รายงานเรื่องเต็มผลงานวิจัยสิ้นสุดปีงบประมาณ 2557

แผนงานวิจัย ชา-โกโก้

โครงการวิจัย การวิจัยและพัฒนาสายพันธุ์โกโก้สำหรับทำชอคโกแลต

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาเทคโนโลยีการผลิตและวิทยาการเหลังการเก็บเกี่ยวของโกโก้สำหรับทำชอคโกแลต

กิจกรรมย่อยที่ 2.1 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต

การทดลองที่ 2.1.3

การศึกษาปริมาณออคราทอกซิน เอในแหล่งปลูกโกโก้ต่างๆ

Study of Ochratoxin's Content in Cocoa bean from Cocoa Plantation

ทิพยา ไกรทอง[1] ปิยนุช นาคะ[2]

ปานหทัย นพชินวงศ์[1] เสรี อยู่สถิตย์[1] ลิลลี่ พรานุสร[3]

.....

บทคัดย่อ

การศึกษาปริมาณออคราทอกซิน เอ ในแหล่งปลูกโกโก้ต่างๆ เพื่อให้ทราบถึงปริมาณสารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนในเมล็ดโกโก้ และมาตรการในการลดการปนเปื้อนของเชื้อรา โดยการสำรวจเก็บตัวอย่างเมล็ดโกโก้แห้งจากแปลงเกษตรกร จุดรับซื้อ ในพื้นที่ จ.ชุมพร นครศรีธรรมราช ประจวบคีรีขันธ์ จันทบุรี และงานวิจัยของศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรตั้งแต่ปี 2555-2557 รวมทั้งหมด 51 ตัวอย่างมาหาความชื้นของเมล็ดโกโก้เฉลี่ย 8.6% ซึ่งมาตรฐานความชื้นของเมล็ดโกโก้อยู่ระหว่าง 7 % และวิเคราะห์ชนิดของเชื้อราด้วยวิธี Direct plate พบเชื้อรา *A. ochraceus* ที่ก่อให้เกิดการสร้างสารพิษ Ochratoxin A เฉลี่ย 1.22 % มีค่าปริมาณสารพิษ 1.33 µg/kg และในปี 2556 พบปริมาณสารพิษจากเชื้อรา 0.88 µg/kg ซึ่งไม่เกินมาตรฐานกำหนด (มาตรฐาน 5 µg/kg) นอกจากนั้นพบเชื้อรา *A. flavus* ที่สร้างสารพิษ Aflatoxin เกือบทุกตัวอย่างเฉลี่ย 20.17 % และ *Pennicillium* 12.93% ที่เหลือเป็นเชื้อรา *Aspergillus sp.* และ Mycelium สาเหตุเกิดจากขั้นตอนการแปรรูปหลังการเก็บเกี่ยว และการเก็บรักษา นอกจากนั้นปัจจัยด้านสภาพแวดล้อมเช่น ความชื้น อุณหภูมิ เป็นตัวการสำคัญที่ส่งเสริมให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษจากเชื้อรา การปฏิบัติที่ถูกต้องเป็นมาตรการลดการปนเปื้อนของเชื้อราได้เป็นอย่างดี ย่อมส่งผลต่อคุณภาพของเมล็ดโกโก้เช่นกัน

---

1 ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อ. สวี จ. ชุมพร 86130 โทร/โทรสาร 077-556073, 077-556026

2 สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900 โทร/โทรสาร 02-5790583, 02- 9406497

3 สำนักวิจัยพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900 โทร/โทรสาร 02-9406806, 02-9407449

คำนำ

ปัจจุบันพื้นที่ปลูกโกโก้ในประเทศไทยมีน้อย (ประมาณ 3,000 ไร่) ผลผลิต ประมาณ 600-700 ตัน ซึ่งไม่เพียงพอกับอุตสาหกรรมในประเทศ จำเป็นต้องนำเข้าเมล็ดโกโก้จากต่างประเทศเข้ามาผลิตเป็นโกโก้ผง และชอคโกแลต สำหรับงานวิจัยกรมวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ได้ดำเนินการวิจัยการปรับปรุงพันธุ์โกโก้ ซึ่งได้ออกเป็นพันธุ์รับรองมาแล้ว จำนวน 1 พันธุ์ คือโกโก้ลูกผสม ชุมพร 1 ซึ่งเหมาะสมในการทำโกโก้ผงและเนยโกโก้ และวิจัยด้านโรคและแมลง วิจัยด้านวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยว และการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้มาตั้งแต่ปี 2530-2535 ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรได้ดำเนินการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์โกโก้ที่ได้จากแหล่งเชื้อพันธุ์ที่ดีจากต่างประเทศประมาณ 34 สายพันธุ์ซึ่งมีเป็นพันธุ์ที่เหมาะสมในการทำชอคโกแลต โกโก้ผง และเนยโกโก้

โกโก้มีการนำมาใช้ประโยชน์ในภาคอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างกว้างขวาง ได้แก่ อุตสาหกรรมการผลิตช็อคโกแลตหวานและช็อคโกแลตนม อุตสาหกรรมลูกอมและลูกกวาด อุตสาหกรรมเครื่องดื่มรสช็อคโกแลต อุตสาหกรรมเบเกอรี่ เพื่อปรุงแต่งรสผลิตภัณฑ์ เช่น โดนัท, คุกกี้ ฯลฯ อุตสาหกรรมยา โกโก้ที่ใช้จะเป็นรูปของน้ำเชื่อมโกโก้ ซึ่งเป็นสารผสมเพื่อให้รสทั้งยาเม็ด ยาน้ำ และใช้เคลือบยาเม็ด เป็นการลบความขม เช่น ยาควินิน อุตสาหกรรมยาสูบ โดยใช้โกโก้เป็นส่วนผสมในยาสูบ เนื่องจากโกโก้มีกลิ่นหอมกลมกลืนกับกลิ่นใบยา และขณะเกิดการเผาไหม้จะรวมตัวกับน้ำตาล ทำให้กลิ่นหอมชวนสูบมากขึ้น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง นิยมใช้ cocoa butter ในการทำลิปสติก เพราะ cocoa butter มีคุณสมบัติละลายได้เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงที่ 37 องศาเซลเซียส แต่คงสภาพอยู่ได้ไม่ละลายในสภาพอุณหภูมิปกติ นอกจากนั้นประโยชน์ด้านสุขภาพ นักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกันยังพบว่า การดื่มโกโก้ร้อน 1 ถ้วยจะมีสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันโรคมะเร็งได้ ซึ่งผลการศึกษาวิจัยได้เน้นถึงคุณสมบัติของโกโก้ในที่มีผลต่อสุขภาพเช่นเดียวกันกับที่พบใน ชา ไวน์แดง หรืออาจมากกว่าชาไวน์แดงถึง 2 เท่า(http//variety.com/food for brain) จะเห็นได้ว่าประโยชน์ของโกโก้มีมากมาย แต่ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวจนถึงขั้นตอนการเก็บรักษา อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราได้ เนื่องจากโกโก้เมื่อเก็บเกี่ยวจากต้นต้องมีการบ่มก่อนหมัก และนำมาตากเพื่อลดความชื้นหรือนำไปอบ ถึงจะได้เมล็ดโกโก้สำหรับนำมาใช้ประโยชน์นำไปเก็บรักษาหรือจำหน่ายต่อไป ซึ่งการปนเปื้อนของเชื้อราขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศ และความชื้นโดยพบว่า ในเขตร้อนชื้นเชื้อราพวก *Aspergillus* และ *penicillum* สามารถเจริญเติบโตได้ดี นอกจากนั้นลักษณะทางสรีระวิทยาของพืช ฤดูกาล การปฏิบัติดูแลรักษา การเก็บเกี่ยว การหมัก การขนส่ง ล้วนแล้วแต่จะส่งเสริมให้เกิดการปนเปื้อนของ OTA ดังนั้นการศึกษาปริมาณออคราทอกซิน เอ ในแต่ละแหล่งปลูก เพื่อให้ทราบถึงปริมาณสารพิษ

จากเชื้อราที่ปนเปื้อนอยู่ในเมล็ดโกโก้ อันเป็นมาตรการหนึ่งสำหรับเป็นแนวทางในการป้องกันและแนะนำสู่เกษตรกรและผู้ผลิตต่อไป

วิธีการดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

13.1 สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

- เมล็ดโกโก้
- ถุงพลาสติกแบบ Zip lock
- อาหารเลี้ยงเชื้อรา (Dichloran 18% Glyceral agar: DG 18)
- สารเคมี โซเดียมไฮดรอกไซด์ ($NaOH_2$) 1 Normal, โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 1% , โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) 1%
- กล้องจุลทรรศน์ , ตู้อบ แก๊ส ไม้ขีดไฟ
- ถุงมือ กรรไกร ผ้าปิดจมูก เทปใส
- อุปกรณ์เครื่องแก้ว
- ปากคีบ , พาราฟิล์ม
- น้ำกลั่น
- เครื่องวัดความชื้น
- ปากกาเมจิก กระดาษสติกเกอร์ กระดาษกรอง
- อุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็นสำหรับงานทดลอง

13.2 แบบและวิธีการทดลอง

ไม่มีการวางแผนการทดลอง แต่จะใช้วิธีสัมภาษณ์ สุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดโกโก้แห้งจากแปลงเกษตรกรที่ปลูกโกโก้ จุดรับซื้อโกโก้ในพื้นที่ จ. ชุมพร ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราชและจันทบุรี และ จากงานทดลองของศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

วิธีการทดลอง

1. สุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดโกโก้แห้งจากแปลงเกษตรกรและจุดรับซื้อโกโก้ในพื้นที่จังหวัดชุมพร ประจวบคีรีขันธ์นครศรีธรรมราชและจันทบุรี รายละ 1 กก.พร้อม เขียนชื่อ ที่อยู่ ของเกษตรกร/จุดรับซื้อ และวันที่เก็บตัวอย่าง ซึ่งเกษตรกรส่วนใหญ่ปลูกโกโก้แซมในสวนผลไม้ เช่น ทุเรียน มังคุด ลองกอง และสวนมะพร้าว มีการตัดแต่งกิ่งน้อยมาก การเก็บผลผลิตเลือกเก็บผลสุกนำมาผ่าเอาเมล็ดออก จากนั้นนำไปหมักในภาชนะเช่น เข่ง และกระสอบปุ๋ยใช้เวลาหมักประมาณ 5 - 7 วัน เมื่อหมักได้ที่จึงนำไปตากแดดรองด้วยบนตาข่ายสีฟ้าบนพื้นดิน และตากบนพื้นซีเมนต์ ตอนเย็นเก็บเข้าที่ร่ม โดยจะใช้เวลาตากนานประมาณ 7-10 วันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ

สภาพอากาศ ส่วนใหญ่เกษตรกรเก็บเมล็ดโกโก้หลังตากแห้งไว้ในกระสอบปุ๋ยที่ผ่านการล้างทำความสะอาดแล้ว นานประมาณ 1 เดือน โดยในปี 2555- 2557 จำนวนตัวอย่างที่สุ่มเก็บทั้งหมด ส่วนจุดรับซื้อจะสุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดโกโก้ที่ อ. ท่าศาลา จ. นครศรีธรรมราช และ สหกรณ์การเกษตรอำเภอแหลมสิงห์ จ. จันทบุรีในฤดูกาลผลิต ปี 2555-2557 รวมทั้งสิ้น 51 ตัวอย่างแบ่งออกเป็นปี 2555 26 ตัวอย่าง ปี 2556 12 ตัวอย่างและปี 2557 13 ตัวอย่าง

2. นำตัวอย่างเมล็ดโกโก้มาหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของเมล็ด

3. สุ่มตัวอย่างเมล็ดโกโก้จากข้อ 1 จำนวน 100 เมล็ด ใส่ในขวดที่มีฝาเกลียวล๊อคผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรให้ท่วมเมล็ดกาแฟ เขย่าไปจนกว่าเยื่อหุ้มเมล็ด (Seed coat) ที่หุ้มเมล็ดกาแฟหลุดออกหมด ล้างด้วยน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง เทน้ำทิ้งสังเกตถ้าเมล็ดยังมีเยื่อหุ้มเมล็ด (Seed Coat) หลงเหลืออยู่ให้ล้างอีกครั้งด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1%

4. จากนั้นเติมด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) 1% ให้ท่วมเมล็ดทิ้งไว้ 10 นาที เทน้ำทิ้งและล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง จนเมล็ดสะอาดปราศจากเยื่อหุ้มเมล็ด

5. นำตัวอย่างเมล็ดโกโก้ที่ได้เทใส่จานเลี้ยงเชื้อรา (Petri dish) ซึ่งรองด้วยกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าแล้วเกลี่ยเมล็ดโกโก้ให้ทั่วเพื่อให้สะเด็ดน้ำ (ควรทำในตู้ปลอดเชื้อ)วางเมล็ดกาแฟบน Petri-dish ทีมีอาหารเลี้ยงเชื้อราจำนวน 10 เมล็ด/plate จนครบ 10 plate เขียนป้ายวันที่วิเคราะห์ / ชื่อตัวอย่าง บ่มเชื้อทิ้งไว้เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง 25-30 องศาเซลเซียส

6. ตรวจนับเชื้อราชนิดต่างๆ หลังจากบ่มเชื้อทิ้งไว้ 10 วัน สรุปนับจำนวนเชื้อรา และแยกชนิดของเชื้อราหากพบเชื้อราที่ก่อให้เกิดการสร้าง OTA ในตัวอย่างใดๆจะส่งตัวอย่างนั้นๆวิเคราะห์ปริมาณ OTA ด้วยวิธีเคมีด้วยเครื่อง HPLC ในลำดับต่อไป

7. บันทึกข้อมูล รวบรวม วิเคราะห์และสรุปผล

เวลาและสถานที่ เริ่มต้นตุลาคม 2555 สิ้นสุดกันยายน 2557 รวม 2 ปี

สถานที่ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อ. สวี จ. ชุมพร แปลงเกษตรกรผู้ปลูกโกโก้จังหวัดจันทบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และนครศรีธรรมราช สำนักวิจัยพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช

ผลการทดลองและวิจารณ์

ปี 2555 จากการสุ่มสำรวจเก็บตัวอย่างเมล็ดโกโก้แห้งในแปลงเกษตรกร กลุ่มผู้รับซื้อ และงานวิจัยของศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ในพื้นที่จังหวัดชุมพร และ นครศรีธรรมราช แบ่งออกเป็นตัวอย่างเมล็ดโกโก้แห้งจากแปลงเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช 23 ตัวอย่างและจากงานวิจัยของศูนย์ฯ 2 ตัวอย่าง และสหกรณ์แหลมสิงห์ จ. จันทบุรี 1 ตัวอย่าง ทำการวัดความชื้นของเมล็ดเฉลี่ย 8.8% ก่อนนำไปวิเคราะห์ชนิดของ

เชื้อราด้วยวิธี Direct plate โดยบ่มเชื้อทิ้งไว้ในสภาพอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน นำมาตรวจแยกชนิดของเชื้อราพบว่า ตัวอย่างเมล็ดโกโก้จากจังหวัดนครศรีธรรมราช สามารถจำแนกชนิดเชื้อราได้ดังนี้ *Aspergillus niger* เฉลี่ย 15.83 % *A. ochraceus* 1.22 %, *A. flavus* 4.39% , *Pennicillium* 3.55%, *A. tamarii* 14.32%, *A. fumigatus* 19.02%, *Fusarium* 4.12%, *Other Aspergillus* 12.32% (ตารางที่ 1 และภาพที่1)

ส่วนตัวอย่างเมล็ดโกโก้แห้งจากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรจำนวน 2 ตัวอย่างนำมาวัดความชื้นของเมล็ด พบว่า ความชื้นของเมล็ดเฉลี่ย 8.19% ซึ่งมาตรฐานการรับซื้อเมล็ดโกโก้ความชื้นไม่เกิน 7 (ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ,2535) หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ชนิดของเชื้อราด้วยวิธี Direct plate บ่มเชื้อทิ้งไว้ 10 วันนำมาแยกชนิดของเชื้อราพบ *A. flavus* 27.62%, *A. tamarii* 25.72%, *Other Aspergillus* 19.33% ไม่พบเชื้อรา 27.60% และไม่พบเชื้อราที่ก่อให้เกิดการสร้างสารพิษ Ochratoxin A และตัวอย่างเมล็ดโกโก้จาก จ. จันทบุรี วัดความชื้นของเมล็ด 8.86 % วิเคราะห์ชนิดของเชื้อราพบ *A. flavus*, และ *A. tamari* 28.09% , *Other Aspergillus* 15.73% (ตารางที่ 1 และภาพผนวก 1)

หลังจากนั้นส่งตัวอย่างเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการแยกชนิดของเชื้อราที่ก่อให้เกิดการสร้างสารพิษ Ochratoxin A คือ *A. ochraceus* , *A. flavus* และ *Pennicillium* ส่งวิเคราะห์ปริมาณสารพิษด้วยวิธี AOAC 2000.3 ที่สำนักวิจัยพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช กรมวิชาการเกษตรจำนวน 8 ตัวอย่างเป็นตัวอย่างเมล็ดโกโก้จากจังหวัดนครศรีธรรมราชประกอบด้วย ตัวอย่างนครศรีธรรมราช 1,9,10,11,12,13,14 และ 17 ผลการวิเคราะห์พบปริมาณสารพิษจากเชื้อราจากตัวอย่างที่ 11 โดยมีค่าปริมาณสารพิษจากเชื้อรา 1.33 µg/kg ส่วนตัวอย่างอื่นๆไม่พบซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีสารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้นน้อยหรือเชื้อรายังไม่สร้างสารพิษ ดังนั้นเมื่อผ่านขั้นตอนการวิเคราะห์แล้วไม่พบปริมาณสารพิษก็อาจเป็นไปได้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ชนิดของเชื้อราด้วยวิธี Direct plate ในเมล็ดโกโก้แห้ง ปี 2555

Sample No.	%RH	% rate of bean infection									Not found	Total
		A.n	*A.och*	*A.fla*	*A.fu*	*Pen*	*Fusa*	*A.tama*	*A.acu*	*A.ot*		
นครศรีฯ1	5.86	10.00	4.16	41.66	0.00	0.00	0.00	0.00	2.91	0.00	41.27	100
นครศรีฯ2	8.16	0.00	0.00	49.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	50.25	100
นครศรีฯ3	8.76	0.00	0.00	39.19	0.00	7.21	0.00	0.90	0.45	17.12	35.13	100
นครศรีฯ4	8.66	1.92	0.00	34.23	0.00	0.00	1.92	16.54	0.00	13.08	32.31	100
นครศรีฯ5	9.95	21.78	0.00	24.02	0.00	4.47	0.00	10.61	1.40	10.61	27.11	100

นครศรีฯ6	8.97	0.00	0.00	27.56	0.00	0.96	0.00	29.17	1.60	11.54	29.17	100
นครศรีฯ7	8.36	6.90	0.66	52.89	0.00	5.26	0.00	21.05	0.00	3.29	10.61	100
นครศรีฯ8	8.47	0.00	0.00	33.22	0.00	0.66	0.00	32.89	0.00	0.00	33.23	100
นครศรีฯ9	8.48	0.00	0.00	46.95	0.00	3.76	0.00	0.00	0.00	2.35	46.94	100
นครศรีฯ10	10.34	0.00	0.00	0.00	49.75	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	49.75	100
นครศรีฯ11	8.70	40.95	1.06	53.19	0.53	0.53	0.00	2.13	0.00	0.00	21.40	100
นครศรีฯ12	9.29	0.00	0.00	42.36	0.00	0.44	0.00	9.61	0.00	3.49	44.10	100
นครศรีฯ13	8.69	0.00	0.00	42.86	2.48	1.24	0.00	3.73	0.00	4.97	44.36	100
นครศรีฯ14	8.47	0.00	0.00	18.30	30.80	9.82	0.00	14.73	0.00	0.00	26.35	100
นครศรีฯ15	8.52	12.5	0.00	31.25	10.29	0.00	0.00	0.00	0.00	7.72	38.14	100
นครศรีฯ16	8.55	0.00	0.00	41.32	0.00	7.85	0.00	0.00	0.00	9.50	41.33	100
นครศรีฯ17	7.97	0.00	0.40	39.84	0.00	0.40	0.00	19.52	0.00	0.00	40.24	100
นครศรีฯ18	8.77	0.00	0.58	21.64	53.80	0.00	0.00	0.00	0.00	11.70	12.28	100
นครศรีฯ19	10.65	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.33	23.33	73.34	100
นครศรีฯ20	11.32	0.00	0.00	46.63	1.23	0.00	0.00	0.00	3.68	0.00	48.46	100
นครศรีฯ 21	9.02	0.97	0.48	48.54	0.00	0.00	0.61	4.85	1.45	0.00	43.10	100
นครศรีฯ22	9.02	0.00	0.00	34.76	3.33	0.00	0.00	14.28	4.76	1.43	41.44	100
นครศรีฯ23	9.36	0.00	0.00	9.09	0.00	0.00	9.85	20.45	4.54	18.18	37.89	100
ศูนย์วิจัยฯ	8.36	0.00	0.00	29.41	0.00	0.00	0.00	25.59	0.00	16.18	28.89	100
ศูนย์วิจัยฯ	8.86	0.00	0.00	25.84	0.00	0.00	0.00	25.84	0.00	22.48	25.84	100
ส ห ก ร ณ์ แหลมสิงห์	8.86	0.00	0.00	28.09	0.00	0.00	0.00	28.09	0.00	15.73	28.09	100

Note: *A.niger = Aspergillus niger* *A.accu =Aspergillus acculentus*

A.Ochr = Aspergillus Ochraceus *Pen = Pennicillum*

A.fla = Aspergillus Flavus *A.Oth = Aspergillus Other*

A.Tama =Aspergillus Tamarii *Fusa = Fusarium* *A. fu =Aspergillus fumigates*

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากเชื้อราด้วยวิธี AOAC 2000.03 ในเมล็ดโกโก้แห้งปี 2555

ตัวอย่างที่	ปริมาณสารพิษจากเชื้อรา (µg/kg)
นครศรีธรรมราช 1	ไม่พบ
นครศรีธรรมราช 9	ไม่พบ
นครศรีธรรมราช 10	ไม่พบ
นครศรีธรรมราช 11	1.33

นครศรีธรรมราช12	ไม่พบ
นครศรีธรรมราช13	ไม่พบ
นครศรีธรรมราช14	ไม่พบ
นครศรีธรรมราช17	ไม่พบ

หมายเหตุ: วิเคราะห์โดยสำนักวิจัยพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช

ส่วนในปี 2556 จากการสุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดโกโก้ในแปลงเกษตรกร ได้ตัวอย่างเมล็ดโกโก้จากการสุ่มเก็บจากแหล่งปลูกต่างๆ ประกอบด้วย จ. นครศรีธรรมราช ประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 12 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ 1-3 ในตารางที่ 3 เป็นตัวอย่างเมล็ดโกโก้จาก จ.ประจวบคีรีขันธ์ ส่วนตัวอย่างที่ 4-12 เป็นตัวอย่างเมล็ดโกโก้จาก จ. นครศรีธรรมราช จากนั้นนำมาวิเคราะห์ชนิดของเชื้อราด้วยวิธี Direct plate ผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างเมล็ดโกโก้จากทั้งสองแหล่งคือ จ.ประจวบคีรีขันธ์ และ จ. นครศรีธรรมราช ไม่พบเชื้อรา *A. ochraceus* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุที่ก่อให้เกิดการสร้างสารพิษ Ochratoxin A แต่จะพบเชื้อ *A. flavus* ที่ก่อให้เกิดการสร้างสารพิษ Aflatoxin โดยเฉพาะอย่างยิ่งตัวอย่างที่ 12 จากจังหวัดนครศรีธรรมราชพบมากถึง 50 % เฉลี่ย 34.74% และพบเชื้อยีสต์มากเกือบทุกตัวอย่างเฉลี่ย 37.41% และ 32.62% สำหรับตัวอย่างเมล็ดโกโก้จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (ตารางที่ 3 และตารางผนวก 2) ทั้งนี้อาจเกิดจากขั้นตอนในกระบวนการหมักเมล็ดก่อนนำไปตากแห้งเกิดการหมักไม่สมบูรณ์ มีเมือกหุ้มเมล็ดและน้ำตาลยังคงเหลือติดอยู่ที่เมล็ด และระหว่างการตากถ้าหากเมล็ดโกโก้แห้งช้าทำให้เชื้อราปนเปื้อนในเมล็ดได้มีผลต่อรสชาติและคุณภาพของเมล็ดโกโก้ (ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร, 2535) และการหมักก่อนตากแห้งถ้าใช้เมล็ดจากฝักที่ไม่ได้คุณภาพหรือสุกแก่ไม่เต็มที่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของ OTA สูงมากกว่า 48 ng/g (Pauline M. *et al*,2008) นอกจากนั้นเป็นเชื้อราในตระกูล *Aspergillus spp.* ที่ไม่สร้างสารพิษ และ *Mycellium* ซึ่งเป็นเส้นใยของเชื้อราที่ขึ้นคลุมบนเมล็ดโกโก้ ส่วนความชื้นของเมล็ดโกโก้เฉลี่ย 7.30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่เกินค่ามาตรฐานกำหนด (ตารางที่ 3) จากนั้นได้ส่งตัวอย่างที่มีเชื้อราก่อให้เกิดการสร้างสารพิษวิเคราะห์ปริมาณสารพิษจากเชื้อราจำนวน 10 ตัวอย่าง พบค่าปริมาณสารพิษ 0.88 µg/kg จากตัวอย่างเมล็ดโกโก้จากจังหวัดนครศรีธรรมราชเพียงตัวอย่างเดียว ส่วนตัวอย่างอื่นๆไม่พบปริมาณสารพิษจากเชื้อรา (ตารางที่ 4) ซึ่งการหมัก การแปรรูป การเก็บรักษา เป็นเงื่อนไขหลักที่ก่อให้เกิดสารพิษจากเชื้อรา (Esteban *et al*, 2006) และ OTA สามารถพบได้ทุกระยะของขบวนการแปรรูปโดยเฉพาะในระยะการตากแห้งและการเก็บรักษา (Copetti MV. *et al*, 2010) ทั้งนี้วัสดุที่ใช้ในการตากไม่มีผลต่อการเกิดสารพิษ OTA (Dano SD *et al*, 2010)

ตารางที่ 3 ผลการแยกชนิดของเชื้อราด้วยวิธี Direct plate ในเมล็ดโกโก้จากแหล่งปลูกต่างๆจากการบ่มเชื้อทิ้งไว้ 10 วันหลังการทดลองปี 2556

Sample No.	%MC	% rate of bean infection										Not found	Total
		A.n	*A.och*	*A.fla*	*A.fu*	*Pen*	*Fusa*	*A.tama*	*yeast*	***My***	*A.ot*		
1	9.49	-	-	-	2.50	40.00	7.50	-	27.50	20.00	2.50	-	100
2	8.14	-	-	-	-	-	3.16	-	34.78	61.49	-	-	100
3	7.66	-	-	2.19	-	43.42	-	3.51	35.58	14.91	-	-	100
4	7.93	-	-	-	-	16.67	-	-	66.67	-	-	16.66	100
5	6.53	0.68	-	17.81	-	2.05	-	2.05	54.11	0.68	-	22.62	100
6	7.10	-	-	6.89	-	0.86	-	0.86	64.66	22.41	-	4.32	100
7	6.93	-	-	35.05	-	-	-	16.49	-	47.42	1.04	-	100
8	5.12	-	-	34.48	-	1.15	-	3.44	-	55.75	-	5.18	100
9	7.93	-	-	38.10	-	-	-	14.83	13.10	34.14	-	-	100
10	6.65	-	-	34.72	-	6.60	-	-	22.92	34.72	-	1.04	100
11	6.81	-	-	36.90	-	-	-	4.17	2.98	54.76	-	1.19	100
12	7.40	-	-	50.00	-	-	-	-	-	50.00	-	-	100

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารพิษ Ochratoxin A ในเมล็ดโกโก้ปี 2556/57

ตัวอย่างที่	รายละเอียดของตัวอย่าง	ปริมาณสารพิษ Ochratoxin A (µg/kg)
1	ประจวบคีรีขันธ์ 1	ไม่พบ
2	ประจวบคีรีขันธ์ 2	ไม่พบ
3	ประจวบคีรีขันธ์ 3	ไม่พบ
4	นครศรีธรรมราช 1	ไม่พบ
5	นครศรีธรรมราช 2	0.88
6	นครศรีธรรมราช 3	ไม่พบ
7	นครศรีธรรมราช 4	ไม่พบ
8	นครศรีธรรมราช 5	ไม่พบ
9	นครศรีธรรมราช 6	ไม่พบ
10	นครศรีธรรมราช 7	ไม่พบ

หมายเหตุ: วิเคราะห์โดยสำนักวิจัยพัฒนาระบบและรับรองมาตรฐานสินค้าพืช

ปี 2557 จากการสุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดโกโก้ทั้งหมด 13 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ชนิดเชื้อราด้วยวิธี Direct plate ไม่พบเชื้อรา *A. ochraceus* ทุกตัวอย่าง แต่พบเชื้อรา *A. flavus* สร้างสารพิษ Aflatoxin พบในตัวอย่างเมล็ดโกโก้เกือบทุกตัวอย่างยกเว้นตัวอย่างที่ 1 และ 3 โดยเฉพาะตัวอย่างที่ 7 จาก จ. นครศรีธรรมราช มากที่สุด 79.84 % รองลงมา 69.93 % เป็นตัวอย่างเมล็ดโกโก้จาก จ.ประจวบคีรีขันธ์ นอกจากนั้นเป็นเชื้อราชนิดต่างๆพบกระจายกันออกไป (ตารางที่ 5) ทั้งนี้จากการสุ่มเก็บตัวอย่างทั้ง 3 ปีที่ทดลองตั้งข้อสังเกตได้ว่าตัวอย่างเมล็ดโกโก้จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจันทบุรี พบเชื้อราที่ก่อให้เกิดการสร้างสารพิษ ochratoxin A น้อย อาจเป็นเพราะสภาพอากาศในขณะที่เก็บเกี่ยวโกโก้และการจัดการหลังการเก็บเกี่ยว ส่วนใหญ่เกษตรกรเก็บผลโกโก้ช่วงเดือนกันยายน-ตุลาคม และพฤศจิกายน-ธันวาคม ซึ่งตรงกับช่วงฤดูฝน แต่เนื่องจากเกษตรกรส่วนใหญ่นิยมขายผลโกโก้สดให้กับสหกรณ์การเกษตรแหลมสิงห์ จ. จันทบุรี มาทำการหมัก ตากและแปรรูปเอง การจัดการหลังการเก็บเกี่ยวมีรูปแบบเหมือนกันหมดโดยจะใช้เครื่องอบแทนการตากแดด ทำให้เมล็ดได้รับความร้อนอย่างทั่วถึงและหลีกเลี่ยงช่วงฤดูฝนซึ่งมีปัญหาเรื่องแสงแดด และความชื้น การตากแห้งจะช้า ก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราได้ง่าย

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ชนิดของเชื้อราด้วยวิธี Direct plate ในเมล็ดโกโก้จากแหล่งปลูกต่างๆจากการบ่มเชื้อทิ้งไว้ 10 วัน หลังการทดลองปี 2557

Sample No.	% MC	% rate of bean infection										Not found	Total
		A.n	*A.och*	*A.fla*	*A.fu*	*Pen*	*Fusa*	*A.tama*	*yeast*	***My***	*A.ot*		
นครศรี 1	8.1	-	-	-	-	-	-	-	-	100.0	-	-	100
นครศรี 2	8.1	-	-	32.5	-	0.6	-	-	-	36.9	-	29.9	100
นครศรี 3	8.8	-	-	-	45.5	-	-	-	-	45.5	-	-	100
นครศรี 4	10.5	-	-	0.9	-	-	-	1.9	-	5.7	-	91.5	100
นครศรี 5	8.1	-	-	44.6	-	-	-	-	-	10.7	-	44.6	100
นครศรี 6	9.0	12.1	-	4.2	-	3.7	-	-	-	52.1	-	27.4	100
นครศรี 7	8.6	0.8	-	79.8	-	-	-	0.8	-	17.7	-	0.8	100
นครศรี 8	8.2	2.7	-	10.8	-	1.8	3.6	-	1.8	78.4	0.9	-	100
นครศรี 9	7.3	36.8	-	33.5	-	-	-	-	-	28.6	-	1.1	100
ชุมพร 1	8.4	-	-	0.6	4.0	-	-	-	-	60.4	-	38.6	100
ชุมพร 2	10.2	-	-	2.9	-	-	-	-	-	97.1	-	-	100
ชุมพร 3	10.5	-	-	69.9	-	-	-	-	-	30.1	-	-	100
ประจวบ	9.1	-	-	21.2	-	12.1	-	-	63.6	-	1.52	3.1	100

Note: *A.niger = Aspergillus niger* *A.accu =Aspergillus acculentus* *my = mycellium*
A.Ochr = Aspergillus Ochraceus *Pen = Pennicillum* *A. fu =Aspergillus fumigatus*
A.fla = Aspergillus Flavus *A.Oth = Aspergillus other*
A.Tama = Aspergillus Tamarii *Fusa = Fusarium*

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการสุ่ม สำรวจเก็บตัวอย่างเมล็ดโกโก้แห้งจากแปลงเกษตรกร จุดรับซื้อ ในพื้นที่ จ.ชุมพร นครศรีธรรมราช ประจวบคีรีขันธ์ จันทบุรี และงานวิจัยของศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรตั้งแต่ปี 2555-2557 รวมทั้งหมด 51 ตัวอย่างมาวิเคราะห์ชนิดของเชื้อราด้วยวิธี Direct plate พบเชื้อรา *A. ochraceus* ที่ก่อให้เกิดการสร้างสารพิษ Ochratoxin A เฉลี่ย 1.22 % มีค่าปริมาณสารพิษ 1.33 µg/kg และในปี 2556 ค่าปริมาณสารพิษ 0.88 µg/kg ซึ่งไม่เกินมาตรฐานกำหนด (5 µg/kg) ค่าปริมาณสารพิษที่พบทั้งปี 2555 และ 2556 ได้จากตัวอย่างเมล็ดโกโก้จาก จ. นครศรีธรรมราช ประกอบกับตัวอย่างที่สุ่มเก็บมีการกระจายตัวและจำนวนมากกว่าสามตัวอย่างเมล็ดโกโก้จากแหล่งอื่น นอกจากนั้นพบเชื้อรา *A. flavus* ที่สร้างสารพิษ Aflatoxin เกือบทุกตัวอย่าง ซึ่งอาจเกิดจากขั้นตอนการเก็บเกี่ยวและหลังการเก็บเกี่ยว ไม่ว่าจะเป็นการตากแห้ง การเก็บรักษา ถ้าโดนฝนหรือความชื้นก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราได้ และช่วงการเก็บเกี่ยวถ้าเก็บฝักมารวมกองไว้นานโดยไม่มีการผ่าเอาเมล็ดออกก่อให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราได้ การลดการปนเปื้อนของเชื้อราโดยการเก็บฝักที่สุกพร้อมเก็บเกี่ยวนำมาผ่าเอาเมล็ดออกและนำไปหมักทันที ช่วยลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของเชื้อรา (Esteban *et al*, 2006) ดังนั้นการปฏิบัติที่ถูกต้องช่วยลดการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราได้ระดับหนึ่ง ทั้งนี้การที่เกษตรกรส่วนหนึ่งได้รับการถ่ายทอดความรู้และเทคโนโลยีการผลิตโกโก้จากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรไปเมื่อปี 2535 ก็ยังคงปฏิบัติที่ถูกต้องย่อมมีผลต่อคุณภาพของเมล็ด และราคาเช่นกัน คุณภาพของเมล็ดที่ดีต้องมีลักษณะผิวเรียบ ไม่เหี่ยวย่น ขนาดเมล็ดโตสม่ำเสมอ มีเมล็ดที่เป็นราไม่เกิน 3 เปอร์เซ็นต์ (ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร, 2535) แม้ปัจจุบันพื้นที่ปลูกโกโก้จะเหลืออยู่ไม่มากแต่ความต้องการของอุตสาหกรรมเพิ่มมากขึ้น อนาคตโกโก้น่าจะเป็นพืชเสริมรายได้ให้เกษตรกรในพื้นที่ปลูกเดิมทางภาคใต้และแหล่งปลูกใหม่ภาคตะวันออกได้ดีพืชหนึ่ง

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. การแนะนำให้ความรู้แก่เกษตรกรผู้ปลูกโกโก้ในการปฏิบัติหลังการเก็บเกี่ยวให้ปลอดภัยต่อการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อรา
2. เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับเจ้าหน้าที่ฯเกี่ยวข้อง กลุ่มผู้รับซื้อ ตลอดจนอุตสาหกรรมโกโก้ในการตัดสินใจเลือกซื้อวัตถุดิบที่มีคุณภาพ

เอกสารอ้างอิง

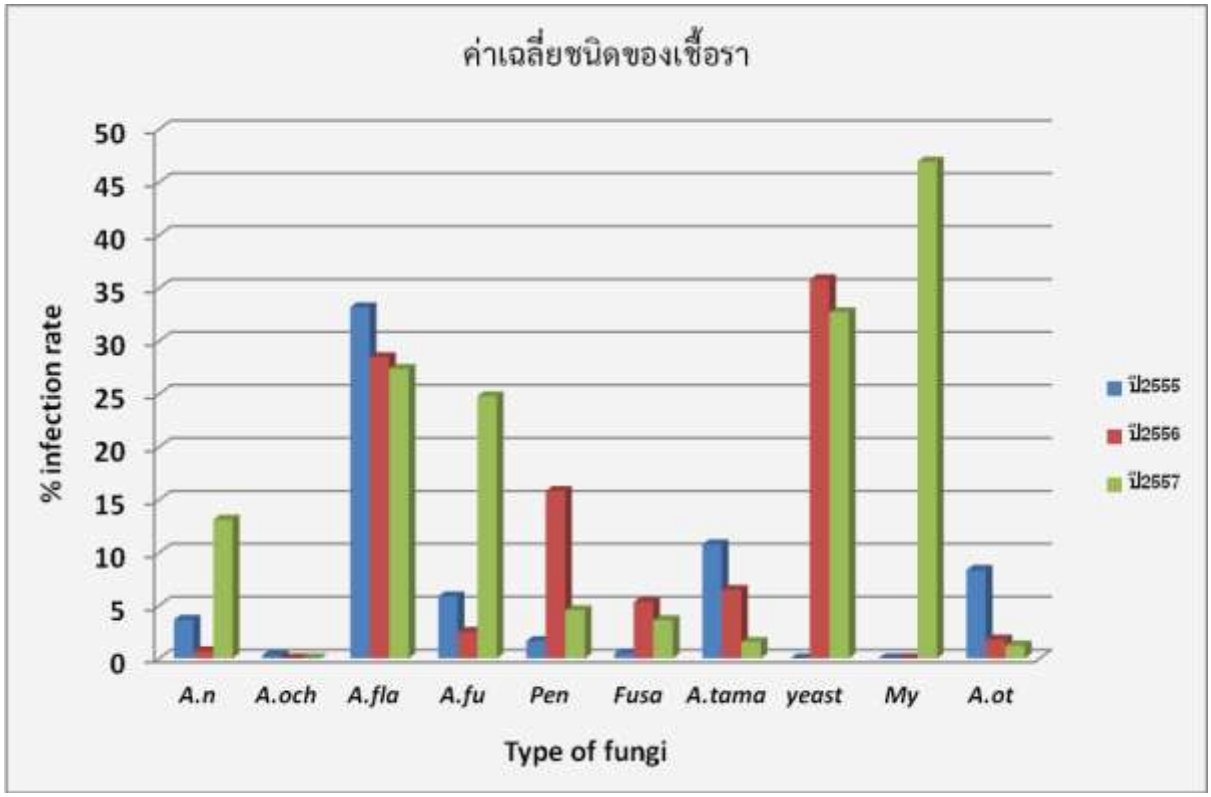
ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร. 2535. คู่มือการปลูกโกโก้. ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. น.

Copetti MV, Pereira JL, Iamanaka BT, Pitt JL, Tanawaki MH. 2010. Odhratoxigenic fungi and ochratoxin A in Cocoa during farm processing. International. Microbioogy. September 30:143 (1-2): 67-70.

Dano SD, Manda P, Dembele A, Kouassi Abla Am, Bibaud JH, Gouet JZ, Ze Maria Sika CB. 2010. Influence of fermentation and drying materials on the contamination of cocoa beans by ochratoxin A. International. Microbioogy. September 30:143 (1-2): 67-70.

Esteban A, Abarca, M.L.Bragulat, M.R., Cabanes, F.J. 2006. Study of the effect of water activity and temperature on Ochratoxin A production by Aspergillus carbonarius . Food microbiology (23) 634-640 p.

Pauline Mounjouenpou, Dominique Gueule, Angelique Fontana- Tachon, Bernard Guyot, Pierre Roger Tobdje. Joseph-Pierre Guiraud. 2008. Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon. International Journal and food microbiology (121) 234-241 p. สืบค้นจาก www. Sciencedirect.com



ภาพผนวก 1 แสดงค่าเฉลี่ยชนิดของเชื้อราระหว่างปี 2555 – 2557

ตารางผนวก 1 ค่าเฉลี่ยชนิดของเชื้อราจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Direct plate จากแหล่งปลูกต่างๆปี 2555

จังหวัด	% MC	*A.n*	*A.och*	*A.fla*	*Pen*	*A.fu*	*Fusa*	*A.tama*	*Yeast*	*My*	*A.ot*
นครศรีฯ	8.8	15.83	1.22	4.39	3.55	19.02	4.12	14.32	-	-	12.32

ชุมพร	8.19	.	.	27.62	-	-	-	25.71	-	-	-
จันทบุรี	8.86	-	-	28.09	-	-	-	28.09	-	-	15.73

ตารางผนวก 2 ค่าเฉลี่ยชนิดของเชื้อราจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Direct plate จากแหล่งปลูกต่างๆปี 2556

จังหวัด	% MC	*A.n*	*A.och*	*A.fla*	*Pen*	*A.fu*	*Fusa*	*A.tama*	*Yeast*	*My*	*A.ot*
นครศรีฯ	8.43	-	-	2.19	41.71	2.5	5.33	3.51	32.62	32.13	2.5
ชุมพร	6.93	0.48	-	31.74	-	5.46	-	6.97	37.41	37.48	1.04

ตารางผนวก 3 ค่าเฉลี่ยชนิดของเชื้อราจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Direct plate จากแหล่งปลูกต่างๆปี 2556

จังหวัด	% MC	*A.n*	*A.och*	*A.fla*	*Pen*	*A.fu*	*Fusa*	*A.tama*	*Yeast*	*My*	*A.ot*
นครศรีฯ	8.5	13.1	-	29.47	2.03	4.55	3.6	1.35	1.8	41.73	0.9
ชุมพร	9.7	-	-	24.46	-	4.0	-	-	-	62.53	-
ประจวบฯ	9.1	-	-	21.2	12.1	-	-	-	63.3	-	1.52

Note: *A.niger = Aspergillus niger* *A.accu =Aspergillus acculentus*

A.Ochr = Aspergillus Ochraceus *Pen = Pennicillum*

A.fla = Aspergillus Flavus *A.Oth = Aspergillus Other*

A.Tama = Aspergillus Tamarii *Fusa = Fusarium*

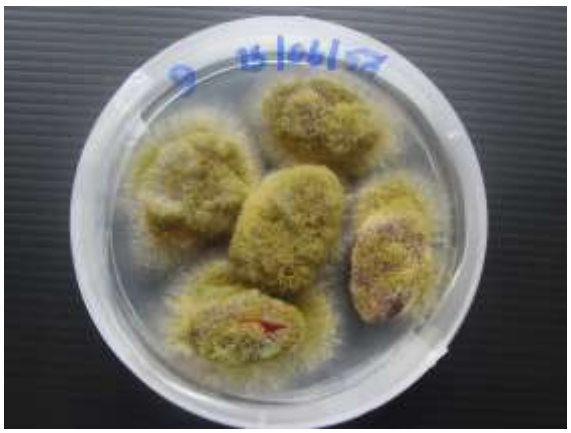
การหมักโกโก้

ฝักโกโก้ที่พร้อมเก็บเกี่ยว

การตากเมล็ดโกโก้

เมล็ดโกโก้แห้ง

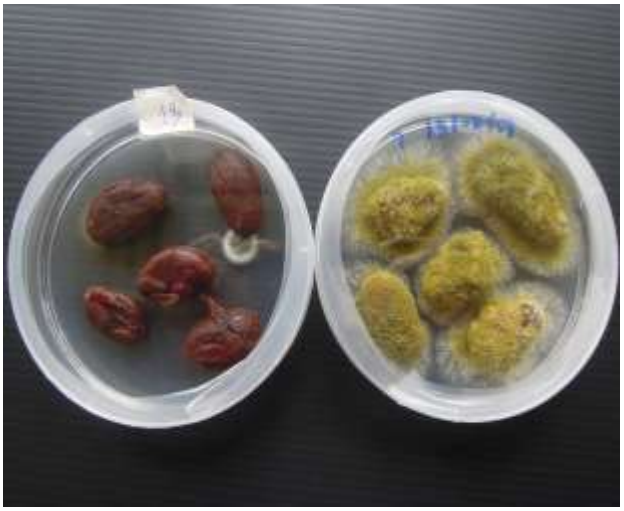
การเก็บรักษาเมล็ดโกโก้ในถุงกระสอบปุ๋ย



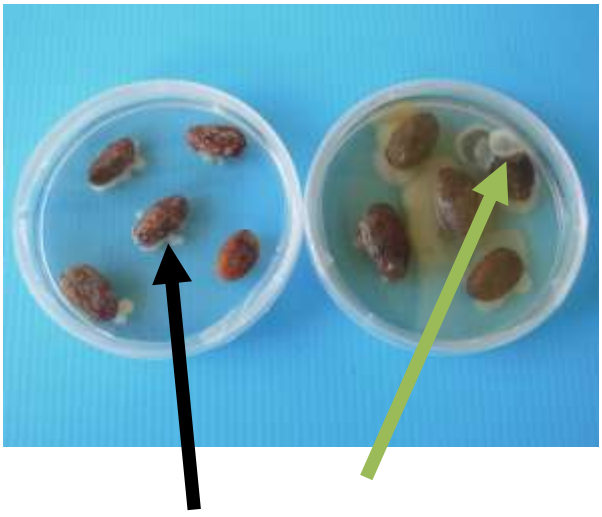
Clan bean

A. flavus

Mycelium



A. flavus



Yeast and Pennicillium