รายงานโครงการวิจัย

โครงการการลดความสูญเสียในผลิตผลเกษตรจากโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวด้วยวิธีปลอดภัย

Reducing Post-Harvest Losses Caused by Plant Disease Using Safe Methods

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวบุญญวดี จิระวุฒิ

MS. BOONYAWADEE CHIRAWUT

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2564

รายงานโครงการวิจัย

โครงการการลดความสูญเสียในผลิตผลเกษตรจากโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยว ด้วยวิธีปลอดภัย

Reducing Post-Harvest Losses Caused by Plant Disease Using Safe Methods

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวบุญญวดี จิระวุฒิ

MS. BOONYAWADEE CHIRAWUT

กรมวิชาการเกษตร

ปี พ.ศ. 2564

คำปรารภ

โรคพืชและสารพิษหลังการเก็บเกี่ยวเป็นปัญหาสำคัญของผลิตผลทางการเกษตร การหาแนวทางในการควบคุมโรคพืช ลดการเข้าทำลายของเชื้อราและการปนเปื้อนของเชื้อราที่สร้างสารพิษ ตั้งแต่แปลงปลูก ขั้นตอนการเก็บเกี่ยว โรงคัดบรรจุ ขนส่ง จนถึงวางจำหน่าย เพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดี มีคุณภาพ และในปริมาณที่คุ้มค่าในเชิงธุรกิจ รวมไปถึงผู้ประกอบการได้ให้ความสำคัญกับคุณภาพและการลดการสูญเสียของผลผลิต ความปลอดภัยของผู้บริโภค จึงมีความจำเป็นต้องมีการวิจัยและพัฒนาวิธีการควบคุมโรคพืชในผลิตผลเกษตร การหาแนวทางการลดการปนเปื้อนเชื้อราที่สร้างสารพิษ เพื่อลดปริมาณสารพิษหลังการเก็บรักษา รวมถึงการพัฒนาชุดตรวจสอบสารพิษกับผลิตผลเกษตร เพื่อให้ได้เทคโนโลยีที่เหมาะสม ปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค

จากปัญหาดังกล่าวคณะผู้วิจัย จึงได้ดำเนินโครงการวิจัย “การลดความสูญเสียในผลิตผลเกษตรจากโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวด้วยวิธีปลอดภัย” โดยศึกษาวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาพริกขี้หนู ลดการปนเปื้อนของเชื้อราและโรคแอนแทรคโนส ควบคุมโรคผลเน่าของส้มด้วยวิธีที่ปลอดภัย ผลของวิธีการตากและเวลาการเก็บรักษาต่อการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงหลังการเก็บเกี่ยว การใช้น้ำกระเทียมสดเพื่อลดการปนเปื้อนเชื้อราและสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้ง และ พัฒนาวิธีตรวจสอบโอคราทอกซิน เอ แบบ strip test โดยเทคนิค Lateral Flow immunoassay เพื่อควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยว ลดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อรา ยืดอายุการเก็บรักษาผลิตผลเกษตร ให้คงความสด ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

สุดท้ายนี้คณะผู้วิจัยหวังว่าผลการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ จะเป็นประโยชน์แก่ผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในทุกภาคส่วนตั้งแต่ภาคเอกชน เกษตรกร นักศึกษา และประชาชนผู้สนใจทั่วไป

นางสาวบุญญวดี จิระวุฒิ
หัวหน้าโครงการวิจัย
14 กุมภาพันธ์ 2565

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... 1

ผู้วิจัย 2

บทนำ..... 3

บทคัดย่อ..... 5

กิจกรรมที่ 1 การควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวโดยผสมผสานวิธีการ 7

กิจกรรมที่ 2 วิธีการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษ 30

กิจกรรมที่ 3 พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา 53

บทสรุปและข้อเสนอแนะ..... 62

บรรณานุกรม..... 63

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว) ที่ได้มอบเงินอุดหนุนเพื่อทำการวิจัยโครงการนี้ รวมทั้งคณะกรรมการที่ปรึกษาวิชาการ คณะกรรมการบริหารงานวิจัย กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร คณะกรรมการที่ปรึกษาด้านวิชาการกรมวิชาการเกษตร คณะกรรมการบริหารงานวิจัยและพัฒนากรมวิชาการเกษตร ที่ให้คำแนะนำ กลั่นกรอง และช่วยเหลือแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณข้าราชการ ลูกจ้างประจำ พนักงานราชการ และพนักงานจ้างเหมาฯ ของกองวิจัยพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร ทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ สนับสนุนและช่วยเหลือ ตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ ให้โครงการนี้สำเร็จตามวัตถุประสงค์ ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาส

กรมวิชาการเกษตร

ผู้วิจัย

นางสาวบุญญวดี จิระวุฒิ
Boonyawadee Chirawut

นางสาวศุภรา อัคคะสาระกุล
Suppara Akkasarakul

นางรัตตา สุทธยาคม
Ratta suttayakom

นางสาวสุพี วนศิรากุล
Su-phi Wanasirakul

นางสาววีรภรณ์ เดชนำบัญชาชัย
Weeraporn Dejnumbunchachai

นางสาวเนตรา สมบูรณ์แก้ว
Nettra Somboonkaew[2]

นางสาวอัจฉราพร
Atcharaporn Srijudanu

นางสาวมัทนา วานิชย์
Mattana Wanitch

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

โรคหลังการเก็บเกี่ยวและสารพิษจากเชื้อรา เป็นปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดความความสูญเสียของผลผลิตหลังการเก็บเกี่ยว ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ในแปลงปลูก ระหว่างการเก็บเกี่ยว ขนส่ง ระยะการเก็บรักษา รวมถึงการวางจำหน่ายด้วย การควบคุมโรคพืชผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวโดยหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีอันตรายหรือใช้สารกำจัดศัตรูพืชอย่างปลอดภัย สามารถทำได้ด้วยวิธีการทางเลือกต่างๆ อาทิเช่น การใช้สารเคมีในกลุ่มปลอดภัย (Generally Recognized As Safe : GRAS) การใช้วิธีการทางกายภาพ การใช้บรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสม เป็นต้น การควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวและยืดอายุการเก็บรักษาผลิตผลทางการเกษตร สามารถใช้หลายวิธีรวมกัน เพื่อให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น เช่น การใช้น้ำร้อนรวมกับสารปลอดภัย การใช้น้ำร้อนรวมกับบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสม นอกจากจะช่วยลดการเข้าทำลายของเชื้อราแล้วยังสามารถยืดอายุการเก็บรักษาและกา รวางจำหน่ายได้นานขึ้น

นอกจากเชื้อราจะเข้าทำลายผลิตผลเกษตรทำให้เกิดการสูญเสียแล้ว ยังพบว่ามีเชื้อราบางชนิดสามารถสร้างสารพิษ (mycotoxins) ก่อให้เกิดอันตรายต่อทั้งคนและสัตว์ เมื่อมีการบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษเข้าไป โดยสามารถก่อให้เกิดอันตรายทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง สารพิษจากเชื้อราเป็น toxic secondary metabolites เช่น แอฟลาทอกซิน โอคราทอกซิน ฟูโมนิซิน และพาทูลิน เป็นต้น สารแอฟลาทอกซินเป็นสารพิษที่พบทั่วไปในผลิตผลเกษตร ได้แก่ ถั่วลิสง พริกแห้ง ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ เป็นต้น สารแอฟลาทอกซินที่พบตามธรรมชาติและมีความเป็นพิษสูง คือ B1 เกิดจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* เป็นสารพิษที่ทนความร้อนได้ถึง 268 องศาเซลเซียส ดังนั้นขั้นตอนการเก็บเกี่ยวจนถึงหลังการเก็บเกี่ยวที่ดีจะช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อราและปริมาณสารพิษจากเชื้อราได้ ดังนั้นควรมีการศึกษาขั้นตอนต่างๆ เช่น วิธีการตากผลิตผลเกษตรเพื่อลดความชื้น จนถึงบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษา เพื่อให้ได้ถั่วลิสงและพริกแห้งที่มีคุณภาพและปลอดภัยต่อผู้บริโภค

การพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราแบบรวดเร็วถือเป็นมาตรการหนึ่งที่แก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษในผลิตผลเกษตร ปัจจุบันโอคราทอกซิน เอ เป็นสารพิษที่มีปัญหาตรวจพบการปนเปื้อนมากขึ้นทั้งในพริก เครื่องเทศ ธัญพืช กาแฟ และไวน์ เป็นต้น ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธีรวดเร็ว เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์โดยไม่ต้องนำเข้าชุดทดสอบจากต่างประเทศ รวมทั้งสามารถตรวจวิเคราะห์ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ เทคนิค Immunochromatographic ที่เรียกว่า Lateral Flow Immunoassay Strip Test เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ตรวจสอบสารพิษในผลิตเกษตร โดยใช้เวลาในการตรวจสอบรวดเร็ว สะดวกต่อการนำไปใช้ ผลการวิเคราะห์จะบอกได้ในเชิงคุณภาพ สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตร ทั้งผลิตผลที่มีการนำเข้าและส่งออก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการคัดกรองผลิตผลเกษตรในเบื้องต้นได้

โครงการวิจัย “การลดความสูญเสียในผลิตผลเกษตรจากโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวด้วยวิธีปลอดภัย” มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาผลพริกขี้หนู ลดการปนเปื้อนของเชื้อราและโรคแอนแทรคโนส การควบคุมโรคผลเน่าของส้มด้วยวิธีปลอดภัย การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และสารแอฟลาทอกซิน บี1 ในถั่วลิสง และพริกแห้งด้วยวิธีปลอดภัย พัฒนาชุดตรวจสอบโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี

กรมวิทยาศาสตร์

Lateral Floe Immunoassay เพื่อให้ได้แนวทางการควบคุมโรคและสารพิษจากเชื้อรา การตรวจสอบสารพิษ ที่สามารนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

คำสำคัญ (Key words)

การควบคุม, การปนเปื้อน, การยับยั้ง, สารพิษจากเชื้อรา,พริกขี้หนู, พริกแห้ง, ถั่วลิสง, ส้ม, น้ำร้อน, โรคแอนแทรคโนส, อะฟลาทอกซิน, โอคราทอกซิน เอ หลังเก็บเกี่ยว, การยืดอายุการเก็บรักษา, วิธีปลอดภัย, โรคผลเน่า, สารกลุ่มปลอดภัย, น้ำร้อน, บรรจุภัณฑ์

control, contamination, inhibition, mycotoxins, *Aspergillus* spp., peanut, dried chili, pepper, hot water, anthracnose disease, aflatoxin, ochratoxin A postharvest, Generally Recognized as Safe (GRAS), *Penicillium digitatum*, Heat treatment, packaging

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

โรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวเป็นสาเหตุสำคัญการของสูญเสียของผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยว ดังนั้นวิธีการควบคุมที่มีประสิทธิภาพและปลอดภัยจึงมีความจำเป็น “โครงการการลดความสูญเสียในผลิตผลเกษตรจากโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวด้วยวิธีปลอดภัย” ดำเนินการระหว่างปี พ.ศ. 2564 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาศึกษาวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาผลพริกขี้หนูและลดการปนเปื้อนของเชื้อราและโรคแอนแทรคโนส การควบคุมโรคผลเน่าของส้มด้วยวิธีปลอดภัย ศึกษาวิธีการตากร่วมกับระยะเวลาการเก็บรักษาถั่วลิสงที่เหมาะสม เพื่อลดการปนเปื้อน AFB1 และคงคุณภาพของเมล็ด ทำการศึกษาผลของน้ำคั้นกระเทียมสดต่อปริมาณการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้ง และพัฒนาชุดตรวจสอบโอคราทอกซิน เอ โดยวิธี Lateral Floe Immunoassay ประกอบด้วย 5 การทดลอง ภายใต้ 3 กิจกรรม คือ กิจกรรมที่1) การควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวโดยผสมผสานวิธีการ กิจกรรมที่ 2) การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษ และ3) พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา จากการดำเนินการ พบว่า วิธียืดอายุการเก็บรักษาร่วมกับวิธีลดการปนเปื้อนของเชื้อราและโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกขี้หนู สามารถทำได้ 2 วิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของบรรจุภัณฑ์ วิธีที่ 1 ผลพริกจุ่มในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำมาจุ่มต่อในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ บรรจุในถุงพลาสติกพอลิโพรไพลีน (PP) และวิธีที่ 2 ผลพริกจุ่มในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที บรรจุในถาดพลาสติกพอลิโพรไพลีน (PP) หุ้มด้วยฟิล์มพลาสติกพอลิเอทิลีน (PE) ทั้ง 2 วิธี เก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส สามารถรักษาความแน่นเนื้อของผล คงสภาพสีเปลือกได้ดี ยืดอายุการเก็บรักษาได้นานขึ้น เป็นเวลา 28 วัน การควบคุมโรคผลเน่าของส้มเกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* โดยการแช่ผลส้มในน้ำร้อน 55°c นาน 3 นาที ร่วมกับโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 3.00% นาน 5 นาที หรือการแช่ผลส้มในน้ำร้อน 55°c นาน 3 นาที ร่วมกับกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 0.10% นาน 5 นาที ลดการเกิดโรคและดัชนีการเกิดโรคได้ 100% ส่วนการลดการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินใน ถั่วลิสง และพริกแห้ง พบว่าวิธีการตากและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซินบี1 ในถั่วลิสงหลังการเก็บเกี่ยว โดยทดสอบวิธีการตากเพื่อลดความชื้น 3 วิธี คือ 1) ใช้เครื่องอบลมร้อน 2) ตากบนตะแกรงตากในโรงเรือน 3) ตากบนลานปูน พบว่า หลังการตากทั้ง 3 วิธี ถั่วลิสงที่ได้มีความชื้นเมล็ดต่ำกว่า 9% โดยวิธีที่ 2 มีการปนเปื้อน AFB1 มากที่สุด และการเก็บรักษาถั่วลิสงไม่ควรนานเกิน 3 เดือน และผลของน้ำคั้นกระเทียมสดต่อคุณภาพของพริกแห้ง เก็บที่อุณหภูมิ 29.7°C ความชื้นสัมพัทธ์ 66.8% นาน 35 วัน ในพริกแห้งที่เติมน้ำคั้นกระเทียมก่อนเติมเชื้อ *A. flavus* พบสารอะฟลาทอกซิน 6.19 µg/kg และ 7.23 µg/kg ในพริกแห้งที่ไม่เติมน้ำคั้นกระเทียม ซึ่งน้ำคั้นกระเทียมมีผลให้การสร้างสารอะฟลาทอกซินลดลง 14.38% การตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธี Lateral Flow Immunoassay test strip เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตรเบื้องต้นอย่างรวดเร็ว โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง (colloidal gold-labeled antibody) แอนติเจนหรือสารพิษในตัวอย่างจะแข่งขันกับแอนติเจนที่เชื่อมติดกับโปรตีนซึ่งตรึงอยู่บนแถบกระดาษในการจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง การอ่านผลจะดูจากการเกิดสีที่เส้นทดสอบ (T) และเส้นควบคุม (C) ถ้าในตัวอย่างมีสารพิษปนเปื้อนอยู่จะไม่พบสีหรือพบสีจางที่เส้นทดสอบ

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Post-harvest disease is a major cause of post-harvest losses, the study of effective and safe control methods is essential. The Project “Reducing Post-Harvest Losses Caused by Plant Diseases Using Safe Methods", conducted during 2021. The objective of this research is to find the most effective method to control anthracnose disease in fresh chilies, to control postharvest rot of citrus using generally recognized as safe (GRAS) substances combined with heat treatment, to determine the appropriate drying method for peanut in conjunction with storage time to minimize the contamination of AFB1 and maintain quality of peanut, the effect of fresh garlic juice on the aflatoxin content of dried chili and lateral flow immunoassay test strip was developed for the detection of ochratoxin A (OTA) in agricultural products. The project consisting of 5 experiments devided into 3 activities as follows. 1) c

ontrol of postharvest disease by combination method 2) methods for controlling fungal contamination and mycotoxin and 3) developing a method for analyzing mycotoxins. The results of the project showed The hot water dip treatment could be used in combination with one of the following packaging processes: 1) polypropylene (PP) plastic bag after harvest 1.5% calcium chloride dip treatment ; and 2) polypropylene (PP) punnet with polyethylene (PE) plastic wrap. In these processes, the storage temperature was set at 10 degree celsius. To increase efficiency of disease inhibition, GRAS combined with heat treatment citrus soaking in 55°c for 3 minute of 3.00% sodium bicarbonate for 5 minute or citrus soaking in 55°c for 3 minute of 0.10% salicylic acid for 5 minute reduced incidence and disease index of green mold disease for 100% . Peanuts were dried using three different methods *viz.* 1) dried with hot air oven 2) dried in greenhouse, and 3) dried on cement ground before being kept at ambient air for 4 months. The results showed that moisture contents of all treated peanut were lower than 9%. Although AFB1 levels (7 µg/kg) from greenhouse were higher than other treatments. After that, the effect of garlic juice on the quality of dried chili was tested store at 29.7˚C, 66.8% relative humidity for 35 days in dried chilies added with garlic juice before inoculating *A. flavus* contained aflatoxin 6.19 µg/kg and 7.23 µg/kg in dried chilies without garlic juice added, which garlic juice had reduced aflatoxin production by 14.38%. Lateral flow immunoassay test strip was developed for the detection of ochratoxin A (OTA) in agricultural products. The detection is based on the competition of OTA in sample and OTA-protein conjugate immobilized on test strip for the binding to colloidal gold-labeled OTA antibodies. The results can be observed from the presence of purple red color in the test line (T)

กิจกรรมที่ 1

การควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวโดยผสมผสานวิธีการ
Control of Postharvest Disease by Combination Method

บุญญวดี จิระวุฒิ วีรภรณ์ เดชนำบัญชาชัย และ รัตตา สุทธยาคม

คำสำคัญ: การยืดอายุ พริกขี้หนู โรคแอนแทรคโนส, ส้ม โรคผลเน่าสีเขียว สารปลอดภัย น้ำร้อน

Key words: anthracnose, chili., shelf life, citrus, green mould rot, Generally Recognized as Safe, heat Treatment

กรมวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

โรคหลังการเก็บเกี่ยวเป็นปัญหาสำคัญก่อให้เกิดการสูญเสียหลังการเก็บเกี่ยว การควบคุมโรคส่วนใหญ่ยังคงใช้สารเคมีซึ่งเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม วัตถุประสงค์ของกิจกรรมนี้เพื่อหาวิธีการควบคุมโรคแอนแทรคโนสและลดการปนเปื้อนของเชื้อราบนผลพริกขี้หนูที่มีประสิทธิภาพ และเพื่อหาสารปลอดภัยร่วมกับน้ำร้อนในการควบคุมโรคผลเน่าของส้ม พบว่า การจุ่มผลพริกในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดีในการลดการปนเปื้อนเชื้อราและโรคแอนแทรคโนสของพริกขี้หนู เมื่อนำวิธีการจุ่มผลพริกในน้ำร้อนมาใช้ร่วมกับวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาที่มีประสิทธิภาพ ทำให้ผลพริกมีคุณภาพดี สามารถทำได้ 2 วิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของบรรจุภัณฑ์ วิธีที่ 1 ผลพริกจุ่มในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำมาจุ่มต่อในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ บรรจุในถุงพลาสติกพอลิโพรไพลีน (PP) และวิธีที่ 2 ผลพริกจุ่มในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที บรรจุในถาดพลาสติกพอลิโพรไพลีน (PP) หุ้มด้วยฟิล์มพลาสติกพอลิเอทิลีน (PE) ทั้ง 2 วิธี เก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส สามารถรักษาความแน่นเนื้อของผล คงสภาพสีเปลือกได้ดี ยืดอายุการเก็บรักษาได้นานขึ้น เป็นเวลา 28 วัน

ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของสารปลอดภัยในการควบคุมโรคผลเน่าของส้ม 2 ชนิด คือ กรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 0.01% 0.05% และ 0.10% และโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 1.00% 2.00% และ 3.00% โดยเปรียบเทียบกับน้ำ สารเคมีโพรคลอราซความเข้มข้น 0.025% และสารเคมีอิมาซาลิล 0.05% วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ในการควบคุม โรคผลเน่าบนผลส้มที่มีการปลูกเชื้อรา *Penicillium digitatum* เป็นเวลา 24 ชม. พบว่าการแช่ผลส้มในโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 3.00% นาน 5 นาที และ กรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 0.01% นาน 5 นาที ลดการเกิดโรคได้ 50% และ 52.08% ดัชนีการเกิดโรคได้ 12.5% และ 13.02% เพื่อประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าจึงทดลองใช้สารปลอดภัยร่วมกับน้ำร้อนและพบว่า การแช่ผลส้มในน้ำร้อน 55°c นาน 3 นาที ร่วมกับโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 3.00% นาน 5 นาที หรือการแช่ผลส้มในน้ำร้อน 55°c นาน 3 นาที ร่วมกับกรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 0.10% นาน 5 นาที ลดการเกิดโรคและดัชนีการเกิดโรคได้ 100%

Abstract

Postharvest disease is considered as a major cause of postharvest losses. Current control of the said disease depends on chemical fungicides which are harmful to health of living things and environment. This research examined methods for shelf-life extension of fresh chilies, and to reduce fungal contamination and anthracnose disease in fresh chilies. and to control postharvest rot of citrus using generally recognized as safe (GRAS) substances combined with heat treatment. Dipping fresh chilies in hot water at 52°C water for 3 minutes was found to be effective in reducing fungal contamination and anthracnose disease. The hot water dip treatment could be used in combination with one of the following packaging processes: 1) polypropylene (PP) plastic bag after harvest 1.5% calcium chloride dip treatment ; and 2) polypropylene (PP) punnet with polyethylene (PE) plastic wrap. In these processes, the storage temperature was set at 10 degree celsius. Both packaging methods could preserve firmness and color of fresh chilies, as well as extend their shelf life. Thus, producers can use the hot water dip treatment in conjunction with either packaging processes identified above in order to maintain the quality of their fresh chili products for 28 days.

The GRAS substances had efficacy to control green mould rot disease of pre inocutated treatment 24 hr, then citrus fruits were soak in salicylic acid at concentrations of 0.01, 0.05 and 0.10% and sodium bicarbonate at concentration of 1.00, 2.00 and 3.00% compared with Soaking in prochlaraz solutions at 0.025% and imazalil solutions at 0.05% or water. The experimental design was completely randomized design (CRD). Although, Soaking citrus fruit 3.00% sodium bicarbonate and 0.10% salicylic acid solution for 5 minute significantly reduced incidence of green mold disease for 50% and 52.08% with 12.5% and 13.02% disease index. To increase efficiency of disease inhibition, GRAS combined with heat treatment citrus soaking in 55°c for 3 minute of 3.00% sodium bicarbonate for 5 minute or citrus soaking in 55°c for 3 minute of 0.10% salicylic acid for 5 minute reduced incidence and disease index of green mold disease for 100%

บทนำ

การควบคุมโรคผักและผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวเป็นสิ่งสำคัญ ทำให้ผักผลไม้มีคุณภาพดี ลดการเน่าเสียระหว่างการขนส่งและการวางจำหน่าย การควบคุมโรคส่วนใหญ่ยังคงใช้สารเคมี เช่น สารเคมีโพรคลอราซ และคาร์เบนดาซิม ซึ่งพบรายงานการตกค้างในผลผลิตส้ม นอกจากจะเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อมแล้ว มักเป็นข้อจำกัดของการส่งออกผลไม้ ในปัจจุบันเริ่มเห็นความสำคัญเรื่องความปลอดภัยของผู้บริโภค ผู้ผลิตให้ความสำคัญต่อการลดการใช้สารเคมีในขบวนการผลิตตั้งแต่แปลงปลูกจนถึงผู้บริโภค การควบคุมโรคของผักผลไม้หลังการเก็บเกี่ยวในปัจจุบัน มุ่งเน้นเรื่องความปลอดภัยของผู้บริโภคเป็นหลัก ผู้ผลิตให้ความสำคัญต่อการลดการใช้สารเคมีในขบวนการผลิต จึงได้มีการศึกษาวิจัยหาวิธีการอื่นๆ ได้แก่ การใช้สารปลอดภัย น้ำร้อน รังสียูวีซี สมุนไพร และการใช้น้ำร้อนร่วมกับสารปลอกภัย เป็นต้น มาใช้ในการควบคุมการเข้าทำลายของเชื้อรา และลดการเกิดโรคหลังการเก็บเกี่ยว การใช้น้ำร้อนเป็นการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคที่มีประสิทธิภาพ สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อรา และการเข้าทำลายแบบแฝงของเชื้อราที่บริเวณผิว หรือเนื้อเยื่อชั้นที่อยู่ใต้เปลือกของผลไม้หรือผัก ผลไม้และผักสามารถทนต่อการสัมผัสน้ำที่มีอุณหภูมิ 50-60 °C ได้นานถึง 10 นาที ซึ่งช่วงอุณหภูมินี้ในระยะเวลาที่สั้นกว่าสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคหลังเก็บเกี่ยวได้ (Barkai-Golan and Phillips. 1991) การใช้ความร้อนเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ให้ผลดีในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสและลดการปนเปื้อนของเชื้อราที่ขั้วและก้านของผลพริกหลังการเก็บเกี่ยว การจุ่มผลพริกในน้ำร้อน 50-52 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที และการเก็บรักษาที่ 5-10 องศาเซลเซียส สามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. ที่เกิดจากการปลูกเชื้อราบนผลพริกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งเป็นเชื้อราที่พบปนเปื้อนบนขั้วและก้านของพริกขี้หนูแดง (บุญญวดีและคณะ, 2562) และน้ำร้อน 50-52 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้ดี และไม่ทำให้คุณภาพของผลพริกเสียหาย งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาผลพริกขี้หนูร่วมกับวิธีการลดการปนเปื้อนของเชื้อราและโรคแอนแทรคโนสของพริกขี้หนูหลังการเก็บเกี่ยว บูรณี (2548) รายงานว่าการจุ่มผลส้มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50, 52, 54 และ 56 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที สามารถลดการเข้าทำลายของโรค green mold เชื้อรา *Penicillium digitatum* ในส้มสายน้ำผึ้ง โดยพบการเกิดโรคร้อยละ 75.0, 66.7, 43.3 และ 20.0 ตามลำดับ ขณะที่การใช้น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ร่วมกับ imazalil ที่ความเข้มข้น 500 ppm. นาน 2 นาที ยับยั้งการเกิดโรคได้เข้มข้นร้อยละ 100 ขณะที่ Palou *et al*. (2001) ได้รายงานผลการใช้สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ควบคุมโรค blue mold เกิดจากเชื้อราสาเหตุ *P. italicum* บนผลส้ม โดยพบว่า โซเดียมไบคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลในการควบคุมเชื้อรา *P. italicum* ในขณะที่โซเดียมไบคาร์บอเนต 1 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถควบคุมเชื้อได้ ต่อมาได้ทดลองผลร่วมระหว่างน้ำร้อนโซเดียมคาร์บอเนต และโซเดียมไบคาร์บอเนต พบว่าการจุ่มผลส้มในโซเดียมคาร์บอเนต 3 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำร้อน 50 องศาเซลเซียส นาน 150 วินาที สามารถควบคุมโรค green mold และ blue mold ได้สมบูรณ์ โดยไม่เกิดความเสียหายต่อผลส้ม ในขณะที่การจุ่มผลส้มในโซเดียมไบคาร์บอเนต 3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิปกตินาน 60 หรือ 150 วินาที จะช่วยลดการเกิดโรคทั้งสองชนิดได้ 40-60 เปอร์เซ็นต์ (Palou *et al*., 2002)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย

ในกิจกรรมนี้ได้ดำเนินการวิจัยเพื่อการพัฒนาวิธีการควบคุมโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวด้วยวิธีปลอดภัย โดยการผสมผสานวิธีการใช้น้ำร้อน สารปลอดภัย และบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวมีคุณภาพดี ลดการสูญเสีย เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและเพิ่มศักยภาพในการส่งออกต่างประเทศ

ระเบียบวิธีการวิจัย

การทดลองที่ 1.1 วิธีการยืดอายุการเก็บรักษาพริกขี้หนูสดเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อราและโรคแอนแทรคโนส

1. แยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกขี้หนูแดง

นำผลพริกขี้หนูแดงที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส มาแยกเชื้อราสาเหตุ ด้วยวิธี tissue transplanting โดยการตัดเนื้อเยื่อของผลพริกที่เป็นโรคบริเวณรอยต่อระหว่างเนื้อเยื่อปกติและเนื้อเยื่อที่แสดงอาการของโรค ขนาด 5x5 ตารางมิลลิเมตร นำชิ้นเนื้อเยื่อแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ (clorox) 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที แล้วนำมาวางในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ใน slant agar เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. ทดสอบวิธีการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกขี้หนูสด

คัดเลือกผลพริกขี้หนูแดงพันธุ์จินดาที่สมบูรณ์ ปลูกเชื้อรา *Colletotrichum capsici* โดยทำแผลลึกประมาณ 1 มิลลิเมตร. หยดสารแขวนลอยสปอร์ *C. capsici* บนแผล 5 ไมโครลิตร คลุมด้วยถุงพลาสติกที่พ่นด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำผลพริกมาทดสอบกับกรรมวิธีต่างๆ ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่จุ่มน้ำ และสารเคมีโพคลอราช 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 3 นาที ผึ่งให้แห้ง บรรจุผลพริกในถาดพลาสติกโพลีโพรพิลีน (PP) หุ้มด้วยฟิลม์พลาสติกโพลิเอธิลีน (PE) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) เปรียบเทียบ 6 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำๆ ละ 10 ผล

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม (น้ำ เป็นเวลา 3 นาที)
กรรมวิธีที่ 2 โพคลอราช 100 มก./ล. เป็นเวลา 3 นาที
กรรมวิธีที่ 3 กรดซาลิไซลิก 500 มก./ล. เป็นเวลา 3 นาที
กรรมวิธีที่ 4 น้ำร้อน 52 ^{o}ซ เป็นเวลา 3 นาที
กรรมวิธีที่ 5 น้ำร้อน 52 ^{o}ซ เป็นเวลา 5 นาที
กรรมวิธีที่ 6 ฉายรังสียูวีซี เป็นเวลา 30 นาที (4.68 กิโลจูล/เมตร^{2})

<u>บันทึกข้อมูล</u> ความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนส (เซนติเมตร) โดยวัดขนาดของแผลที่มีการเข้าทำลายของเชื้อรา และการเกิดโรคแอนแทรคโนส (เปอร์เซ็นต์)

$$\text{การเกิดโรคแอนแทรคโนส (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนผลที่เป็นโรคแอนแทรคโนส}}{\text{จำนวนผลพริกทั้งหมด}} \times 100$$

กรมวิชาการเกษตร

3. ทดสอบวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาร่วมกับวิธีการควบคุมโรคแอนแทรคโนสและลดการปนเปื้อนเชื้อราบนผลพริกขี้หนูสด

3.1 ศึกษาผลของวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาร่วมกับวิธีการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพและการปนเปื้อนของเชื้อราบนผลพริกขี้หนูหลังการเก็บเกี่ยว

คัดเลือกผลพริกขี้หนูแดงพันธุ์จินดาสมบูรณ์ นำมาทดสอบวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาที่มีประสิทธิภาพ (จากงานวิจัยปี 2563 เรื่อง เทคโนโลยีการยืดอายุพริกขี้หนูสดให้ปลอดจากการปนเปื้อนของเชื้อราเพื่อการส่งออก) และการควบคุมโรคแอนแทรคโนสและลดการปนเปื้อนเชื้อรา (จากข้อ 2) เปรียบเทียบกับผลพริกขี้หนูจุ่มน้ำ เป็นเวลา 3 นาที และผลพริกที่จุ่มสารเคมีโพรคลอราช 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 3 นาที ผึ่งผลพริกให้แห้ง กรรมวิธีที่ 1-4 บรรจุในถาดพลาสติกโพลีโพรพิลีน (PP) หุ้มด้วยฟิลม์พลาสติกโพลิเอธิลีน (PE) และกรรมวิธีที่ 5 บรรจุในถุงพลาสติกโพลีโพรพิลีน (PP) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) เปรียบเทียบ 5 กรรมวิธี จำนวน 5 ซ้ำๆ ละ 25 ผล

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม (น้ำ เป็นเวลา 3 นาที)

กรรมวิธีที่ 2 โพคลอราช 100 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 3 นาที

กรรมวิธีที่ 3 น้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

กรรมวิธีที่ 4 น้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที

กรรมวิธีที่ 5 น้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที บรรจุในถุงพลาสติกโพลีโพรพิลีน (PP)

<u>บันทึกข้อมูล</u> วันที่ 7 14 21 และ 28 ของการเก็บรักษา

1. จำนวนผลพริกที่มีเชื้อราที่ก้านผล (เปอร์เซ็นต์)
2. คุณภาพของผลพริกขี้หนูหลังการเก็บรักษา

- การสูญเสียน้ำหนัก โดยชั่งน้ำหนักของผลพริกหวานก่อนและหลังการเก็บรักษา นำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักจากสูตร

$$\text{การสูญเสียน้ำหนัก (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(\text{น้ำหนักก่อนเก็บรักษา} - \text{น้ำหนักหลังเก็บรักษา}) \times 100}{\text{น้ำหนักก่อนเก็บรักษา}}$$

- ความแน่นเนื้อ (นิวตัน) โดยใช้เครื่อง texture analyzer ยี่ห้อ Chatillon รุ่น 10 LBF ประเทศสหรัฐอเมริกา

- การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกของผลพริก ด้วยเครื่องวัดสียี่ห้อ Hunter lab รุ่น Miniscan EZรายงานผลเป็นค่า ค่า L เป็นค่าที่รายงานถึงความสว่างของสี ค่า a เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีเขียว-แดง และ ค่า b เป็นค่าที่รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีน้ำเงิน-เหลือง

3.2 ศึกษาผลของวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาร่วมกับวิธีการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนส

กรมวิชาการเกษตร

คัดเลือกผลพริกขี้หนูแดงพันธุ์จินดาที่สมบูรณ์ ปลูกเชื้อรา *Colletotrichum capsici* โดยวิธีการทำแผลเช่นเดียวกับข้อ 2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำผลพริกมาทดสอบกับกรรมวิธีต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.1 ผึ่งผลพริกให้แห้ง กรรมวิธีที่ 1-4 บรรจุในถาดพลาสติกโพลีโพรพิลีน (PP) หุ้มด้วยฟิลม์พลาสติกโพลิเอธิลีน (PE) ส่วนกรรมวิธีที่ 5 บรรจุในถุงพลาสติกโพลีโพรพิลีน (PP) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) เปรียบเทียบ 5 กรรมวิธี เช่นเดียวกับข้อ 3.1 จำนวน 5 ซ้ำๆ ละ 10 ผล

<u>บันทึกข้อมูล</u> วันที่ 14 21 และ 28 ของการเก็บรักษา

ความรุนแรงของโรคแอนแทรคโนส (เปอร์เซ็นต์) โดยวัดขนาดของแผลที่มีการเข้าทำลายของเชื้อรา และการเกิดโรคแอนแทรคโนส (เปอร์เซ็นต์) โดยนับจำนวนผลที่เป็นโรค

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาผลของสารกลุ่มปลอดภัยร่วมกับน้ำร้อนในการควบคุมโรคผลเน่าของส้มจากเชื้อรา *Penicillium digitatum*

1. แยกเชื้อและจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของส้ม

เก็บตัวอย่างผลส้มที่เน่าเสียหลังเก็บเกี่ยวมาแยกเชื้อราสาเหตุโรค ด้วยวิธี tissue transplanting method บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ จากนั้นจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าของส้ม เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. ทดสอบประสิทธิภาพการใช้สารกลุ่มปลอดภัย ในการควบคุมโรคผลเน่าบนผลส้ม

คัดเลือกส้มสายน้ำผึ้ง จากสวนในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยคัดเลือกลักษณะผลที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ไม่มีตำหนิหรือบาดแผล ผิวสีเหลืองสม่ำเสมอ ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า ผึ่งให้แห้ง นำมาเรียงใส่ตะกร้าพลาสติก จากนั้นปลูกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าลงบนผลส้ม โดยทำแผลผลส้มด้วยเข็มที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะลงบนผลส้ม ห่างจากขั้วผล 1 เซนติเมตร ทั้งสองข้างของผลส้ม ลึกประมาณ 0.2 มิลลิเมตร หยดสปอร์แขวนลอยความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 20 ไมโครลิตรต่อ 1 แผล ทำการหยดสปอร์แขวนลอยครั้งละ 10 ไมโครลิตร รอจนแห้งแล้วหยดซ้ำอีก 10 ไมโครลิตร คลุมด้วยถุงพลาสติกที่พ่นด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำผลส้มจุ่มในสารกลุ่มปลอดภัย เป็นเวลา 5 นาที ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำผลส้มเรียงใส่ตะกร้าพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design: CRD) เปรียบเทียบ 9 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำๆละ 12 ผล

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม (น้ำเปล่า)
กรรมวิธีที่ 2 กรดซาลิไซลิก 0.01%
กรรมวิธีที่ 3 กรดซาลิไซลิก 0.05%
กรรมวิธีที่ 4 กรดซาลิไซลิก 0.1%
กรรมวิธีที่ 5 โซเดียมไบคาร์บอเนต 1.0%
กรรมวิธีที่ 6 โซเดียมไบคาร์บอเนต 2.0%
กรรมวิธีที่ 7 โซเดียมไบคาร์บอเนต 3.0%
กรรมวิธีที่ 8 สารเคมีโพรคลอราช 0.025%
กรรมวิธีที่ 9 สารเคมีอิมาซาลิล 0.05%

กรมวิชาการเกษตร

<u>บันทึกข้อมูล</u>

1) การเกิดโรค (%) โดยการนับจำนวนผลส้มที่แสดงอาการโรคต่อจำนวนผลส้มทั้งหมด นำค่าที่ได้มาคำนวณหา % การเกิดโรค โดยใช้สูตรดังต่อไปนี้

% การเกิดโรค = (จำนวนผลส้มที่เป็นโรค/จำนวนผลส้มทั้งหมด) × 100

2) ความรุนแรงของโรค โดยวัดพื้นที่ผิวที่แสดงอาการของโรคเทียบกับพื้นที่ผิวทั้งหมด

ประเมินการเกิดโรค โดยแบ่งระดับความรุนแรง เป็น 5 ระดับ ดังนี้

ระดับ 0= ผลส้มที่ไม่แสดงอาการของโรค

ระดับ 1= ผลส้มที่มีระดับการเกิดโรคเน่าราสีเขียว = 1-25%

ระดับ 2= ผลส้มที่มีระดับการเกิดโรคเน่าราสีเขียว = 26-50%

ระดับ 3= ผลส้มที่มีระดับการเกิดโรคเน่าราสีเขียว = 51-75%

ระดับ 4= ผลส้มที่มีระดับการเกิดโรคเน่าราสีเขียว = 76-100%

จากนั้นคำนวณดัชนีการเกิดโรค (Disease index) ตามสูตรดังนี้

$$\% \text{ Disease Index} = \frac{(na \times 0) + (nb \times 1) + (nc \times 2) + (nd \times 3) + (ne \times 4) \times 100}{N \times 4}$$

เมื่อ na = จำนวนผลส้มที่มีระดับความรุนแรงเท่ากับ 0

nb = จำนวนของผลส้มที่มีระดับความรุนแรงเท่ากับ 1

nc = จำนวนของผลส้มที่มีระดับความรุนแรงเท่ากับ 2

nd = จำนวนของผลส้มที่มีระดับความรุนแรงเท่ากับ 3

ne = จำนวนผลส้มที่มีระดับความรุนแรงเท่ากับ 4

N = จำนวนผลส้มทั้งหมด

เมื่อคำนวณได้ค่าดัชนีของการเกิดโรค (Percent Disease index) แล้วจึงแบ่งระดับความรุนแรงของการเกิดโรคออกเป็น 5 ระดับ คือ

1. ระดับที่ไม่แสดงอาการของโรคหรือไม่เกิดโรคเลย (nil) มีค่าดัชนีของการเกิดโรคเท่ากับ 0%
2. ความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับต่ำ (low) ค่าดัชนีของการเกิดโรคเท่ากับ 1-25%
3. ความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับปานกลาง (medium) ค่าดัชนีของการเกิดโรคเท่ากับ 26-50%
4. ความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับมาก (high) ค่าดัชนีของการเกิดโรคเท่ากับ 51-75%
5. ความรุนแรงของโรคอยู่ในระดับมากที่สุด (very high) ค่าดัชนีของการเกิดโรคเท่ากับ 76-100%

คัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของสารกลุ่มปลอดภัย ที่ประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* ได้ดี เพื่อนำมาทดสอบในการทดลองขั้นต่อไป

3. ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำร้อนในการควบคุมโรคผลเน่าบนผลส้ม

คัดเลือกส้มสายน้ำผึ้ง จากสวนในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยคัดเลือกลักษณะผลที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ไม่มีตำหนิหรือบาดแผล ผิวสีเหลืองสม่ำเสมอ ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า ผึ่งให้แห้ง นำมาเรียงใส่ตะกร้าพลาสติก จากนั้นปลูกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าลงบนผลส้ม โดยทำแผลผลส้มด้วยเข็มที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะลง

กรมวิชาการเกษตร

บนผลส้ม ห่างจากขั้วผล 1 เซนติเมตร ทั้งสองข้างของผลส้ม ลึกประมาณ 0.2 มิลลิเมตร หยดสปอร์แขวนลอยความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 20 ไมโครลิตรต่อ 1 แผล ทำการหยดสปอร์แขวนลอยครั้งละ 10 ไมโครลิตร รอจนแห้งแล้วหยดซ้ำอีก 10 ไมโครลิตร คลุมด้วยถุงพลาสติกที่พ่นด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาจุ่มผลส้มลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิต่างๆ ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำผลส้มเรียงใส่ตะกร้าพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20°C เป็นเวลา 14 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด เปรียบเทียบ 9 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำๆละ 12 ผล

กรรมวิธีที่ 1 กรรมวิธีควบคุม (จุ่มน้ำเปล่า)
กรรมวิธีที่ 2 น้ำร้อนอุณหภูมิ 50 °C นาน 3 นาที
กรรมวิธีที่ 3 น้ำร้อนอุณหภูมิ 50 °C นาน 5 นาที
กรรมวิธีที่ 4 น้ำร้อนอุณหภูมิ 52 °C นาน 3 นาที
กรรมวิธีที่ 5 น้ำร้อนอุณหภูมิ 52 °C นาน 5 นาที
กรรมวิธีที่ 6 น้ำร้อนอุณหภูมิ 55 °C นาน 3 นาที
กรรมวิธีที่ 7 น้ำร้อนอุณหภูมิ 55 °C นาน 5 นาที
กรรมวิธีที่ 8 สารเคมีโพรคลอราช 0.025% นาน 5 นาที
กรรมวิธีที่ 9 สารเคมีอิมาซาลิล 0.05% นาน 5 นาที

<u>บันทึกข้อมูล</u>

1) การเกิดโรค (%) โดยการนับจำนวนผลส้มที่แสดงอาการโรคต่อจำนวนผลส้มทั้งหมด นำค่าที่ได้มาคำนวณหา % การเกิดโรค (เช่นเดียวกับข้อ 2)

2) ความรุนแรงของโรค โดยวัดพื้นที่ผิวที่แสดงอาการของโรคเทียบกับพื้นที่ผิวทั้งหมด โดยใช้หลักการประเมินความรุนแรงของโรค (เช่นเดียวกับข้อ 2)

คัดเลือกอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมที่มีประสิทธิภาพสามารถควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* ได้ดี เพื่อนำมาทดสอบในการทดลองขั้นต่อไป

4. ทดสอบประสิทธิภาพการใช้สารกลุ่มปลอดภัยร่วมกับน้ำร้อน ในการควบคุมโรคผลเน่าบนผลส้ม

คัดเลือกส้มสายน้ำผึ้ง จากสวนในอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยคัดเลือกลักษณะผลที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ไม่มีตำหนิหรือบาดแผล ผิวสีเหลืองสม่ำเสมอ ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่า ผึ่งให้แห้ง นำมาเรียงใส่ตะกร้าพลาสติก จากนั้นปลูกเชื้อราสาเหตุโรคผลเน่าลงบนผลส้ม โดยทำแผลผลส้มด้วยเข็มที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะลงบนผลส้ม ห่างจากขั้วผล 1 เซนติเมตร ทั้งสองข้างของผลส้ม ลึกประมาณ 0.2 มิลลิเมตร หยดสปอร์แขวนลอยความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 20 ไมโครลิตรต่อ 1 แผล ทำการหยดสปอร์แขวนลอยครั้งละ 10 ไมโครลิตร รอจนแห้งแล้วหยดซ้ำอีก 10 ไมโครลิตร คลุมด้วยถุงพลาสติกที่พ่นด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจุ่มผลส้มในสารกลุ่มปลอดภัยร่วมกับน้ำร้อน ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าของส้มที่เกิดจากเชื้อรา *Penicillium digitatum* ได้ดี (คัดเลือกจากผลการทดลองข้อ 2 และ 3) ผึ่งให้แห้ง จากนั้นนำผลส้มเรียงใส่ตะกร้าพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 14 วัน วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด จำนวน 4 ซ้ำๆละ 12 ผล

<u>บันทึกข้อมูล</u>

1) การเกิดโรค (%) โดยการนับจำนวนผลส้มที่แสดงอาการโรคต่อจำนวนผลส้มทั้งหมด นำ (เช่นเดียวกับข้อ 2)

2) ความรุนแรงของโรค โดยวัดพื้นที่ผิวที่แสดงอาการของโรคเทียบกับพื้นที่ผิวทั้งหมด โดยใช้หลักการประเมินความรุนแรงของโรค (เช่นเดียวกับข้อ 2)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การทดลองที่ 1.1 วิธีการยืดอายุการเก็บรักษาพริกขี้หนูสดเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อราและโรคแอนแทรคโนส

1. แยกเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริกขี้หนูแดง

แยกเชื้อราจากผลพริกที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนส นำมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA) พบว่า โคโลนีมีลักษณะกลมขอบเรียบเจริญเป็นวงแหวน (concentric ring) เส้นใยสีขาวอมเทาฟูเล็กน้อย สร้างกลุ่มสปอร์สีส้มบริเวณกลางโคโลนี และมีการสร้างโครงสร้างลักษณะคล้ายหนาม เรียกว่า ซีเต้ (setae) สีน้ำตาลดำ ลักษณะของสปอร์ เซลล์เดียว ไม่มีสี รูปพระจันทร์เสี้ยว ซึ่งตรงกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามเกณฑ์ของ Sutton (1980) เป็นเชื้อรา *Colletotrichum capsici* เก็บเชื้อราบริสุทธิ์ไว้ใน slant agar เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2. ทดสอบวิธีการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกขี้หนูสด

การควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกขี้หนูสดมีหลายวิธี คือ การใช้น้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 5 นาที กรดซาลิไซลิก 500 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 3 นาที การฉายรังสียูวีซี เป็นเวลา 30 นาที (4.68 กิโลจูล/ตารางเมตร) เปรียบเทียบกับสารเคมีโพรคลอราช 100 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำ (กรรมวิธีควบคุม) โดยการปลูกเชื้อรา *C. capsici* บนผลพริกด้วยวิธีทำแผล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสร้างเส้นใยเจริญเข้าภายในผลพริก แล้วนำมาผ่านกรรมวิธีต่างๆ เก็บที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่า วิธีการใช้น้ำร้อนมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส ผลพริกที่แช่น้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 และ 5 นาที มีขนาดแผล 0.01-0.02 เซนติเมตร และการเกิดโรค 11.67-23.33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบวิธีการควบคุมโรคแอนแทรคโนสวิธีอื่นๆ (การใช้กรดซาลิไซลิก และรังสียูวีซี) มีขนาดแผล 0.94-1.11 เซนติเมตร และการเกิดโรค 91.67-94.82 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนกรรมวิธีควบคุม (น้ำ) และ สารเคมีโพรคลอราช 100 มิลลิกรัม/ลิตร มีขนาดแผล 1.15 และ 0.48 เซนติเมตร และการเกิดโรค 89.82 และ 61.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 1 and Figure 1) สอดคล้องกับงานวิจัยของรัตตาและคณะ (2563) ผลพริกที่ปลูกเชื้อรา *C. capsici* จุ่มในน้ำร้อน 52°ซ. นาน 3, 4 และ 5 นาที มีขนาดแผล 0.13-0.17 เซนติเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับผลพริกที่ไม่จุ่มน้ำร้อน มีขนาดแผล 0.49 เซนติเมตร การใช้กรดซาลิไซลิก 500 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อกระตุ้นความต้านทานโรคแอนแทรคโนสบนผลพริก มีข้อจำกัดเรื่องระยะเวลาในการใช้กรดซาลิไซลิกต้องใช้หลังเก็บเกี่ยวผลพริกทันทีและไม่ควรเกิน 1 วัน ถ้าเก็บผลพริกเป็นเวลานานมากกว่า 1 วัน ประสิทธิภาพของกรดซาลิไซลิกในการกระตุ้นความต้านทานจะลดลง จนไม่สามารถควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้ (วีรภรณ์และคณะ, 2564) ส่วนรังสี UV-C เมื่อนำมาฉายในพืชจะซึมผ่านเพียงแค่ผิวเท่านั้น (Luckey, 1980) ถ้าเชื้อราเจริญเข้าไปในผลพริกแล้ว ไม่สามารถที่จะยับยั้งหรือฆ่าเชื้อราได้ ทำให้ผลพริกแสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสใกล้เคียงกับกรรมวิธีควบคุม จากผลการทดลองนี้ เลือกน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป ซึ่งมีประสิทธิ-ภาพดีในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสและไม่ทำให้ผลพริกเสียหาย

กรมวิชาการเกษตร

Table 1 Efficacy of treatment to control anthracnose of *Colletotrichum capsici* Inoculated chili fruits storage at 15 ºC for 14 days

Treatment	Symptom lesion [(1)] (cm)	Disease incidence [(1)] (%)
control (water for 3 min)	1.15 d	89.82 c
Prochloraz 100 mg/l for 3 min	0.48 b	61.67 b
Salicylic acid 500 mg/l for 3 min	0.94 c	91.67 c
hot water 52 ºC for 3 min	0.02 a	11.67 a
hot water 52 ºC for 5 min	0.01 a	23.33 a
UVC for 30 min (4.68 kJ/m^2)	1.11 cd	94.82 c
F-test	**	**
CV (%)	23.68	21.87

[(1)] Means followed by a same letters are not significantly different at the 95% level by DMRT

Figure 1 Efficacy of treatments to control anthracnose of *Colletotrichum capsici* Inoculated Chili fruits storage at 15 ºC for 14 days

A) control (water for 3 min)
B) Prochloraz 100 mg/l for 3 min
C) Salicylic acid 500 mg/l for 3 min
D) hot water 52 ºC for 3 min
E) hot water 52 ºC for 5 min
F) UVC for 30 min (4.68 kJ/m^2)

3. ทดสอบวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาร่วมกับวิธีการควบคุมโรคแอนแทรคโนสและลดการปนเปื้อนเชื้อราบนผลพริกขี้หนูสด

3.1 ศึกษาผลของวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาร่วมกับวิธีการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพ และการปนเปื้อนของเชื้อราบนผลพริกขี้หนูหลังการเก็บเกี่ยว

การปนเปื้อนเชื้อราบนขั้วและก้านของผลพริกเริ่มพบ หลังเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน บริเวณขั้วและก้านของผลพริกที่จุ่มในน้ำ (กรรมวิธีควบคุม) มีการปนเปื้อนของเชื้อรา 36.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลพริกที่จุ่มในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส ทุกกรรมวิธี หลังเก็บรักษาผลพริกเป็นเวลา 21 และ 28 วัน มีการปนเปื้อนของเชื้อรา 0.80-6.40 เปอร์เซ็นต์ และ 4.00-13.60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับผลพริกที่จุ่มน้ำ (กรรมวิธีควบคุม) มีการปนเปื้อนของเชื้อรา 77.60 และ 97.60 เปอร์เซ็นต์ (Table 2) สอดคล้องกับงานวิจัยของบุญญวดี และคณะ (2562) การจุ่มผลพริกในน้ำร้อน 50-52 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ร่วมกับการเก็บผลพริกที่อุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส สามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *Fusarium* sp. และ *Alternaria* sp. ได้ดี ซึ่งเชื้อราทั้งสองชนิดนี้เป็นเชื้อราที่เข้าทำลายบริเวณขั้วและก้านของผลพริกระหว่างการเก็บรักษา และงานวิจัยของ Fellik *et al.,* (1999) การจุ่มผลพริกในน้ำร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที สามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อรา *Botrytis cinerea* และ *Alternaria alternate* ระหว่างการเก็บรักษา

Table 2 Effect of treatments on contaminated fungi on chili storage at 10 ºC for 7, 14, 21 and 28 days

treatment	Contaminated fungi[(1)] (%)			
	7 day	14 day	21 day	28 day
control (water for 3 min)	0.00	36.00 b	77.60 c	97.60 c
Prochloraz 100 mg/l for 3 min	0.00	4.80 a	52.80 b	80.00 b
hot water 52 ºC	0.00	0.00 a	3.20 a	6.40 a
hot water 52 ºC + Ca_2Cl 1.5 %	0.00	0.80 a	6.40 a	13.60 a
hot water 52 ºC + Ca_2Cl 1.5 % packed in PP plastic bag	0.00	0.00 a	0.80 a	4.00 a
F-test	-	**	**	**
CV (%)	-	94.70	34.62	19.79

[(1)] Means followed by a same letters are not significantly different at the 95% level by DMRT

การเก็บรักษาผลพริกขี้หนูในบรรจุภัณฑ์ต่างชนิดกัน มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของผลพริก พบว่า ผลพริกที่จุ่มในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วนำมาจุ่มในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาที นำมาบรรจุในถุงพลาสติกโพลิโพรพิลีน (PP) มีการสูญเสียน้ำหนักน้อยที่สุด หลังเก็บรักษา 7, 14, 21 และ 28 วัน มีการสูญเสียน้ำหนัก 0.08, 0.22, 0.44 และ 0.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่ผลพริกบรรจุในถาดโพลิโพรพิลีน (PP) หุ้มด้วยฟิล์มพลาสติกโพลิเอธิลีน (PE) มีการสูญเสียน้ำหนัก 0.28-0.37, 0.44-0.68, 1.20-1.63 และ 1.80-2.79 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และการสูญเสียน้ำหนักของผลพริกจะ

กรมวิชาการเกษตร

เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น (Table 3) ผลพริกที่บรรจุในถุงพลาสติก PP มีการสูญเสียน้ำหนักน้อย อาจเนื่องมากจากพลาสติกชนิดโพลิโพรพิลีน (PP) มีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ 100-300 กรัม.ไมโครเมตร/ตารางเมตร.วัน ซึ่งต่ำกว่าพลาสติกชนิดโพลิเอธิลีน (LDPE) มีอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ 375-500 กรัม.ไมโครเมตร/ตารางเมตร.วัน (Mangaraj *et al.,* 2009) ทำให้เปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของผลพริกบรรจุถุงพลาสติก PP น้อยกว่าผลพริกบรรจุถาดโพลิโพรพิลีน (PP) หุ้มด้วยฟิล์มพลาสติกโพลิเอธิลีน (PE)

Table 3 Values of weight loss (%) of treated chili after 7, 14, 21 and 28 days storage at 10 °C

Treatment	Change of weight loss (%) [1]			
	7 day	14 day	21 day	28 day
control (water for 3 min)	0.28 b	0.68 b	1.63 c	2.25 bc
Prochloraz 100 mg/l for 3 min	0.36 b	0.63 b	1.20 b	1.80 b
hot water 52 ºC	0.35 b	0.44 ab	1.36 bc	2.07 bc
hot water 52 ºC + Ca_2Cl 1.5 %	0.37 b	0.57 b	1.27 bc	2.79 c
hot water 52 ºC + Ca_2Cl 1.5 % packed in PP plastic bag	0.08 a	0.22 a	0.44 a	0.74 a
F test	**	**	**	**
CV (%)	38.66	35.70	25.04	29.26

[1] Means followed by a same letters are not significantly different at the 95% level by DMRT

ความแน่นเนื้อของผลพริกหลังการเก็บรักษาครบ 7 14 และ 28 วัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนผลพริกหลังการเก็บรักษา 21 วัน พบว่า ผลพริกทุกกรรมวิธีที่จุ่มในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที มีค่าความแน่นเนื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ค่าความแน่นเนื้อ 19.05-20.37 นิวตัน เมื่อเปรียบเทียบกับผลพริกที่จุ่มน้ำ (กรรมวิธีควบคุม) มีความแน่นเนื้อ 22.23 นิวตัน ซึ่งผลพริกที่จุ่มในน้ำร้อนเมื่อเก็บรักษานานขึ้นจะทำให้ค่าความแน่นเนื้อลดลง แต่อย่างไรก็ตามสามารถเพิ่มความแน่นเนื้อให้ผลพริกได้ โดยการนำผลพริกที่จุ่มในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส แล้วจุ่มผลพริกในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ บรรจุในถุงพลาสติก PP ทำให้ผลพริกมีค่าความแน่นเนื้อ 20.37 นิวตัน (Table 4) ใกล้เคียงกับกรรมวิธีควบคุม การใช้สารประกอบแคลเซียม เช่น $CaCl_2$ สามารถช่วยรักษาคุณภาพของผลผลิตป้องกันความผิดปกติทางสรีรวิทยา ช่วยลดอัตราการหายใจของผลผลิตพืชได้ ชะลอการละลายของสารประกอบแพกทินบริเวณผนังเซลล์พืช ทำให้ผนังเซลล์ของพืชมีความแข็งแรง และทำให้กระบวนการสุกแก่ของผลเกิดช้าลง (Burns and Pressey, 1987; Salunkhe and Desai, 1984; Magee *et al.,* 2002)

กรมวิชาการเกษตร

Table 4 Values of firmness (N) of treated chili after 7, 14, 21 and 28 days storage at 10 °C

Treatment	Change Firmness (N) [1]			
	7 day	14 day	21 day	28 day
control (water for 3 min)	21.03	22.10	22.23 a	20.92
Prochloraz 100 mg/l for 3 min	21.11	22.10	21.97 ab	19.41
hot water 52 ºC	22.27	21.72	19.05 c	19.84
hot water 52 ºC + Ca_2Cl 1.5 %	20.86	21.45	19.32 c	19.48
hot water 52 ºC + Ca_2Cl 1.5 % packed in PP plastic bag	22.66	21.62	20.37 bc	20.51
F test	ns	ns	**	ns
CV (%)	5.14	5.93	6.38	9.66

[1] Means followed by a same letters are not significantly different at the 95% level by DMRT

การเปลี่ยนแปลงสีเปลือกของผลพริก สามารถวัดการเปลี่ยนแปลงสีของผลพริกดูจากค่าความสว่าง (L) ค่าการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีเขียว-แดง (a) และค่าการเปลี่ยนแปลงของสีในช่วงสีน้ำเงิน-เหลือง (b) หลังจากการเก็บรักษาผลพริกครบ 7 วัน พบว่า ค่า L และ ค่า b มีความแตกต่างทางสถิติ ผลพริกทุกกรรมวิธีที่จุ่มในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที มีค่า L อยู่ในช่วง 33.92-34.52 และค่า b อยู่ในช่วง 31.93-34.16 สูงกว่าผลพริกที่จุ่มในน้ำ (กรรมวิธีควบคุม) มีค่า L 32.90 และค่า b 29.74 ส่วนค่า a ของทุกกรรมวิธีไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามค่า a ของผลพริกทุกกรรมวิธีที่จุ่มในน้ำร้อนมีค่าสูงกว่าผลพริกที่จุ่มในน้ำ และเมื่อเก็บรักษาผลพริกครบ 14, 21 และ 28 วัน ค่า L ค่า a และ ค่า b มีความแตกต่างทางสถิติ และพบว่าผลพริกทุกกรรมวิธีที่จุ่มในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส มีค่า L ค่า a และ ค่า b สูงกว่าผลพริกที่จุ่มในน้ำ (กรรมวิธีควบคุม) ผลพริกทุกกรรมวิธีที่จุ่มในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที มีค่า L อยู่ในช่วง 34.25-35.81 ค่า a อยู่ในช่วง 42.12-45.03 และค่า b อยู่ในช่วง 30.01-34.17 (Table 5) สีเปลือกของผลพริกใกล้เคียงกับสีเปลือกของผลพริกหลังเก็บเกี่ยว โดยวันที่ 0 ผลพริกมีสีเริ่มต้นเป็นสีส้มแดงสว่าง มีค่า L 34.72 ค่า a 42.29 และค่า b 32.05 เมื่อเปรียบเทียบกับผลพริกที่จุ่มในน้ำ (กรรมวิธีควบคุม) หลังจากเก็บรักษาครบ 14, 21 และ 28 วัน มีค่า L อยู่ในช่วง 30.21-32.36 ค่า a อยู่ในช่วง 39.84-40.71 และค่า b อยู่ในช่วง 24.78-26.93 สีเปลือกของผลพริกจะเปลี่ยนเป็นสีแดงคล้ำมากขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น การนำผลผลิตจุ่มน้ำร้อนในระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม สามารถชะลอการเสื่อมคุณภาพได้ด้วยการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACC synthase และเอนไซม์ ACC oxidese ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอทิลีน ซึ่งเป็นฮอร์โมนการกระตุ้นการสุกของผลผลิต (Yang *et. al.*. 2009.) และยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์คลอโรฟิลเลสที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ (อภิรดีและคณะ, 2555) ดังนั้นการจุ่มพริกขี้หนูพันธุ์ซุปเปอร์ฮอทในน้ำร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ช่วยลดการสูญเสียน้ำหนัก รักษาความแน่นเนื้อ และชะลอการเปลี่ยนแปลงสีได้ แต่หากใช้อุณหภูมิถึง 55 องศาเซลเซียส จะทำให้เนื้อเยื่อเสียหาย พริกจึ่งช้ำและมีสีดำ (อโนชา, 2556)

ศรีวิชัยการเกษตร

Table 5 Values of skin colour (L, a, b) of treated chili after 7, 14, 21 and 28 days storage at 10 °C

treatment	Change of color of peel [1]											
	7 day			14 day			21 day			28 day		
	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
control (water for 3 min)	32.90b	42.22	29.74b	32.36b	40.71b	26.93b	31.63b	39.84c	24.78b	30.21c	39.93b	24.82c
Prochloraz 100 mg/l for 3 min	32.88b	42.35	29.92b	32.08b	40.18b	26.17b	31.88b	41.33b	26.69b	30.99c	39.74b	24.93c
hot water 52 ºC	33.92a	43.17	31.93ab	34.67a	42.12ab	30.01a	35.58a	43.89a	31.98a	34.35b	44.29a	31.88b
hot water 52 ºC + Ca_2Cl 1.5 %	34.52a	43.46	32.59a	34.89a	43.00a	31.81a	35.46a	45.03a	33.76a	34.25b	44.13a	32.39ab
hot water 52 ºC + Ca_2Cl 1.5 % packed in PP plastic bag	33.99a	44.16	34.16a	34.33a	43.16a	31.90a	35.81a	44.29a	33.87a	35.38a	44.98a	34.17a
F test	**	ns	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
CV (%)	1.95	2.78	5.27	2.46	3.38	6.05	2.48	2.05	4.90	2.09	2.17	5.58

[1] Means followed by a same letters are not significantly different at the 95% level by DMRT

3.2 ศึกษาผลของวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาร่วมกับวิธีการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกต่อการควบคุมโรคแอนแทรคโนส

การใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคแอนแทรคโนสบนผลพริกขี้หนูที่ปลูกเชื้อรา *C. capsici* (จากผลการทดลองข้อ 2) ร่วมกับวิธีการยืดอายุโดยเลือกบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสม 2 ชนิด คือ ถาดพลาสติกโพลีโพรพิลีน (PP) หุ้มด้วยฟิลม์พลาสติกโพลิเอธิลีน (PE) และถุงพลาสติกโพลีโพรพิลีน (PP) ร่วมกับแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสารกลุ่มปลอดภัยที่มีคุณสมบัติในการยืดอายุผลพริกช่วยรักษาความแน่นเนื้อของผลพริก เพื่อให้ผลพริกมีอายุการเก็บรักษาได้นานขึ้น และควบคุมโรคแอนแทรคโนสได้ดี พบว่า ผลพริกที่ปลูกเชื้อรา *C. capsici* ทุกกรรมวิธี หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ยังไม่พบอาการของโรคแอนแทรคโนส เริ่มพบการเกิดโรคบางเล็กน้อยหลังจากเก็บรักษาครบ 14 วัน ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกกรรมวิธี เมื่อเก็บผลพริกครบ 21 และ 28 วัน ผลพริกที่จุ่มน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส มีขนาดแผล 0.08-0.12 และ 0.15-0.19 เซนติเมตร และการเกิดโรค 48.33-66.67 และ 56.67-65.00 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับผลพริกที่จุ่มน้ำ (กรรมวิธีควบคุม) มีขนาดแผล 0.17 และ 0.57 เซนติเมตร และการเกิดโรค 81.67 และ 100.00 เปอร์เซ็นต์ (Table 6) ผลพริกที่จุ่มในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส แล้วนำมาจุ่มต่อด้วยแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 % ทำให้ผลพริกมีขนาดแผลที่แสดงอาการของโรคแอนแทรคโนสเล็กกว่าผลพริกที่จุ่มในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส เพียงอย่างเดียว แต่อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างทางสถิติ การใช้สารประกอบแคลเซียมช่วยส่งเสริมการเจริญของพืช จึงสามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรค และช่วยยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาผลผลิตภายหลังการเก็บเกี่ยว (Akhtar *et al.,* 2010)

กรมวิชาการเกษตร

Table 6 Efficacy of treatment to control anthracnose of *Colletotrichum capsici* Inoculated chili fruits storage at 10 ºC for 14, 21 and 28 days

treatment	Symptom lesion [1] (cm)			Disease incidence [1] (%)		
	14 day	21 day	28 day	14 day	21 day	28 day
control (water for 3 min)	0.05	0.17 b	0.57 b	41.67	81.67 c	100.00 b
Prochloraz 100 mg/l for 3 min	0.04	0.13 ab	0.21 a	36.67	70.00 bc	98.33 b
hot water 52 ºC	0.05	0.12 ab	0.19 a	35.00	66.67 b	65.00 a
hot water 52 ºC + Ca_2Cl 1.5 %	0.03	0.08 a	0.15 a	18.30	48.33 a	56.67 a
hot water 52 ºC + Ca_2Cl 1.5 % packed in PP plastic bag	0.05	0.09 a	0.16 a	36.67	65.00 b	56.67 a
F-test	ns	**	**	ns	**	**
CV (%)	65.44	37.04	36.82	48.93	17.71	16.58

[1] Means followed by a same letters are not significantly different at the 95% level by DMRT

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 1.2 ศึกษาผลของสารกลุ่มปลอดภัยร่วมกับน้ำร้อนในการควบคุมโรคผลเน่าของส้มจากเชื้อรา

1. แยกเชื้อและจำแนกชนิดของเชื้อสาเหตุโรคผลเน่าของส้ม

จากการเก็บตัวอย่างส้มที่แสดงอาการโรคผลเน่าจากตลาด โดยดูจากลักษณะอาการเริ่มต้นคือแผลจะฉ่ำน้ำ ต่อมาแผลจะขยายขนาดออกมีการสร้างกลุ่มของโคนีเดียสีเขียวบริเวณแผล เมื่อนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA มีสีเขียวเส่นใยฝงอยู่ในอาหาร เจริญช้า เมื่อส่องโคโลนีภายใต้กล้องสเตอริโอจะเห็นโคนิดิโอฟอรเกิดขึ้นอยางหนาแนน ทำให้ผิวหนาโคโลนี มีลักษณะคลายกำมะหยี จากนั้นจำแนกลักษณะต่างๆภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าโคนิดิโอฟอรเปนแบบแตกกิ่งกานเปน 1-3 ชั้น สวนปลายกานโคนิดิโอฟอรแตกแขนงเปนไฟอะลายด์หรือเมตูเล มีลักษณะเปนลูกชมพูให กำเนิดโคนิเดียเรียกวาไฟอะโลสปอรรูปรางกลม เกิดตอกันเปนโซยาว ซึ่งตรงกับลักษณะทางสัณฐานของเชื้อรา *Penicillium digitatum* (Pitt and Hocking, 1997) (Figure 1)

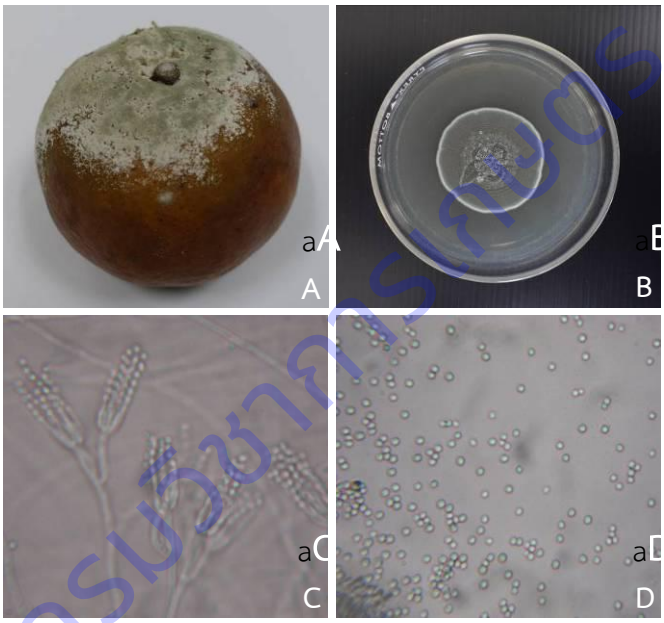


Figure 1 Green mould rot of citrus caused by *Penicillium digitatum*

A. symptom green mould of citrus B. colony of *P. digitatum*

C. conidiophores and phialide of *P. digitatum* D. conidia of *P. digitatum*

2. ทดสอบประสิทธิภาพการใช้สารกลุ่มปลอดภัย ในการควบคุมโรคผลเน่าบนผลส้ม

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพสารปลอดภัยในการควบคุมโรคผลเน่าในส้มที่มีการปลูกเชื้อรา *P. digitatum* บนส้ม นาน 24 ชม.พบว่าส้มที่แช่ในโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 3.00% และกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0.10% นาน 5 นาที ให้ผลในการควบคุมโรคผลเน่าได้ดี และเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีโพรคลอราซ ความเข้มข้น 0.025% และสารเคมีอิมาซาลิล ความเข้มข้น 0.50% พบว่าโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 3.00% และกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0.10% มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าได้ดีไม่แตกต่างกันทางสถิติสามารถใช้ทดแทนการใช้สารเคมีโพรคลอราซและสารเคมีอิมาซาลิลในผลส้มได้ (Table1) สอดคล้องกับ

กรมวิชาการเกษตร

รายงานของ Lai (2015) การใช้โซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.6% หลังการเก็บรักษา 8 วัน ลดการเกิดโรคและขนาดแผลในผลสาลี่ได้ 43.33% และ 1.12 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม เนื่องจากโซเดียมไบคาร์บอเนตจะไปทำลายในส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ของสปอร์เชื้อรา (Lai *et al.*,2015) นอกจากนี้ โซเดียมไบคาร์บอเนต เป็นสารละลายที่มีฤทธิ์เป็นด่าง มีส่วนประกอบคือโซเดียมและไบคาร์บอเนต ซึ่งในโซเดียมหรือเกลือนั้นมีความเป็นพิษต่อเชื้อจุลินทรีย์โดยตรง ทำให้เกิด Dehydration ของเซลล์เป็นเหตุให้เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เกิดการเสียน้ำอย่างแรง (plasmolysis) เชื้อจุลินทรีย์จึงหยุดการเจริญเติบโต (กล้าณรงค์, 2521) ในส่วนของกรดซาลิไซลิกนั้น ให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Tian *et al.* (2006) พบว่ากรดซาลิไซลิก ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ลดการเน่าเสียของผลสาลี่ที่เกิดจากเชื้อรา *Alternaria alternata* โดยกรดซาลิไซลิกจะกระตุ้นผลสาลี่ให้มีการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับกลไกการต้านทานต่อเชื้อรา *A. alternata* เช่น เบต้า-1,3 กูลคาเนส, ฟีนิลอะลานีนแอมโมเนียไลเอส, เพอร์ออกซิเดส และ โพลีฟีนอลออกซิเดส นอกจากกรดซาลิไซลิกจะใช้เพื่อลดการเกิดโรคแล้ว กรดซาลิไซลิกอาจจะเกี่ยวข้องกับระบบ signal transduction ซึ่งจะไปชักนำให้พืชเกิดความต้านทานโดยการสร้างสารต่างๆ เช่น โพลีฟีนอล หรือ Pathogenesis-related protein (PR-protein) (Hahlbrock and scheel, 1989) โดย PR-protein ช่วยให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อสาเหตุโรคได้ เช่น เอนไซม์ไคติเนส และกูลคาเนส จัดเป็น PR-protein ที่พืชสร้างขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรคและสภาวะกดดันต่างๆ (Bowles, 1990)

จากผลการทดลองข้อ 2 ได้คัดเลือกสารกลุ่มปลอดภัยและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* คือโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 3.00% นาน 5 นาที และกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0.10% นาน 5 นาที มาทดสอบในการทดลองขั้นต่อไป

Table 1 Efficacy of **Generally Recognized as Safe (GRAS) Substances** to control green mould rot disease on citrus kept at 20°C for 14 days after artificial inoculation with spores of *Penicillium digitatum*

Treatment	Disease incidence (%)	Disease index (%)
control (water)	100.00 c	77.08 e
0.01% salicylic acid, soak 5 min	100.00 c	34.38 d
0.05% salicylic acid, soak 5 min	87.50 b	26.04 c
0.10% salicylic acid, soak 5 min	52.08 a	13.02 a
1.00% sodium bicarbonate, soak 5 min	85.42 b	29.69 c
2.00% sodium bicarbonate, soak 5 min	77.09 b	21.36 b
3.00% sodium bicarbonate, soak 5 min	50.00 a	12.50 a
0.025% prochloraz, soak 5 min	60.42 a	15.10 a
0.05% *imazalil* , soak 5 min	50.00 a	12.50 a
CV (%)	10.22	10.87

(1) Mean in the same column, followed by a common letter (s) are not significantly different at the 5% level by DMRT

กรมวิชาการเกษตร

Figure 2 Efficacy of **Generally Recognized as Safe (GRAS) Substances** to control green mould rot disease on citrus kept at 20°C for 14 days after artificial inoculation with spores of *Penicillium digitatum*

A. control (water)

B. 0.01% salicylic acid, soak 5 min

C. 0.05% salicylic acid, soak 5 min

D. 0.1% salicylic acid, soak 5 min

E. 1.0% sodium bicarbonate, soak 5 min

F. 2.0% sodium bicarbonate, soak 5 min

G. 3.0% sodium bicarbonate, soak 5 min

H. 0.025% prochloraz, soak 5 min

I. 0.05% *imazalil* , soak 5 min

กรมวิชาการเกษตร

3. ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำร้อนในการควบคุมโรคผลเน่าบนผลส้ม

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพน้ำร้อนที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่ต่างกัน ในการควบคุมโรคผลเน่าในส้มที่มีการปลูกเชื้อรา *P. digitatum* บนส้ม นาน 24 ชม. พบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผลส้มที่แช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 55°c นาน 3 นาที และผลส้มที่แช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 55°c นาน 5 นาที มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าได้ผลดีเท่ากัน การเกิดโรค 50.00% และ 50.00% และดัชนีการเกิดโรค 12.50% และ 12.50% เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีอิมาซาลิล ความเข้มข้น 0.05% และสารเคมีโพรคลอราซ ความเข้มข้น 0.025% พบว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าได้ดีไม่แตกต่างกันทางสถิติ การเกิดโรค 52.78% และ 54.17% ดัชนีการเกิดโรค 13.19% และ 13.54% สามารถใช้ทดแทนกันได้ ในขณะที่กรรมวิธีที่แช่ผลส้มในน้ำเพียงอย่างเดียว (กรรมวิธีควบคุม) พบการเกิดโรค 100.00% และดัชนีการเกิดโรค 77.61% (Table 2 and Figure 3) ดังนั้นการจุ่มผลส้มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 55°c เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* เนื่องจากช่วยลดปริมาณของจุลินทรีย์ที่อาศัยบริเวณผิวของส้ม (Porat *et al.,* 2000) และไม่ทำให้ผลส้มเกิดความเสียหายเนื่องจากความร้อน (heat damage) ซึ่งผลจะมีสีคล้ำน้ำตาลได้

จากผลการทดลองข้อ 3 สามารถคัดเลือกอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมคือ น้ำร้อนอุณหภูมิ 55°c นาน 3 นาที เนื่องจากการใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ 55°c นาน 3 นาที และ 5 นาที ให้ผลในการควบคุมโรคผลเน่าที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ จึงเลือกเพียงระยะเวลาเดียวเพื่อประหยัดเวลา มาทดสอบในการทดลองขั้นต่อไป

Table 2 Efficacy of Heat Treatment to control green mould rot disease on citrus kept at 20°C for 14 days after artificial inoculation with spores of *Penicillium digitatum*

Treatment	Disease incidence (%)	Disease index (%)
control (water)	100.00 c	77.61 d
hot water 50°C, soak 3 min	100.00 c	35.94 c
hot water 50°C, soak 5 min	97.92 c	27.60 b
hot water 52°C, soak 3 min	95.83 c	25.00 b
hot water 52°C, soak 5 min	62.50 b	15.63 a
hot water 55°C, soak 3 min	50.00 a	12.50 a
hot water 55°C, soak 5 min	50.00 a	12.50 a
0.025% prochloraz, soak 5 min	54.17 ab	13.54 a
0.05% *imazalil* , soak 5 min	52.78 a	13.19 a
CV (%)	8.35	7.75

(1) Mean in the same column, followed by a common letter (s) are not significantly different at the 5% level by DMRT

กรมวิชาการเกษตร

Figure 3 Efficacy of **Heat Treatment** to control green mould rot disease on citrus kept at 20°C for 14 days after artificial inoculation with spores of *Penicillium digitatum*

A. control (water)

B. hot water 50°C, soak 3 min

C. hot water 50°C, soak 5 min

D. hot water 52°C, soak 3 min

E. hot water 52°C, soak 5 min

F. hot water 55°C, soak 3 min

G. hot water 55°C, soak 5 min

H. 0.025% prochloraz, soak 5 min

I. 0.05% *imazalil* , soak 5 min

ศูนย์วิทยทรัพยากร

4. ทดสอบประสิทธิภาพการใช้สารกลุ่มปลอดภัยร่วมกับน้ำร้อน ในการควบคุมโรคผลเน่าบนผลส้ม

นำผลส้มพันธุ์สายน้ำผึ้งมาทดสอบประสิทธิภาพของสารกลุ่มปลอดภัยร่วมกับน้ำร้อน ในการควบคุมโรคผลเน่าในส้มที่มีการปลูกเชื้อรา *P. digitatum* บนส้ม นาน 24 ชม. โดยสารกลุ่มปลอดภัยที่คัดเลือกมาใช้คือ โซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 3.00% นาน 5 นาที และกรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0.10% นาน 5 นาที ส่วนอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมคือ น้ำร้อนอุณหภูมิ 55°c นาน 3 นาที ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* พบว่า การแช่ผลส้มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 55°c นาน 3 นาทีก่อนแล้วจึงแช่กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0.1% นาน 5 นาที ทีหลังเมื่อขึ้นจากน้ำร้อนและการแช่ผลส้มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 55°c นาน 3 นาที ก่อนแล้วจึงแช่โซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 3% นาน 5 นาที ทีหลังเมื่อขึ้นจากน้ำร้อนสามารถควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* ได้ 100% ซึ่งสามารถทดแทนสารเคมีอิมาซาลิลและสารเคมีโพรคลอราซได้ ในขณะที่กรรมวิธีที่แช่ผลส้มในน้ำเพียงอย่างเดียว (กรรมวิธีควบคุม) พบการเกิดโรค 100.00% และดัชนีการเกิดโรค 36.98% (Table 3 and Figure 4)

Table 3 Efficacy of **Generally Recognized as Safe (GRAS) Substances in Combination with Heat Treatment** to control green mould rot disease on citrus kept at 20°C for 14 days after artificial inoculation with spores of *Penicillium digitatum*

Treatment	Disease incidence (%)	Disease index (%)
control (water)	100.00 d	36.98 d
0.1% salicylic acid, soak 5 min	20.84 c	5.21 c
3.0% sodium bicarbonate, soak 5 min	20.84 c	5.21 c
hot water 55°C, soak 3 min	8.33 b	2.08 b
hot water 55°C, soak 3 min + 0.1%salicylic acid	0.00 a	0.00 a
hot water 55°C, soak 3 min + 3.0% sodium bicarbonate	0.00 a	0.00 a
0.025% prochloraz, soak 5 min	10.42 b	2.60 b
0.05% *imazalil* , soak 5 min	0.00 a	0.00 a
CV (%)	18.49	17.88

(1) Mean in the same column, followed by a common letter (s) are not significantly different at the 5% level by DMRT

กรมวิชาการเกษตร

Figure 4 Efficacy of **Generally Recognized as Safe (GRAS) Substances in Combination with Heat Treatment** to control green mould rot disease on citrus kept at 20°C for 14 days after artificial inoculation with spores of *Penicillium digitatum*

A. control (water)

B. 0.1% salicylic acid, dip 5 min

C. 3.0% sodium bicarbonate, dip 5 min

D. hot water 55°C, dip 3 min

E. hot water 55°C, dip 3 min + 0.1% salicylic acid, dip 5 min

F. hot water 55°C, dip 3 min + 3.0% sodium bicarbonate, dip 5 min

G. 0.025% prochloraz, dip 5 min

H. 0.05% *imazalil* , dip 5 min

สรุปผลการวิชัย และข้อเสนอแนะ

วิธีการยืดอายุการเก็บรักษาพริกขี้หนูสดเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อราและโรคแอนแทรคโนส โดยการใช้น้ำร้อนอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ร่วมกับบรรจุภัณฑ์และการใช้สารปลอดภัยที่มีประสิทธิภาพ สามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 ผลพริกจุ่มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที บรรจุในถาดพลาสติก PP หุ้มด้วยฟิล์ม PE และ วิธีที่ 2 ผลพริกจุ่มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วนำมาจุ่มต่อในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 % บรรจุในถุงพลาสติก PP เก็บผลพริกที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ผลพริกมีคุณภาพดี สามารถรักษาความแน่นเนื้อของผลพริก คงสภาพสีเปลือกได้ดี สามารถยืดอายุการเก็บรักษาและการวางจำหน่ายผลพริกได้นานมากขึ้น และปลอดภัยต่อผู้บริโภค

การแช่ผลส้มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 55°C นาน 3 นาที แล้วนำผลส้มมาแช่กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0.1% นาน 5 นาที และการแช่ผลส้มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 55°C นาน 3 นาที แล้วนำผลส้มแช่โซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 3% นาน 5 นาที สามารถควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* ได้ 100% เปรียบเทียบกับการแช่ผลส้มในน้ำเพียงอย่างเดียว (กรรมวิธีควบคุม) พบการเกิดโรค 100.00% และดัชนีการเกิดโรค 36.98% สามารถใช้ทดแทนสารเคมีอิมาซาลิลและสารเคมีโพรคลอราซได้ เนื่องจากสารกลุ่มปลอดภัยและน้ำร้อนปลอดภัยต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2
วิธีการควบคุมการปนเปื้อนเชื้อราและสารพิษ
Methods for Controlling Fungal Contamination and Mycotoxin

ศุภรา อัคคะสาระกุล รัตตา สุทธยาคม เนตรา สมบูรณ์แก้ว สุพี วนศิรากุล
วีรภรณ์ เดชนำบัญชาชัย และ มัทนา วานิชย์
Suppara Aukkasarakul Nettra Somboonkaew Ratta Suttayakom Su-phi Wanasirakul
Weeraporn Dejnumbunchachai and Mattana Wanitch

คำสำคัญ น้ำคั้นกระเทียม, พริกแห้ง, อะฟลาทอกซิน วิธีการตาก, ถั่วลิสง, ระยะเวลาเก็บรักษา,
Keywords: Aflatoxin, Dried chili, Garlic juice drying method, peanut, storage time, aflatoxin B1

บทคัดย่อ

ถั่วลิสง และ พริกแห้ง มักพบปัญหาการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus flavus* และสารอะฟลาทอกซิน ซึ่ง AF มีความเป็นพิษที่ก่อให้เกิดมะเร็งตับ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิธีการตากร่วมกับระยะเวลาการเก็บรักษาถั่วลิสงที่เหมาะสม เพื่อลดการปนเปื้อน AFB1 และคงคุณภาพของเมล็ด โดยทดสอบวิธีการตากเพื่อลดความชื้น 3 กรรมวิธี คือ 1) ใช้เครื่องอบลมร้อน 2) ตากบนตะแกรงตากในโรงเรือน 3) ตากบนลานปูน พบว่าหลังการตากทั้ง 3 กรรมวิธี ถั่วลิสงที่ได้มีความชื้นเมล็ดต่ำกว่า 9% มีการปนเปื้อน AFB1 ไม่แตกต่างกัน โดยกรรมวิธีที่ 2 พบการปนเปื้อน AFB1 มากสุด เฉลี่ย 7.0 ไมโครกรัม/กิโลกรัม (µg/kg) และเมื่อทดสอบการปนเปื้อนเชื้อรา ทั้ง 3 กรรมวิธี ส่วนใหญ่พบเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* โดยกรรมวิธีที่ 3 พบปนเปื้อนมากที่สุด เฉลี่ย 83.3% เมื่อนำถั่วลิสงมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิโดยรอบ เป็นระยะเวลา 4 เดือน และสุ่มตัวอย่างมาทดสอบทุก 1 เดือน พบว่า วิธีการตากและระยะเวลาการเก็บรักษาไม่มีปฏิสัมพันธ์ต่อการปนเปื้อน AFB1 ปริมาณโปรตีน และไขมัน แต่ระยะเวลาการเก็บรักษามีผลต่อการปนเปื้อน AFB1 ปริมาณโปรตีน และไขมัน โดยในช่วงแรกถั่วลิสงมีการปนเปื้อน AFB1 ไม่แตกต่างกัน ในเดือนที่ 3 ของการเก็บรักษา พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* เล็กน้อยในกรรมวิธีที่ 2 และ 3 มีการปนเปื้อน 3.3% และ 1.7% ตามลำดับ แต่ในเดือนที่ 4 ของการเก็บรักษา ถั่วลิสงทั้ง 3 กรรมวิธีพบการปนเปื้อน AFB1 สูงขึ้น 9.5-13.0% แต่ไม่เกินข้อกำหนดปริมาณ AFB1 (20 µg/kg) รวมทั้งปริมาณโปรตีนและไขมันในเมล็ดลดลง ถั่วลิสงในกรรมวิธีที่ 2 มีเมล็ดดีลดลง เหลือ 57.7% มีเมล็ดเสียสูงถึง 42.3% โดยน้ำหนัก เนื่องจากพบการเข้าทำลายของด้วงขาโต

พริกแห้งเป็นผลิตผลเกษตรแปรรูปที่ใช้เป็นส่วนประกอบอาหารตั้งแต่ในระดับครัวเรือน จนถึงภาคธุรกิจในกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้พริกแห้งคุณภาพดี ยังรวมถึงขั้นตอนในการเก็บรักษาที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราที่จะเป็นสาเหตุให้เกิดการสร้างสารพิษขึ้นได้ ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของน้ำคั้นกระเทียมสดต่อปริมาณการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้ง โดยการทดสอบความเข้มข้นของน้ำคั้นกระเทียม 4 ระดับ ได้แก่ 25% 50% 75% และ100% พบว่า น้ำคั้นกระเทียมทุกความเข้มข้นมีผลยับยั้งการเจริญของสปอร์เชื้อรา *Aspergillus flavus* บนอาหารพีดีเอ และศึกษาความสามารถในการสร้างสารอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A.*

กรมวิชาการเกษตร

flavus ในพริกแห้ง ทำการตรวจสอบโดยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) พบปริมาณสารอะฟลาทอกซินสูงสุด 35.20 µg/kg ที่ช่วงเวลา 21 วัน หลังจากนั้นทดสอบผลของน้ำคั้นกระเทียมต่อคุณภาพของพริกแห้ง เก็บที่อุณหภูมิ 29.7°C ความชื้นสัมพัทธ์ 66.8% นาน 35 วัน ในพริกแห้งที่เติมน้ำคั้นกระเทียมก่อนเติมเชื้อ *A. flavus* พบสารอะฟลาทอกซิน 6.19 µg/kg และ 7.23 µg/kg ในพริกแห้งที่ไม่เติมน้ำคั้นกระเทียม ซึ่งน้ำคั้นกระเทียมมีผลให้การสร้างสารอะฟลาทอกซินลดลง 14.38% และทำการทดสอบเปรียบเทียบปริมาณสารอะฟลาทอกซินระหว่าง 2 กรรมวิธี คือ พริกแห้งเติมเชื้อรา *A. flavus* กับพริกแห้งเติมน้ำคั้นกระเทียมและเชื้อ *A. flavus* ผลการทดลอง พบค่า t-value มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังนี้ ค่า t-value เท่ากับ 8.15 2.78 8.11 และ 6.64 ที่ช่วงเวลา 14 วัน 21 วัน 28 วัน และ 35 วัน ตามลำดับ โดยที่เวลา 14 วัน ค่า t-value สูงสุด และพบการสร้างสารอะฟลาทอกซินลดลง 34.93%.

Abstract

Aspergillus flavus and Aflatoxin B1 (AFB1) contamination are often found in peanut and eirer chilli which are the most toxic and induces primary liver cancer. This study aimed to determine the appropriate drying method for peanut in conjunction with storage time to minimize the contamination of AFB1 and maintain quality of peanut. Peanuts were dried using three different methods *viz.* 1) dried with hot air oven 2) dried in greenhouse, and 3) dried on cement ground before being kept at ambient air for 4 months. The results showed that moisture contents of all treated peanut were lower than 9%. Although AFB1 levels (7 µg/kg) from greenhouse were higher than other treatments, significant difference were not found between all three drying methods. *Penicillium* was mainly found in contaminated peanuts from all methods in this study. The highest *Penicillium* contamination was detected from methods no.3. at 83.3%. During storage, dry peanuts were determined for AFB1 contamination, moisture content, protein and lipid in 1 month interval. Drying methods and storage time were not related to AFB1, protein and lipid contents of peanuts. However, there were significantly different in amount of AFB1, protein and lipid between peanut from different storage time. Although there was no different in AFB1 level at the initial storage time, *A. flavus* contamination was detected in the third months of storage at 3.3% and 1.7% from method no.2 and 3, respectively. AFB1 contaminations from all dry peanuts were 9.5 - 13.0% after 4 months storage which did not exceed the Thailand maximum permitted level (20 µg/kg). The contents of protein and lipid were decreased with storage time. Besides, number of defected kernels increase to 42.3% (by weight) due to *Caryedon serratus* infestation after 4 months storage.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

การปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษในผลิตผลเกษตร มักพบการปนเปื้อนของเชื้อรากลุ่ม *Aspergiillus* โดยเชื้อรา *A. flavus* สามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินและเจริญบนผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยว อะฟลาทอกซิน เป็นสารพิษที่สร้างโดยเชื้อราหลายชนิด ได้แก่ *A. flavus, A. parasiticus, A. tamarii* และ *A. nomius* ในประเทศไทยพบ *A. flavus* เป็นเชื้อราสาเหตุสำคัญที่สร้างสารอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในผลิตผลเกษตรและในผลิตภัณฑ์แปรรูปที่ใช้วัตถุดิบที่มีเชื้อราชนิดนี้ปนเปื้อน Hesseltine (1973) ศึกษาเชื้อรา *Aspergillus* พบจะเจริญได้ดีในธัญพืชที่มีความชื้น 18% หรือเท่ากับในสภาพอากาศความชื้นสัมพัทธ์ 85% และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 27-30˚C และจากการศึกษาช่วงเวลาในการสร้างสารอะฟลาทอกซิน พบว่าที่อุณหภูมิ 30˚C นาน 14 วัน เป็นช่วงเวลาที่เหมาะสม โดยปริมาณสารอะฟลาทอกซินจะลดลงเมื่อบ่มเชื้อไว้นานขึ้น (Kheiralla *et al.,* 1920) เชื้อรา *A. flavus* เป็นเชื้อราที่สามารถทนแล้งได้ในระดับปานกลาง (moderately xerophilic) มีระดับความชื้นต่ำสุดที่เชื้อรา *A. flavus* จะเจริญได้ในข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และข้าว เท่ากับ 18-18.5% ถั่วเหลือง 17-17.5% และถั่วลิสง เมล็ดทานตะวัน 11-12% แม้ในสภาวะที่มีความชื้นต่ำมากจนสปอร์ของเชื้อ *A. flavus* ไม่สามารถเจริญได้ แต่สปอร์ของเชื้อ *A. flavus* ก็สามารถพักตัวอยู่ได้บนอาหารแห้ง เป็นเวลานานหลายวันจนถึงหลายเดือนโดยที่สปอร์ยังคงมีชีวิต

ระเบียบวิธีการวิจัย

การทดลองที่ 2.1 ผลของวิธีการตากและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซิน บี1 ในถั่วลิสงหลังการเก็บเกี่ยว

1. สำรวจแปลงปลูกถั่วลิสงและขั้นตอนการดำเนินงานหลังการเก็บเกี่ยวของเกษตรกร คัดเลือกพื้นที่ปลูกที่เหมาะสมจำนวน 1 แหล่งปลูก เพื่อใช้ในการทดสอบกรรมวิธีการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว

2. เปรียบเทียบวิธีการตากเพื่อลดความชื้นหลังการเก็บเกี่ยว วางแผนการทดลองแบบ RCB มีแถวแปลงปลูกเป็นบล็อค จำนวน 4 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธีต่าง ๆ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 (T1) ปลิดฝักถั่วลิสง นำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบลดความชื้นแบบอบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (°C) โดยถั่วลิสงที่ใช้ในการทดลอง 197 กิโลกรัม (kg) ใช้เวลาในการอบนาน 34 ชั่วโมง

กรรมวิธีที่ 2 (T2) ปลิดฝักถั่วลิสง นำไปตากบนตะแกรงตากในโรงเรือน ใช้เวลาในการตากนาน 18 วัน ช่วงเวลาทำการทดลองมีอุณหภูมิในช่วงกลางวันเฉลี่ย 26-38°C ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 64-85 เปอร์เซ็นต์ (%)

กรรมวิธีที่ 3 (T3) ปลิดฝักถั่วลิสง ใส่ตะกร้านำไปล้างน้ำ และตากบนตาข่ายมุ้งไนลอนบนพื้นปูน นาน 7 วัน (กรรมวิธีเกษตรกรปฏิบัติ) ช่วงเวลาทำการทดลองมีอุณหภูมิในช่วงกลางวันเฉลี่ย 29-36°C ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 64-73%

- นำฝักถั่วลิสงมากะเทาะเปลือก หาเปอร์เซ็นต์เมล็ดดี-เสีย (โดยน้ำหนัก) ด้วยการคัดแยกเมล็ดดี และเมล็ดเสีย (เมล็ดที่ขึ้นรา เมล็ดลีบ แบน มีตำหนิ) นำไปชั่งน้ำหนัก พร้อมทั้งวัดความชื้นเมล็ดในทุกกรรมวิธี

กรมวิชาการเกษตร

- ตรวจสอบเชื้อรากลุ่มที่สร้างสารพิษในแปลงปลูก โดยเก็บตัวอย่างดินในแปลงปลูกมาทดสอบด้วยวิธี soil dilution plate นำตัวอย่างดินที่สุ่มจากแปลงมา 1 กรัม ใสลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไป 9 มิลลิลิตร (ml) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย เจือจางสารละลายดินให้ได้ระดับความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-6} โดยดูดสารละลายดินปริมาตร 1 ml ใสลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 9 ml ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย จากนั้นดูดสารละลายดิน 1 ml ใสลงในหลอดต่อไปจน ครบทุกความเข้มข้น ดูดสารละลายดินที่ความเข้มข้น 10^{-3} ถึง 10^{-6} ปริมาตร 0.1 ml ใสลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เตรียมไว้ จากนั้นใช้แท่งแก้วเกลี่ยสารละลายดินให้ทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 7 วัน บันทึกข้อมูลการปนเปื้อนเชื้อราที่พบ

- ตรวจการปนเปื้อนเชื้อราในเมล็ดโดยการสุ่มตัวอย่างเมล็ดในทุกกรรมวิธีมาทดสอบด้วยวิธี direct plating โดยสุ่มเมล็ดถั่วลิสงในทุกกรรมวิธีแช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaOCl) 0.825% นาน 2 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ และวางบนอาหาร Dichloran 18% Glycerol (DG 18) agar จำนวน 5 เมล็ดต่อจานเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-7 วัน เพื่อตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเชื้อราที่พบ

- วิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อน AFB1 ในทุกกรรมวิธี โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดมาวิเคราะห์ปริมาณ AFB1 ด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยใช้ชุดตรวจสอบสาร AFB1 DOA-Aflatoxin ELISA test kit

3. ทดสอบวิธีการตากร่วมกับระยะเวลาการเก็บรักษาต่อคุณภาพของเมล็ด วางแผนการทดลองแบบ Split plot จำนวน 4 ซ้ำ โดยมีปัจจัย 2 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยหลัก คือ กรรมวิธีการตากเพื่อลดความชื้น 3 กรรมวิธี จากวิธีการข้อที่ 2

ปัจจัยรอง คือ ระยะเวลาการเก็บรักษาถั่วลิสงก่อนการกะเทาะเปลือก 5 ระยะ คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน

นำถั่วลิสงที่ผ่านขั้นตอนการตากในแต่ละกรรมวิธีและเก็บรักษา 0, 1, 2, 3 และ 4 เดือน มากะเทาะเปลือก และตรวจสอบคุณภาพเมล็ดในทุกกรรมวิธีดังนี้

- หาเปอร์เซ็นต์เมล็ดดี-เสีย (โดยน้ำหนัก) ด้วยการคัดแยกเมล็ดดี และเมล็ดเสีย (เมล็ดที่ขึ้นรา เมล็ดลีบแบน มีตำหนิ) นำไปชั่งน้ำหนัก พร้อมทั้งวัดความชื้นเมล็ดในทุกกรรมวิธี

- ตรวจการปนเปื้อนเชื้อราโดยการสุ่มตัวอย่างเมล็ดในทุกกรรมวิธีมาทดสอบด้วยวิธี direct plating บนอาหาร DG 18 agar จำนวน 5 เมล็ดต่อจานเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5-7 วัน เพื่อตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเชื้อราที่พบ

- วิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนสาร AFB1 ในทุกกรรมวิธี โดยสุ่มตัวอย่างเมล็ดมาวิเคราะห์ปริมาณ AFB1 ด้วยวิธี ELISA

- วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดถั่วลิสง โดยวิเคราะห์โปรตีน (Protein) ด้วยเครื่องวิเคราะห์โปรตีน Nitrogen Combustion (Nitrogen CN-628) และวิเคราะห์ไขมัน (Crude Fat) ด้วยเครื่องสกัดไขมัน Soxtec™ 8000

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาผลของน้ำคั้นกระเทียมต่อปริมาณการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้ง

1. การเตรียมพริกแห้ง

พริกขี้หนูแดงเก็บเกี่ยวจากแปลงปลูกในเขต อ.หนองหงส์ จ.บุรีรัมย์ คัดเลือกผลเน่าเสียทิ้ง เด็ดขั้ว ล้างน้ำทำความสะอาด ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ ตากในโรงอบพลังงานแสงอาทิตย์ (solar drying house) เป็นเวลา 5 วัน ได้พริกแห้งที่มีปริมาณการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน 4.48 µg/kg และความชื้น 12.36% สำหรับใช้ในการทดลอง

หมายเหตุ พริกแห้งที่ใช้ในการทดลองเป็นพริกแห้งที่เตรียมเอง เพื่อให้ได้ตัวอย่างที่มีความสม่ำเสมอ ในแต่ละหัวข้อการทดลองจะใช้พริกแห้งน้ำหนักไม่เท่ากัน ขึ้นกับจำนวนตัวแปรที่ต้องการวัด สาเหตุจากตัวอย่างพริกแห้งมีปริมาณจำกัด และจากสถานการณ์ของโควิด 19 ทำให้ไม่สะดวกในการเดินทางต่างจังหวัด เพื่อผลิตพริกแห้งเพิ่ม

2. การเตรียมน้ำคั้นกระเทียมสด

กระเทียมไทย จ.ศรีสะเกษ แกะเปลือก ล้างน้ำสะอาด ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ นำไปคั้นน้ำด้วยเครื่องคั้นน้ำชนิดแยกกาก และกรองด้วยผ้าขาวบางอีกครั้ง จะได้น้ำคั้นกระเทียมไว้ใช้ในการทดลอง ซึ่งจะเตรียมก่อนใช้งาน

3. ความเข้มข้นของน้ำคั้นกระเทียมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* บนอาหารพีดีเอ

วางแผนการทดลองแบบ CRD เปรียบเทียบ 5 กรรมวิธี จำนวน 6 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (ไม่เติมน้ำกระเทียม)

กรรมวิธีที่ 2 น้ำคั้นกระเทียม 25%

กรรมวิธีที่ 3 น้ำคั้นกระเทียม 50%

กรรมวิธีที่ 4 น้ำคั้นกระเทียม 75%

กรรมวิธีที่ 5 น้ำคั้นกระเทียม 100%

เตรียมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *A. flavus* ความเข้มข้น $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมในอาหารพีดีเอ ปริมาตร 400 มิลลิลิตร และเทอาหารพีดีเอที่ผสมสปอร์ของเชื้อรา ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อจานเลี้ยงเชื้อ วางกระดาษกรอง (paper disc) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ลงบนผิวหน้าอาหาร จำนวน 4 จุด ต่อจานเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นหยดน้ำคั้นกระเทียมลงบนกระดาษกรอง ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ตามกรรมวิธีที่กำหนดเก็บที่อุณหภูมิห้อง

บันทึกผลเมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่การยับยั้ง (clear zone) การเจริญของเชื้อรา *A. flavus* (เซนติเมตร) บนผิวหน้าอาหาร

4. ศึกษาความสามารถของเชื้อรา *A. flavus* ในการสร้างสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้ง

วิเคราะห์ผลด้วยการทดสอบ t-test เปรียบเทียบ 2 กรรมวิธี จำนวน 10 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ชุดควบคุม (เติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร)

กรรมวิธีที่ 2 เติมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *A. flavus* ความเข้มข้น $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ทำการชั่งพริกแห้งใส่ถุงพลาสติกชนิดโพลีโพรพิลีน หรือถุงร้อน (polypropylene, PP) น้ำหนัก ถุงละ 100 กรัม ตามกรรมวิธีที่กำหนด มัดปากถุงให้แน่นด้วยยางวง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

ศรีวิชาการเกษตร

บันทึกผลเมื่อครบเวลา 7 วัน 14 วัน และ 21 วัน

1. วัดความชื้น (moisture content) โดยบดตัวอย่างพริกแห้งให้ละเอียดนำมาวัดค่าความชื้น (%)

2. ตรวจปริมาณสารอะฟลาทอกซิน (µg/kg) โดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ชุดตรวจอะฟลาทอกซินของกรมวิชาการเกษตร

5. ผลของน้ำคั้นกระเทียมต่อคุณภาพของพริกแห้ง

วางแผนการทดลองแบบ Split plot design จัดเรียงตัวอย่างแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำมี 3 หน่วยทดลอง ดังนี้

Main plot = 4 (M1 = น้ำ M2 = น้ำคั้นกระเทียม 100% M3 = สารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *A. flavus* 1×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ M4 = น้ำคั้นกระเทียม และเชื้อรา *A. flavus*)

Sub plot = 5 (S1 = 7 วัน S2 = 14 วัน S3 = 21 วัน S4 = 28 วัน และ S5 = 35 วัน)

กรรมวิธีที่ 1 เติมน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 2 เติมน้ำคั้นกระเทียม 100% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 3 เติมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *A. flavus* $1x10^{6}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 4 เติมน้ำคั้นกระเทียม 100% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้ทั่ว หลังจากนั้นเติมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *A. flavus* $1x10^{6}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ทำการชั่งพริกแห้งใส่ถุงพลาสติก PP น้ำหนักถุงละ 50 กรัม ตามกรรมวิธีที่กำหนด มัดปากถุงให้แน่นด้วยยางวง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

บันทึกผล เมื่อครบเวลา 7 วัน 14 วัน 21 วัน 28 วัน และ 35 วัน

1. วัดค่าความชื้น (%)

2. ตรวจปริมาณสารอะฟลาทอกซิน (µg/kg) โดยวิธี ELISA

3. ตรวจปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ในพริกแห้ง (%) โดยวิธี Direct Plating Method สุ่มตัวอย่างพริกแห้งจำนวน 5 เม็ดต่อถุง นำพริกแห้งมาแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 0.1% (w/v) นาน 2 นาที ล้างด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ซับน้ำให้แห้ง ตัดเป็นชิ้นขนาด 10 มิลลิเมตร วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อเอเอฟพีเอ จำนวน 4 ชิ้นต่อจานเลี้ยงเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน ตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อรา *A. flavus* ที่เจริญบนชิ้นตัวอย่าง

6. ผลของน้ำคั้นกระเทียมต่อการสร้างสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้ง

วิเคราะห์ผลด้วยการทดสอบ t-test เปรียบเทียบ 2 กรรมวิธี จำนวน 10 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำมี 2 หน่วยทดลอง ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เติมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *A. flavus* ความเข้มข้น $1x10^{8}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 2 เติมน้ำคั้นกระเทียม 100% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร คลุกให้ทั่ว หลังจากนั้นเติมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *A. flavus* ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กรมวิชาการเกษตร

ทำการชั่งพริกแห้งใส่ถุงพลาสติก PP น้ำหนัก ถุงละ 30 กรัม ตามกรรมวิธีที่กำหนด มัดปากถุงให้แน่นด้วยยางวง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

บันทึกผล เมื่อครบเวลา 7 วัน 14 วัน 21 วัน 28 วัน และ 35 วัน ตรวจปริมาณสารอะฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA นำค่าที่ได้มาคำนวณ % Inhibition of aflatoxin production ตาม Equation 1

$$\% \text{ Inhibition production} = \frac{(\text{aflatoxin with } \textit{A. flavus} - \text{aflatoxin with garlic juice and } \textit{A. flavus}) \times 100}{\text{aflatoxin with } \textit{A. flavus}}$$

7. พริกแห้งคลุกน้ำกระเทียมเก็บรักษานาน 2 เดือน

วางแผนการทดลองแบบ Split plot design จัดเรียงตัวอย่างแบบ RCB จำนวน 4 ซ้ำ ในแต่ละซ้ำมี 2 หน่วยทดลอง

Main plot = 3 (M1 = น้ำคั้นกระเทียม 100% M2 = เชื้อรา *A. flavus* และ M3 = น้ำคั้นกระเทียม 100% + เชื้อรา *A. flavus*)

Sub plot = 2 อายุการเก็บรักษา (S1 = 1 เดือน และ S2 = 2 เดือน)

กรรมวิธีที่ 1 เติมน้ำคั้นกระเทียม 100% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 2 เติมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *A. flavus* $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 3 เติมน้ำคั้นกระเทียม 100% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้ทั่ว หลังจากนั้นเติมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *A. flavus* $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ทำการชั่งพริกแห้งใส่ถุงซิปเมทัลไลท์ น้ำหนักถุงละ 50 กรัม จำนวน 180 ถุง ทำตามกรรมวิธีที่กำหนด กรรมวิธีละ 60 ถุง ปิดปากถุงให้สนิท เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

การบันทึกผล เมื่อครบเวลา 1 และ 2 เดือน

1. วัดค่าความชื้น (%)
2. ตรวจปริมาณสารอะฟลาทอกซิน (µg/kg) โดยวิธี ELISA
3. ตรวจปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ในพริกแห้ง (%) โดยวิธี Direct Plating Method

กรมวิชาการเกษตร

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การทดลองที่ 2.1 ผลของวิธีการตากและระยะเวลาการเก็บรักษาต่อการปนเปื้อนสารอะฟลาทอกซิน บี1 ในถั่วลิสงหลังการเก็บเกี่ยว

1. สำรวจแปลงปลูกถั่วลิสงและขั้นตอนการดำเนินงานหลังการเก็บเกี่ยวของเกษตรกร คัดเลือกพื้นที่ปลูกถั่วลิสงพันธุ์ขอนแก่น 5 ใน อ.น้ำพอง จ.ขอนแก่น ซึ่งลักษณะเด่นของพันธุ์ คือ มีขนาดเมล็ดโตและให้ผลผลิตสูง เหมาะสำหรับใช้ในรูปถั่วกะเทาะเปลือก (ถั่วลิสงเมล็ดแห้ง) จากการสอบถามขั้นตอนการปฏิบัติงานของเกษตรกร พบว่าถั่วลิสงที่จะทำเป็นเมล็ดแห้งจะเก็บเกี่ยวที่อายุประมาณ 100-110 วัน โดยการสุ่มถอนดูเมื่อเมล็ดถั่วลิสงแก่เต็มที่เปลือกฝักด้านในเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ 60-80% ถอนต้นถั่วลิสงและปลิดฝักทันที นำถั่วลิสงใส่ตะกร้าและนำไปล้างน้ำเพื่อเอาดินที่ติดฝักออก จากนั้นนำไปตากบนตาข่ายมุ้งไนล่อนบนพื้นจนฝักแห้ง ใช้เวลาประมาณ 6-10 วัน

2. เปรียบเทียบวิธีการตากเพื่อลดความชื้นหลังการเก็บเกี่ยว

นำถั่วลิสงมาทดสอบกรรมวิธีการตากแบบต่าง ๆ ซึ่งในช่วงทำการทดลองกลางวันสภาพอากาศมีอุณหภูมิสูง 36-39°C กลางคืนมีอุณหภูมิลดลงอยู่ที่ 23-29°C ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 64-69% และมีฝนตกหนักในช่วงทำการทดลองด้วย ซึ่งช่วงฝนตกความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศสูงถึง 83-85% โดยกรรมวิธีที่ 1 ปลิดฝักถั่วลิสง และนำไปอบแห้งด้วยเครื่องอบลดความชื้นแบบอบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 40°C ซึ่งในการทดลองใช้ถั่วลิสงฝักสด 197 kg ใช้เวลาในการอบจนฝักแห้ง 36 ชั่วโมง (Figure 1) กรรมวิธีที่ 2 ปลิดฝักถั่วลิสง นำไปตากบนตะแกรงตากในโรงเรือนจนเมล็ดถั่วลิสงแห้ง ซึ่งการตากไม่โดนแสงแดดโดยตรงจึงใช้เวลาในการตากนานถึง 18 วัน ความชื้นเมล็ดจึงลดลงต่ำกว่า 9% (Figure 2) และกรรมวิธีที่ 3 ปลิดฝักถั่วลิสง ใส่ตะกร้านำไปล้างน้ำเพื่อนำเศษดินที่ติดฝักออกและตากบนตาข่ายมุ้งไนลอนบนพื้นปูน นาน 7 วัน (Figure 3)

Figure 1 Treatment 1 Pods were removed from the peg and dried with hot air oven

Figure 2 Treatment 2 Pods were removed from the peg and dried on drying rack in green house

Figure 3 Treatment 3 Pods were removed from the peg, washed and dried on cement ground

การวัดความชื้นเมล็ดหลังการเก็บเกี่ยวพบว่า ถั่วลิสงมีความชื้นเมล็ดเฉลี่ย 44.6-49.5% และหลังจากผ่านการตากแห้งตามกรรมวิธีต่าง ๆ ความชื้นเมล็ดลดลง โดยมีความชื้นเมล็ดเฉลี่ย 5.9-6.0% (Figure 4) สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2553) ได้ออกมาตรฐานสินค้าเกษตร การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับถั่วลิสง โดยมีคำแนะนำสำหรับฝักถั่วลิสงที่ปลิดเป็นถั่วลิสงสดทั้งเปลือกทันทีหลังถอน ให้ตากจนมีความชื้นของเมล็ดไม่เกิน 12% ภายใน 4 วัน และไม่เกิน 9% ภายใน 7 วัน

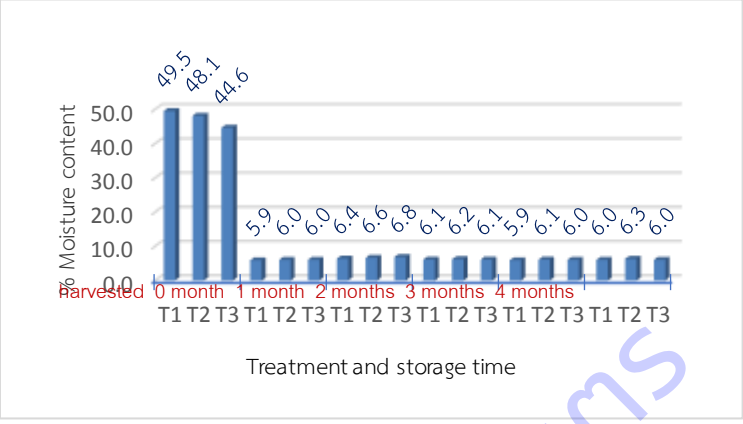


Figure 4 Percentage of moisture content of peanuts after treated with drying methods and storage for 4 months

จากการคัดแยกเมล็ดดีและเมล็ดเสียจากถั่วลิสงที่ผ่านการตากแต่ละกรรมวิธี พบว่า กรรมวิธีที่ 3 พบเมล็ดดีสูงเฉลี่ย 97.4% (โดยน้ำหนัก) รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 2 และ 1 มีปริมาณเมล็ดดี 94.6% และ 86.6% ตามลำดับ โดยพบเมล็ดเสียมากในกรรมวิธีที่ 1 เฉลี่ย 13.4% (โดยน้ำหนัก) รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 2 และ 3 พบปริมาณเมล็ดเสียเฉลี่ย 5.4% และ 2.6% ตามลำดับ (Figure 5) ซึ่งปริมาณเมล็ดเสียที่พบมากในกรรมวิธีที่ 1 ส่วนใหญ่เป็นเมล็ดลีบ แบน สีคล้ำ ที่เกิดจากการอบแห้ง เนื่องจากในการอบด้วยอุณหภูมิเท่ากันขนาดเมล็ดที่เล็กและไม่สมบูรณ์จะเกิดความเสียหายจากความร้อนได้ง่าย

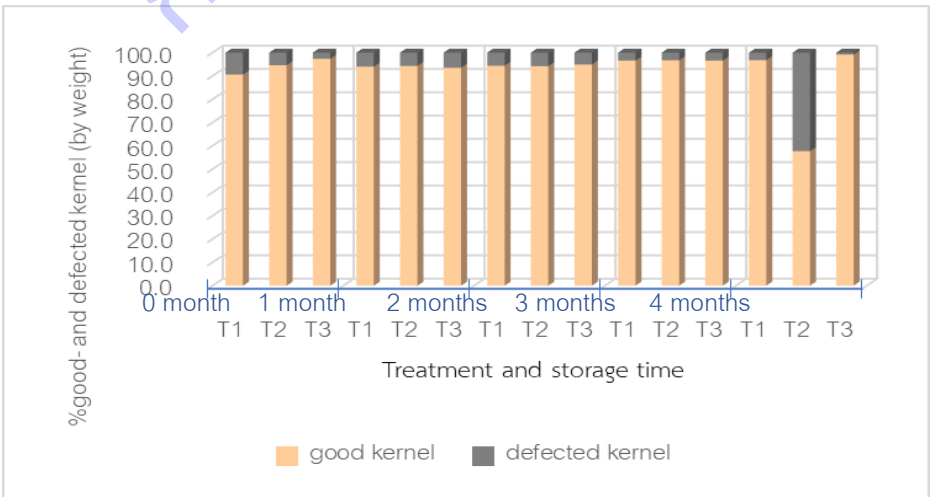


Figure 5 Percentage of good- and defected kernels (by weight) of peanuts after treated with drying methods and storage for 4 months

กรมวิชาการเกษตร

การตรวจสอบเชื้อราที่พบปนเปื้อนในดินแปลงปลูกถั่วลิสง ด้วยวิธี soil dilution plate พบว่า ดินในแปลงปลูกมีการปนเปื้อนเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยวในกลุ่ม *Penicillium* มากสุดเฉลี่ย $3.05x10^4$ cfu/ml รองลงมาคือ *Aspergillus terreus* $1.11x10^4$ cfu/ml *Eurotium* sp. $0.83x10^4$ cfu/ml และ *A. niger* $0.55x10^4$ cfu/ml

ผลการปนเปื้อนเชื้อราในถั่วลิสงหลังการตาก พบว่า ถั่วลิสงหลังการตากมีการปนเปื้อนเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* มาก โดยกรรมวิธีที่ 3 พบปนเปื้อนมากที่สุด เฉลี่ย 83.3% รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 1 และ 2 พบปนเปื้อน 66.7% และ 36.7% ตามลำดับ และเชื้อราที่พบปนเปื้อนรองลงมาคือ *A. niger* จากกรรมวิธีที่ 2 พบการปนเปื้อนสูงสุดเฉลี่ย 25.0% รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 3 และ 1 พบการปนเปื้อน 13.3% และ 3.3% ตามลำดับ และ ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* แต่พบการปนเปื้อนเชื้อรา *Eurotium* sp. 1.7-6.7% ซึ่ง *Eurotium* sp. เป็นระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* (Table 1) Chein *et al.* (2019) ได้สำรวจและเก็บตัวอย่างถั่วลิสงจากโรงเก็บของเกษตรกร ผู้รวบรวม และผู้ค้าส่ง ในสาธารณรัฐแห่งสหภาพพม่า จำนวน 640 ตัวอย่าง พบว่า ถั่วลิสงมีการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* 38 ไอโซเลท *A. niger* 20 ไอโซเลท *A. terreus* 15 ไอโซเลท *P. citrinum* 12 ไอโซเลท ซึ่งแตกต่างจากในการทดลองนี้อาจเนื่องจากดินในแปลงปลูกที่ทำการทดลองพบเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* มาก และการปนเปื้อน *A. flavus* มักพบมากในระยะการเก็บรักษา

Table 1 Percentage of *Aspergillus flavus* and other mycotoxins producing fungi contamination in peanuts after treated with different drying methods

Treatment (drying method)	Fungal contamination (%)				
	A. flavus	*A. niger*	*Fusarium* sp.	*Penicillium* sp.	*Eurotium* sp.
T1 dried with hot air oven	-	3.3	-	66.7	1.7
T2 dried on drying rack in green house	-	25.0	-	36.7	3.3
T3 dried on cement ground	-	13.3	-	83.3	6.7

จากการทดสอบกรรมวิธีการตาก พบว่า ทั้ง 3 กรรมวิธีมีการปนเปื้อน AFB1 ไม่แตกต่างกัน โดยกรรมวิธีที่ 2 (การตากบนตะแกรงตากในโรงเรือน) พบการปนเปื้อน AFB1 มากสุด เฉลี่ย 7.0 µg/kg รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 1 (อบแห้งด้วยเครื่องอบลดความชื้น) และกรรมวิธีที่ 3 (ตากบนตาข่ายมุ้งไนลอนบนพื้นปูน) โดยพบการปนเปื้อนเฉลี่ย 6.9 และ 4.1 µg/kg ตามลำดับ (Table 2) เนื่องจากในกระบวนการตากแห้งทั้ง 3 วิธี เมล็ดไม่มีการสัมผัสพื้นดินโดยตรง ทำให้เมล็ดไม่พบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* รวมทั้งมีความชื้นเมล็ดต่ำกว่า 9% และพบการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินต่ำกว่าเกณฑ์ที่มาตรฐานกำหนด สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน (2563) ให้คำแนะนำการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยว โดยแนะนำให้ตากบนตะแกรงตาข่าย แคร่ หรือผ้าใบ ไม่ให้ฝักสัมผัสพื้นดิน ควรพลิกกลับกองถั่วที่ตากประมาณ 2-3 ครั้งต่อวัน เพื่อช่วยให้ฝักแห้งเร็วขึ้น ถ้าเป็นช่วงที่แดดจัดใช้เวลาตาก 3-5 วัน เพื่อลดความชื้นให้ต่ำกว่า 9%

กรมวิชาการเกษตร

Table 2 Aflatoxin B1 contamination (µg/kg) in peanuts after treated with different drying methods

Treatment	Mean of AFB1 (µg/kg)
T1 dried with hot air oven	6.9
T2 dried on drying rack in green house	7.0
T3 dried on cement ground	4.1
Mean	6.0

C.V. = 32.0%

3. ทดสอบวิธีการตากร่วมกับระยะเวลาการเก็บรักษาต่อคุณภาพของเมล็ด

ถั่วลิสงที่ผ่านการตากตามกรรมวิธีต่าง ๆ บรรจุในกระสอบพลาสติกนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิโดยรอบในอาคารเป็นระยะเวลา 4 เดือน นำมาทดสอบการปนเปื้อนเชื้อราที่สร้าง AFB1 รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและไขมันในเมล็ดทุกเดือน พบว่า ถั่วลิสงที่ผ่านการตากเพื่อลดความชื้นตามกรรมวิธีต่าง ๆ ในแต่ละเดือนส่วนใหญ่มีปริมาณเมล็ดดีมากกว่า 90% แต่ในช่วงเดือนที่ 4 ของการเก็บรักษา ถั่วลิสงในกรรมวิธีที่ 2 (T2) มีเมล็ดดีลดลง เหลือ 57.7% มีเมล็ดเสียสูงถึง 42.3% โดยน้ำหนัก เนื่องมาจากพบการเข้าทำลายของด้วงขาโต (*Caryedon serratus*) กัดกินเมล็ดจนเป็นรูพรุน (Figure 5 and 6) ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากการตากบนตะแกรงตากในโรงเรือนนานเกินไป โดยใช้เวลาในการตากนานถึง 18 วัน เมล็ดจึงมีความชื้นเหลือต่ำกว่า 9% ทำให้แมลงศัตรูพืชเข้ามาวางไข่ในช่วงระยะเวลาการตาก และเจริญเติบโตทำความเสียหายในช่วงเดือนที่ 4 ของการเก็บรักษา

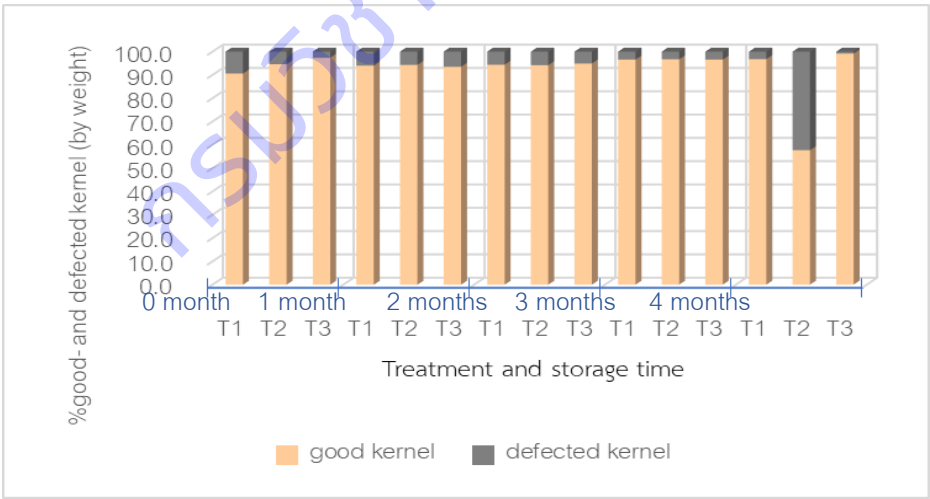


Figure 5 Percentage of good- and defected kernels (by weight) of peanuts after treated with drying methods and storage for 4 months

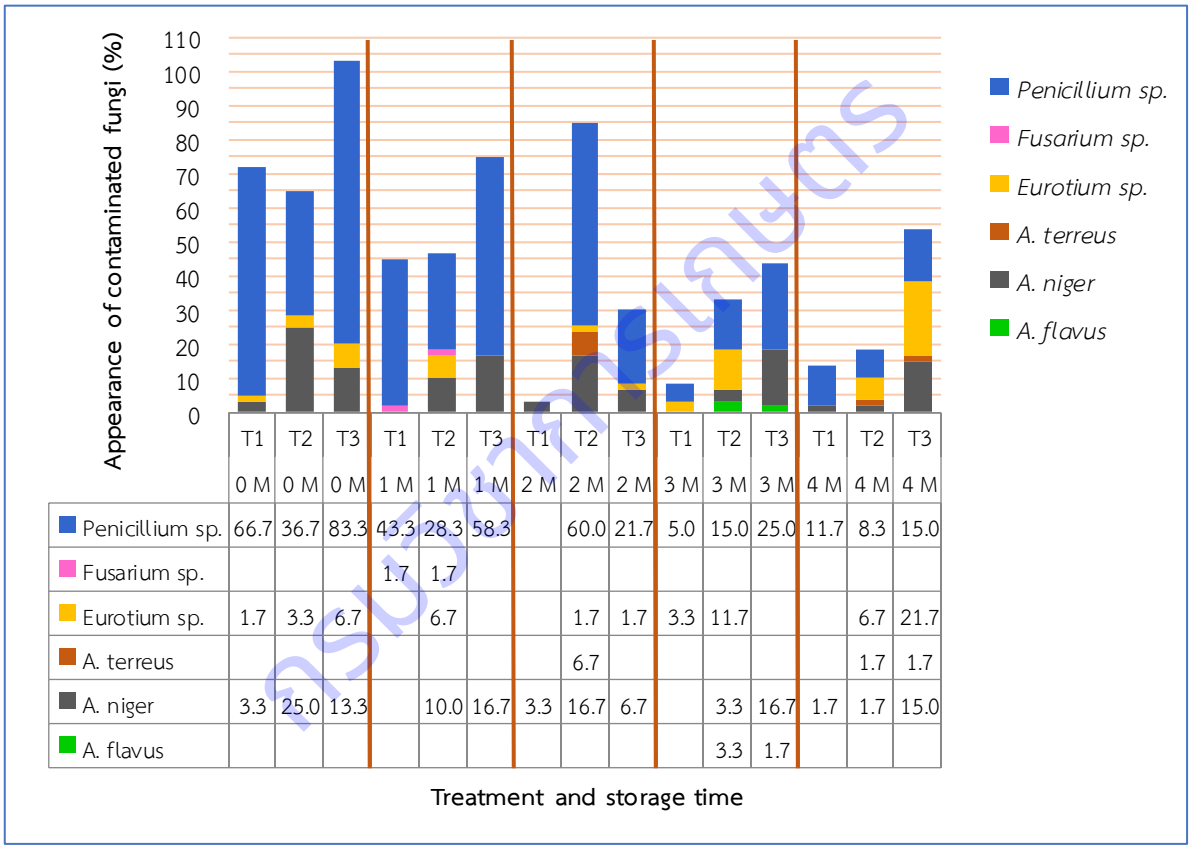
Figure 6 In the fourth months of storage, peanuts from method no.2 were infested by *Caryedon serratus* (groundnut seed beetle).

ถั่วลิสงที่เก็บเกี่ยวใหม่จากแปลงมีความชื้นสูงถึง 44.6-49.5% เมื่อลดความชื้นด้วยกรรมวิธีต่างๆ ความชื้นเมล็ดลงเหลือ 5.9-6.0% มีความชื้นเมล็ดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในเดือนที่ 1 และ 2 ของการเก็บรักษา เป็น 6.4-6.8% และ 6.1-6.2% ตามลำดับ ในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษา เมล็ดมีความชื้น 6.0-6.3% ซึ่งทุกกรรมวิธีทดลองมีเปอร์เซ็นต์ความชื้นเมล็ดต่ำกว่ามาตรฐานถั่วลิสงเมล็ดแห้งกำหนด (9%) (Figure 4) โสภณ และ สนั่น (2554) แนะนำว่า การนำถั่วลิสงไปใช้ในรูปของถั่วเมล็ดแห้ง จำเป็นต้องมีวิธีการลดความชื้นของเมล็ดให้ลดต่ำจาก 30% จนถึง 12% ภายในระยะเวลาไม่เกิน 3 วัน จึงจะปลอดภัยจากการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซิน เนื่องจากช่วงที่เมล็ดมีความชื้น 12-30% เหมาะแก่การเจริญและการสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* มากที่สุด Zuza Jnr *et.al* (2018) ศึกษาพบว่าปริมาณความชื้นของเมล็ดถั่วลิสงมีผลอย่างมากต่อการเจริญของเชื้อราที่สร้างสารพิษและการสร้างสารอะฟลาทอกซิน วิธีการทำให้แห้งแบบต่างๆ มีผลแตกต่างกันต่อการสูญเสียความชื้นของเมล็ด โดยการสูญเสียความชื้นภายในเมล็ดจะเป็นไปอย่างรวดเร็วหลังการเก็บเกี่ยวเมื่อเทียบกับสัปดาห์ต่อๆ มา เนื่องจากเมล็ดหลังการเก็บเกี่ยวมีปริมาณน้ำอิสระในเมล็ดสูง ส่งผลให้เกิดอัตราการแพร่กระจายของน้ำจากเมล็ดสู่สภาพแวดล้อมเพิ่มขึ้นโดยการระเหยและสูญเสียน้ำอย่างรวดเร็ว

การทดสอบการปนเปื้อนเชื้อราในเมล็ดถั่วลิสงในระยะเวลาการเก็บรักษา พบว่า ก่อนการเก็บรักษา (เดือน 0) ทั้ง 3 กรรมวิธี พบการปนเปื้อนเชื้อรา *Penicillium* sp. สูง 36.7-83.3% รองลงมาคือ เชื้อรา *A. niger* 3.3-25.0% และ *Eurotium* sp. 1.7-6.7% ตามลำดับ หลังเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 เดือน ยังคงพบการปนเปื้อนของเชื้อรา *Penicillium* sp. และ *A. niger* มาก 28.3-58.3% และ 10.0-16.7% ตามลำดับ นอกจากนี้มีการปนเปื้อนเชื้อรา *Fusarium* sp. เล็กน้อย 1.7% ในกรรมวิธีที่ 1 และ 2 ส่วนเดือนที่ 2 ของการเก็บรักษา กรรมวิธีที่ 2 มีการปนเปื้อนเชื้อราหลายชนิด พบ *Penicillium* sp. 60.0% *A. niger* 16.7% *A. terreus* 6.7% และ *Eurotium* sp. 1.7% ในเดือนที่ 3 ของการเก็บรักษา พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* เล็กน้อยในกรรมวิธีที่ 2 และ 3 มีการปนเปื้อน 3.3% และ 1.7% ตามลำดับ ส่วนเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษา พบการปนเปื้อนของเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยวชนิดต่างๆ ลดลง แต่ในกรรมวิธีที่ 3 มีการพบเชื้อรา *Eurotium* sp. เพิ่มสูงขึ้น 21.7% (Figure 7) การพบเชื้อรา *A. niger* สูง เนื่องจากเป็นเชื้อราที่เจริญได้ดีทั้งในสภาพอากาศ

กรมวิชาการเกษตร

ค่อนข้างเย็นและร้อนชื้น อีกทั้งเป็นเชื้อราที่พบปนเปื้อนได้ทั้งในดินและผลิตผลเกษตรหลายชนิด ในส่วนของเชื้อรา *Penicillium* sp. ที่พบปนเปื้อนสูงมากกว่าเชื้อราชนิดอื่นๆ ในช่วงแรกของการเก็บรักษาเป็นผลมาจากการปนเปื้อนจากดินในแปลงปลูก เนื่องจากการสำรวจดินในแปลงปลูกถั่วลิสงที่ทำการทดลองพบมีเชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* มาก จากรายงานของ Ding *et al*. (2015) ได้ศึกษาความแตกต่างของเชื้อราและสารอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงที่เก็บรักษาใน 4 พื้นที่ของประเทศจีน พบว่า พื้นที่ที่มีอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศสูงอาจจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อรา *Aspergillus* และสารอะฟลาทอกซินในถั่วลิสง เช่น มณฑลหูเป่ย์ตอนกลางของประเทศมีการปนเปื้อนเชื้อรา *Penicillium, Eurotium* และ *Aspergillus* สูง ส่วนมณฑลชานตงทางภาคตะวันออกพบ *Rhizopus, Emericella* และ *Clonostachys* เป็นส่วนใหญ่ และมณฑลกวางตุ้งทางตอนใต้ของจีนพบเชื้อรา *Eurotium*, *Aspergillus* และ *Emericella*



	T1 0 M	T2 0 M	T3 0 M	T1 1 M	T2 1 M	T3 1 M	T1 2 M	T2 2 M	T3 2 M	T1 3 M	T2 3 M	T3 3 M	T1 4 M	T2 4 M	T3 4 M
Penicillium sp.	66.7	36.7	83.3	43.3	28.3	58.3		60.0	21.7	5.0	15.0	25.0	11.7	8.3	15.0
Fusarium sp.				1.7	1.7										
Eurotium sp.	1.7	3.3	6.7		6.7			1.7	1.7	3.3	11.7			6.7	21.7
A. terreus								6.7						1.7	1.7
A. niger	3.3	25.0	13.3		10.0	16.7	3.3	16.7	6.7		3.3	16.7	1.7	1.7	15.0
A. flavus											3.3	1.7			

Figure 7 Percentage of *A. flavus* and other post-harvest fungi contamination in dried peanut after treated with drying methods and storage for 4 months

ทดสอบวิธีการตากและระยะเวลาในการเก็บรักษา พบว่า วิธีการตากเพื่อลดความชื้นร่วมกับระยะเวลาการเก็บรักษาไม่มีผลต่อการปนเปื้อน AFB1 ปริมาณโปรตีน และไขมัน โดยทุกกรรมวิธีที่ทำการทดสอบพบการปนเปื้อน AFB1 ไม่ค่าเกินมาตรฐานตามข้อกำหนดปริมาณอะฟลาทอกซินสำหรับเมล็ดถั่วลิสง (20 µg/kg) โดยในช่วง 3 เดือนแรกของการเก็บรักษาถั่วลิสงมีการปนเปื้อน AFB1 ไม่แตกต่างกัน เฉลี่ย 5.8-7.9 µg/kg แต่ในเดือนที่ 4 ของการเก็บรักษา ถั่วลิสงมีการปนเปื้อน AFB1 สูงขึ้น โดยถั่วลิสงที่ลดความชื้นด้วยกรรมวิธีที่ 2 พบการ

ปนเปื้อน AFB1 สูงกว่ากรรมวิธีอื่น เฉลี่ย 13.0 µg/kg (Table 3) ซึ่งอาจเกิดจากการพบการปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* ในเดือนที่ 3 ของการเก็บรักษา และจากงานวิจัยของ Ding *et al*. (2015) พบว่า ในระหว่างการเก็บรักษา *Aspergillus* มีการปนเปื้อนสูงในช่วง 7-12 เดือนของการเก็บรักษา มากกว่าช่วง 0-6 เดือน ซึ่งบ่งบอกถึงความเสี่ยงที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่จัดเก็บ โดยมีการปนเปื้อน AFB1 ในถั่วลิสง เพิ่มขึ้นในช่วงการเก็บรักษา 7-10 เดือน งานวิจัยของ Mutegi *et al.* (2013) พบว่า ถั่วลิสงที่เก็บรักษาในถุง polyethylene มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินมากกว่าที่เก็บรักษาในถุง polypropylene และกระสอบปอ ถั่วลิสงแห้งควรบรรจุในภาชนะที่จะป้องกันการเพิ่มขึ้นของความชื้นเมล็ดและการปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน โดยเก็บไว้ในห้องที่แห้ง มีอากาศหมุนเวียนและการระบายอากาศที่ดี

Table 3 Aflatoxin B1 contamination (µg/kg) in peanuts after treated with different drying methods and storage time

Drying method	Storage time (month)					Mean of AFB1
	0	1	2	3	4	(µg/kg)
T1 dried with hot air oven (40°C)	6.9	6.2	7.8	5.0	10.8	7.3a
T2 dried on drying rack in green house	7.0	5.1	8.6	7.5	13.0	8.2a
T3 dried on cement ground	4.1	7.4	7.3	4.9	9.5	6.6a
Mean	6.0a	6.3a	7.9a	5.8a	11.1b	

C.V.(a) = 30.3% C.V.(b) = 23.5%

Mean in the same column, followed by a common letter are not significantly different at 5% level by DMRT

นอกจากนี้นำเมล็ดถั่วลิสงมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน และไขมัน พบว่า เมล็ดถั่วลิสงจากการลดความชื้นทุกกรรมวิธีมีปริมาณโปรตีนไม่แตกต่างกัน แต่ในเดือนสุดท้ายของการเก็บรักษาถั่วลิสงมีโปรตีนลดลงต่ำสุด โดยทุกกรรมวิธีมีโปรตีนเฉลี่ย 23.1% (Table 4) ในการวิเคราะห์ปริมาณไขมันพบว่า การตากทุกกรรมวิธีมีปริมาณไขมันในเมล็ดไม่แตกต่างกัน แต่ในเดือนที่ 4 ของการเก็บรักษาถั่วลิสงมีปริมาณไขมันลดลง โดยวิธีที่ 1 ถั่วลิสงมีไขมันเฉลี่ย 39.8% รองลงมาคือ ถั่วลิสงจากวิธีที่ 3 และ 1 มีปริมาณไขมันเฉลี่ย 36.6 และ 36.3% ตามลำดับ (Table 5) Liu *et al*. (2019) การเก็บรักษามีผลต่อปริมาณไขมัน โปรตีน น้ำตาลทั้งหมด และความชื้นในถั่วลิสง แต่ไม่มีผลต่อปริมาณเถ้า โดยทั่วไปองค์ประกอบของกรดไขมันและกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกัน อุณหภูมิสูงทำให้เกิดการออกซิเดชันของไขมันและการสูญเสียสารอาหารในระดับสูง

ลิขสิทธิ์การเกษตร

Table 4 Protein content (%) in peanuts after treated with different drying methods and storage time

Drying method	Storage time (month)					Mean of protein (%)
	0	1	2	3	4	
T1 dried with hot air oven (40°C)	27.7	27.5	27.2	28.6	23.3	26.9a
T2 dried on drying rack in green house	27.5	27.5	27.4	28.4	23.4	26.8a
T3 dried on cement ground	27.0	27.0	27.1	27.9	22.7	26.3a
Mean	27.4b	27.3b	27.2b	28.3a	23.1c	26.7

C.V.(a) = 2.5% C.V.(b) = 1.5%

Mean in the same column, followed by a common letter are not significantly different at 5% level by DMRT

Table 5 Fat content (%) in peanuts after treated with different drying methods and storage time

Drying method	Storage time (month)					Mean of fat (%)
	0	1	2	3	4	
T1 dried with hot air oven (40°C)	41.9	41.4	38.2	40.4	39.8	40.3a
T2 dried on drying rack in green house	41.2	41.5	39.4	38.0	36.3	39.3a
T3 dried on cement ground	39.4	41.0	38.8	39.8	36.6	39.1a
Mean	40.8ab	41.3a	38.8bc	39.4abc	37.6c	39.6

C.V.(a) = 5.9% C.V.(b) = 4.3%

Mean in the same column, followed by a common letter are not significantly different at 5% level by DMRT

กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาผลของน้ำคั้นกระเทียมต่อปริมาณการปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้ง

1. ความเข้มข้นของน้ำคั้นกระเทียมในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* บนอาหารพีดีเอ

การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหารพีดีเอ โดยวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางของพื้นที่ที่เกิดการยับยั้ง (clear zone) รอบกระดาษกรองที่หยดน้ำกระเทียมความเข้มข้น 25% 50% 75% และ 100% ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำกระเทียมตามลำดับ ดังนี้ 1.07 ซม. 1.63 ซม. 1.74 ซม. และ 1.90 ซม. เมื่อบ่มเชื้อนาน 24 ชั่วโมง และขนาดของ clear zone จะลดลงเมื่อบ่มนาน 48 ชั่วโมง ตามลำดับ 0.66 ซม. 0.82 ซม. 0.90 ซม. และ 1.01 ซม. ผลการทดลองแสดงใน Table 1, Figure 1 และ Figure 2 จากผลการทดลองนี้ clear zone เกิดล้อมรอบกระดาษกรองที่หยดน้ำกระเทียม สปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* ที่ผสมอยู่ในอาหารพีดีเอจะไม่สามารถเจริญเข้ามาได้ เพียงแต่เจริญอยู่รอบนอก แสดงให้เห็นว่าน้ำกระเทียมมีผลยับยั้งการเจริญของสปอร์เชื้อรา ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในลักษณะเดียวกับ บุญญวดี และคณะ (2558) ทดสอบการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหารพีดีเอผสมน้ำคั้นกระเทียม 10% 5% 2.5% และ 1.25% พบว่าน้ำคั้นกระเทียมทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ 100% เช่นเดียวกับ Thanaboripat *et al*. (1997) รายงานสารสกัดหยาบของกระเทียม 10% (w/v) มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร malt extract agar และ Bocate *et al*. (2021) ศึกษาการใช้สาร garlic essential oil ในรูปแบบสารระเหย พบว่า garlic essential oil ความเข้มข้นตั้งแต่ 2 µl/L ขึ้นไปสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *A. parasiticus* บนอาหารพีดีเอได้สมบูรณ์

Table 1 Inhibition of *Aspergillus flavus* on paper disc with garlic juice on potato dextrose agar at 24 and 48hr. of incubation.

Concentration of garlic juice (%)	Inhibition zone of *Aspergillus flavus* (cm.)	
	24 hr. **	48 hr. **
Control (0% garlic juice)	0^{e}	0^{e}
25% garlic juice	1.07^{d}	0.66^{d}
50% garlic juice	1.63^{c}	0.82^{c}
75% garlic juice	1.74^{b}	0.90^{b}
100% garlic juice	1.90^{a}	1.01^{a}
CV (%)	10.49	18.42

** = significant at $p < 0.01$

Means in the same column followed by different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

กรมวิชาการเกษตร

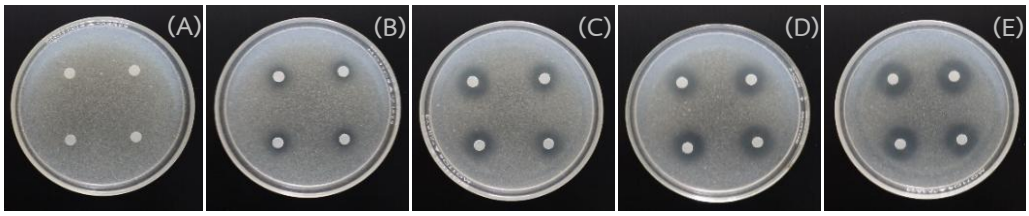


Figure 1 Inhibition zone of paper disc with garlic juice on the growth of *Aspergillus flavus* on PDA for 24 hr.: (A) 0% of garlic juice; (B) 25% of garlic juice; (C) 50% of garlic juice; (D) 75% of garlic juice; (E) 100% of garlic juice.

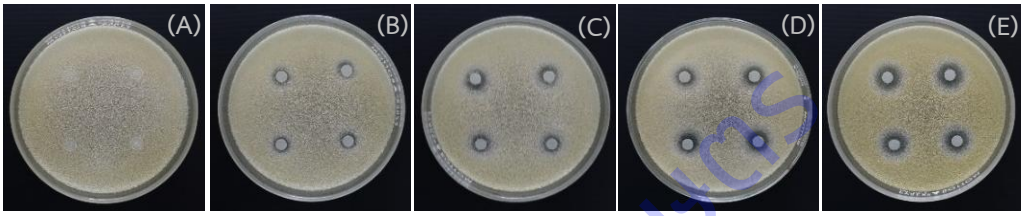


Figure 2 Inhibition zone of paper disc with garlic juice on the growth of *Aspergillus flavus* on PDA for 48 hr.: (A) 0% of garlic juice; (B) 25% of garlic juice; (C) 50% of garlic juice; (D) 75% of garlic juice; (E) 100% of garlic juice.

2. ศึกษาความสามารถของเชื้อรา *A. flavus* ในการสร้างสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้ง

เปรียบเทียบปริมาณสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้งที่เติมสารแขวนลอยสปอร์เชื้อรา *A. flavus* กับพริกแห้งที่เติมน้ำ (ชุดควบคุม) เก็บที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน 14 วัน และ 21 วัน พบว่า พริกแห้งที่เติมเชื้อรามีปริมาณสารอะฟลาทอกซินสูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับพริกแห้งชุดควบคุม ดังนี้ พริกแห้งเติมเชื้อราพบสารอะฟลาทอกซิน 27.70 µg/kg 24.63 µg/kg และ 35.20 µg/kg พริกชุดควบคุมพบสารอะฟลาทอกซิน 10.08 µg/kg 6.10 µg/kg และ 8.82 µg/kg ตามลำดับ และที่เวลา 21 วัน มีค่า t-test สูงสุด เท่ากับ 17.9 เป็นช่วงเวลาที่มีการสร้างสารอะฟลาทอกซินสูงสุดเช่นกัน ผลการทดลองแสดงใน Table 2

Table 2 Aflatoxin content in dried chili storage in polypropylene bag at room temperature for 21 days.

Aflatoxin content after storage. (µg/kg)	Day 7		Day 14		Day 21	
	control	*A. flavus*	control	*A. flavus*	control	*A. flavus*
Mean	10.08	27.70 (A)	6.10	24.63 (B)	8.82	35.20 (C) (D)
T-test	17.6**		16.4**		17.9**	

** = significant at $p < 0.01$

สำหรับความชื้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างพริกแห้งเติมเชื้อรา *A. flavus* กับชุดควบคุม แต่ความชื้นจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บรักษาไว้นาน ดังนี้ ที่เวลา 21 วัน มีค่าความชื้นสูงสุด ในพริกแห้งเติมเชื้อ 15.98% พริกชุดควบคุม 15.95% รองลงมาที่เวลา 14 วัน และ 7 วัน ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงใน Table 3 ความชื้นที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการเติมเชื้อรา 1 มิลลิลิตร และน้ำ 1 มิลลิลิตร ก่อนการบ่มเชื้อ และอีกส่วนจากความชื้นในสภาพแวดล้อมเนื่องจากพริกแห้งเก็บในถุงพลาสติกชนิดโพลีโพรพิลีน ซึ่งเป็นพลาสติกความหนาแน่นต่ำ 0.90-0.91 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ทนความร้อนสูง 90 องศาเซลเซียส มีความใส ทนต่อแรงกระแทก ไอน้ำและออกซิเจนซึมผ่านได้บ้าง (พิมพ์เพ็ญ และนิธิยา, ม.ป.ป.)

Table 3 Moisture content in dried chili storage in polypropylene bag at room temperature for 21 days.

Moisture content	Day 7		Day 14		Day 21	
after storage (%)	control	*A. flavus*	control	*A. flavus*	control	*A. flavus*
Mean	14.46	14.61	15.43	15.50	15.95	15.98
t-test	1.20^{ns}		0.79^{ns}		0.44^{ns}	

ns = not significant

3. ผลของน้ำคั้นกระเทียมต่อคุณภาพของพริกแห้ง

พริกแห้งเก็บรักษาครบกำหนด 35 วัน ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 29.7°C ความชื้นสัมพัทธ์ 66.8% พบว่า กรรมวิธีมีผลให้ปริมาณสารอะฟลาทอกซินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนี้ กรรมวิธีที่ 3 (เชื้อ *A. flavus*) สารอะฟลาทอกซินสูงที่สุด 7.23 µg/kg รองลงมากรรมวิธีที่ 4 (น้ำคั้นกระเทียม และเชื้อ *A. flavus*) 6.19 µg/kg ส่วนกรรมวิธีที่ 1 (น้ำ) และกรรมวิธีที่ 2 (น้ำคั้นกระเทียม) ปริมาณสารอะฟลาทอกซินไม่แตกต่างกัน 4.56 µg/kg และ 4.50 µg/kg ตามลำดับ เมื่อพิจารณาตามช่วงเวลามีผลให้ปริมาณสารอะฟลาทอกซินมีค่าแตกต่างกัน โดยพบมีค่าสูงสุด 6.67 µg/kg เมื่อเก็บนาน 35 วัน ผลการทดลองแสดงใน table 4 จากผลการทดลองกรรมวิธีที่ 1 และกรรมวิธีที่ 2 มีปริมาณสารอะฟลาทอกซินไม่แตกต่างกัน และมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณสารอะฟลาทอกซินเริ่มต้นของตัวอย่างพริกแห้ง (4.48 µg/kg) เนื่องจากพริกแห้งทั้งสองกรรมวิธีนี้ไม่มีการเติมเชื้อรา *A. flavus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่สามารถสร้างสารอะฟลาทอกซินในผลิตผลเกษตรได้ สำหรับกรรมวิธีที่ 4 พริกแห้งเติมน้ำคั้นกระเทียมก่อนเติมเชื้อ *A. flavus* (6.19 µg/kg) มีผลให้สารอะฟลาทอกซินเกิดขึ้นต่ำกว่าในกรรมวิธีที่ 3 พริกแห้งเติมเชื้อเพียงอย่างเดียว (7.23 µg/kg) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินได้ 14.38% แสดงให้เห็นว่าน้ำคั้นกระเทียมไม่มีผลต่อปริมาณสารอะฟลาทอกซินเดิมที่มีอยู่ก่อนแล้ว แต่มีผลให้ปริมาณสารอะฟลาทอกซินลดลงในพริกแห้งที่เติมน้ำคั้นกระเทียมก่อนเติมเชื้อ *A. flavus*

กรมวิชาการเกษตร

Table 4 Aflatoxin content in dried chili storage in polypropylene bag at room temperature for 35 days.

Treatment	Aflatoxin content in dry chili after storage (µg/kg).					T-Mean**
	7 days	14 days	21 days	28 days	35 days	
Control (water)	4.13	4.27	4.58	4.80	5.03	4.56^{a}
Garlic juice	3.94	4.76	4.10	4.50	5.20	4.50^{a}
A. flavus	7.18	7.35	6.30	6.85	8.48	7.23^{c}
Garlic juice + *A. flavus*	5.94	6.48	5.14	5.42	7.96	6.19^{b}
D-Mean**	5.29^{ab}	5.71^{b}	5.03^{a}	5.39^{ab}	6.67^{c}	5.62

cv (a) = 22.8%; cv (b) = 15.2%

** = significant at p < 0.01

Means in the same column; the same row followed by different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

การปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* บนพริกแห้ง พบว่ากรรมวิธีและช่วงเวลาในการเก็บรักษามีผลให้ปริมาณของเชื้อราที่พบบนพริกแห้งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 (น้ำ) และกรรมวิธีที่ 2 (น้ำคั้นกระเทียม) ไม่พบเชื้อ *A. flavus* ทุกช่วงเวลา แต่พบปริมาณเชื้อราสูงที่สุดในกรรมวิธีที่ 3 (เชื้อ *A. flavus*) รองลงมาในกรรมวิธีที่ 4 (น้ำคั้นกระเทียม และเชื้อ *A. flavus*) ในแต่ละช่วงเวลาที่เก็บรักษา เมื่อเปรียบเทียบระหว่างช่วงเวลา พบว่ากรรมวิธีที่ 3 และกรรมวิธีที่ 4 มีปริมาณเชื้อราลดลงตามลำดับเวลา 7 วัน 14 วัน 21 วัน 28 วัน และ 35 วัน ดังนี้ กรรมวิธีที่ 3 พบปริมาณเชื้อรา *A. flavus* 100% 75% 70% 45% และ 72.5% ในกรรมวิธีที่ 4 พบปริมาณเชื้อรา 70% 45% 32.5% 27.5% และ 37.5% ผลการทดลองแสดงใน table 5 และ Figure 3 แสดงให้เห็นว่า การเติมน้ำกระเทียมในพริกแห้งมีผลต่อปริมาณเชื้อราทำให้มีค่าต่ำกว่าในพริกแห้งที่ไม่เติมน้ำกระเทียม เนื่องจากการเติมน้ำกระเทียมก่อนเติมเชื้อทำให้มีน้ำกระเทียมเคลือบอยู่ที่ผิวพริกแห้ง และการใช้น้ำกระเทียมความเข้มข้นสูง 100% จึงมีผลต่อการเจริญของสปอร์เชื้อรา *A. flavus* ที่ตกลงบนผิวของพริกแห้ง ในขณะเดียวกันสภาพแวดล้อมภายนอกส่งผลต่อความมีชีวิต การอยู่รอดของสปอร์เชื้อราเช่นกัน และเป็นที่น่าสังเกตที่ช่วงเวลา 35 วัน ปริมาณเชื้อราที่พบมีค่าเพิ่มขึ้นจากที่เวลา 28 วัน ซึ่งควรจะลดลงตามลำดับเวลา แต่ถ้าพิจารณาจากปริมาณสารอะฟลาทอกซินใน Table 4 ที่ช่วงเวลา 35 วัน กลับพบปริมาณสารอะฟลาทอกซินสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลา 28 วัน ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกันระหว่างปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อรากับปริมาณสารอะฟลาทอกซินที่เกิดขึ้น

กรมวิทยาศาสตร์

Table 5 Contamination of *Aspergillus flavus* in dried chili storage in polypropylene bag at room temperature for 35 days.

Treatment	Contamination of *Aspergillus flavus* in dried chili * (%).				
	7 days	14 days	21 days	28 days	35 days
Control (water)	0.0^{cA}	0.0^{cA}	0.0^{cA}	0.0^{bA}	0.0^{cA}
Garlic juice	0.0^{cA}	0.0^{cA}	0.0^{cA}	0.0^{bA}	0.0^{cA}
A. flavus	100.0^{aA}	75.0^{aB}	70.0^{aB}	45.0^{aC}	72.5^{aB}
Garlic juice + *A. flavus*	70.0^{bA}	45.0^{bB}	32.5^{bB}	27.5^{aB}	37.5^{bB}

cv (a) = 54.2%; cv (b) = 47.0%

* = significant at $p < 0.05$

a, b, c in the same column; A, B, C in the same row followed by different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

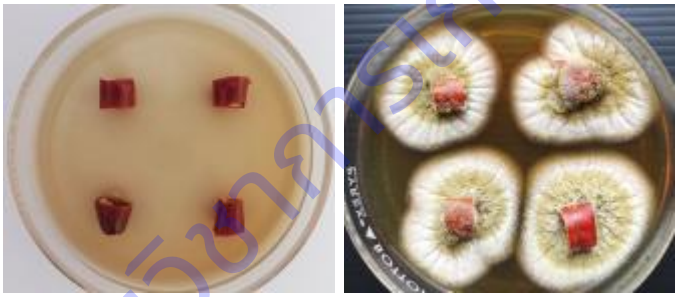


Figure 3 Dried chili plating on Aspergillus flavus and parasiticus agar for 5 days; (A) 0% of *A. flavus* on dried chili, (B) 100% of *A. flavus* on dried chili.

ค่าความชื้นของพริกแห้งที่เก็บครบ 35 วัน กรรมวิธีมีผลให้มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนี้ กรรมวิธีที่ 4 (น้ำคั้นกระเทียม และเชื้อ *A. flavus*) ความชื้นสูงสุด 16.33% รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 3 (เชื้อ *A. flavus*) และกรรมวิธีที่ 1 (น้ำ) มีค่าเท่ากับ 15.65% และ 15.54% ตามลำดับ กรรมวิธีที่ 2 (น้ำคั้นกระเทียม) มีค่าต่ำสุด 15.27% ซึ่งสอดคล้องกับชนิดและปริมาตรของสารที่เติมในช่วงเริ่มต้นการทดลอง ผลการทดลองแสดงใน table 6

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Table 6 Moisture content in dried chili storage in Polypropylene bag at room temperature for 35 days.

Treatment	Moisture content in dry chili after storage. (%)					T-Mean**
	7 days	14 days	21 days	28 days	35 days	
Control (water)	14.81	15.37	15.35	15.85	16.29	15.54[b]
Garlic juice	14.57	14.99	15.12	15.77	15.91	15.27[c]
A. flavus	14.95	15.46	15.69	15.89	16.27	15.65[b]
Garlic juice + *A. flavus*	15.93	16.09	16.42	16.44	16.75	16.33[a]
D-Mean**	15.06[d]	15.48[c]	15.65[c]	15.99[b]	16.30[a]	15.70

cv (a) = 1.5%; cv (b) = 1.6%

Means in the same column; the same row followed by different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

4. ผลของน้ำคั้นกระเทียมต่อการสร้างสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้ง

เปรียบเทียบปริมาณสารอะฟลาทอกซินระหว่างพริกแห้งกรรมวิธีที่ 1 (เชื้อ *A. flavus*) และกรรมวิธีที่ 2 (น้ำคั้นกระเทียม และเชื้อ *A. flavus*) เก็บที่อุณหภูมิเฉลี่ย 29.8°C ความชื้นสัมพัทธ์ 69.7% เมื่อครบ 14 วัน 21 วัน 28 วัน และ 35 วัน พบปริมาณสารอะฟลาทอกซินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า t-test เท่ากับ 8.15 2.78 8.11 และ 6.64 ตามลำดับ ดังค่าแสดงใน table 7 และใน Figure 4 แสดงปริมาณสารอะฟลาทอกซินในกรรมวิธีที่ 1 มีค่าสูงกว่ากรรมวิธีที่ 2 ที่ทุกช่วงเวลา คำนวณตาม Equation 1 จะได้เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้งที่เติมน้ำคั้นกระเทียมก่อนเติมเชื้อ *A. flavus* ดังนี้ 5.86% 34.93% 27.0% 23.14% และ 19.48% ตามเวลาที่บ่มเชื้อ 7 วัน 14 วัน 21 วัน 28 วัน และ 35 วัน ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ อมรา และคณะ (2551) ศึกษาน้ำคั้นกระเทียมพบว่ามีประสิทธิภาพในการลดปริมาณสารอะฟลาทอกซินในข้าวโพดที่มีการปลูกเชื้อได้ 56.60% 58.70% 78.0% และ 76.34 % ที่เวลา 7 วัน 10 วัน 15 วัน และ 20 วัน ตามลำดับ และมีรายงานการใช้สารสกัดหยาบของกระเทียม 10% (w/v) มีผลลดการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และลดการสร้างสารอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวที่เติมเชื้อ *A. flavus* เช่นกัน (Thanaboripat *et al*., 1997) จากผลการทดลองที่เวลา 21 วัน กรรมวิธีที่ 1 มีปริมาณสารอะฟลาทอกซินสูงสุด 20.74 µg/kg กรรมวิธีที่ 2 เท่ากับ 15.14 µg/kg ซึ่งปริมาณสารอะฟลาทอกซินมีแนวโน้มจะค่อยๆ ลดลงตามลำดับเวลาที่บ่มเชื้อ จากค่า t-test สูงสุด 8.15 ที่เวลา 14 วัน จะพบการยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินสูงสุด 34.93% ผลเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ Kheiralla *et al*. (1992) ศึกษาระยะเวลาและอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และการสร้างสารอะฟลาทอกซินบนผลิตผลเกษตร พบว่าที่อุณหภูมิ 30°C นาน 14 วัน เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *A. flavus* และเป็นช่วงเวลาที่มีการสร้างสารอะฟลาทอกซินสูงสุด โดยที่ระดับการสร้างสารอะฟลาทอกซินจะลดลงเมื่อบ่มเชื้อไว้นานขึ้น สาเหตุเกิดจากการดูดซับกลับ (re-adsorption) หรือการเสื่อมสลายของสารอะฟลาทอกซินเอง (degradation)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Table 7 Comparison of aflatoxin content in dried chili amended with and without garlic juice.

Storage day	7 Days	14 Days	21 Days	28 Days	35 Days
t-test	1.19^{ns}	8.15**	2.78*	8.11**	6.64**

** = significant at $p < 0.01$; * = significant at $p < 0.05$; ns = not significant.

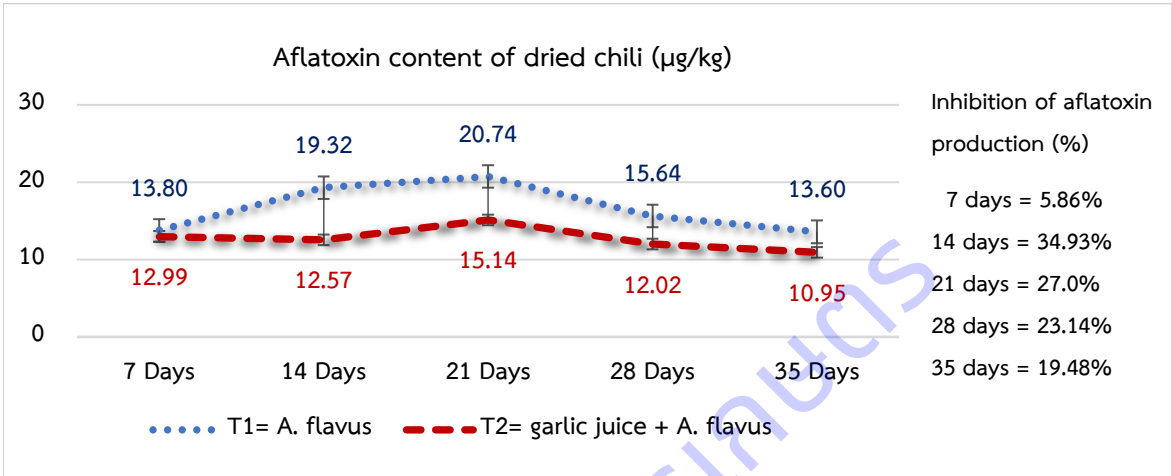


Figure 4 Aflatoxin content of dried chili storage in polypropylene bags at room temperature for 35 days.

5. พริกแห้งคลุกน้ำกระเทียมเก็บรักษานาน 2 เดือน

พริกแห้งเก็บรักษาในถุงซิปเมทัลไลท์ นาน 2 เดือน เปรียบเทียบกรรมวิธีที่ 1 (น้ำคั้นกระเทียม) กรรมวิธีที่ 2 (เชื้อ *A. flavus*) และกรรมวิธีที่ 3 (น้ำคั้นกระเทียม และเชื้อ *A. flavus*) พบว่า กรรมวิธีมีผลต่อปริมาณสารอะฟลาทอกซิน ความชื้น และปริมาณของเชื้อรา *A. flavus* ทำให้มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังนี้ ปริมาณสารอะฟลาทอกซินในกรรมวิธีที่ 1 มีค่าต่ำสุด 3.40 µg/kg กรรมวิธีที่ 3 เท่ากับ 21.63 µg/kg และกรรมวิธีที่ 2 มีค่าสูงสุด 26.65 µg/kg ส่วนค่าความชื้นของพริกแห้งในกรรมวิธีที่ 1 เท่ากับ 16.60% และกรรมวิธีที่ 2 เท่ากับ 16.71% มีค่าไม่แตกต่างกัน พบปริมาณความชื้นสูงสุดในกรรมวิธีที่ 3 เท่ากับ 17.14% สำหรับการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* บนพริกแห้งในกรรมวิธีที่ 1 ไม่พบเชื้อ *A. flavus* กรรมวิธีที่ 2 และกรรมวิธีที่ 3 พบเชื้อ *A. flavus* 41.97% และ 30.11% ตามลำดับ ดังค่าแสดงใน table 8

กรมวิชาการเกษตร

Table 8 Dried chili storage in metalize zipper bag at room temperature for 2 months.

Treatment	Aflatoxin content (µg/kg) **	Moisture content (%) **	Contamination of *Aspergillus flavus* (%) **
Garlic juice	3.40[a]	16.60[a]	0.00[a]
A. flavus	26.65[c]	16.71[a]	41.97[b]
Garlic juice + *A. flavus*	21.63[b]	17.14[b]	30.11[b]
CV (%)	6.4	0.4	17.1

** = significant at $p < 0.01$

Means in the same column followed by different superscripts are significantly different ($p < 0.05$)

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การตากแห้งตามกรรมวิธีต่าง ๆ ทำให้ความชื้นเมล็ดลดลง โดยมีความชื้นเมล็ดเฉลี่ย 5.9-6.0% และเมื่อคัดแยกเมล็ดดีและเมล็ดเสียจากถั่วลิสงที่ผ่านการตากแต่ละกรรมวิธี พบว่า กรรมวิธีที่ 3 พบเมล็ดดีสูงเฉลี่ย 97.4% (โดยน้ำหนัก) รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 2 และ 1 มีปริมาณเมล็ดดี 94.6% และ 86.6% ตามลำดับ การตรวจสอบเชื้อราที่พบปนเปื้อนในดินแปลงปลูกถั่วลิสง พบเชื้อราหลังการเก็บเกี่ยวในกลุ่ม *Penicillium* มากสุด

แนะนำการใช้เครื่องอบลมร้อน และการตากบนพื้นปูนให้ความชื้นเมล็ดลดต่ำกว่า 9% ภายใน 7 วัน ช่วยลดการปนเปื้อน AFB1 ในถั่วลิสงได้ และในการเก็บรักษานานเกิน 3 เดือน จะทำให้ปริมาณโปรตีนและไขมันลดลง วิธีการตากเพื่อลดความชื้นที่ดีไม่ควรให้ถั่วลิสงสัมผัสพื้นดิน ลดความชื้นให้เร็วและควรระวังการเข้ามาวางไข่ของแมลงศัตรูในโรงเก็บ และในการเก็บรักษาก่อนการกะเทาะเปลือกถั่วลิสงควรเก็บในที่โล่งระบายอากาศได้ดี และไม่ควรเก็บนานเกินไปจะทำให้คุณภาพของเมล็ดลดลง

เชื้อรา *A. flavus* สามารถสร้างสารอะฟลาทอกซินบนพริกแห้งได้ หลังใส่เชื้อรา เป็นเวลา 7 และ 14 วัน พบสารอะฟลาทอกซิน เท่ากับ 27.70 และ 24.63 µg/kg และมีค่าสารอะฟลาทอกซินสูงสุดหลังการใส่เชื้อรา *A. flavus* เป็นเวลา 21 วัน เท่ากับ 35.20 µg/kg

น้ำคั้นกระเทียมสด ความเข้มข้น 100% สามารถยับยั้งการเจริญของสปอร์เชื้อรา *A. flavus* บนอาหารพีดีเอได้ดี น้ำคั้นกระเทียมสดมีผลลดการสร้างสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้งที่มีการเติมเชื้อรา *A. flavus* และยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้งได้สูงสุด 34.93% เมื่อบ่มนาน 14 วัน

พริกแห้งคลุกน้ำคั้นกระเทียม บรรจุถุงซิปเมทัลไลท์ เก็บนาน 2 เดือน พบสารอะฟลาทอกซิน 3.40 µg/kg ความชื้น 16.6% และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* บนพริกแห้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

กิจกรรมที่ 3
พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์สารพิษจากเชื้อรา
Developing a method for analyzing mycotoxins

สุพี วนศิรากุล ศุภรา อัคคะสาระกุล อัจฉราพร ศรีจุดานุ
Su-phi Wanasirakul* Suppara Akkasarakul and Atcharaporn Srijudanu

คำหลัก : อนุภาคทอง, แอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ, แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง, เส้นทดสอบ, เส้นควบคุม

Keywords: colloidal gold, OTA-antibodies, colloidal gold-labeled OTA antibodies, test line, control line

กรมวิทยาศาสตร์

บทคัดย่อ

การตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธี Lateral Flow Immunoassay test strip เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตรเบื้องต้นอย่างรวดเร็ว โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง (colloidal gold-labeled antibody) แอนติเจนหรือสารพิษในตัวอย่างจะแข่งขันกับแอนติเจนที่เชื่อมติดกับโปรตีนซึ่งตรึงอยู่บนแถบกระดาษในการจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง การอ่านผลจะดูจากการเกิดสีที่เส้นทดสอบ (T) และเส้นควบคุม (C) ถ้าในตัวอย่างมีสารพิษปนเปื้อนอยู่จะไม่พบสีหรือพบสีจางที่เส้นทดสอบ ถ้าตัวอย่างไม่มีสารพิษจะพบสีที่เส้นทดสอบและทุกครั้งที่ทำการตรวจสอบจะต้องปรากฏสีที่เส้นควบคุมเสมอ การทดลองนี้ใช้แอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในการเชื่อมติดกับอนุภาคทอง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร ปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.6 ละลายตะกอนอนุภาคทองที่เชื่อมติดกับแอนติบอดีด้วย น้ำกลั่น+ 0.05M $NaH_2PO_4H_2O$+ 0.1M NaOH+ 1%BSA+ 0.1% NaN_3+ 10% sucrose ขีดเส้นในตำแหน่งเส้นทดสอบด้วย OTA-BSA ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และขีดเส้นควบคุมด้วย goat anti-rabbit IgG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบการเกิดสีม่วงแดงของอนุภาคทองได้ชัดเจนที่สุด ทดสอบการตรวจจับสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน พบว่าสามารถตรวจจับสารโอคราทอกซิน เอ ที่ความเข้มข้นต่ำสุด 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร แต่สำหรับการตรวจสอบตัวอย่างข้าวกล้องและกาแฟด้วยชุดตรวจสอบนี้ ยังไม่สามารถตรวจจับสารพิษในตัวอย่างได้ เนื่องจากการสกัดตัวอย่างต้องเจือจางสารสกัดลง ถึง 10 เท่า มีผลให้สารพิษในตัวอย่างลดลง ทำให้ผลการตรวจสอบเป็นลบ (negative) หรือตรวจไม่พบสารพิษ จึงยังต้องปรับหาวิธีการเพื่อให้การตรวจสอบมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

Abstract

Lateral flow immunoassay test strip was developed for the detection of ochratoxin A (OTA) in agricultural products. The detection is based on the competition of OTA in sample and OTA-protein conjugate immobilized on test strip for the binding to colloidal gold-labeled OTA antibodies. The results can be observed from the presence of purple red color in the test line (T). The high concentration of OTA in sample will result to invisible line in the test zone (positive result). While the sample without OTA will form visible color in test line (negative result) and the control line will always be visible. In this study, OTA-antibodies at 100 µg/ml were suitable for conjugated with colloidal gold diameter of 40 nanometer, the pH of the solution was adjusted to 8.6. The precipitate of colloidal gold-labeled antibody was dissolved with distilled water containing 0.05M $NaH_2PO_4H_2O$+ 0.1M NaOH+ 1%BSA+ 0.1% NaN_3 and 10% sucrose. The suitable concentration of OTA-BSA at 0.8 mg/ml for test line and goat anti-rabbit IgG at 0.5 mg/ml for control line. The result of the test strip was detected minimum level of OTA standard at 25 ng/ml. While the OTA was could not be detected in brown rice and coffee samples which the extracts were diluted to 10x of OTA in the sample, causing the results to be negative or could not be detected in the sample.

บทนำ

สารโอคราทอกซิน เอ (Ochratoxin A) เป็นสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) ที่พบปนเปื้อนในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด ถั่วลิสง พริก กาแฟ โกโก้ ส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและส่งผลกระทบโดยตรงต่อสุขภาพของมนุษย์ การปนเปื้อนพบได้ทั้งในอาหารคนและอาหารสัตว์ซึ่งเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงและคาดการณ์ได้ยาก นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้เป็นเครื่องต่อรองราคาในการซื้อขายทั้งในประเทศและระหว่างประเทศ (กรมวิชาการเกษตร, 2560) องค์กร International Agency for Research on Cancer, IRAC (2002) จัดให้สารโอคราทอกซิน เอ เป็นสารก่อมะเร็งกลุ่ม 2B คือ มีความเป็นไปได้ต่อการเกิดโรคมะเร็งในมนุษย์ ประเทศไทยโดยกระทรวงสาธารณสุข (2563) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 414 เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน ได้กำหนดปริมาณการปนเปื้อนสูงสุดของสารโอคราทอกซิน เอ สำหรับพริกแห้งหรือพริกป่นที่ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ข้าวบาร์เลย์ ข้าวไรย์ และข้าวสาลี 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

ปัจจุบันพบปัญหาการปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวเพิ่มมากขึ้น เพื่อเป็นการลดความเสี่ยงในการบริโภคผลิตผลหรือผลิตภัณฑ์ที่อาจมีการปนเปื้อนของสารพิษ การตรวจสอบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ จึงเป็นสิ่งสำคัญ สารพิษจากเชื้อราเป็นสารที่มีโมเลกุล ไม่มีสี ไม่มีกลิ่นและรส การที่จะทราบว่าผลิตผลเกษตรหรือผลิตภัณฑ์มีการปนเปื้อนของสารพิษหรือไม่ ต้องทำการการตรวจวิเคราะห์ การตรวจหาปริมาณสารพิษทำได้หลายวิธี แต่วิธีการที่สามารถตรวจวิเคราะห์ในเบื้องต้นอย่างรวดเร็ว ได้แก่ วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา (immunological assay) ซึ่งอาศัยหลักการทำปฏิกิริยาที่เฉพาะเจาะจงระหว่าง

กรมวิชาการเกษตร

แอนติเจนกับแอนติบอดี เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้งานง่าย ไม่จำเป็นต้องทำในห้องปฏิบัติการ ไม่ต้องมีความเชี่ยวชาญพิเศษ วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา เช่น การใช้เทคนิค ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) และเทคนิค LFIA (Lateral Flow Immunoassay) (กรมวิชาการเกษตร, 2560)

เทคนิค Lateral flow immunoassay หรือ Immunochromatographic assay เป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์แบบรวดเร็ว (rapid test) ในรูปแบบแถบทดสอบ (strip test) ที่ใช้หลักการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี สารพิษหรือแอนติเจนในตัวอย่างจะแข่งขันกับสารพิษที่เชื่อมติดกับโปรตีนซึ่งตรึงอยู่บนกระดาษในการจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง โดยอาศัยของเหลวหรือสารละลายเป็นตัวพาให้แอนติเจนไหลผ่านบริเวณที่มีแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง ในลักษณะ capillary จากล่างขึ้นสู่บน หรือลักษณะ lateral flow จากซ้ายไปขวา การอ่านผลจะดูจากแถบสีที่เกิดขึ้นบริเวณเส้นทดสอบ (test zone) ซึ่งสามารถอ่านผลได้ภายใน 10-15 นาที (Bazin *et al.*, 2010) และเนื่องจากสามารถอ่านผลการทดสอบได้เอง ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือในการแปรผล สะดวกต่อการนำไปใช้วิเคราะห์ผลในเชิงคุณภาพ จึงได้มีการพัฒนาชุดทดสอบแบบ strip test นี้ มาใช้อย่างกว้างขวาง เช่น ชุดตรวจการตั้งครรภ์ ชุดตรวจสารเสพติด ชุดตรวจวินิจฉัยโรค และชุดตรวจคุณภาพอาหาร รวมถึงการตรวจสอบการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตรด้วย (Dzantiev *et al*, 2014)

Urusov *et al*. (2011) พัฒนาชุดทดสอบสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยเทคนิค LFIA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีเชื่อมติดกับอนุภาคทอง ใช้หลักการแข่งขันของสารโอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่าง และโอคราทอกซิน เอ ที่เชื่อมติดกับโปรตีนบนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลสจับกับแอนติบอดีที่เชื่อมติดกับอนุภาคทอง ถ้ามีการปนเปื้อนของสารพิษจะไม่พบแถบสีบริเวณเส้นทดสอบ (test line) สามารถอ่านผลการทดสอบได้ภายใน 10 นาที นอกจากนี้ Liu *et al*. (2018) พัฒนาชุดทดสอบสารโอคราทอกซิน เอ ในไวน์แดง โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เชื่อมติดกับอนุภาคทองขนาด 15 นาโนเมตร ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และสามารถตรวจจับสารโอคราทอกซิน เอ ได้ต่ำสุดที่ปริมาณ 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ โดยเทคนิค Lateral Flow Immunoassay ในรูปแบบ strip test เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถตรวจสอบสารพิษในผลิตเกษตร ซึ่งใช้เวลาในการตรวจสอบรวดเร็ว สะดวกต่อการนำไปใช้ ผลการวิเคราะห์จะบอกได้ในเชิงคุณภาพ สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตผลเกษตร ทั้งผลิตผลที่มีการนำเข้าและส่งออก โดยไม่ต้องนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศที่มีราคาสูง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการคัดกรองผลิตผลเกษตรในเบื้องต้น และเป็นการเพิ่มคุณภาพสินค้าเกษตรให้มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. การเตรียมชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยเทคนิค Lateral Flow Immunoassay

1.1 การติดฉลากแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยอนุภาคทอง (colloidal gold-labeled antibody)

นำสารละลายอนุภาคทอง (colloidal gold) ขนาด 40 นาโนเมตร ปริมาตร 5,000 ไมโครลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้ได้ 8.6 ด้วยสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนต (K_2CO_3) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เติม

กรมวิชาการเกษตร

แอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราส่วนแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ต่ออนุภาคทองเท่ากับ 1:10 กวนสารละลาย เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติมโบวีนซีรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) ให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ กวนสารละลาย เป็นเวลา 60 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนอนุภาคทองที่เชื่อมติดกับแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ (colloidal gold-labeled antibody) ด้วยสารละลายสูตรต่างๆ ดังนี้

สูตร 1 น้ำกลั่น+ 0.05M $NaH_2PO_4H_2O$+ 0.1M NaOH+ 1%BSA+ 0.1% NaN_3+ 10%sucrose

สูตร 2 0.01M PBS+ 1%BSA+ 1%PEG8000 + 0.05% NaN_3+ 10%sucrose

สูตร 3 0.02M BB+ 1%BSA+ 0.25%Tween20 + 0.05% NaN_3+ 10%sucrose

1.2 เตรียมแผ่นปล่อยตัวตรวจจับ (conjugate released pad)

นำแผ่นปล่อยตัวตรวจจับที่ตัดให้มีขนาดกว้างประมาณ 0.7 เซนติเมตร มาวางบนกระดาษที่สะอาด ใช้พู่กันเบอร์ศูนย์ จุ่มสารละลายอนุภาคทองที่เชื่อมติดกับแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่เตรียมได้ ทาลงบนแผ่นปล่อยตัวตรวจจับให้ทั่ว โดยใช้สารละลายตะกอนอนุภาคทองที่เชื่อมติดกับแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ อัตรา 6 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร (Figure 1) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ห่อด้วยกระดาษหรือถุงอลูมินั่มฟอยล์ แล้วเก็บในที่แห้ง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการเตรียมชุดทดสอบต่อไป

1.3 การขีดเส้นทดสอบ (test line, T) และเส้นควบคุม (control line, C)

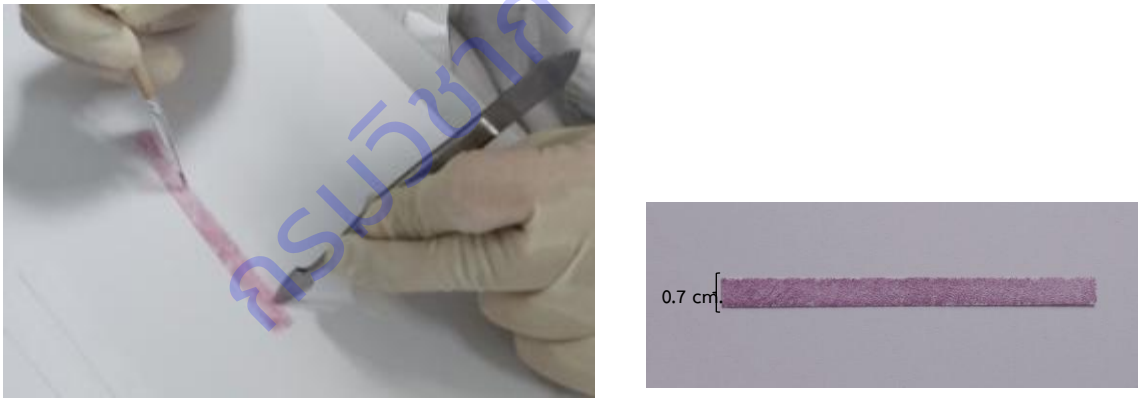


Figure 1 A conjugate released pad (CRP) coated with the colloidal gold-labeled antibody at 6 µL/cm.

ติดกระดาษไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose Membrane) ลงบนแผ่นติดส่วนประกอบชุดทดสอบ (plastic backing card) ขีดเส้นทดสอบ (T) และเส้นควบคุม (C) ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยใช้ปากกาหมึกซึมจุ่ม OTA-BSA ความเข้มข้นที่ 0.5 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ขีดลงที่ตำแหน่งเส้นทดสอบ และปากกาอีกด้ามจุ่ม goat anti- rabbit IgG ความเข้มข้น 0.5 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ขีดลงตรงตำแหน่งเส้นควบคุม ให้แต่ละเส้นห่างกัน 0.5 เซนติเมตร (Figure 2) แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร

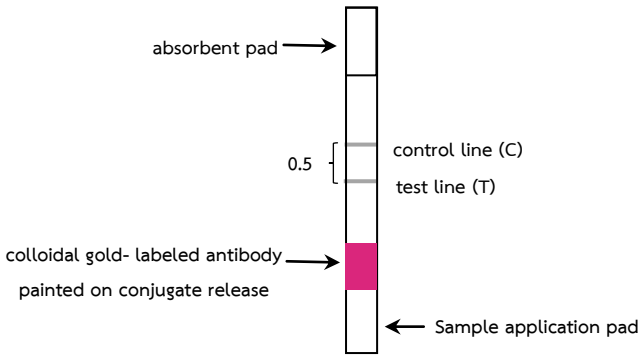


Figure 2 The layout of test line (T) and control line (C) on the lateral fiow test strip.

1.4 การประกอบชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ

นำชิ้นส่วนต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยแผ่นรองรับตัวอย่าง (sample application pad) แผ่นปล่อยตัวตรวจจับ (conjugate release pad) กระดาษไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) แผ่นดูดซับตัวอย่าง (absorbent pad) แผ่นติดส่วนประกอบชุดทดสอบ (plastic backing card) มาประกอบเป็นชุดตรวจสอบ lateral flow immunoassay หรือ strip test ตัดชุดทดสอบให้มีความกว้าง 0.4 เซนติเมตร แล้วใส่ลงในตลับ (cassettes) (Figure 3) เก็บชุดตรวจสอบไว้ในที่แห้ง อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

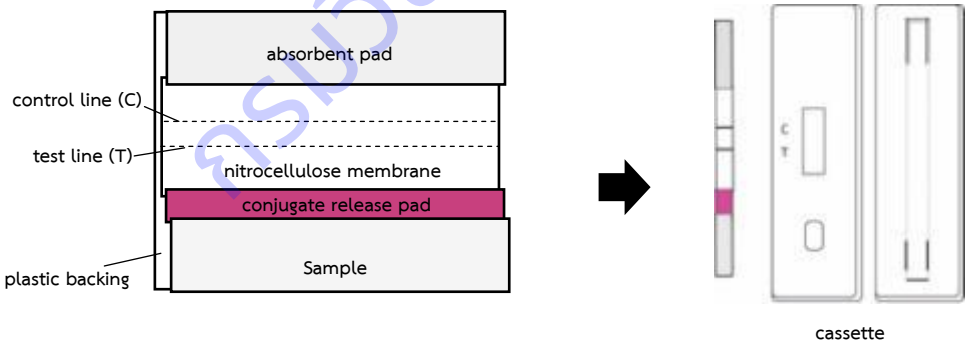


Figure 3 The components of lateral flow test strip.

2. การทดสอบความเข้มข้นของสารโอคราทอกซิน เอ ต่ำสุดที่สามารถตรวจจับได้

เตรียมสารพิษโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน (OTA standard) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0 5 10 25 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หยดสารพิษมาตรฐานลงในแผ่นรองรับตัวอย่าง ถ้าชุดตรวจสอบสามารถตรวจจับสารพิษได้ที่ระดับความเข้มข้นใด จะไม่เกิดสีม่วงแดง หรือมีสีจาง ปรับความเข้มข้นและปริมาตรของ OTA-BSA และ goat anti-rabbit IgG ในการขีดเส้นทดสอบ และเส้นควบคุม เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นสารพิษต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจจับได้

กรมวิชาการเกษตร

3. การเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์

การเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์ ทำการเติมสารพิษโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน ในตัวอย่างทดสอบ ได้แก่ ข้าวกล้อง และกาแฟ ให้มีความเข้มข้น 0 5 10 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 ส่วน สำหรับการตรวจสอบด้วยชุดทดสอบที่เตรียมได้ เทียบกับวิธี HPLC และ ELISA

ตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์ด้วยชุดตรวจสอบที่ผลิตได้ เตรียมโดยบดตัวอย่างให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างที่บดแล้ว 10 กรัม สกัดสารพิษด้วยเมทานอล เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:4) เจือจางสารสกัดด้วย 0.01 M Phosphate Buffer Saline (PBS) + 2% PEG ที่อัตราส่วน 1:1 หยดสารสกัดที่เจือจางแล้ว 3 หยด ลงในช่องสำหรับหยดตัวอย่าง

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การทดลองที่ 3.1 การพัฒนาวิธีตรวจสอบโอคราทอกซิน เอ แบบ Strip Test โดยเทคนิค Lateral Flow Immunoassay

1. การเตรียมชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยเทคนิค Lateral Flow Immunoassay

การประกอบชุดตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ แบบ strip test ลำดับแรกทำการติดกระดาษไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) ลงบนแผ่นติดส่วนประกอบชุดทดสอบ (plastic backing card) กำหนดจุดสำหรับการขีดเส้นทดสอบ (T) และเส้นควบคุม (C) ห่างกัน 0.5 เซนติเมตร ใช้ปากกาหมึกซึมจุ่ม OTA-BSA ขีดเส้นทดสอบ และใช้ปากกาหมึกซึมอีกด้ามจุ่ม goat anti-rabbit IgG ขีดเส้นควบคุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำแผ่นปล่อยตัวตรวจจับที่ทาด้วยอนุภาคทองที่เชื่อมติดกับแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ซึ่งบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้ว นำมาติดตรงส่วนด้านล่างของกระดาษไนโตรเซลลูโลส โดยติดให้เกยกันประมาณ 0.1-0.2 เซนติเมตร ติดแผ่นรองรับตัวอย่างตรงด้านล่างให้เกยทับแผ่นปล่อยตัวตรวจจับ สุดท้ายทำการติดแผ่นดูดซับตัวอย่าง (absorbent pad) ในส่วนบนให้เกยทับแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส

จากการทดสอบละลายตะกอนอนุภาคทองที่เชื่อมติดกับแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยสารละลายสูตรต่างๆ พบว่า การละลายตะกอนอนุภาคทองที่เชื่อมติดกับแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยสารละลายสูตร 1 และสูตร 3 ให้สีบนเส้นทดสอบที่ชัดเจน และได้เลือกสารละลายสูตร 1 (น้ำกลั่น+ 0.05M $NaH_2PO_4H_2O$+ 0.1M NaOH+ 1%BSA+ 0.1% NaN_3+ 10% sucrose) สำหรับใช้ในการทดสอบต่อไป

การทดสอบหยดสารละลาย 0.01M PBS ซึ่งไม่มีสารพิษเป็นตัวอย่างทดสอบ พบการเกิดสีที่ตำแหน่งเส้นทดสอบและควบคุมค่อนข้างชัดเจน เมื่อขีดเส้นทดสอบด้วย OTA-BSA ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตรา 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร และขีดเส้นควบคุมด้วย goat anti-rabbit IgG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตรา 1 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง การหยดสารละลายลงบนแผ่นรองรับตัวอย่าง ของเหลวจะไหลผ่านแผ่นปล่อยตัวตรวจจับที่มีแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทองอยู่ แอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ จะไหลไปจับกับ OTA-BSA ที่ตรึงอยู่บน

ศูนย์วิทยทรัพยากร

กระดาษในตำแหน่งเส้นทดสอบ ทำให้เกิดสีม่วงแดงของอนุภาคทอง จากนั้นของเหลวจะไหลต่อไปและจับกับ goat anti-rabbit IgG ที่ตรึงอยู่บนกระดาษ ทำให้เกิดสีม่วงแดงในตำแหน่งเส้นควบคุม (Figure 4)

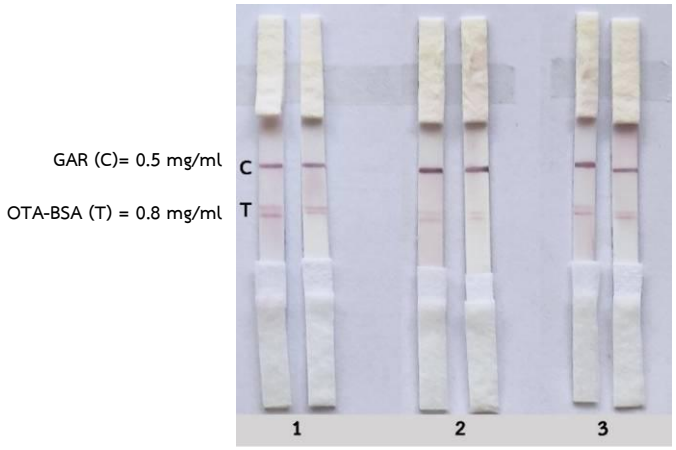


Figure 4 The color on test line (T) and control line (C) when used difference buffer for the colloidal gold- labeled antibody and lined with OTA-BSA (T) at 0.8 mg/ml and Goat Anti-Rabbit IgG (C) at 0.5 mg/ml.

2. การทดสอบความเข้มข้นของสารโอคราทอกซิน เอ ต่ำสุดที่สามารถตรวจจับได้

การทดสอบหยดสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 0 5 10 25 50 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมด้วย 0.01M PBS+7%MeOH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร พบว่า สารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐานสามารถจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทองได้ดี ตั้งแต่ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้สีที่ปรากฏในตำแหน่งเส้นทดสอบ (T) เริ่มจาง (Figure 5) แสดงว่า ชุดทดสอบสามารถตรวจจับสารโอคราทอกซิน เอ มาตรฐานที่ความเข้มข้นต่ำสุด 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งการเกิดสีจางลงเมื่อความเข้มข้นของสารพิษสูงขึ้นเกิดจากสารพิษจากตัวอย่างเกาะจับกับแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทองและเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งเส้นทดสอบที่มี OTA-BSA และเส้นควบคุม (C) ที่มี goat anti-rabbit IgG บนแผ่นกระดาษไนโตรเซลลูโลส ถ้าในตัวอย่างมีสารพิษปนเปื้อนอยู่ จะเกิดสีม่วงแดงให้เห็นเฉพาะที่ตำแหน่งเส้นควบคุม ถ้าในตัวอย่างไม่มีสารพิษจะปรากฏสีให้เห็นทั้งในตำแหน่งเส้นควบคุม และเส้นทดสอบ (Michael *et al*., 2006) สารโอคราทอกซิน เอ จะจับกับแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ ที่ติดฉลากด้วยอนุภาคทอง และไหลไปที่ตำแหน่งเส้นทดสอบ ถ้าปริมาณสารพิษมากแอนติบอดีจะจับกับอนุภาคทองหมด ทำให้ไม่เหลือมาจับกับ OTA-BSA ที่ตำแหน่งเส้นทดสอบ แต่ถ้าปริมาณสารพิษมีน้อย ก็จะพบสีของอนุภาคทองจาง แต่จากการทดสอบยังให้ผลไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากสีที่ปรากฏในตำแหน่งเส้นทดสอบยังมีความแตกต่างกันไม่ชัดเจน อาจเกิดจากปริมาณแอนติบอดีมีมากกว่าแอนติเจน ทำให้มีปริมาณเหลือมากพอในการจับกับแอนติเจนที่ตำแหน่งเส้นทดสอบ การสารรบกวนของสารอื่น หรืออัตราการไหลที่เร็วหรือช้าไป รวมถึงการเลือกชนิดของกระดาษสำหรับขีดในตำแหน่งเส้นทดสอบและเส้นควบคุม ซึ่งมีผลต่อการจับกันของสารพิษกับแอนติบอดี (Anfossi *et al*., 2011; Urusov *et al*., 2011) จึงต้องทำการปรับเพื่อให้ได้ชุดทดสอบที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

กรมวิทยาศาสตร์

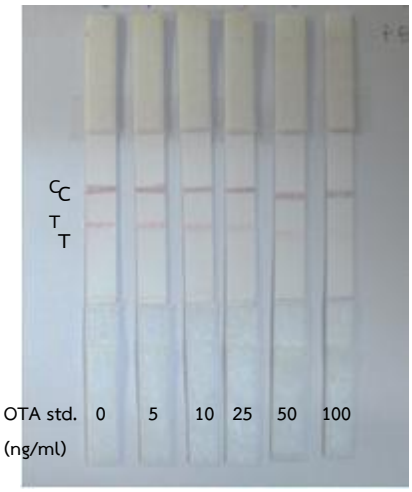


Figure 5 The color on test line (T) for different concentrations of Ochratoxin A standard and showed a faint line at 25 ng/ml.

3. การเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจวิเคราะห์

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในตัวอย่างข้าวกล้อง และกาแฟที่มีการเติมสารพิษโอคราทอกซิน เอ มาตรฐาน ให้มีความเข้มข้น 0 5 10 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จากการตรวจด้วยวิธี HPLC พบสารพิษปริมาณ 0- 31.30 และ 0- 23.21 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ การตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA พบปริมาณสารพิษ 0 - 67.53 และ 0 - 74.12 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Table 1, 2) เมื่อตรวจสอบสารพิษในตัวอย่างข้าวกล้อง และกาแฟ ด้วยชุดทดสอบที่ผลิตได้ พบผลการทดสอบเป็นลบ (negative) โดยพบแถบสีขึ้นทั้งที่เส้นทดสอบ (T) และเส้นควบคุม (C) (Figure 6,7) จากผลการทดสอบแสดงว่าในตัวอย่างมีปริมาณสารพิษต่ำกว่า 25 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC และ ELISA โดยปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ สูงสุดที่ตรวจพบด้วยวิธี HPLC พบ 31.30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมจากตัวอย่างข้าวกล้อง ผลการตรวจสอบด้วยชุดทดสอบที่ผลิตได้ควรให้ผลบวก (positive) ทั้งนี้เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างต้องทำการสกัดตัวอย่างและเจือจางสารสกัดตัวอย่างลงถึง 10 เท่า ทำให้ปริมาณสารพิษในตัวอย่างลดลงด้วย ซึ่งการสกัดตัวอย่างจำเป็นต้องเจือจางสารสกัดลง เนื่องจากการใช้เมทานอลในปริมาณสูง มีผลต่อความสามารถในการจับกันของแอนติเจนและแอนติบอดี (Urusov *et al*., 2011) ดังนั้นเพื่อให้ได้ชุดทดสอบที่สามารถตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ ในเบื้องต้นได้ อาจต้องปรับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ชุดตรวจสอบสามารถตรวจจับได้ให้ต่ำลงอีก พร้อมทั้งหาวิธีการสกัดตัวอย่างให้มีการเจือจางน้อยที่สุด เพื่อให้ตรวจสอบกับผลิตผลเกษตรได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Table 1 The Detection of ochratoxin A in brown rice by Lateral Flow Immunoassay method.

Ochratoxin A in brown rice (µg/kg)	HPLC (µg/kg)	ELISA (µg/kg)	strip test
0	0	0	negative*
5	0	12.38	negative
10	3.41	18.11	negative
25	24.54	32.15	negative
50	31.30	74.12	negative

* negative = ไม่พบสารพิษ (ปรากฏแถบสี 2 เส้น)

Table 2 The Detection of ochratoxin A in coffee by Lateral Flow Immunoassay method.

Ochratoxin A in coffee (µg/kg)	HPLC (µg/kg)	ELISA (µg/kg)	strip test
0	0	0	negative*
5	4.35	7.47	negative
10	6.00	16.28	negative
25	18.63	38.22	negative
50	23.21	67.53	negative

* negative = ไม่พบสารพิษ (ปรากฏแถบสี 2 เส้น)

กรมวิชาการเกษตร

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารโอคราทอกซิน เอ โดยเทคนิค lateral flow immunoassay ในรูปแบบ strip test ด้วยการติดฉลากอนุภาคทองกับแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ พบการเกิดสีที่เส้นทดสอบ (T) และเส้นควบคุม (C) ชัดที่สุด เมื่อใช้ OTA-BSA ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้ Goat Anti-Rabbit IgG ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในเบื้องต้นได้ชุดตรวจสอบต้นแบบที่สามารถตรวจจับสารโอคราทอกซิน เอ ได้ต่ำสุดที่ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูงสำหรับการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างซึ่งต้องมีการสกัดสารพิษออกจากตัวอย่าง ดังนั้นต้องปรับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ชุดทดสอบสามารถตรวจจับได้ให้ต่ำลงอีก และหาวิธีการสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมต่อไป

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากการทดลอง จำนวน 5 การทดลอง ภายใต้ 3 กิจกรรม ในโครงการวิจัยการลดความสูญเสียในผลิตผลเกษตรจากโรคพืชหลังการเก็บเกี่ยวด้วยวิธีปลอดภัย ได้ผลผลิต (output) จำนวน 5 องค์ความรู้ดังนี้

1. การยืดอายุการเก็บรักษาพริกขี้หนูสดเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อราและโรคแอนแทรคโนส สามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 ผลพริกจุ่มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที บรรจุในถาดพลาสติก PP หุ้มด้วยฟิล์ม PE และ วิธีที่ 2 ผลพริกจุ่มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วนำมาจุ่มต่อในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 1.5 % บรรจุในถุงพลาสติก PP เก็บผลพริกที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ผลพริกมีคุณภาพดี สามารถรักษาความแน่นเนื้อของผลพริก คงสภาพสีเปลือกได้ดี สามารถยืดอายุการเก็บรักษาและการวางจำหน่ายผลพริกได้นานมากขึ้น และปลอดภัยต่อผู้บริโภค

2. การแช่ผลส้มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 55°c นาน 3 นาทีก่อนแล้วจึงแช่กรดซาลิไซลิกความเข้มข้น 0.1% นาน 5 นาที ทีหลังเมื่อขึ้นจากน้ำร้อนและการแช่ผลส้มในน้ำร้อนอุณหภูมิ 55°c นาน 3 นาที ก่อนแล้วจึงแช่โซเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 3% นาน 5 นาที ทีหลังเมื่อขึ้นจากน้ำร้อนสามารถควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *P. digitatum* ได้ 100%

3. วิธีการตากที่ดีไม่ควรให้ถั่วลิสงสัมผัสพื้นดิน ลดความชื้นให้เร็วและควรระวังการเข้ามาวางไข่ของแมลงศัตรูในโรงเก็บ และในการเก็บรักษาก่อนการกะเทาะเปลือกถั่วลิสงควรเก็บในที่โล่งระบายอากาศได้ดี และไม่ควรเก็บนานเกินไปจะทำให้คุณภาพของเมล็ดลดลง

4. น้ำคั้นกระเทียมสดมีผลลดการสร้างสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้งที่มีการเติมเชื้อรา *A. flavus* และยับยั้งการสร้างสารอะฟลาทอกซินในพริกแห้งได้สูงสุด 34.93% เมื่อบ่มนาน 14 วัน

5. ได้ชุดตรวจสอบต้นแบบที่สามารถตรวจจับสารโอคราทอกซิน เอ ได้ต่ำสุดที่ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูงสำหรับการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างซึ่งต้องมีการสกัดสารพิษออกจากตัวอย่าง ดังนั้นต้องปรับค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ชุดทดสอบสามารถตรวจจับได้ให้ต่ำลงอีก และหาวิธีการสกัดตัวอย่างที่เหมาะสมต่อไป

จากผลการทดลองที่ได้มาจากโครงการสามารถนำผลงานมาใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาและควบคุมโรคหลังการเก็บเกี่ยวของพริกและส้มเพื่อให้การเก็บรักษาและวางจำหน่ายผลผลิตได้นานมากขึ้น ลดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารอะฟลาทอกซินในถั่วลิสงและพริกแห้ง รวมถึงชุดตรวจสอบที่สามารถตรวจจับสารโอคราทอกซิน เอ ได้ต่ำสุดที่ความเข้มข้น 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และกำลังพัฒนาชุดตรวจสอบให้มีความสามารถในการตรวจจับสารพิษที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

บรรณานุกรม

กระทรวงสาธารณสุข. 2563. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 414 (พ.ศ. 2563) เรื่อง มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน. ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 137 ตอนพิเศษ 118ง ลงวันที่ 20 พฤษภาคม พ.ศ. 2563.

กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร. 2560. สารพิษจากเชื้อราในผลิตผลเกษตร. กรมวิชาการเกษตร.บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด. กรุงเทพฯ. 90 หน้า.

กล้าณรงค์ ศรีรอต. 2521. เกลือ คุณสมบัติและการใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 49 น.

เครือข่ายเตือนภัยสารเคมีกำจัดศัตรูพืช. 2559. สถานการณ์การนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืช การใช้และการตกค้างในผลผลิต. แหล่งที่มา:. https://www.thaipan.org/sites/default/files/conference2559/pesticide_conference_2559_1.3.pdf, 25 กุมภาพันธ์ 2564

บุญญวดี จิระวุฒิ เนตรา สมบูรณ์แก้ว สุพี วนศิรากุล อัฉราพร ศรีจุดานุ และอมรา ชินภูติ. 2558. การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และลดปริมาณสารแอฟลาทอกซินโดยสารออกฤทธิ์จากกระเทียม. *วารสารวิชาการเกษตร* 33 (1): 15-28.

บุญญวดี จิระวุฒิ รัตตา สุทธยาคม และวีรภรณ์ เดชนำบัญชาชัย. 2562. การลดการปนเปื้อนของเชื้อราบนผลพริกขี้หนูระหว่างการเก็บรักษาด้วยวิธีทางกายภาพ.. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 57:49-56.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. ม.ป.ป. ถั่วลิสง. Food Network Solution ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร. แหล่งที่มา: http://www.foodnetworksolution.com, 16 พฤศจิกายน 2564.

รัตตา สุทธยาคม บุญญวดี จิระวุฒิ วีรภรณ์ เดชนำบัญชาชัย. 2563. การควบคุมโรคแอนแทรคโนสของพริกขี้หนูหลังการเก็บเกี่ยวโดยการใช้น้ำร้อน. หน้า 109-126. *ใน* รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2562. กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ

วีรภรณ์ เดชนำบัญชาชัย บุญญวดี จิระวุฒิ รัตตา สุทธยาคม. 2564. การควบคุมโรคแอนแทรคโนสในกระบวนการผลิตพริกขี้หนูหลังเก็บเกี่ยวโดยการชักนำความต้านทาน. หน้า 241-256. *ใน* รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2563 เล่ม 2.. กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ

สายชล เกตุษา. 2528. สรีรวิทยาและเทคโนโลยีหลังเก็บเกี่ยวผักผลไม้. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

โสภณ วงศ์แก้ว และ สนั่น จอกลอย. 2554. อะฟลาทอกซินในถั่วลิสง: ข้อเสนอวิธีแก้ปัญหา. แก่นเกษตร 39 ฉบับพิเศษ 3: 1-11.

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน). 2559. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง ทิศทางพืชเศรษฐกิจไทยในอาเซียน. บริษัท พรทรัพย์การพิมพ์ จำกัด กรุงเทพฯ. 160 หน้า.

กรมวิชาการเกษตร

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2553. การปฏิบัติทางการเกษตรที่ดีสำหรับถั่วลิสงมาตรฐานสินคาเกษตร. มกษ. 4900-2553. ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศและงานทั่วไป เลม 127 ตอนพิเศษ 147ง. 34 หน้า.

สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน. 2563. เอกสารคำแนะนำ เทคโนโลยีการผลิตถั่วลิสง. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. แหล่งที่มา: https://www.doa.go.th/fcri/wp-content/uploads/2020/tachno/E-Book-8.pdf. 28 ธันวาคม 2564.

อมรา ชินภูติ ศุภรา อัคคะสาระกุล อรุณศรี วงษ์อุไร ชวเลิศ ตรีกรุณาสวัสดิ์ พรทิพย์ วิสารทานนท์ และไพศาล รัตนเสถียร. 2551. การควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และยับยั้งการสร้างสารแอฟลาทอกซินโดยใช้พืชสมุนไพร. ผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี 2551 ประเภทงานวิจัยพื้นฐาน. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1-15.

อภิรดี อุทัยรัตนกิจ ปิระมิด จิตรมาตร สุกัญญา เอี่ยมลออ และผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์. 2555. ผลของน้ำร้อนและเอทีฟอนต่อคุณภาพของมะระจีนตัดแต่ง. ว.วิทย. กษ. 43:3 (พิเศษ): 408-411

อโนชา ธุรี. 2556. ผลของการจุ่มน้ำร้อนร่วมกับสารเคลือบผิวไคโตซานต่อคุณภาพ หลังการเก็บเกี่ยวของพริกขี้หนูพันธุ์ซุปเปอร์ฮอทในระยะสุก. ข้อมูลออนไลน์ https://kres.ubru.ac.th/index.php?p=research_view2&research_id=117, เข้าถึงข้อมูลเมื่อ 27 ตุลาคม 2564.

Akhtar, A., Akhtar, N.A. and Hussain, A. 2010. Effect of calcium chloride treatment on quality characteristic of loquat fruit during storage. Pakistan J Bot. 42: 181-188.

Anfossi L., G. D'Arco, C. Baggiani, C. Giovannoli and G. Giraudi. 2011. A Lateral flow immunoassay for measuring ochratoxin A: Development of a single system for maize, wheat and durum wheat. **Food Control**. 22: 1965-1970.

Bowles, D.J. 1990. Defense-related proteins in higher plants. J. Annu. Rev.of Biochem. 59: 873-907.

Bazin, I., E. Nabais and M. Lopez-Ferber. 2010. Raid Visual Tests: Fast and Reliable Detection of Ochratoxin A. **Toxins**, 2: 2230-2241.

Burns, J.K. and R. Pressey. 1987. Ca^{2+} in the cell wall of ripening tomato and peach. J. Am. Soc. Hort. Sci. 112: 783-787.

Castafier, M., M. I. Gil and F. Artes. 1997. Organic acids as browning inhibitors on harvested "Baby" lettuce and endive. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A 205: 375-379.

Chein, S.H., M.B. Sadiq, A. Datta and A.K. Anal. 2019. Prevalence and identification of *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from peanut kernels in central Myanmar. Journal of Chuaysrinule, C., T. Maneeboon, C. Roopkham and W. ahakarnchanakul. 2020.

กรมวิชาการเกษตร

Occurrence of aflatoxin- and ochratoxin A-producing *Aspergillus* species in Thai dried chilli. *Journal of Agriculture and Food Research*. 2. 8 p.

Couey, M. H. 1989. Heat treatment for control of postharvest disease and insect pests of fruit. Hort Sci**.** 24: 198-202.

Ding, N., F. Xing, X. Liu, J.N. Selvaraj, L. Wang, Y. Zhao, Y. Wang, W. Guo, X. Dai and Y. Liu. 2015. Variation in fungal microbiome (microbiome) and aflatoxin in stored in-shell peanuts at four different areas of China. Fronteirs in Microbiology 6: 1-10.

Dzantiev, B.B., N.A. Byzova, A.E. Urusov, A.V. Zherdev. 2014. Immunochromatographic methods in food analysis. **Trends Anal. Chem**, 55: 81-93.

Fellik E., Grinberg S., Alkalai S., Yekutieli O., Wiseblum A., Regev R., Beres H. & Bar-Lev E. 1999. A unique hot water treatment to improve storage quality of sweet pepper.. Postharvest Biology and Technology. 15:25-32.

Hahlbrock, K. and D. Scheel. 1989. Physiology and Molecular Biology of Phenylpropanoid Metabolism. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 40: 347-369.

Hesseltine, C. 1973. Recent research for the control of mycotoxins in cereal. *Pure and Applied Chemistry*. 35: 251-258.

Kheiralla, Z., N. Hassanin and H. Amra. 1992. Effect of incubation time, temperature and substrate on growth and aflatoxin production. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 30: 17-27.

Lai, T., X. Bai, Y. Wang, J. Zhou, N. shi and T. Zhou (2015). Inhibitory effect of exogenous sodium bicarbonate on development and pathogenicity of posthavest disease *Penicillium digitatum*. Scientia Horticulturae 187: 108-114.

Liu, K., Y. Liu and F. Chen. 2019 Effect of storage temperature on lipid oxidation and changes in nutrient contents in peanuts. Food Science and Nutrition 7:2280–2290.

Liu, L., L. Xu, S. Suryoprabowo, S. Song and Hua Kuang. 2018. Development of an immunochromatographic test strip for the detection of ochratoxin A in red wine. **Food and Agricultural Immunology**, 29(1): 434-444.

Luckey T.D. 1980. Hormesis with ionizing radiation. CRC Press, Boca Roton, Florida, 220p.

Magee, R.L., F. Caporaso and A. Prakash. 2002. Inhibiting irradiation induced softening in diced tomatoes using a calcium treatment. Sessino 30 G, Fruit and Vegetable Produce: Processed Fruits and Vegetables. Annual meeting and Food Expo-Anaheim, California. (http:/www.ift.comfex.com).

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Mangaraj S., T.K. Goswami, P. V. Mahajan. 2009. Applications of Plantic Films for Modified Atmosphere Packaging of Fruits and Vegetables: A Review. Food Eng Rev 1:133-158.

Michael, Z.Z., J.L. Richard and J. Binder. 2006. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. **Mycopathologia** 161: 261-273.

Mutegi, C.K., J.M., Wagacha, M.E. Christie, J. Kimani and L. Karanja. 2013. Effect of storage conditions on quality and aflatoxin contamination of peanuts (*Arachis hypogaea* L.). International Journal of AgriScience 3(10):746-758.

Pitt, J. I. and Hocking, A. D. 1997. Fungi and Food Spoilage. 2nd ed. London, Blackie Academic and Professional.

Porat, R., A. Daus, B. Weiss, L. Cohen, E. Fallik and S. Droby. 2000. Reduction of postharvest decay in organic citrus fruit by a short hot water brushing treatment. Postharvest Biol. Technol. 18: 151–157

Salumkhe, D.K. and B.B. Desai. 1984. Post harvest Biotechnology of Vegetable. CRC press, Inc. Boca Raton Florida, US, pp: 55-82.

Santhosha, S.G., P. Jamuna and S.N. Prabhavathi. 2013. Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: A review. *Food Bioscience*. 3: 59-74.

Smilanick, J., Margosan, D. A., Mlikota, F., Usall, J., Michael, I. F. 1999. Control of citrus green mold by carbonate and bicarbonate salts and the influence of commercial postharvest practices on their efficacy. J. Plant Dis. 83: 139-145.

Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes, Fungi Imperfecti with Pyxnidia, Acervuli and Stromata, p. 696. Surrey, England: Commonwealth Mycological Institue, Kew, UK. 696 p.

Thanaboripat, D., K. Nontabenjawan, K. Leesin, D. Teerapiannont, O. Sukcharoen and V. Ruangrattanametee. 1997. Inhibitory effect of garlic, clove and carrot on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Journal of Forestry Research* 8: 39-42.

Tian, S., Y. Wan, G. Z. Qin and Y. Xu. 2006. Induction of defense responses against *Alternaria* rot by different elicitors in harvested pear fruit. Applied Microbiology and Biotechnology 70(6): 726-734.

Urusov, A.E., S.N. Kostenko, P.G. Sveshnikov, A.V. Zherdev and B.B. Dzantiev. 2011. Immunochromatographic assay for the detection of ochratoxin A. **J. Anal Chem**, 66: 770-776.

Yang J., M.R. Fau, Y.Y. Zhao and L.C. Mao. 2009. Reduction of chilling injury and ultrastructural damage in cherry tomato fruits after hot water treatment. Agric. Sci. China 8:304-310.

กรมวิทยาศาสตร์

Zuza Jnr, E., A. Muitia, M.I.V. Amane, R.L. Brandenburg, A. Emmott and A.M. Mondjana. 2018. Effect of harvesting time and drying methods on aflatoxin contamination in groundnut in Mozambique. *In*: Njobeh P.B. and F. Stepman, eds. Mycotoxins Impact and Management Strategies. Available source: https://www.intechopen.com/chapters/64390, January 7, 2022.

กรมวิชาการเกษตร