเล็กอยู่บริเวณกลางโคโลนี ความหนาแน่นของสปอร์ค่อนข้างน้อย ใต้โคโลนีมีน้ำตาลอ่อน ขนาดโคโลนีประมาณ 7.5 เซนติเมตร บนอาหาร CYA (รูปที่ 3.5 ฌ) และบนอาหาร MEA มีโคลนีสีน้ำตาลเทา เส้นใยสีครีม โคลนีสีมีรอยยับจำนวนมาก สร้างสปอร์สีน้ำตาลขนาดเล็กจำนวนมากบริเวณกลางโคโลนี ใต้โคโลนีมีสีเหลืองอ่อนและมีขนาดโคโลนีประมาณ 5.5 เซนติเมตร (รูปที่ 3.5 ญ)

กลุ่มที่ 6 โคลนีสดำ เส้นใยสีขาว โคลนีสมีรอยยับอย่างเห็นได้ชัดเป็นจำนวนมาก สร้างสปอร์ขนาดเล็กสีดำ จำนวนมากทั่วทั้งโคลน ใต้โคลนีสสีเหลือง และมีขนาดโคลนีสประมาณ 7.5 เซนติเมตร บนอาหาร CYA (รูปที่ 3.5 ฎ) และบนอาหาร MEA โคลนีสสีดำ เส้นใยสีขาว โคลนีสมีรอยยับเล็กน้อย สร้างสปอร์ขนาดเล็กสีดำ สปอร์มีความหนาแน่นของจำนวนสปอร์ค่อนข้างน้อย ใต้โคลนีสมีสีครีมและมีขนาดโคลนีสประมาณ 7 เซนติเมตร (รูปที่ 3.5 ฎ)

กลุ่มที่ 7 โคลนีสเขียวขี้ม้า เส้นใยสีขาว มีรอยยับที่ผิวโคลนีส สร้างสปอร์เล็กน้อย ใต้โคลนีสสีครีม และมีขนาดโคลนีสประมาณ 5.0 เซนติเมตร บนอาหาร CYA (รูปที่ 3.5 ฐ) และบนอาหาร MEA โคลนีสน้ำตาล เส้นใยสีขาว ไม่มีรอยยับที่ผิวโคลนีส สร้างสปอร์เล็กน้อย ใต้โคลนีสมีสีครีมและมีขนาดโคลนีสประมาณ 4.5 เซนติเมตร (รูปที่ 3.5 ท)

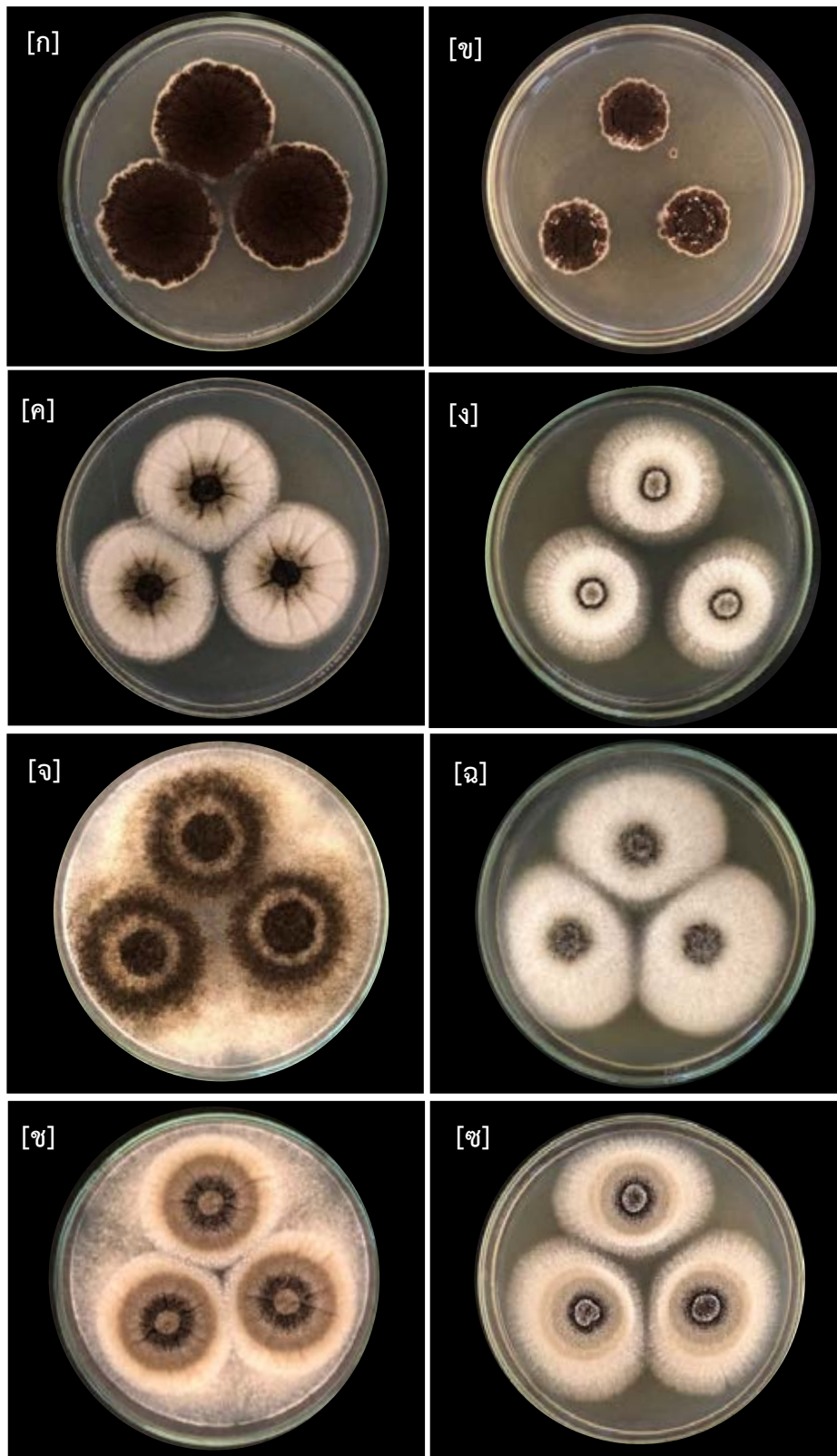
กลุ่มที่ 8 โคลนีสสีเทาอ่อน เส้นใยสีขาว โคลนีสมีรอยยับอย่างเห็นได้ชัด สร้างสปอร์สีเทาขนาดเล็กบริเวณกลางโคลนีส ใต้โคลนีสมีสีครีม และมีขนาดโคลนีสประมาณ 7 เซนติเมตร (รูปที่ 3.5 ฑ) และบนอาหาร MEA โคลนีสสีเทา เส้นใยสีขาว โคลนีสมีรอยยับเล็กน้อย สร้างสปอร์สีเทาหนาแน่นอยู่บริเวณกลางโคลนีส ใต้โคลนีสมีสีเหลืองและมีขนาดโคลนีสประมาณ 5 เซนติเมตร (รูปที่ 3.5 ฒ)

กลุ่มที่ 9 โคลนีสสีดำ เส้นใยสีขาว โคลนีสมีรอยยับอย่างเห็นได้ชัดอยู่เป็นจำนวนมาก สร้างสปอร์สีดำขนาดเล็กจำนวนมากทั่วทั้งโคลนีส ใต้โคลนีสมีสีครีม และมีขนาดโคลนีสประมาณ 6.5 เซนติเมตร บนอาหาร CYA (รูปที่ 3.5 ด) และบนอาหาร MEA โคลนีสสีดำ เส้นใยสีขาว โคลนีสมีรอยยับอย่างเห็นได้ชัดอยู่เป็นจำนวนมาก สร้างสปอร์สีดำขนาดเล็กจำนวนมาก ใต้โคลนีสมีสีครีม และมีขนาดโคลนีสประมาณ 4.5 เซนติเมตร (รูปที่ 3.5 ต)

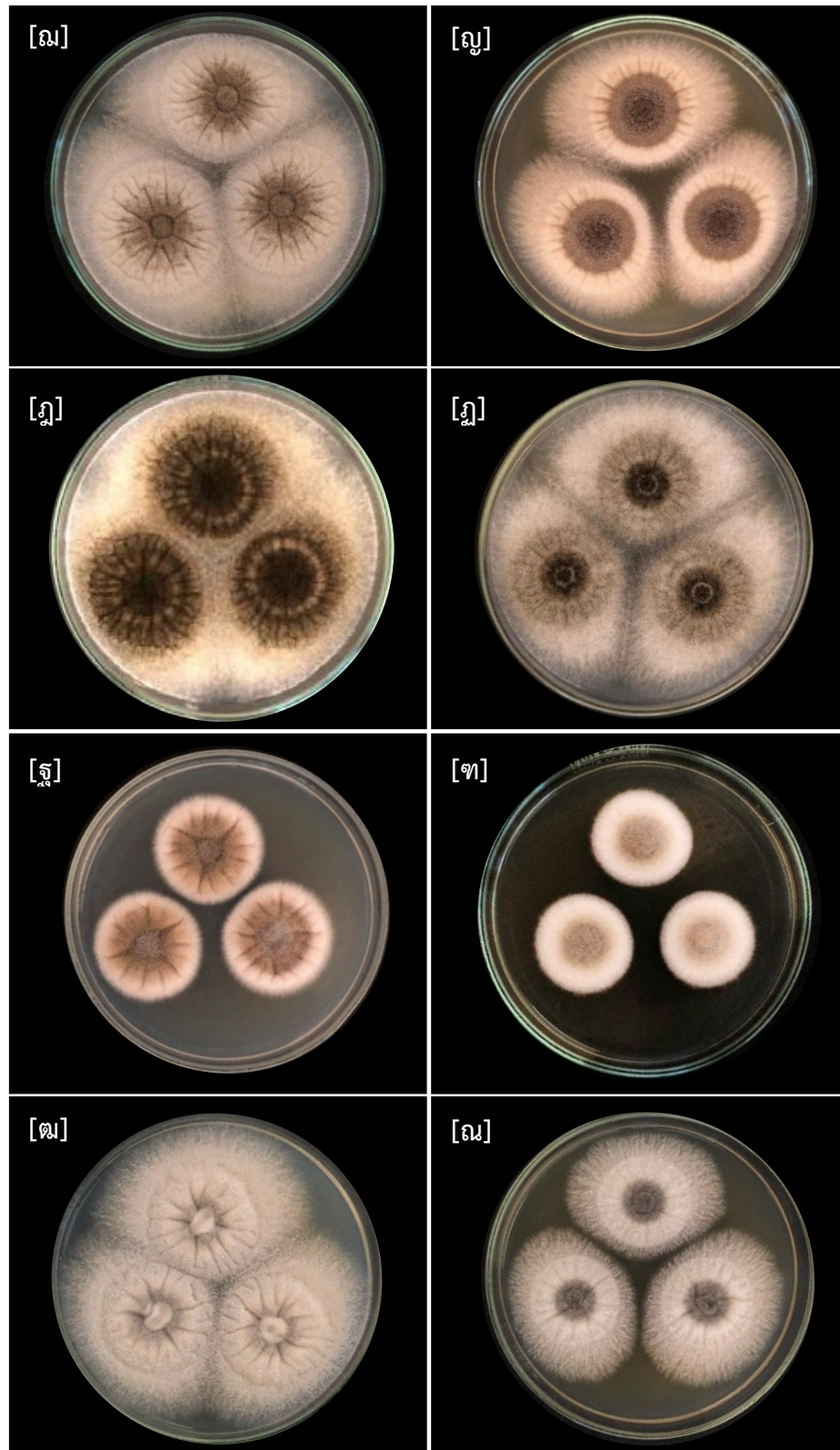
กลุ่มที่ 10 โคลนีสน้ำตาล เส้นใยสีขาวฟู โคลนีสมีรอยยับเล็กน้อย สร้างสปอร์สีน้ำตาลขนาดเล็กอยู่ทั่วโคลนีสอย่างหนาแน่น ใต้โคลนีสมีสีครีม และมีขนาดโคลนีสประมาณ 6.2 เซนติเมตร บนอาหาร CYA (รูปที่ 3.5 ถ) และบนอาหาร MEA โคลนีสสีเทา เส้นใยสีขาว โคลนีสมีรอยยับจำนวนมากค่อนข้างมาก สร้างสปอร์สีเทาขนาดเล็กบริเวณกลางโคลนีส ใต้โคลนีสสีเหลืองอ่อน และมีขนาดโคลนีสประมาณ 5 เซนติเมตร (รูปที่ 3.5 ท)

กลุ่มที่ 11 โคลนีสสีดำ เส้นใยสีขาว โคลนีสมีรอยยับอยู่เป็นจำนวนมาก สร้างสปอร์สีดำขนาดเล็กอยู่ทั่วโคลนีสอย่างหนาแน่น ใต้โคลนีสมีสีครีม และมีขนาดโคลนีสประมาณ 7.5 เซนติเมตร บนอาหาร CYA (รูปที่ 3.5 ฐ) และบนอาหาร MEA โคลนีสสีดำ เส้นใยสีขาว โคลนีสมีรอยยับจำนวนมาก สร้างสปอร์สีดำขนาดเล็กอยู่อย่างหนาแน่น ใต้โคลนีสมีสีครีม และมีขนาดโคลนีสประมาณ 6 เซนติเมตร (รูปที่ 3.5 น)

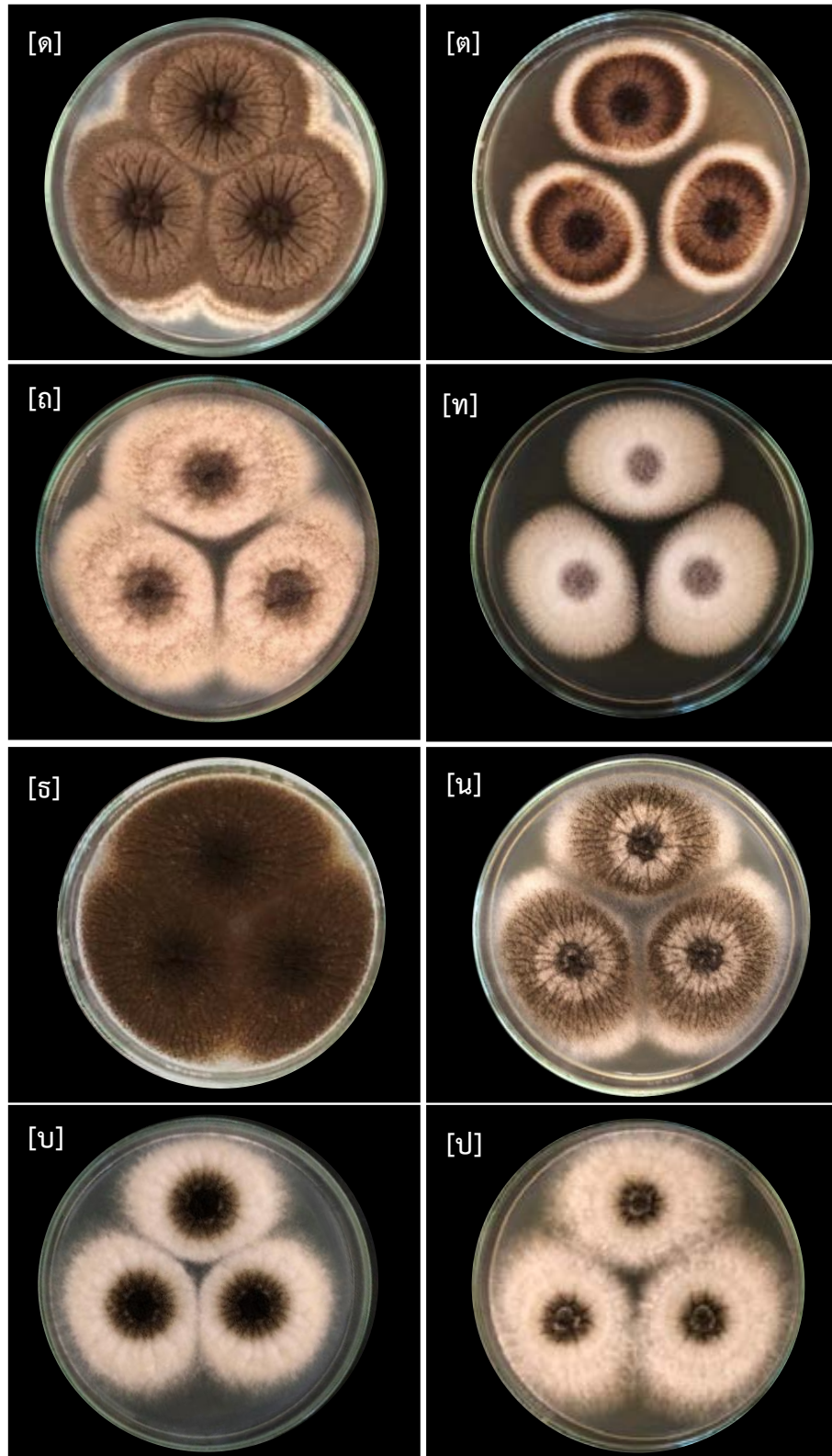
กลุ่มที่ 12 โคลนีสสีดำ เส้นใยสีขาวฟู โคลนีสมีรอยยับเล็กน้อย สร้างสปอร์สีดำขนาดเล็กอยู่บริเวณกลางโคลนีส ใต้โคลนีสมีสีครีม และมีขนาดโคลนีสประมาณ 6.3 เซนติเมตร บนอาหาร CYA (รูปที่ 3.5 บ) และบนอาหาร MEA โคลนีสสีดำ เส้นใยสีขาวฟู ไม่มีรอยยับที่ผิวโคลนีส สร้างสปอร์เล็กน้อย สปอร์มีสีดำอยู่บริเวณกลางโคลนีส ใต้โคลนีสมีสีเหลืองอ่อน และมีขนาดโคลนีสประมาณ 6 เซนติเมตร (รูปที่ 3.5 ป)



รูปที่ 3.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟบนอาหาร CYA (ด้านซ้าย) และอาหาร MEA (ด้านขวา) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน กลุ่มที่ 1 [ก] [ข], กลุ่มที่ 2 [ค][ง], กลุ่มที่ 3 [จ][ฉ], กลุ่มที่ 4 [ช][ซ]



รูปที่ 3.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟบนอาหาร CYA (ด้านซ้าย) และอาหาร MEA (ด้านขวา) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน กลุ่มที่ 5 [ณ][ญ], กลุ่มที่ 6 [ณ][ณ], กลุ่มที่ 7 [ฐ][ฑ], กลุ่มที่ 8 [ณ][ณ]



รูปที่ 3.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟบนอาหาร CYA (ด้านซ้าย) และอาหาร MEA (ด้านขวา) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน กลุ่มที่ 9 [ด][ต], กลุ่มที่ 10 [ถ][ท], กลุ่มที่ 11 [จ][น], กลุ่มที่ 12 [บ][ป],

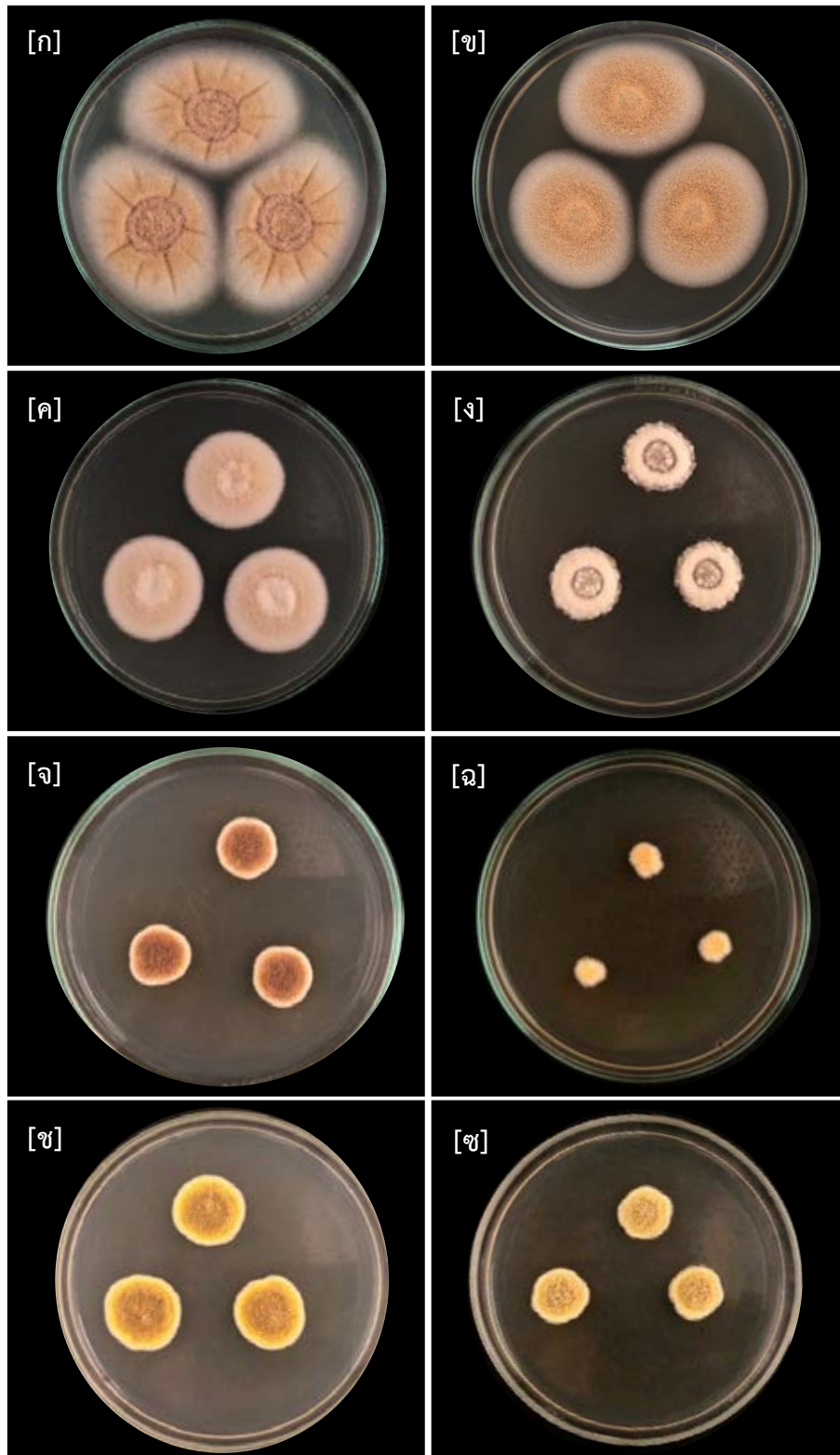
สำหรับราเหลืองในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* เมื่อจัดจำแนกตามลักษณะลักษณะที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าบนอาหาร CYA และ MEA บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า สามารถจัดจำแนกได้เป็น 4 กลุ่ม (รูปที่ 3.6) โดยแต่ละกลุ่มมีลักษณะ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 โคลนีสีเหลือง ผิวหน้ามีลักษณะเป็นปุย (floccose) เส้นใยสีขาว โคลนีสีรอยยับอย่างเห็นได้ชัด สร้างสปอร์สีเหลืองขนาดเล็กจำนวนมาก ใต้โคลนีสีสีน้ำตาลอ่อน และมีขนาดโคลนีสีประมาณ 5.5 เซนติเมตรบนอาหาร CYA (รูปที่ 3.6 ก) และบนอาหาร MEA โคลนีสีเหลือง เส้นใยสีขาว สร้างสปอร์สีเหลืองจำนวนมากทั่วทั้งโคลนีสี โคลนีสีไม่มีรอยยับ ใต้โคลนีสีสีเหลืองอมเขียว และมีขนาดโคลนีสีประมาณ 4.2 เซนติเมตร (รูปที่ 3.6 ข)

กลุ่มที่ 2 โคลนีสีเหลืองอ่อน ผิวหน้ามีลักษณะเป็นปุย (floccose) เส้นใยสีขาวฟู สร้างสปอร์สีเหลืองจำนวนเล็กน้อย ใต้โคลนีสีครีม และมีขนาดโคลนีสีประมาณ 3.5 เซนติเมตรบนอาหาร CYA (รูปที่ 3.6 ค) และบนอาหาร MEA โคลนีสีเหลืองซีด กลางโคลนีสีสีน้ำตาล เส้นใยสีขาวฟู สร้างสปอร์สีเหลืองออกน้ำตาลอยู่บริเวณกลางโคลนีสี ใต้โคลนีสีมีสีครีม และมีขนาดโคลนีสีประมาณ 2.0 เซนติเมตร (รูปที่ 3.6 ง)

กลุ่มที่ 3 โคลนีสีเหลืองอมน้ำตาล เส้นใยสีขาว สร้างสปอร์สีเหลืองอมน้ำตาล ใต้โคลนีสีครีม และมีขนาดโคลนีสีประมาณ 2.0 เซนติเมตรบนอาหาร CYA (รูปที่ 3.6 จ) และบนอาหาร MEA โคลนีสีเหลือง เส้นใยสีขาว สร้างสปอร์สีเหลือง ใต้โคลนีสีมีสีครีม และมีขนาดโคลนีสีประมาณ 1.2 เซนติเมตร (รูปที่ 3.6 ฉ)

กลุ่มที่ 4 โคลนีสีเหลืองสด เส้นใยสีขาว สร้างสปอร์สีน้ำตาลอมเหลือง ใต้โคลนีสีเหลืองอ่อน และมีขนาดโคลนีสีประมาณ 2.2 เซนติเมตรบนอาหาร CYA (รูปที่ 3.6 ช) และบนอาหาร MEA โคลนีสีเหลืองสด เส้นใยสีขาว สร้างสปอร์สีเหลืองเข้ม ใต้โคลนีสีเหลืองอ่อน และมีขนาดโคลนีสีประมาณ 2.0 เซนติเมตร (รูปที่ 3.6 ซ)



รูปที่ 3.6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของราในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* ที่ตัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟบนอาหาร CYA (ด้านซ้าย) และอาหาร MEA (ด้านขวา) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน กลุ่มที่ 1 [ก][ข], กลุ่มที่ 2 [ค][ง], กลุ่มที่ 3 [จ][ฉ], กลุ่มที่ 4 [ช][ซ]

เมื่อจัดจำแนกราดำและราเหลืองแล้ว พบว่า ราดำมีจำนวนกลุ่มมากกว่าราเหลืองแต่จำนวนไอโซเลตในแต่ละกลุ่มของราดำมีเพียง 1-4 ไอโซเลตซึ่งน้อยกว่าราเหลืองที่มีจำนวนไอโซเลตในแต่ละกลุ่ม 4-11 ไอโซเลต โดยราดำส่วนใหญ่ที่คัดแยกมีลักษณะ conidial head เป็นแบบ uniseriate (ตารางที่ 3.2) จากนั้น คัดเลือกราดำและราเหลืองในแต่ละกลุ่ม โดยใช้หลักเกณฑ์ 3 ไอโซเลตที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันเลือกมา 1 ไอโซเลต เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตไอคราทอกซินเอในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 3.2 จำนวนไอโซเลตในแต่ละกลุ่มของราดำและราเหลืองที่จัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

รา	กลุ่ม (จำนวนไอโซเลต)	ลักษณะ conidial head	ไอโซเลต
ราดำ			
	1 (2)	Uniseriate	MF2I1, MK2I9
	2 (4)	Uniseriate	MK2I25, MK3I27, MK3I3, TKI20
	3 (1)	Uniseriate	TKI19
	4 (1)	Uniseriate	TKI18
	5 (1)	Uniseriate	MK2I8
	6 (2)	Uniseriate	MK2I17, MK1I16
	7 (1)	Uniseriate	MK1I11
	8 (3)	Uniseriate	MK2I20, MK3I23, MK3I23 (2)
	9 (1)	Uniseriate	MF3I1
	10 (1)	Uniseriate	TKI15
	11 (1)	Biseriate	PFI1
	12 (3)	Biseriate	MK1I8, PFI2, PFI3
ราเหลือง			
	1 (11)	Biseriate	MK3I9, MK2I3, TKI9, MK3I5, MK3I5(2), TKI1, TKI6, TKI13, MK3I6, MK3I4, MK2I15
	2 (5)	Biseriate	TKI2, TKI5, TKI7, TKI14, TKI10
	3 (4)	Biseriate	MK1I15, MK1I17, MK3I19, MK3I18
	4 (4)	Biseriate	MK1I6, MK2I16, MK3I15, MK2I6

3.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอของราที่คัดแยกได้

ราดำในสกุล *Aspergillus section Nigri* ที่จัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำนวน 12 ไอโซเลต จาก 21 ไอโซเลต ถูกสุ่มมาทดสอบความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ พบว่า ทั้ง 12 ไอโซเลตสามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ โดยมีปริมาณการผลิตต่ำสุดเท่ากับ 2.32 ± 0.29 นาโนกรัมต่อกรัมของอาหารแข็ง PDA และมีปริมาณการผลิตสูงสุดเท่ากับ 64.57 ± 12.51 นาโนกรัมต่อกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ไอโซเลตราดำที่ให้ปริมาณการผลิตสูงสุด คือ TKI20 ถูกคัดแยกมาจากจากเมล็ดกาแฟกะลาจากศูนย์วิจัยโครงการหลวงตีนตก (ตารางที่ 3.3)

ราเหลืองในสกุล *Aspergillus section Circumdati* ที่จัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจำนวน 10 ไอโซเลตจาก 24 ไอโซเลต ถูกสุ่มมาทดสอบความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ พบว่าทั้ง 10 ไอโซเลตสามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้ โดยมีปริมาณการผลิตต่ำสุดเท่ากับ 1.26 ± 0.38 นาโนกรัมต่อกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และมีปริมาณการผลิตสูงสุดเท่ากับ 74.69 ± 9.28 นาโนกรัมต่อกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ไอโซเลตราเหลืองที่ให้ปริมาณการผลิตสูงสุด คือ TKI9 ถูกคัดแยกมาจากเมล็ดกาแฟกะลาจากศูนย์วิจัยโครงการหลวงตีนตก (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 การผลิตโอคราทอกซินเอของรา *Aspergillus section Nigri* และ *Aspergillus section Circumdati* ที่คัดแยกได้

ไอโซเลต	ชนิดกาแฟ	ศูนย์	ปริมาณโอคราทอกซินเอ (นาโนกรัมต่อกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อ)
<i>Aspergillus section Nigri</i>			
MF2I1	เมล็ดกาแฟหมัก	แม่หลอด	2.67±1.47
PF12	เมล็ดกาแฟหมัก	ป่าเมี่ยง	19.70±8.95
MK1I11	เมล็ดกาแฟกะลา	แม่หลอด	23.78±12.46
MK1I16	เมล็ดกาแฟกะลา	แม่หลอด	14.88±5.40
MK1I8	เมล็ดกาแฟกะลา	แม่หลอด	11.86±8.50
MK2I8	เมล็ดกาแฟกะลา	แม่หลอด	5.11±1.11
MK2I20	เมล็ดกาแฟกะลา	แม่หลอด	29.94±5.27
MK3I23	เมล็ดกาแฟกะลา	แม่หลอด	13.53±10.22
MK3I27	เมล็ดกาแฟกะลา	แม่หลอด	8.68±6.11
TK118	เมล็ดกาแฟกะลา	ตีนตก	3.76±3.76
TK119	เมล็ดกาแฟกะลา	ตีนตก	2.32±0.29
TK120	เมล็ดกาแฟกะลา	ตีนตก	64.57±12.51
<i>Aspergillus section Circumdati</i>			
MK1I6	เมล็ดกาแฟกะลา	แม่หลอด	1.26±0.38
MK2I6	เมล็ดกาแฟกะลา	แม่หลอด	4.51±2.42
MK3I5	เมล็ดกาแฟกะลา	แม่หลอด	13.09±3.22
MK3I6	เมล็ดกาแฟกะลา	แม่หลอด	14.12±1.64
MK3I9	เมล็ดกาแฟกะลา	แม่หลอด	11.16±1.09
MK3I19	เมล็ดกาแฟกะลา	แม่หลอด	8.81±0.08
TKI5	เมล็ดกาแฟกะลา	ตีนตก	2.86±1.29
TKI6	เมล็ดกาแฟกะลา	ตีนตก	36.64±4.31
TKI7	เมล็ดกาแฟกะลา	ตีนตก	47.13±21.23
TKI9	เมล็ดกาแฟกะลา	ตีนตก	74.69±9.28

3.4 การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟ

การประเมินปนเปื้อนโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟหมักและเมล็ดกาแฟกะลาด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) พบว่า ตัวอย่างเมล็ดกาแฟหมักและเมล็ดกาแฟกะลาทุกตัวอย่างมีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอ ซึ่งตัวอย่างเมล็ดกาแฟหมักมีปริมาณการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอน้อยกว่าในเมล็ดกาแฟกะลา โดยเมล็ดกาแฟหมักมีปริมาณโอคราทอกซินเอปนเปื้อนอยู่ในช่วง น้อยกว่า 0.1-2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และตัวอย่างเมล็ดกาแฟหมักที่มีปริมาณการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอสูงสุดมาจากศูนย์วิจัยโครงการหลวงป่าเมี่ยงมีปริมาณโอคราทอกซินเอปนเปื้อนเฉลี่ยเท่ากับ 1.70 ± 0.15 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม สำหรับเมล็ดกาแฟกะลามีปริมาณโอคราทอกซินเอปนเปื้อนอยู่ในช่วง 0.1-10.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และตัวอย่างเมล็ดกาแฟกะลาที่ได้จากศูนย์วิจัยโครงการหลวงตีนตกมีปริมาณโอคราทอกซินเอปนเปื้อนเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 6.48 ± 3.76 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 3.4)

ตารางที่ 3.4 ปริมาณโอคราทอกซินเอในตัวอย่างเมล็ดกาแฟหมักและเมล็ดกาแฟกะลา

ชนิดกาแฟ	ศูนย์วิจัย	ปริมาณโอคราทอกซินเอเฉลี่ย (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	ช่วงปริมาณของโอคราทอกซินเอ (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)
เมล็ดกาแฟหมัก	แม่หลอด	0.50 ± 0.4	<0.1-0.9
	ป่าเมี่ยง	1.70 ± 0.15	1.0-2.1
	ตีนตก	1.63 ± 0.08	1.2-2.0
เมล็ดกาแฟกะลา	แม่หลอด	0.90 ± 0.57	0.1-2.9
	ตีนตก	6.48 ± 3.76	1.8-10.3

บทที่ 4

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างกาแฟในช่วงต้นกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียกหลังการเก็บเกี่ยว 3 ชนิด คือ ผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และเมล็ดกาแฟกะลาจากโครงการหลวง 3 โครงการ ได้แก่ สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ศูนย์วิจัยโครงการหลวงตีนตก และศูนย์วิจัยโครงการหลวงป่าเมี่ยง ในจังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย รวมทั้งหมด 16 ตัวอย่างด้วยวิธี direct plating พบว่า ตัวอย่างผลกาแฟสุก เมล็ดกาแฟหมัก และเมล็ดกาแฟกะลาจากโครงการหลวงทั้ง 3 โครงการมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดไม่แตกต่างกัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อเฉลี่ยในกาแฟแต่ละชนิด เท่ากับ 96 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราดำและราเหลือง พบว่า ตัวอย่างเมล็ดกาแฟทั้ง 3 ชนิดมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อต่ำ โดยตัวอย่างเมล็ดกาแฟกะลามีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราดำและราเหลืองสูงที่สุด เท่ากับ 8.00 ± 5.57 และ 17.50 ± 2.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างผลกาแฟสุกและเมล็ดกาแฟหมักพบการติดเชื้อจากราดำและราเหลืองได้ต่ำ หรือไม่พบการติดเชื้อ แต่พบการปนเปื้อนของราสายใยในสกุลอื่นๆ เป็นจำนวนมาก เช่น *Penicillium*, *Fusarium*, *Curvularia* และ *Rhizopus* ซึ่งเป็นราที่พบปนเปื้อนได้มากในแปลงเพาะปลูก (field fungi) นอกจากนี้ ในผลกาแฟสุกและเมล็ดกาแฟหมักพบการปนเปื้อนของยีสต์เป็นหลัก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lamanaka และคณะ (2014) พบการปนเปื้อนของราในสกุล *Penicillium*, *Fusarium* และ ยีสต์ เป็นกลุ่มหลักในผลกาแฟสุก และเมล็ดกาแฟหมัก เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Pereira และคณะ (2014) ซึ่งราเหล่านี้สามารถพบปนเปื้อนได้มากทั้งในผลกาแฟสุกหลังการเก็บเกี่ยว และจากเมล็ดกาแฟที่ผ่านการตากแห้งอย่างเมล็ดกาแฟกะลาด้วย (Urbano และคณะ, 2001; Taniwaki และคณะ, 2003) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากผลกาแฟสุกอาจได้รับความเสียหายระหว่างการเพาะปลูก และการเก็บเกี่ยวจึงส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของราในกลุ่ม field fungi ได้ และเมื่อกำจัดเนื้อผลของผลกาแฟสุกออก แล้วนำไปแช่น้ำจะได้เป็นเมล็ดกาแฟหมักซึ่งกระบวนการหมักเมล็ดกาแฟมีสภาวะค่อนข้างเป็นกรด ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการเจริญของยีสต์ประจำถิ่นในกาแฟ (indigenous coffee yeasts) เพื่อช่วยในการกำจัดเมือกที่เมล็ดกาแฟ และทำให้กลิ่นรสของกาแฟดีขึ้น ดังนั้น ในเมล็ดกาแฟหมักจึงพบการปนเปื้อนของยีสต์เป็นหลัก (Pereira และคณะ, 2014) ในขณะที่เมล็ดกาแฟกะลาถูกทำให้แห้ง ส่งผลให้ราดำและราเหลืองที่คาดว่าเป็นราในสกุล *Aspergillus* ซึ่งเป็นราที่เจริญได้ดีเมื่อปริมาณน้ำอิสระต่ำ (water activity, a_w) (Xerophilic fungi) จึงพบการเจริญของราดำและราเหลืองได้มากที่สุดในตัวจากกาแฟกะลา อีกทั้งระหว่างกระบวนการตากแห้งต้องอาศัยระยะเวลา สิ่งแวดล้อมและสภาพภูมิอากาศที่เอื้ออำนวยเพื่อให้เมล็ดกาแฟกะลาแห้งอย่างสมบูรณ์ จึงส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของราดำและราเหลือง (Teixera และคณะ, 2001;

Frisvad และคณะ, 2004; Leong และคณะ, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับผลการคัดแยกราสายใยจากตัวอย่างกาแพทั้ง 3 ชนิดในงานวิจัยนี้ พบว่า เมล็ดกาแพกะลาสามารถคัดแยกราดำและราเหลืองในสกุล *Aspergillus* ได้มากที่สุด และผลกาแพสุกและเมล็ดกาแพหมักไม่สามารถคัดแยกราในสกุล *Aspergillus* ได้แต่สามารถแยกราในสกุลอื่นๆ เช่น *Fusarium*, *Curvularia* และ *Rhizopus* ซึ่งเป็นราในกลุ่ม Field fungi ได้มาก

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณราสายใยทั้งหมดที่พบบนเปลือกในตัวอย่างกาแพทั้ง 3 ชนิด พบว่า ผลกาแพสุกมีปริมาณราสายใยบนเปลือกสูงที่สุด โดยมีปริมาณเท่ากับ $1.55 \pm 1.5 \times 10^6$ CFU ต่อกรัมของกาแพ ตัวอย่างเมล็ดกาแพหมักและเมล็ดกาแพกะลามีปริมาณราสายใยบนเปลือกเฉลี่ยใกล้เคียงกันเท่ากับ $3.55 \pm 1.83 \times 10^5$ และ $2.38 \pm 3.03 \times 10^5$ CFU ต่อกรัมของกาแพ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมื่อเมล็ดกาแพผ่านขั้นตอนการผลิตมากขึ้นส่งผลให้จำนวนของราสายใยที่ปนเปื้อนลดน้อยลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากขั้นตอนต่าง ๆ ในกระบวนการผลิต เช่น การกำจัดเปลือกและเนื้อผลจะช่วยลดการปนเปื้อนของราที่บริเวณผิวของผลกาแพลงได้ และกระบวนการหมักสามารถช่วยหยุดการเจริญของราที่ปนเปื้อนได้ (Batista และคณะ, 2016) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณราของตัวอย่างกาแพชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากโครงการหลวง 3 แห่ง พบว่า ตัวอย่างกาแพทั้ง 3 ชนิดจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงตีนตกมีปริมาณราสายใยบนเปลือกสูงที่สุด

สำหรับผลการคัดแยกและจัดจำแนกราดำและราเหลืองที่คาดว่าเป็นราในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* และ *Aspergillus* section *Circumdati* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบลักษณะเด่นของ conidial head ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ทำให้สามารถสรุปได้ว่า ราดำและราเหลืองที่คัดแยกได้เป็นราในสกุล *Aspergillus* และจากการจัดจำแนกลักษณะที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าบนอาหาร CYA และ MEA พบว่า รากลุ่มหลักที่พบปนเปื้อนในเมล็ดกาแพกะลาสายพันธุ์อะราบิกา คือ *Aspergillus* section *Circumdati* ซึ่งจัดจำแนกได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม นอกจากนี้ ยังพบความหลากหลายของ *Aspergillus* section *Nigri* มากถึง 12 กลุ่ม สำหรับราเหลืองในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* กลุ่มที่มีจำนวนไอโซเลตมากที่สุด คือ กลุ่มที่ 1 ซึ่งมีลักษณะโคโลนีสีเหลือง ผิวหน้ามีลักษณะเป็นปุย (floccose) เส้นใยสีขาว โคโลนีมีรอยยับอย่างเห็นได้ชัด สร้างสปอร์สีเหลืองขนาดเล็กจำนวนมาก ใต้โคโลนีมีสีน้ำตาลอ่อน และมีขนาดโคโลนีประมาณ 5.5 เซนติเมตร บนอาหาร CYA และบนอาหาร MEA มีโคโลนีสีเหลือง เส้นใยสีขาว สร้างสปอร์สีเหลืองจำนวนมากทั่วทั้งโคโลนี โคโลนีไม่มีรอยยับ ใต้โคโลนีมีสีเหลืองอมเขียว และมีขนาดโคโลนีประมาณ 4.2 เซนติเมตรลักษณะภายใต้อกล้องจุลทรรศน์มี conidial head เป็น Biseriate ซึ่งจากการทดลองไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน แต่ลักษณะสัณฐานวิทยาดังกล่าวใกล้เคียงกับ *A. westerdijkiae* *A. steynii* และ *A. ochraceus* (Pitt และ Hocking, 2009; Visagie และคณะ, 2014) ซึ่งเป็นราสายพันธุ์หลักในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* ที่พบปนเปื้อนได้มากในกาแพอะราบิกา เนื่องจาก *Aspergillus* section *Circumdati* เป็นราที่เจริญได้ดีเมื่อมีปริมาณน้ำอิสระต่ำ (Xerophilic fungi)

และมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญที่อุณหภูมิค่อนข้างเย็นประมาณ 20-28 องศาเซลเซียส ซึ่งช่วงอุณหภูมิดังกล่าวเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูกกาแฟอาราบิก้าใน section *Circumdati* ปนเปื้อนได้มาก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Noonim และคณะ (2008) ที่พบว่า *Aspergillus* section *Circumdati* เป็นรากลุ่มหลักที่พบปนเปื้อนในกาแฟอาราบิก้าจากทางเหนือของประเทศไทย เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Taniwaki และคณะ (2003) ที่พบ *Aspergillus* section *Circumdati* เป็นรากลุ่มหลักที่ปนเปื้อนในกาแฟจากประเทศบราซิล

หลังจากการจัดจำแนกราดำในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* และราเหลืองในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* แล้วสุ่มเลือกราดำในสกุล *Aspergillus* section *Nigri* จำนวน 12 ไอโซเลต และราเหลืองในสกุล *Aspergillus* section *Circumdati* จำนวน 10 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอ พบว่า *Aspergillus* section *Nigri* ที่ผลิตโอคราทอกซินเอได้สูงสุด คือ ไอโซเลต TKI20 ซึ่งแยกได้จากเมล็ดกาแฟจากศูนย์วิจัยโครงการหลวงตีนตกสามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้เท่ากับ 64.57 ± 12.51 นาโนกรัมต่อกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง และ *Aspergillus* section *Circumdati* ที่ผลิตโอคราทอกซินเอได้สูงสุด คือ ไอโซเลต TKI9 ซึ่งแยกได้จากเมล็ดกาแฟจากศูนย์วิจัยโครงการหลวงตีนตกเช่นกัน สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้เท่ากับ 74.69 ± 9.28 นาโนกรัมต่อกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ในขณะที่ *Aspergillus* section *Nigri* และ *Aspergillus* section *Circumdati* ที่คัดแยกได้จากเมล็ดกาแฟอาราบิก้าในงานวิจัยของ Alwindia และคณะ (2016) สามารถผลิตโอคราทอกซินเอได้สูงสุดถึง 18,439 และ 36,561 นาโนกรัมต่อกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า *Aspergillus* section *Nigri* และ *Aspergillus* section *Circumdati* ที่คัดแยกได้จากเมล็ดกาแฟอาราบิก้าในงานวิจัยนี้มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ปริมาณน้ำอิสระ ที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตโอคราทอกซินเอ หรือสายพันธุ์ของราที่คัดแยกได้มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอได้ต่ำ (Taniwaki และคณะ, 2003; Visagie และคณะ, 2014)

สำหรับการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟหมักและเมล็ดกาแฟกะลา พบว่า เมล็ดกาแฟหมักมีปริมาณการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอต่ำกว่าเมล็ดกาแฟกะลา สำหรับเมล็ดกาแฟหมักมีการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง น้อยกว่า 0.1-2.0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และเมล็ดกาแฟกะลา มีการปนเปื้อนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.1-10.3 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากกระบวนการตากเมล็ดกาแฟที่ต้องใช้ระยะเวลา และสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เมล็ดกาแฟกะลาที่แห้งสมบูรณ์ตามที่กล่าวไปข้างต้น ประกอบกับการมีหมอกในตอนเช้า และมีฝนตกในบางพื้นที่ในจังหวัดเชียงใหม่ (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2561) อาจจึงส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของ *Aspergillus* section *Nigri* และ section *Circumdati* และเกิดการผลิตโอคราทอกซินเอสะสมในเมล็ดกาแฟกะลาได้มากกว่า ดังนั้น การเก็บเกี่ยวและการจัดการกระบวนการหลังการเก็บเกี่ยวภายใต้การควบคุมที่เหมาะสมสามารถช่วยลดการปนเปื้อนของราและโอคราทอกซินเอได้ (Taniwaki และคณะ, 2003) เมื่อพิจารณา

ปริมาณโอคราทอกซินในตัวอย่างกาแฟแต่ละตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างกาแฟกะลาจากศูนย์วิจัยโครงการหลวงตีนตกมีปริมาณโอคราทอกซินเอปนเปื้อนสูงสุด เท่ากับ 6.48 ± 3.76 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอของ *Aspergillus section Nigri* และ *section Circumdati* ที่คัดแยกได้ในงานวิจัยนี้ พบว่าทั้งโอโซเลต *Aspergillus section Nigri* และ *section Circumdati* ที่ผลิตโอคราทอกซินเอได้สูงสุดถูกคัดแยกมาจากตัวอย่างเมล็ดกาแฟกะลาที่ได้จากศูนย์วิจัยโครงการหลวงตีนตกซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้เมล็ดกาแฟกะลาจากศูนย์วิจัยโครงการหลวงตีนตกมีปริมาณโอคราทอกซินเอสูงที่สุดจากตัวอย่างทั้งหมด

แต่อย่างไรก็ตามในประเทศไทย ไม่มีข้อกำหนดปริมาณโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟหมักและเมล็ดกาแฟกะลา มีเพียงในเมล็ดกาแฟสาร ซึ่งกำหนดให้มีโอคราทอกซินเอในเมล็ดกาแฟสาร สำหรับกาแฟอะราบิกาได้ไม่เกิน 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (มกษ. 5700-2561) จากปริมาณการปนเปื้อนโอคราทอกซินเอที่ตรวจสอบได้ในเมล็ดกาแฟกะลาที่ได้จากศูนย์วิจัยโครงการหลวงทั้ง 3 แห่ง ซึ่งจะถูกสีเปลือกออกเป็นเมล็ดกาแฟสารต่อไป อาจส่งผลให้การปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอต่ำลง ทั้งนี้ ปริมาณของโอคราทอกซินเอที่ปนเปื้อน ในผลผลิตกาแฟมีความแตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมในแต่ละปี เช่น ปริมาณน้ำฝน อุณหภูมิ ความชื้นของแสง ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อการปนเปื้อนของราและการสะสมโอคราทอกซินเอ รวมไปถึงกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟที่เลือกใช้ การจัดการภายในแปลงเพาะปลูก สภาวะในการเก็บรักษาที่เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการปนเปื้อนของราและการสะสมโอคราทอกซินเอในกาแฟหลังการเก็บเกี่ยว และการแปรรูป

จากการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าตัวอย่างกาแฟอะราบิกาจากช่วงต้นกระบวนการผลิตเมล็ดกาแฟแบบเปียกที่เก็บเมื่อเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2561 จากศูนย์วิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ป่าเมี่ยง และตีนตก ผลกาแฟสุกและเมล็ดกาแฟหมักแทบไม่พบการปนเปื้อนของ *Aspergillus section Circumdati* และ *section Nigri* โดยยีสต์และราสายใยอื่นๆอย่าง *Penicillium*, *Curvularia* และ *Rhizopus* เป็นรากลุ่มหลักที่พบปนเปื้อน สำหรับเมล็ดกาแฟกะลาพบการปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus section Circumdati* และ *section Nigri* เพียง 17.50 ± 2.18 และ 8.00 ± 5.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดย *Aspergillus section Circumdati* เป็นราสายพันธุ์หลักที่พบปนเปื้อน นอกจากนี้ ยังพบว่ามีการปนเปื้อนของราในสกุล *Aspergillus section Nigri* หลากหลายกลุ่ม แต่ *Aspergillus section Circumdati* และ *section Nigri* ที่พบปนเปื้อนและคัดแยกได้มีความสามารถในการผลิตโอคราทอกซินเอได้ในปริมาณต่ำประกอบกับการปนเปื้อนของราทั้งสองกลุ่มไม่มากนักจึงส่งผลให้เมล็ดกาแฟหมักและเมล็ดกาแฟกะลา สายพันธุ์อะราบิกา มีการปนเปื้อนของโอคราทอกซินเอน้อยกว่าข้อกำหนดปริมาณโอคราทอกซินเอ สำหรับกาแฟอะราบิกาในประเทศไทย

รายการอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. (2559). ยุทธศาสตร์กาแฟ 2560-2564. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.doa.go.th/hort/images/jsn_is_thumbs/images/hort/strategiccoffee.pdf. [1 พฤษภาคม 2561].
- กรมอุตุนิยมวิทยา. (2561). ลักษณะอากาศของประเทศไทยราย 3 เดือน เดือน พฤศจิกายน พ.ศ.2561 ถึง มกราคม พ.ศ.2562. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://www.tmd.go.th/programs/uploads/Tmddocuments/climate-0075.pdf>. [8 เมษายน 2562].
- สำนักงานพัฒนาการวิจัยทางการเกษตร องค์การมหาชน. (2558). ประวัติและความสำคัญของกาแฟ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.arda.or.th/kasetinfo/south/coffee/history/index.php..> [25 เมษายน 2561].
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2561). มาตรฐานสินค้าเกษตร (มกษ. 5700-2561) เมล็ดกาแฟโรบัสตา. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.acfs.go.th/standard/download/ROBUSTA_GREEN_COFFEE_2561.pdf. [7 เมษายน 2562].
- มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2561). มาตรฐานสินค้าเกษตร (มกษ. 5701-2561) เมล็ดกาแฟโรบัสตา. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.acfs.go.th/standard/download/Arabica_coffee_bean_2561.pdf. [7 เมษายน 2562].
- สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร. (2555). สารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตร. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.doa.go.th/pprdo/download/%E0%B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%9E%E0%B8%B4%E0%B8%A9%E0%B8%88%E0%B8%B2%E0%B8%81%E0%B9%80%E0%B8%8A%E0%B8%B7%E0%B9%89%E0%B8%AD%E0%B8%A3%E0%B8%B2%E0%B9%83%E0%B8%99%E0%B8%9C%E0%B8%A5%E0%B8%B4%E0%B8%95%E0%B8%9C%E0%B8%A5%E0%B9%80%E0%B8%81%E0%B8%A9%E0%B8%95%E0%B8%A3.pdf>. [16 พฤษภาคม 2561].
- สถาบันอาหาร. (2559). อุตสาหกรรมกาแฟ. มีนาคม 2559. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://fic.nfi.or.th/foodsectordatabank-detail.php?id=17>. [1 พฤษภาคม 2561].
- Alshannaq, A., & Yu, J.-K. (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14, 632.

- Alvindia, D. G., & De Guzman, M. F. (2016). Survey of Philippine coffee beans for the presence of ochratoxigenic fungi. *Mycotoxin Research*, 32, 61-67.
- Amézqueta, S., Galindo, S. S., Arbizu, M. M., Penas, E. G., De Cerain A. L., & Guiraud, J. P. (2012). OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. *Food Control*, 26, 259-268.
- Aoyama, K., Nakajima, M., Tabata, S., Ishikuro, E., Tanaka, T., Norizuki, H., Itoh, Y., Fujita, K., Kai, S., Tsutsumi, T., Takahashi, M., Tanaka, H., Iizuka, S., Ogiso, M., Maeda, M., Yamaguchi, S., Sugiyama, K., Sugita-Konishi, Y., Kumagai, S. (2010). Four-Year Surveillance for Ochratoxin A and Fumonisin in Retail Foods in Japan. *Journal of Food Protection*, 73, 344-352.
- Batista, L. R., Chalfoun, S. M., Silva, C. F., Cirillo, M., Varga, E. A., & Schwan, R. F. (2009). Ochratoxin A in coffee beans (*Coffea arabica* L.) processed by dry and wet methods. *Food Control*, 20, 784-790.
- Batista, L. R., De Souza S. M. C., Silva, C. F., & Schwan, R. F. (2016). Coffee: Types and Production. *Encyclopedia of Food and Health*, 1, 244-251.
- Dachoupakan, C., Ratomahenina, R., Martinez, V., Guiraud, J. P., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2009). Study of the phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black aspergilli isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology*, 132, 14-23.
- El Khoury, A., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*, 2, 461-493.
- European Union law. (2005). COMMISSION REGULATION (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. [Online]. Source: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32005R0123>. [16 May 2018].
- Farah, A., & Santos, T. F. D. (2015). The Coffee Plant and Beans: An Introduction. *Coffee in Health and Disease Prevention*, 5-10.
- Ferraz, M. B. M., Farah, A., Iamanaka, B. T., Perrone, D., Copetti, M. V., Marques, V. X., Vitali, A. A., & Taniwaki, M. H. (2010). Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting. *Food Control*, 21, 872-877.
- Freire, L., Passamani, R. F., Thomas, A. B., Nassur, R. D. C. M. R., Silva, L. M., Paschoal, F. N., Pereira, G. E., Prado, G., & Batista, L. R. (2017). Influence of physical

- and chemical characteristics of wine grapes on the incidence of *Penicillium* and *Aspergillus* fungi in grapes and ochratoxin A in wines. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 181-190.
- Frisvad, J. C., Frank, J. M., Houbraeken, J. A. M. P., Kuijpers, A. F. A., & Samson, R. A. (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, 50, 23-43.
- Galarce-Bustos, O., Alvarado, M., Vega, M., & Aranda, M. (2014). Occurrence of ochratoxin A in roasted and instant coffees in Chilean market. *Food Control*, 46, 102-107.
- Geremew, T., Abate, D., Landschoot, S., Haesaert, G., & Audenaert, K. (2016). Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption. *Food Control*, 69, 65-73.
- Gopinandhan, T. N., Kannan, G. S., Panneerselvam, P., Velmourougane, K., Raghuramulu, Y., & Jayarama. (2008). Survey on ochratoxin A in Indian green coffee destined for export. *Food Additives & Contaminants Part B-Surveillance*, 1, 51-57.
- Holzhauser, D., Delatour, T., Marinkuan, M., Junod, S., Guignard, G., Piguët, D., Richoz, J., Bezencon, C., Schilter, B., & Cavin, C. (2003). Ochratoxin a toxicity and carcinogenicity. *Toxicology Letter*, 144(1), s65.
- Lamanaka, B. T., Teixeira A. A., Teixeira A. R. R., Vicente, E., Frisvad J. C., Taniwaki M. H., & Bragagnolo N. (2014). Potential of volatile compounds produced by fungi to influence sensory quality of coffee beverage. *Food Research International*, 64, 166-170.
- Lea, T., Steien, K., & Stormer, C. (1989). Mechanism of ochratoxin A induced immunosuppression. *Mycopathologia*, 107, 153-159.
- Leong, S. L., Hocking, A. D., & Pitt, J. I. (2004). Occurrence of fruit rot fungi (*Aspergillus* section *Nigri*) on some drying varieties of irrigated grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10, 83-88.
- Leong, S. L., Hien, L. T., An, T. V., Trang, N. T., Hocking, A. D., & Scott, E. S. (2007). Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 301-306.
- Leoni, L. A. B., Soares, L. M. V., & Oliveira, P. L. C. (2000). Ochratoxin A in Brazilian roasted and instant coffees. *Food Additives and Contaminants*, 17, 867-870.

- Logrieco, A., Ferracane, R., Visconti, A., & Retieni, A. (2009). Natural occurrence of fumonisin B2 in red wine from Italy. *Food Additives and Contaminants*, 27(8), 1136-1141.
- Magnoli, C. E., Astoreca, A. L., Chiacchiera, S. M., & Dalcerro, A. M. (2007). Occurrence of ochratoxin A and ochratoxigenic mycoflora in corn and corn-based foods and feeds in South American countries. *Mycopathologia*, 163, 249-260.
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218-237.
- National Center for Biotechnology Information. (2018). Ochratoxin A. [Online]. Source: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ochratoxin_a#section=Top. [15 May 2018].
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad J. C., & Samson, R. A. (2008). Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 197-202.
- Ozden, S., Akdeniz, A. S., & Alpertunga, B. (2012). Occurrence of ochratoxin A in cereal-derived food products commonly consumes in Turkey. *Food Control*, 25, 69-74.
- Pardo, E., Marin, S., Ramos, A., & Sanchis, V. (2004). Occurrence of ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in green coffee from different origins. *Food Science and Technology International*, 10, 45-49.
- Paterson, M., Russell, R., Venâncio, A., Lima, N., Guilloux-Bénatier, M., & Rousseaux, S. (2018). Predominant mycotoxins, mycotoxigenic fungi and climate change related to wine. *Food Research International*, 103, 478-491.
- Patriarca, A., & Pinto, V. F. (2017). Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. *Current Opinion in Food Science*, 14, 50-60.
- Pereira, G. V. D., Soccol, V. T., Pandey, A., Medeiros, A. B. P., Lara, J. M. R. A., Gollo, A. L., & Soccol, C. R. (2014). Isolation, selection and evaluation of yeasts for use in fermentation of coffee beans by the wet process. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 60-66.
- Pitt, J. I. (1987). *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum*, and production

- of ochratoxin *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 266–269.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. 3rd ed. New York: Springer
- Ribelin, W. E., Fukushima, K., & Still, P.E. (1978). The toxicity of ochratoxin A to ruminants. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 42, 172–176.
- Silva, D. M., Batista, L. R., Rezende, E. F., Fungaro, M. H., Sartori, D., & Alves, E. (2011). Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section *Nigri* using polyphasic taxonomy. *Braz J Microbiol*, 42, 761-773.
- Soleas, G. J., Yan, J., & Goldberg, D. M. (2001). Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2733–2740.
- Sonjak, S., Ličen, M., Frisvad, J. C., & Gunde-Cimerman, N. (2011). The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. *Food Microbiology*, 28, 373-376.
- Stoev, S. D. (2013). Food safety and increasing hazard of mycotoxin occurrence in foods and feeds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 887-901.
- Suarez-Quiroz, M., Gonzalez-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., & Guiraud, J. P. (2005). Effect of the post-harvest processing procedure on OTA occurrence in artificially contaminated coffee. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 339-345.
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Teixeira, A. A., & Lamanaka, B. T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 173-179.
- Taniwaki, M. H., Teixeira, A. A., Teixeira, A. R. R., Copetti, M. V., & Lamanaka, B. T. (2014). Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in defective coffee beans. *Food Research International*, 61, 161-166.
- Tao, Y., Xie, S., Xu, F., Liu, A., Wang, Y., Chen, D., Pan, Y., Huang, L., Peng, D., Wang, X., & Yuan, Z. (2018). Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 320-331.
- Teixera, A. A., Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., & Martins, C. P. (2001). The presence of ochratoxin A in coffee due to local conditions and processing in four regions in Brazil.

Proceedings of the 19th International Scientific Colloquium on Coffee: International Coffee Science Association.

- Urbano, G. R., Taniwaki, M. H., Leitao, M. F. D., & Vicentini, M. C. (2001). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of Food Protection*, 64, 1226-1230.
- Van der Merwe, K. J., Steyne, P. S., Fourie, L. F., Scott, D. B., & Theron, J. J. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature*, 205, 1112–1113.
- Vaughan, M. J., Mitchell, T., & Gardener, B. B. M. (2015). What's Inside The Seed We Brew? A New Approach To Mining The Coffee Microbiome. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 6518-6527.
- Velmourougane, K., Bhat, R., Gopinandhan, T. N., & Panneerselvam, P. (2011). Management of *Aspergillus ochraceus* and Ochratoxin-A contamination in coffee during on-farm processing through commercial yeast inoculation. *Biological Control*, 57, 215-221.
- Vettorazzi, A., & De Cerain, A. L. (2016). Mycotoxins as Food Carcinogens. *Environmental Mycology in public Health: Academic Press*, 261-298.
- Visconti, A., Pascale, M., & Centoze, G. (1999). Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 864, 89–101.
- Visagie, C. M., Varga, J., Houbraken, J., Meijer, M., Kocsube, S., Yilmaz, N., Fotedar, R., Seifert, K. A., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2014). Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Stud Mycol*, 78, 1-61.
- Zhao, X., Yuan, Y., Zhang, X., & Yue, T., (2014). Identification of ochratoxin A in Chinese spices using HPLC fluorescent detectors with immunoaffinity column cleanup. *Food Control*, 46, 332-337.

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง Dichloran 18% Glycerol (DG18) agar

อาหารสำเร็จรูป DG18	31.6	กรัม
กลีเซอรอล	175	มิลลิลิตร

ละลายอาหารสำเร็จรูปในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เติมกลีเซอรอล 175 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารแข็ง Malt Extract agar (MEA)

ผงสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	30	กรัม
เพปโทน (peptone)	5	กรัม
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต	0.005	กรัม
ซิงค์ (II) ซัลเฟต	0.01	กรัม
วุ้น	15	กรัม

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดแล้วละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. อาหารแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารสำเร็จรูป PDA (Difco Laboratories, USA)	39	กรัม
--	----	------

ชั่งอาหารสำเร็จรูปแล้วละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารแข็ง Czapek' s Yeast Autolysate agar (CYA)

Czapek concentrate	10	มิลลิลิตร
ซูโครส	30	กรัม
ผงผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต	1	กรัม
คอปเปอร์ (II) ซัลเฟต	0.005	กรัม
ซิงค์ (II) ซัลเฟต	0.01	กรัม
วุ้น	20	กรัม

ซึ่งส่วนผสมทั้งหมดแล้วละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Czapek concentrate

โซเดียมไนเตรต	30	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์	5	กรัม
แมกนีเซียม (II) ซัลเฟต	5	กรัม
ไอโรรอน (II) ซัลเฟต	0.1	กรัม

ซึ่งส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข
สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายเพปโตน 0.1 เปอร์เซ็นต์ (peptone water)

ชั่งเพปโตน 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. สารละลายที่ใช้เตรียมสารแขวนลอยสปอร์

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิตรผสมกับ Tween80 ปริมาตร 1 มิลลิตร ให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

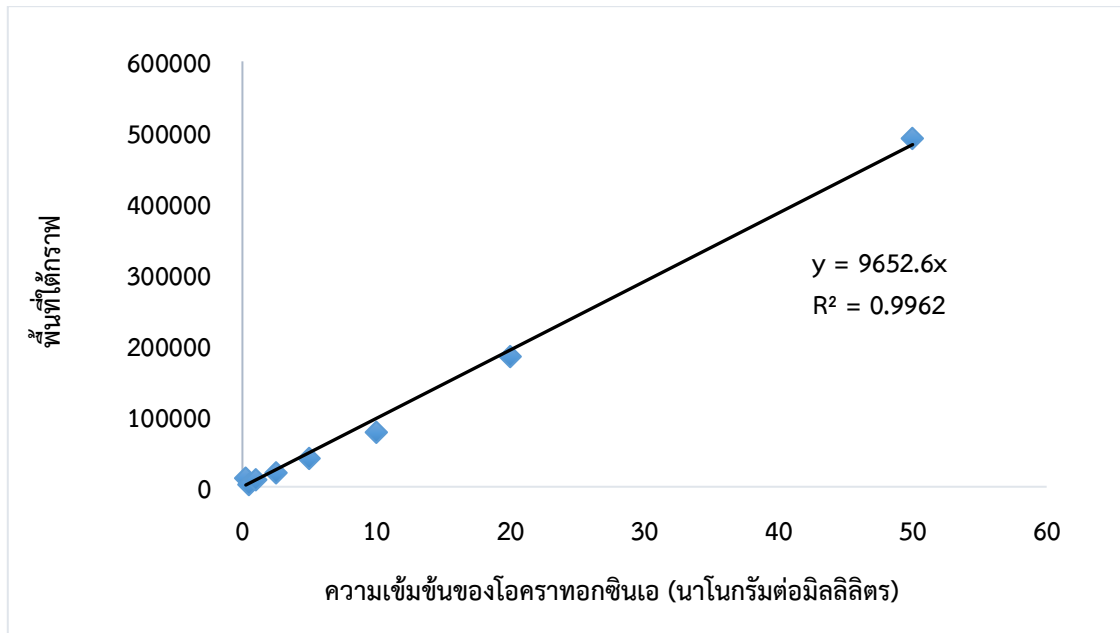
3. เมทานอลผสมกับกรดฟอร์มิก อัตราส่วน 25:1 สำหรับสกัดโอคราทอกซินเอ

เตรียมเมทานอลปริมาตร 25 มิลลิตร ผสมกับกรดฟอร์มิกปริมาตร 1 มิลลิตร

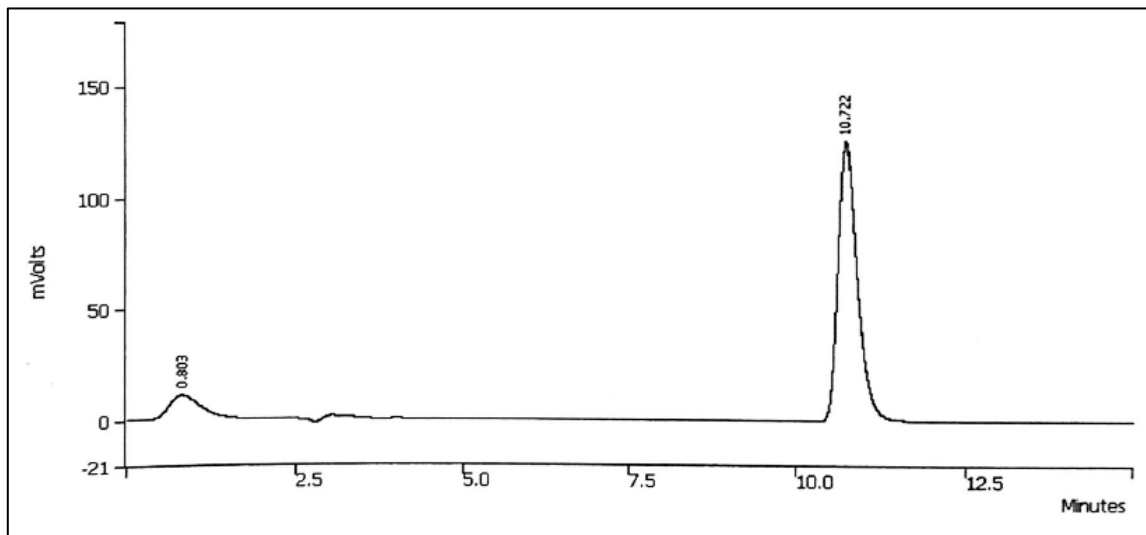
4. เฟสเคลื่อนที่สำหรับโอคราทอกซินเอ

เตรียมอะซีโตนไนโตรลัปริมาตร 495 มิลลิตร น้ำปลอดประจุปริมาตร 495 มิลลิตรและกรดอะซีติก ปริมาตร 1 มิลลิตร ผสมรวมกัน และกรองด้วยชุดกรองผ่านกระดาษกรอง ไล่แก๊สในสารละลายด้วยเครื่องคลื่นเสียงความถี่สูง (sonication) เป็นเวลา 15 นาทีก่อนนำไปใช้วิเคราะห์ปริมาณโอคราทอกซินเอด้วยเครื่อง HPLC

ภาคผนวก ค



รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ



รูปที่ ค.2 โครมาโทแกรมของโอคราทอกซินเอ retention time (RT) ประมาณ 11 นาที

การคำนวณปริมาณโอคราทอกซินเอ

$$\text{ปริมาณโอคราทอกซินเอ (นาโนกรัมต่อกรัมวุ้น)} = (A/B) \times 2.5 \times C \times (1/D)$$

โดย A = พื้นที่ใต้กราฟ

B = สัมประสิทธิ์หน้า X ของกราฟมาตรฐานโอคราทอกซินเอ

C = การเติมเฟสเคลื่อนที่ลงในโอคราทอกซินเอที่สกัดได้

D = น้ำหนักวุ้น

ภาคผนวก ง

1. การคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (% infection)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนเมล็ดกาแฟที่มีการเจริญของรา} \times 100}{\text{จำนวนเมล็ดกาแฟทั้งหมด}}$$

ภาคผนวก จ

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ จ.1 จำนวนราสายใยทั้งหมดของตัวอย่างกาแฟทั้ง 3 ชนิด จากศูนย์วิจัยโครงการหลวงทั้ง 3 แห่งบนอาหารแข็ง DG18

ชนิดกาแฟ	ตัวอย่าง	CFU/g ของกาแฟ	เฉลี่ยแต่ละศูนย์
ผลกาแฟสุก			
แม่หลอด	MC1	$3.28 \pm 2.93 \times 10^5$	
	MC2	$46.57 \pm 44.93 \times 10^5$	$17.58 \pm 20.50 \times 10^5$
	MC3	$2.90 \pm 1.85 \times 10^5$	
ป่าเมี่ยง	PC	$2.23 \pm 0.76 \times 10^5$	$2.23 \pm 0.76 \times 10^5$
	ตีนตก	TC1	$19.20 \pm 14.30 \times 10^5$
TC2		$19.08 \pm 17.43 \times 10^5$	$19.14 \pm 0.06 \times 10^5$
เมล็ดกาแฟหมัก			
แม่หลอด	MF1	$2.35 \pm 0.50 \times 10^5$	
	MF2	$3.90 \pm 1.45 \times 10^5$	
	MF3	$1.70 \pm 0.20 \times 10^5$	$3.71 \pm 2.31 \times 10^5$
	MF4	$6.87 \pm 5.13 \times 10^5$	
ป่าเมี่ยง	PF	$1.85 \pm 1.20 \times 10^5$	$1.85 \pm 1.20 \times 10^5$
ตีนตก	TF	$4.65 \pm 1.85 \times 10^5$	$4.65 \pm 1.85 \times 10^5$
เมล็ดกาแฟกะลา			
แม่หลอด	MK1	$4.00 \pm 3.50 \times 10^4$	
	MK2	$5.90 \pm 5.10 \times 10^4$	$6.30 \pm 2.06 \times 10^4$
	MK3	$9.00 \pm 2.00 \times 10^4$	
ตีนตก	TK	$76.2 \pm 0.25 \times 10^4$	$76.2 \pm 0.25 \times 10^4$

ตารางที่ จ.2 จำนวนไอโซเลตราเหลือ รำดำและรำอื่นๆ ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกาแฟทั้ง 3 ชนิด จากศูนย์วิจัยโครงการหลวงทั้ง 3 แห่ง

ศูนย์	ตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลต		
		รำเหลือ	รำดำ	รำอื่นๆ
แม่หลอด	ผลกาแฟสุก (MC1-3)	0	0	5
	เมล็ดกาแฟหมัก (MF1-4)	0	3	16
	เมล็ดกาแฟกะลา (MK1-3)	15	11	33
ตีนตก	ผลกาแฟสุก (TC1-2)	0	0	6
	เมล็ดกาแฟหมัก (TF)	0	0	4
	เมล็ดกาแฟกะลา (TK)	9	4	7
ป่าเมี่ยง	ผลกาแฟสุก (PC)	0	0	2
	เมล็ดกาแฟหมัก (PF)	0	3	2
	*ไม่มีตัวอย่างเมล็ดกาแฟกะลา			
รวม	(120 ไอโซเลต)	24	21	75

ตารางที่ จ.3 การผลิตโอคราทอกซินเอบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ของ *Aspergillus section Circumdati*

ชื่อตัวอย่าง	ปริมาณโอคราทอกซินเอ (นาโนกรัมต่อกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อ)	ปริมาณโอคราทอกซินเอเฉลี่ย (นาโนกรัมต่อกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อ)	SD
MK3I5#1	16.31	13.09	3.22
MK3I5#2	9.87		
MK3I6#1	12.49	14.12	1.64
MK3I6#2	15.76		
MK3I9#1	12.24	11.16	1.09
MK3I9#2	10.07		
MK1I6#1	1.64	1.26	0.38
MK1I6#2	0.88		
MK3I19#1	8.73	8.81	0.08
MK3I19#2	8.89		
MK2I6#1	6.93	4.51	2.42
MK2I6#2	2.10		
TKI5#1	1.58	2.86	1.29
TKI5#2	4.15		
TKI7#1	68.36	35.47	32.88
TKI7#2	2.59		
TKI9#1	65.41	74.69	9.28
TKI9#2	83.97		
TKI6#1	40.96	36.64	4.31
TKI6#2	32.33		

*หมายเหตุ #1 และ #2 ด้านหลังชื่อตัวอย่าง คือ การสกัดครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ จ.4 การผลิตโอคราทอกซินเอบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA ของ *Aspergillus section Nigri*

ชื่อตัวอย่าง	ปริมาณโอคราทอกซินเอ (นาโนกรัมต่อกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อ)	ปริมาณโอคราทอกซินเอเฉลี่ย (นาโนกรัมต่อกรัมของอาหารเลี้ยงเชื้อ)	SD
MF2I1#1	4.14	2.67	1.47
MF2I1#2	1.20		
MK1I11#1	11.32	23.78	12.46
MK1I11#2	36.24		
MK2I20#1	35.21	29.94	5.27
MK2I20#2	24.67		
MK3I27#1	14.79	8.68	6.11
MK3I27#2	2.57		
PFI2#1	28.64	19.70	8.95
PFI2#2	10.75		
MK1I8#1	20.36	11.86	8.50
MK1I8#2	3.36		
MK2I8#1	4.00	5.11	1.11
MK2I8#2	6.21		
MK1I16#1	20.28	14.88	5.40
MK1I16#2	9.48		
MK3I23#1	3.31	13.53	10.22
MK3I23#2	23.76		
TKI18#1	0.00	3.76	3.76
TKI18#2	7.52		
TKI19#1	2.03	2.32	0.29
TKI19#2	2.61		
TKI20#1	77.08	46.63	30.44
TKI20#2	16.19		

*หมายเหตุ #1 และ #2 ด้านหลังชื่อตัวอย่าง คือ การสกัดครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ