

การปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราตอกซิน เอ ที่พบในผลองุ่นจากแปลงปลูก
Contamination of Fungi and Orchratoxin A Detected in Grape Fruits from
Vineyard

วีรภรณ์ เดชนำบุญชาชัย^{1/} บุญญวดี จิระวุฒิ^{1/} รัตตา สุธธยาคม^{1/}
Weeraporn Dejnombunchachai^{1/} Boonyawadee Chirawut^{1/} Ratta Suttayakom^{1/}

ABSTRACT

The contaminations of fungi and Orchratoxin A at 4 growth stages of grape were studied in 4 famers' vineyard. The first stage of growth was 30-40 days after fruit set and the second, third and fourth were 60-70, 90-100 and 120 days after fruit set, respectively. In every vineyard, the average Orchratoxin A of the first and second stages were 7.95-119.0 µg/kg which were higher than the third and fourth stages (2.90-20.3 µg/kg). *Penicillium spp.* and *Aspergillus aculeatus* were found to produce a toxin whereas *Alternaria spp.*, *Curvularia spp.* and *Cladosporium spp.* did not produce the toxin. Soil in each vineyard was investigated for fungi contamination by dilution plate count and air was investigated by settle plate. The amounts of *Penicillium spp.* and *A. aculeatus* contamination in grape were high which correlated to increase of Orchratoxin A concentration detected in the fruit. Fungi and Orchratoxin A could contaminate in every growth stage of grape. Therefore, a good management from planting to harvest must be considered to reduce the amount of fungi and Orchratoxin A contamination.

Key words: Orchratoxin A, grape, contamination, fungi

^{1/} กองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลผลิตเกษตร กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Postharvest and Products Processing Research and Development Office, Department of Agriculture, Chatuchak Bangkok 10900

บทคัดย่อ

ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ ในสวนองุ่น 4 ระยะการเจริญเติบโต ระยะที่ 1 หลังการติดผล 30-40 วัน ระยะที่ 2 หลังการติดผล 60-70 วัน ระยะที่ 3 หลังการติดผล 90-100 วัน และระยะที่ 4 หลังการติดผล 120 วัน จำนวน 4 สวน พบว่า อยุ่นระยะที่ 1 และระยะที่ 2 ของทุกสวน มีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 7.95-119.0 ไมโครกรัม/กก. ซึ่งสูงกว่า อยุ่นระยะที่ 3 และระยะที่ 4 ของทุกสวน ที่มีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 2.90-20.3 ไมโครกรัม/กก. และพบการปนเปื้อนของเชื้อรากลุ่มที่สร้างสารโอคราทอกซิน เอ ทุกสวน คือ *Penicillium* spp. และ *Aspergillus aculeatus* เชื้อรากลุ่มที่ไม่สร้างสารโอคราทอกซิน เอ ได้แก่ *Alternaria* spp. *Curvularia* spp. และ *Cladosporium* spp. เมื่อเก็บตัวอย่างดินแต่ละสวนมาตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราด้วยวิธี dilution plate count และตรวจอากาศบริเวณแปลงปลูกโดยวิธี settle plate พบว่า มีการปนเปื้อนเชื้อรา *Penicillium* spp. และ *A. aculeatus* ปริมาณสูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ในผลองุ่น จะเห็นได้ว่าเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ มีโอกาสปนเปื้อนในผลองุ่นสดทุกระยะการเจริญเติบโต ดังนั้นควรมีระบบการจัดการที่ดีตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงเก็บเกี่ยว เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ

คำสำคัญ: โอคราทอกซิน เอ อยุ่น การปนเปื้อนเชื้อรา

บทนำ

โอคราทอกซิน เอ เป็นสารทุติยภูมิที่สร้างโดยเชื้อรา 2 สกุล คือ สกุล *Aspergillus* (*A. carbonarius*, *A. niger* และ *A. ochraceus*) ส่วนใหญ่จะพบในเขตร้อน และ *Penicillium* (*P. verrucosum* และ *P. nordicum*) ซึ่งพบในประเทศเขตอบอุ่น (Mounjouenpou *et al.*, 2008) สารโอคราทอกซิน เอ เป็นสารพิษต่อมนุษย์และสัตว์ ทำให้เกิดความผิดปกติที่ไตและมีการเสื่อมของหลอดเลือดไต (Meca *et al.*, 2010) เป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immunotoxic) ดังนั้นองค์การ International Agency for Research on Cancer (IARC) จัดให้สารโอคราทอกซิน เอ เป็นสารที่อาจก่อมะเร็งได้ในมนุษย์ กลุ่ม 2B (IARC, 1993) ในปี 1996 มีรายงานการค้นพบสารโอคราทอกซิน เอ ในน้ำองุ่นและไวน์เป็นครั้งแรก (Zimmerli and Dick, 1966) นับตั้งแต่นั้นมาจึงมีรายงานการปนเปื้อนของสารพิษชนิดนี้ในไวน์จากหลายประเทศ ในยุโรป อเมริกาใต้ ออสเตรเลีย โดยเฉพาะไวน์ที่มาจากประเทศในแถบเมดิเตอร์เรเนียน เช่น ฝรั่งเศส อิตาลี กรีซ และสเปน ซึ่งเป็นบริเวณที่พบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ ในไวน์บ่อยครั้ง และพบในปริมาณที่สูงกว่าประเทศในภูมิภาคอื่น ๆ จากนั้นได้มีรายงานการตรวจพบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตภัณฑ์และการเกษตร รวมทั้งเครื่องดื่มหลากหลายชนิด เช่น ธัญพืช เมล็ดกาแฟ โกโก้ ถั่ว เครื่องเทศ ผลไม้แห้ง เป็นต้น (SCOOP European commission, 2002) เนื่องจากสารโอคราทอกซิน เอ มีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ ดังนั้นการกำหนดปริมาณสูงสุดของโอคราทอกซิน เอ ที่อนุญาตให้มีการปนเปื้อนได้จึงเป็นเรื่องที่จำเป็นอย่างยิ่ง ในหลายประเทศที่พัฒนาแล้วทั่วโลกให้ความสำคัญอย่างมากกับสาร

พิษจากเชื้อรา และได้มีข้อกำหนดปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในระดับสูงสุดที่ยอมรับได้ในผลิตผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร รวมทั้งเครื่องมือ เช่น คณะกรรมาธิการยุโรป (European Commission) กำหนดให้มีระดับการปนเปื้อนสูงสุดของโอคราทอกซิน เอ ในน้ำองุ่น และไวน์ทุกชนิดที่ 2 ไมโครกรัม/กก. และในองุ่นแห้งที่ 10 ไมโครกรัม/กก. (Anon, 2005)

สำหรับประเทศไทยมีการตรวจพบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ ในผลิตภัณฑ์และผลิตผลเกษตรหลายชนิด สุพีและคณะ (2557) ทำการตรวจผลไม้อบแห้งจำนวน 20 ชนิด และพบการปนเปื้อนของเชื้อราในผลไม้อบแห้ง 14 ชนิด เชื้อราที่พบ ได้แก่ *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. aculeatus*, *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp. และ *Fusarium* spp. และสารโอคราทอกซิน เอ ปนเปื้อนในผลไม้อบแห้ง 19 ชนิด มีปริมาณ 0.05-24.1 ไมโครกรัม/กก. โดยพบปริมาณสูงสุดในบลูเบอร์รี่อบแห้ง รองลงมาคือ ลูกเกดขาว การปนเปื้อนของเชื้อราสามารถเกิดขึ้นได้ในตั้งแต่แปลงปลูก ในระหว่างกระบวนการผลิต การแปรรูป การขนส่งและการเก็บรักษา หากมีการปนเปื้อนของเชื้อราและมีการเจริญของเชื้อราบนผลิตผลจะทำให้เกิดการปนเปื้อนสารพิษจากเชื้อราได้ (Raddy *et al.*, 2008) ดังนั้นการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ ในผลองุ่นตั้งแต่แปลงปลูกจนถึงการเก็บเกี่ยว เพื่อให้ทราบว่าขั้นตอนใดของกระบวนการผลิตที่มีการปนเปื้อนมากที่สุด ทราบสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์องุ่น เพื่อเป็นแนวทางในการป้องกันกำจัดต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1.1 การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อรา และสารพิษจากเชื้อราในองุ่นผลสด

เก็บตัวอย่างองุ่น 2 พันธุ์ คือ พันธุ์แบล็คโอบอล จำนวน 3 สวน (สวนที่ 1 และสวน 3 อ. มากเหล็ก จ.สระบุรี) และ (สวนที่ 2 อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา) และพันธุ์ชีราส จำนวน 1 สวน (สวนที่ 4 อ. ภูเรือ จ.เลย) ทำการเก็บผลองุ่นสด 4 ระยะคือ ระยะที่ 1 หลังการติดผล 30-40 วัน ระยะที่ 2 หลังการติดผล 60-70 วัน ระยะที่ 3 หลังการติดผล 90-100 วัน และระยะที่ 4 หลังการติดผล 120 วัน โดยทุกระยะจะเก็บตัวอย่างละ 5 ซ้ำ ๆ 1 กก. เพื่อนำมาตรวจการปนเปื้อนของเชื้อรา และสารโอคราทอกซิน เอ

1.1.1 ตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในองุ่นผลสดด้วยวิธี Direct plate count

สุ่มผลองุ่นจากตัวอย่างที่เก็บมาจำนวน 5 ซ่อ ๆ ละ 20 ผล มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา potato dextrose agar (PDA) จำนวน 5 ผล/จานเลี้ยงเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน ตรวจนับเชื้อราที่ปนเปื้อน และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้

$$\text{การปนเปื้อนเชื้อรา (\%)} = \frac{\text{จำนวนผลองุ่นที่ปนเปื้อนเชื้อรา}}{\text{จำนวนผลองุ่นทั้งหมด}} \times 100$$

บันทึกลักษณะของเชื้อรา และจำแนกชนิดของเชื้อราที่ปนเปื้อนในผลองุ่น โดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำข้อมูลลักษณะสัณฐานที่บันทึกไว้มาจัดจำแนกโดยเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิงที่มีรายงาน (Raper and Fennell, 1965 และ อรุมา, 2555)

1.2 ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซิน เอ ในอุณหภูมิผลสดในกระบวนการผลิต โดยวิธี ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

1.2.1 การเตรียมตัวอย่างและสกัดสารโอคราทอกซิน เอ จากตัวอย่าง โดยชั่งอุณหภูมิผลสด 25 ก. เติมน้ำละลายเมทานอล 70 % ปริมาตร 100 มล. บดให้ละเอียดและผสมคลุกเคล้าให้เป็นเนื้อเดียวกันใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. (อัตราส่วน 1:4) ปิดปากขวดด้วยจุกยาง แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อัตราความเร็ว 300 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ให้ตกตะกอน แล้วนำส่วนใสมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ส่วนที่กรองได้นำไปตรวจสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธี ELISA โดยชุดทดสอบสำเร็จรูป Veratox® NEOGEN (USA)

1.2.2 การวิเคราะห์สารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธี ELISA โดยชุดทดสอบสำเร็จรูป Veratox® NEOGEN (USA) ใช้หลุมทดสอบชนิด 48 หลุม/เพลท ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อสารโอคราทอกซิน เอ

- หยดสารพิษมาตรฐานโอคราทอกซิน เอ 100 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมผสมสารระดับความเข้มข้น คือ 0 0.5 1.25 2.5 และ 6.25 นาโนกรัม/มล. และหยดสารสกัดตัวอย่าง ลงในหลุมถัดไป 100 ไมโครลิตร

- หยดเอ็นไซม์คอนจูเกต 100 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมผสมสารทุกหลุม ผสมให้เข้ากัน ดูดสารที่ผสมแล้ว 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ บ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 10 นาที ล้างหลุมทดสอบ 3 ครั้ง ด้วย 0.01 M phosphate buffer saline-tween 20 (PBS-T) ซับให้แห้ง

- หยดซับสเตรท (substrate) 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมทดสอบ บ่มไว้ในที่มืดเป็น

เวลา 10 นาที จากนั้นเติมน้ำหยุดปฏิกิริยา (stopping solution) 100 ไมโครลิตร อ่านค่าความเข้มสี และปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader (Sunrise ของ Tecan) ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณเป็นปริมาณสารพิษมีหน่วยเป็น ไมโครกรัม/กก.

1.3 ทดสอบการสร้างสารพิษของเชื้อราที่ปนเปื้อนในอุณหภูมิผลสด ในอาหารเหลว Yeast Extract Sucrose (YES medium)

นำเชื้อราที่พบปนเปื้อนจากข้อ 1.1 มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีรายงานว่าสร้างโอคราทอกซิน เอ มาทดสอบในอาหารเหลว YES medium โดยนำเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อายุ 5 วัน มาทำสปอร์แขวนลอย (spore suspension) ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มล. จากนั้นดูดสปอร์แขวนลอย 10 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลว YES medium ปริมาณ 9 มล. เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบกำหนดเวลา ดูดอาหารเหลวที่มีเชื้อราไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuged ความเร็วรอบ 15,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปตรวจปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ด้วยวิธี ELISA ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป Veratox® NEOGEN (USA) ตามวิธีข้อ 1.2.1 ทำการทดสอบกรรมวิธีละ 2 ซ้ำ

2 การปนเปื้อนของเชื้อราในดินและอากาศบริเวณแปลงปลูก

2.1 การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในดินบริเวณแปลงปลูก ด้วยวิธี Dilution plate count -

สุ่มเก็บตัวอย่างดินในบริเวณรอบ ๆ ต้นที่เก็บตัวอย่างอุณหภูมิ โดยชุดเฉพาะผิวหน้าดิน

เนื่องจากต้องการดูการปนเปื้อนที่ผิวดิน โดย 1 ตำแหน่ง จุด 5 จุด นำมาผสมรวมกันในถุงพลาสติกให้ได้น้ำหนัก 500 กรัม นำมาตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในดิน ด้วยวิธี dilution plate count (ตัวอย่างดินจำนวน 1 ก. ต่อน้ำกลั่นหนึ่งช้อน 9 มล.) ความเข้มข้นที่ 1:10 และ 1:100 ดูตัวอย่างจำนวน 100 ไมโครลิตร หยดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DG18 เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วรูปตัวแอล ความเข้มข้นละ 6 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิห้อง บันทึกรูปผล โดยนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี นำไปคำนวณหาจำนวนเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่างเป็น cfu/g ดังนี้

$$\text{ปริมาณโคโลนีของจุลินทรีย์ต่อตัวอย่าง 1 กรัม} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่ขึ้นใน plate (โคโลนี)}}{\text{ระดับความเจือจาง} \times \text{ปริมาณตัวอย่างที่ใส่ลงใน plate}}$$

2.2 การตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในอากาศ บริเวณแปลงปลูก

การตรวจเชื้อปนเปื้อนในอากาศ ด้วยวิธี settle plate จะเก็บอากาศบริเวณแปลงต้นองุ่นโดยเปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ DG 18 ไว้บริเวณต้นองุ่นที่เก็บตัวอย่าง นาน 30 นาที จำนวน 5 ชั่วโมง และเดินรอบแปลงที่ทำการเก็บองุ่น โดยเดินตามลมเปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อถือเดินรอบแปลง ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของผลองุ่น ทั้ง 4 ระยะ จำนวน 5 ชั่วโมง นำจานเลี้ยงเชื้อมาบ่มเก็บที่อุณหภูมิห้อง ตรวจเชื้อราที่ปนเปื้อน

3 ประเมินเข้าทำลายของเชื้อราปนเปื้อน และปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในแต่ละขั้นตอนการผลิต

3.1 วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอครา

ทอกซิน เอ ในขั้นตอนการผลิต

3.2 หาแนวทางแก้ไขการปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ ในขั้นตอนการผลิต

ผลการทดลองและวิจารณ์

1 การปนเปื้อนของเชื้อรา และสารพิษจากเชื้อราในองุ่นผลสด

1.1 การปนเปื้อนของเชื้อราในองุ่นผลสด จากการสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อราบนผลองุ่นพันธุ์แบล็คโอปอล และพันธุ์ซีราส ทั้ง 4 ระยะ การเจริญเติบโต พบว่า ทุกระยะมีการปนเปื้อนของเชื้อราหลายชนิด (Figure 1) และจากการจำแนกชนิดของเชื้อราที่ปนเปื้อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *Aspergillus aculeatus* *Penicillium* spp. *A. flavus* *Rhizopus* spp. *Fusarium* spp. *Alternaria* spp. *Curvularia* spp. *Nigrospora* spp. และ *Cladosporium* spp. (Figure 2) ผลองุ่นพันธุ์แบล็คโอปอล พบเชื้อรา *A. aculeatus* มากที่สุดคือ 6-100% รองลงมาคือเชื้อรา *Penicillium* sp. 1-54% ซึ่งเชื้อรา 2 ชนิดมีรายงานว่าสามารถสร้างสารโอคราทอกซิน เอ ได้ (Zhang et al. 2016; Battilani et al., 2003) และเชื้อราที่ไม่สร้างสารโอคราทอกซิน เอ ได้แก่ *A. flavus* *Rhizopus* spp. *Fusarium* spp. *Alternaria* spp. *Curvularia* spp. *Nigrospora* spp. และ *Cladosporium* spp. ขณะที่องุ่นพันธุ์ซีราส ตรวจพบเชื้อราบนผลองุ่นทั้ง 4 ระยะ โดยเชื้อราที่พบมากที่สุดคือ *Penicillium* spp. (11-19%) และพบการปนเปื้อนของเชื้อราที่ไม่สร้างสารโอคราทอกซิน เอ คือ *Fusarium* spp. และ *Alternaria* spp. ในปริมาณที่สูงคือ 39-57% และ 41-56% (Table 1)

Table 1 The percentage of contaminated fungi from grape fruit at various stages of growth

vineyard	cultivar	stage*	Contaminated fungi (%)										
			<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Penicillium</i> spp.	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Curvularia</i> spp.	<i>Nigrospora</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.	bacteria
1	Blackopor	1	6	4	0	0	0	5	44	15	28	3	0
		2	15	0	0	0	0	6	44	18	9	3	0
		3	68	3	5	0	0	4	2	1	0	0	0
		4	20	0	0	0	1	1	3	0	0	0	bac
2	Blackopor	1	15	6	3	0	0	2	18	22	10	41	0
		2	18	1	0	0	0	0	25	26	3	74	0
		3	31	54	1	0	0	2	2	15	1	19	0
		4	66	8	0	0	0	0	0	1	0	0	bac
3	Blackopor	1	84	30	14	0	1	1	3	3	1	0	0
		2	91	41	1	3	0	18	9	0	2	0	0
		3	100	35	0	0	2	0	1	1	0	0	0
		4	21	20	18	0	2	0	0	2	1	0	bac
4	Shiraz	1	0	16	0	0	0	39	41	5	7	10	0
		2	0	19	0	0	0	41	49	7	11	11	0
		3	0	11	0	0	0	42	43	0	13	10	0
		4	0	11	0	0	0	57	56	3	9	13	0

*Average from 100 fruits samples

stage 1 = 30-40 days after fruit set

stage 3 = 90-100 days after fruit set

stage 2 = 60-70 days after fruit set

stage 4 = 120 days after fruit set

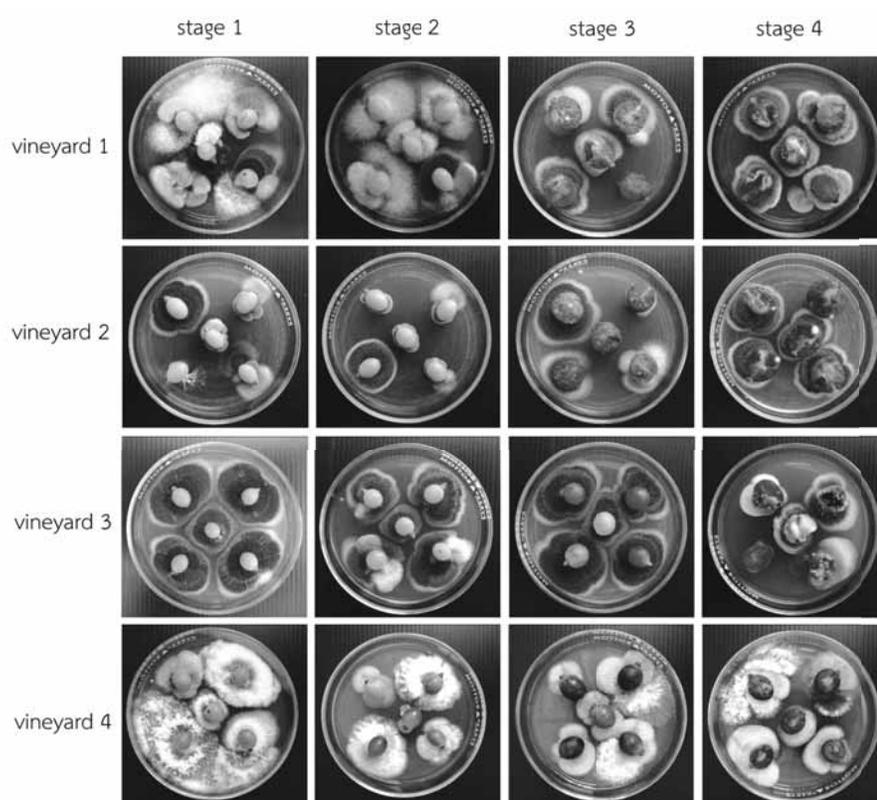


Figure 1 Grape fruit contaminated with fungi at 4 stages of growth from different vineyards

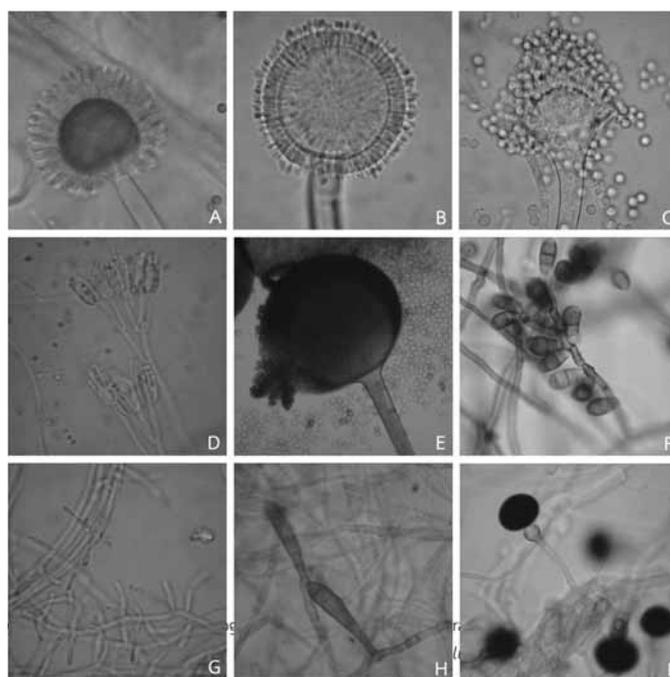


Figure 2 Microscopic morphology of contaminated fungi on grape fruit

- | | |
|------------------------------|---------------------------------|
| A) <i>Aspergillus niger</i> | B) <i>Aspergillus aculeatus</i> |
| C) <i>Aspergillus flavus</i> | D) <i>Penicillium</i> spp. |
| E) <i>Rhizopus</i> spp. | F) <i>Curvularia</i> spp. |
| G) <i>Fusarium</i> spp. | H) <i>Alternaria</i> spp. |
| I) <i>Nigrospora</i> spp. | |

1.2 การปนเปื้อนสารโอคราทอกซิน เอ ขององุ่นผลสดในกระบวนการผลิต

เมื่อนำผลองุ่นพันธุ์แบล็คโอปอล และพันธุ์ซีราส ทั้ง 4 ระยะเวลา ของทุกสวน มาตรวจ ปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ พบว่า องุ่นทั้ง 2 พันธุ์ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน คือ องุ่นระยะ 1 และ 2 ของทุกสวน มีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ สูงกว่าผลองุ่นระยะ 3 และ 4 โดยมีค่าเฉลี่ย ของสารโอคราทอกซิน เอ อยู่ระหว่าง 7.95-119.00 ไมโครกรัม/กก. และ 2.90-20.30 ไมโครกรัม/กก. (Figure 3) ซึ่งสอดคล้องกับ Serra *et al.* (2006) ที่รายงานพบการปนเปื้อนของสารโอคราทอกซินในผลองุ่นที่ระยะ pea berry, early verasion และ ripe berry ปริมาณ 263 149 และ 35 นาโนกรัม/กก. ตามลำดับ ซึ่งระยะ pea berry นั้นจะตรงกับระยะที่ 1 และ 2 ของการทดลองนี้ คือระยะที่ผลองุ่นมี

การสร้างซ่อ และการเปลี่ยนแปลงขนาดและน้ำหนักรวดอย่างรวดเร็ว สังเกตลักษณะภายนอกขององุ่นระยะนี้จะมีสีเขียว และผลองุ่นค่อนข้างแข็ง (Bisson, 2001) ระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ ขององุ่นมีอิทธิพลต่อการสร้างสารโอคราทอกซิน เอ เนื่องจากสารโอคราทอกซิน เอ จะสร้างได้สูงเมื่อมีปริมาณกรดอินทรีย์ (organic acid) สูง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ต่ำ (Serra *et al.*, 2006) ซึ่งการสะสมของกรดใน ระยะการเจริญเติบโตของผลองุ่น จะพบว่าความเข้มข้นของกรดจะลดลงหลังจากองุ่นเริ่มเปลี่ยนสีจนกระทั่งองุ่นสุกเต็มที่ (Terrier *et al.*, 2001) และเมื่อองุ่นเริ่มสุกความเข้มข้นของน้ำตาลจะมีมากขึ้น ทำให้ไม่เหมาะสมต่อการสร้างสารโอคราทอกซิน เอ ซึ่งอาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่สนับสนุนว่าการสร้างสารโอคราทอกซิน เอ จะพบมากในองุ่นระยะ 1 และ 2 มากกว่า ระยะ 3 และ 4

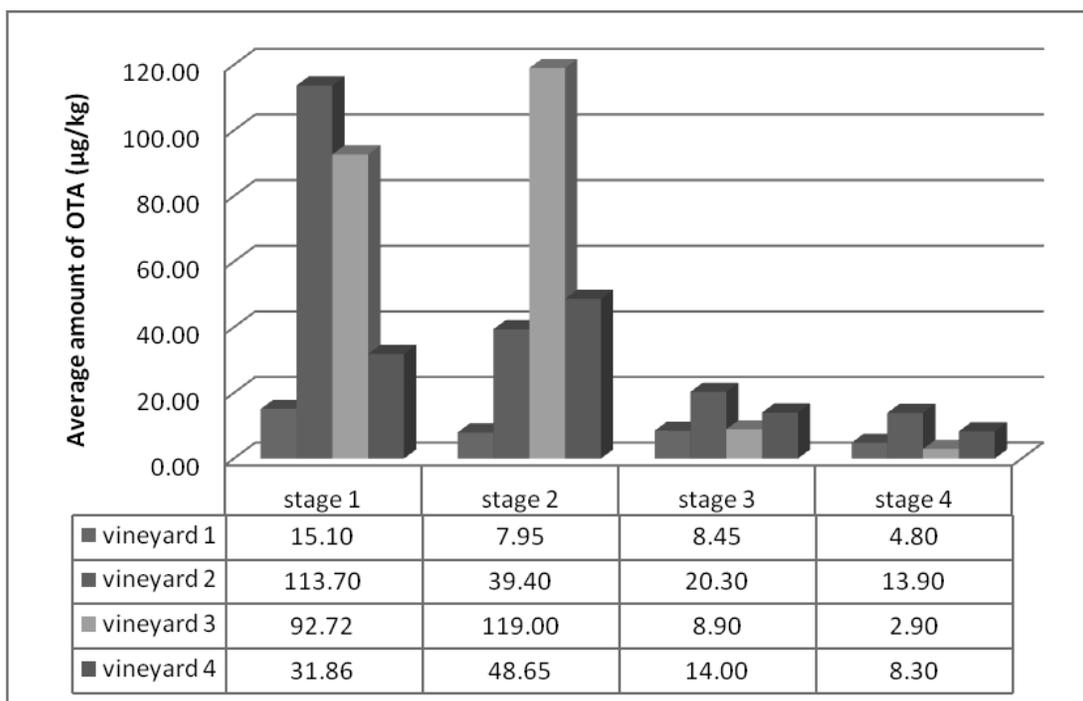


Figure 3 Contaminated ochratoxin A from grape fruit at various stages of growth
 stage 1 = 30-40 days after fruit set
 stage 2 = 60-70 days after fruit set
 stage 3 = 90-100 days after fruit set
 stage 4 = 120 days after fruit set
 vineyard 1-3 = Blackopor
 vineyard 4 = Shiraz

1.3 การสร้างสารพิษของเชื้อราที่พบปนเปื้อนในองุ่นผลสด

ผลการทดสอบ พบว่า เชื้อรา *A. aculeatus* *A. niger* และ *Penicillium* spp. ที่พบในองุ่นผลสดสามารถสร้างสารโอคราทอกซิน เอ ในอาหารเหลว yeast extract sucrose (YES medium) ได้โดยมีค่าเฉลี่ยของปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ที่สร้าง อยู่ระหว่าง 2.35-33.15, 3.30-5.10 และ 5.53-19.68 ไมโครกรัม/กก. ตาม

ลำดับ (Table 2) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhang *et al.* (2016) ที่จำแนกเชื้อราจากองุ่นที่สามารถสร้างสารโอคราทอกซิน เอ จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Talaromyces rugulosus* (Q1 และ Q3) *Penicillium commune* (V5-1) *Penicillium rubens* (MQ-5) และ *Aspergillus aculeatus* (MB1-1) โดยมีปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ที่สร้างคือ 97.5, 50.11, 43.94, 96.86 และ 25.9 นาโนกรัม/ก. ตามลำดับ

Table 2 The efficacy of toxigenic fungi isolated from fresh grape fruit to produce Ochratoxin A in yeast extract sucrose medium

vineyard	Average amount of OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	<i>Aspergillus niger</i>	<i>A. aculeatus</i>	<i>Penicillium</i> spp.
1	4.50	2.88	8.05
2	5.10	2.35	19.68
3	3.30	33.15	8.88
4	-	-	5.53

vineyard 1-3 = Blackopor

vineyard 4 = Shiraz - = non detectable

2 การปนเปื้อนของเชื้อราในดินและในอากาศบริเวณแปลงปลูก

2.1 การปนเปื้อนของเชื้อราในดิน

ตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราในดินพบว่า ดินจากแปลงปลูกองุ่นระยะที่ 1-4 ของทุกสวน มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. aculeatus* และ *Penicillium* spp. (Figure 3) ในปริมาณที่สูง อยู่ระหว่าง 3.7×10^2 - 1.7×10^4 cfu/g และ 8.3×10^1 - 4.3×10^4 cfu/g ตามลำดับ (Table 4) การปนเปื้อนอาจเนื่องมาจากการจัดการแปลงที่ไม่ถูกต้องของเกษตรกร จากการสังเกตสภาพสวน พบว่า สวนองุ่นทุกแปลงไม่มีการทำความสะอาดแปลงปลูก มีวัชพืชขึ้นรก ไม่มีการเก็บเศษ

ซากวัชพืชออกจากแปลง มีการตัดผลองุ่นที่ขนาดเล็ก คุณภาพไม่ดีลงสู่พื้นโดยไม่ได้เก็บออกนอกแปลง และพบว่า ดินบริเวณแปลงปลูกองุ่นของสวนที่ 3 มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. aculeatus* 5.0×10^3 - 1.7×10^4 cfu/g และ *Penicillium* spp. 6.8×10^3 - 4.3×10^4 cfu/g. มากกว่าสวนอื่น ๆ เพราะมีการปล่อยให้ผลองุ่นเน่าคาต้น ทำให้เป็นแหล่งแพร่กระจายของเชื้อรา ถึงแม้จะเก็บเกี่ยวผลผลิตไปแล้ว ผลองุ่นที่เน่าเสียก็ยังถูกตัดทิ้งลงในแปลงด้วย นอกจากนี้ยังพบเชื้อราชนิดอื่น ๆ ในดิน ได้แก่ *Fusarium* spp. *Alternaria* spp. *Cladosporium* spp. และ *Curvularia* spp.

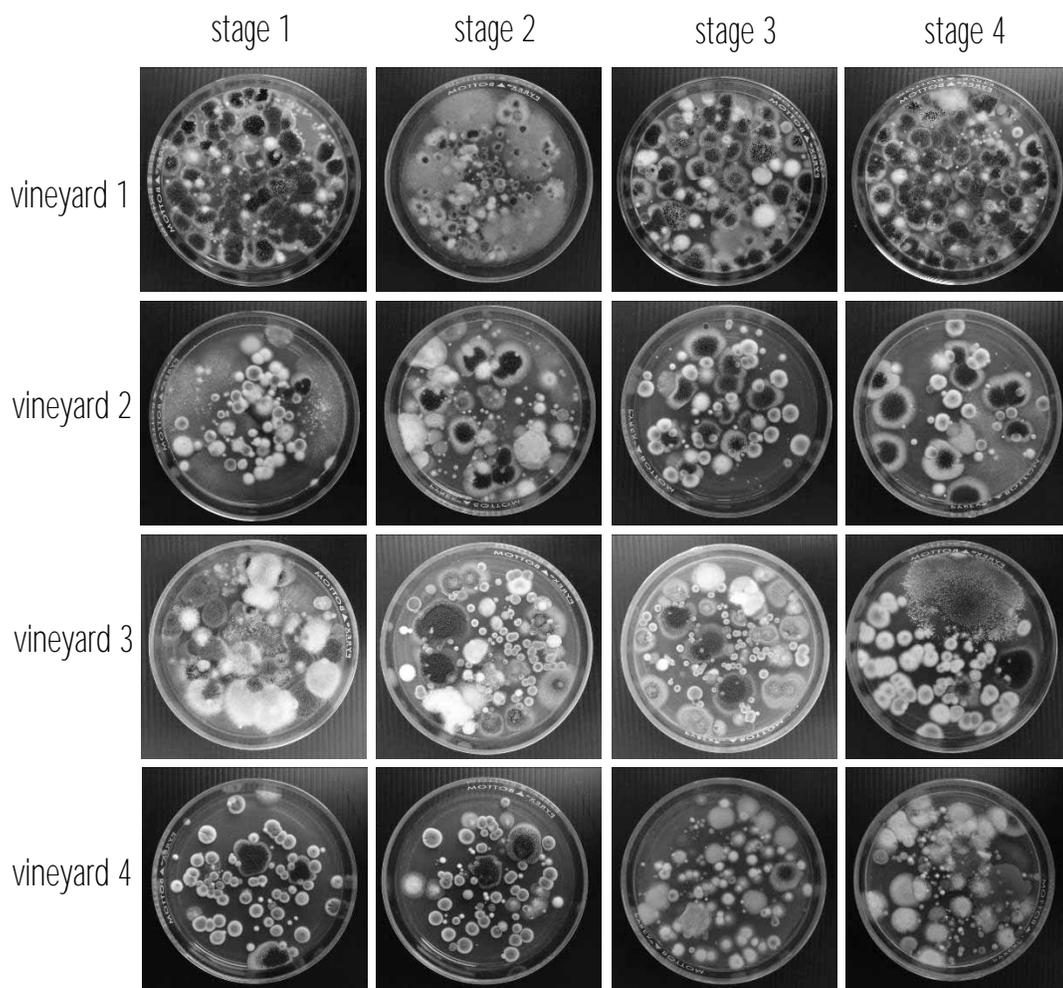


Figure 3 Colonies of contaminated fungi in soil from different grape vineyards

2.2 การปนเปื้อนของเชื้อราในอากาศ

ผลจากการตรวจเชื้อราในอากาศ พบว่า อากาศบริเวณแปลงปลูกองุ่นทุกสวน มีการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. aculeatus* และ *Penicillium* spp. ทุกระยะการเจริญเติบโต (Table 5) นอกจากนี้ยังพบเชื้อราชนิดอื่น ๆ ในอากาศ เช่น *Fusarium* spp. *Alternaria* spp. *Cladosporium* spp. และ *Curvularia* spp. ซึ่งสอดคล้องกับการปนเปื้อนของเชื้อราในผลองุ่นและในดินที่พบเชื้อรา *A. aculeatus* และ *Penicillium* spp. ปริมาณมาก และพบเชื้อรา

ชนิดอื่น ๆ เช่นเดียวกัน เนื่องจากการเคลื่อนที่ของอากาศจะทำให้สปอร์จากผิวดินเคลื่อนที่ไปยังผิวผลองุ่นได้ จากนั้นสปอร์จะอาศัยสภาวะที่เหมาะสมเข้าทำลาย เจริญเติบโตและสร้างสารพิษในผลองุ่น (ชีวานันท์, 2555) จากการทดลองนี้สามารถบอกได้ว่าระยะการเจริญเติบโตขององุ่นมีผลต่อการปนเปื้อนของเชื้อราและการสร้างสารโอคราทอกซิน เอ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเจริญและสร้างสารพิษจากรา เช่น สารอาหาร ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิ และปริมาณน้ำอิสระ (กรมวิชาการเกษตร, 2560)

Table 4 Quantitative of contaminated fungi in soil surface from grape vineyard at each stages of growth

vineyard	cultivar	stage	Number of fungal colonies (cfus/g)									
			<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Penicillium</i> spp.	<i>A. niger</i>	<i>A. ochraceus</i> .	<i>A. flavus</i>	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Curvularia</i> spp.	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.
1	B	1	4.7 × 10 ³	2.5 × 10 ²	1.1 × 10 ³	0	3.3 × 10 ¹	3.3 × 10 ¹	6.7 × 10 ¹	0	0	0
		2	1.9 × 10 ³	1.0 × 10 ²	0	0	0	3.8 × 10 ²	8.5 × 10 ²	0	0	0
		3	3.3 × 10 ³	8.3 × 10 ¹	1.1 × 10 ³	0	0	4.8 × 10 ²	8.3 × 10 ¹	0	0	0
		4	2.0 × 10 ³	1.0 × 10 ²	0	0	0	4.0 × 10 ²	6.8 × 10 ²	0	0	0
2	B	1	6.3 × 10 ²	3.7 × 10 ³	0	0	0	1.7 × 10 ²	0	0	8.3 × 10 ¹	0
		2	2.3 × 10 ³	3.7 × 10 ²	0	0	0	2.0 × 10 ²	3.7 × 10 ²	0	0	0
		3	2.3 × 10 ³	3.1 × 10 ³	0	0	0	3.2 × 10 ²	1.5 × 10 ²	0	0	0
		4	3.0 × 10 ³	4.0 × 10 ²	0	0	0	2.0 × 10 ²	3.7 × 10 ²	0	0	0
3	B	1	1.7 × 10 ⁴	6.8 × 10 ³	7.7 × 10 ³	0	0	1.5 × 10 ³	1.0 × 10 ³	1.2 × 10 ³	3.3 × 10 ²	0
		2	8.5 × 10 ³	4.3 × 10 ⁴	0	1.3 × 10 ³	0	3.3 × 10 ²	2.8 × 10 ³	1.7 × 10 ³	0	0
		3	1.2 × 10 ⁴	2.2 × 10 ⁴	0	0	0	4.3 × 10 ³	1.3 × 10 ⁴	1.5 × 10 ³	0	0
		4	5.0 × 10 ³	4.2 × 10 ⁴	3.3 × 10 ²	0	0	3.3 × 10 ²	0	0	8.3 × 10 ²	0
4	S	1	3.7 × 10 ²	3.6 × 10 ³	0	1.1 × 10 ³	0	5.0 × 10 ²	0	0	0	2.7 × 10 ²
		2	3.8 × 10 ²	4.3 × 10 ³	0	1.3 × 10 ³	0	3.3 × 10 ²	0	0	0	1.8 × 10 ²
		3	0	4.8 × 10 ²	0	0	0	2.8 × 10 ³	4.8 × 10 ²	0	5.0 × 10 ¹	3.5 × 10 ²
		4	0	4.8 × 10 ²	0	0	0	3.4 × 10 ³	5.2 × 10 ²	0	6.7 × 10 ¹	4.2 × 10 ²

Average of 6 replications

The formula used to compute the number of CFU/g, : $C = \frac{N}{S \times D}$

C = CFU/g

N = number of colonies

D = dilution blank factor

S = volume transferred to plate

stage 1 = 30-40 days after fruit set

stage 2 = 60-70 days after fruit set

stage 3 = 90-100 days after fruit set

stage 4 = 120 days after fruit set

B = Blackopor

S = Shiraz

Table 5 Frequency and occurrence of fungal contaminants in air from grape vineyard

Vineyard	Cultivar	stage	Contaminated fungi										
			<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Penicillium</i> spp.	<i>A. niger</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>Fusarium</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Curvularia</i> spp.	<i>Nigrospora</i> spp.	<i>Cladosporium</i> spp.
1	Blackopor	1	√	√	-	-	-	-	√	√	-	-	-
		2	√	√	-	-	-	-	√	-	√	-	-
		3	√	√	√	-	-	-	-	√	-	-	-
		4	√	√	-	-	-	√	-	-	-	-	-
2	Blackopor	1	√	√	√	-	-	-	-	-	-	-	√
		2	√	√	-	-	-	-	-	√	√	-	-
		3	√	√	-	-	-	-	-	-	√	-	√
		4	√	√	-	-	-	√	-	-	-	-	√
3	Blackopor	1	√	√	√	-	-	-	-	√	-	-	-
		2	√	√	-	-	-	-	√	√	-	-	-
		3	√	√	-	-	-	√	√	√	-	-	-
		4	√	√	-	-	√	-	-	-	-	-	-
4	Shiraz	1	√	√	√	√	-	-	√	-	-	-	√
		2	√	√	-	√	-	-	-	√	-	-	-
		3	√	√	-	-	-	-	√	√	-	-	-
		4	√	√	√	-	-	-	-	-	-	-	√

stage 1 = 30-40 days after fruit set

stage 3 = 90-100 days after fruit set

√ = detectable

stage 2 = 60-70 days after fruit set

stage 4 = 120 days after fruit set

- = non detectable

3 ประเมินเข้าทำลายของเชื้อราปนเปื้อน และ ปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ ในแต่ละขั้นตอน การผลิต

3.1 สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการปนเปื้อน ของเชื้อราและสารโอคราทอกซินในขั้นตอนการผลิต

การเตรียมดิน เมื่อเริ่มการปลูกองุ่น ไม่มีการทำความสะอาดแปลงปลูก ไม่เก็บเศษซาก วัชพืชและส่วนต่าง ๆ ของวัชพืชออกจากแปลง ทำให้เศษซากพืชเหล่านั้นเป็นแหล่งสะสมของเชื้อโรค หรือเป็นพืชอาศัย (host plant) ของเชื้อรา ทำให้เป็นแหล่งกระจายและแพร่เชื้อโรคได้เป็นอย่างดี ดังนั้นควรมีการทำลายพืชเหล่านี้ เช่นการ ขุดทิ้ง การเผาไฟเพื่อป้องกันการปนเปื้อนและการ แพร่กระจายของเชื้อได้ดีมากวิธีการหนึ่ง

ระยะเลี้ยงช่อดอก ผลพวงองุ่น และระยะ เก็บเกี่ยวผลผลิต ไม่มีการตัดผลองุ่นที่เป็นโรคออกจากแปลง เพื่อเผาทำลาย ยังคงปล่อยให้เน่าคาคับ เป็นแหล่งแพร่กระจายของโรค และเมื่อเก็บเกี่ยว ผลผลิตไปแล้ว องุ่นที่เน่าคาคับก็ทำการตัดทิ้งลง มาที่พื้น ไม่มีการเก็บออกนอกแปลง ทำให้เกิดการสะสมเชื้อราในดิน จึงเป็นสาเหตุที่ปริมาณ เชื้อราที่ปนเปื้อนในดินและอากาศมาก

3.2 แนวทางการแก้ไขการปนเปื้อนของ เชื้อราและสารโอคราทอกซิน เอ ในขั้นตอนการผลิต

1) ควรนำเอาวิธีเขตกรรมมาปรับใช้ในการ ปลูกองุ่น ต้นองุ่นต้นใดแสดงอาการผิดปกติซึ่ง อาจจะเป็นจุดเริ่มต้นของการเกิดโรค ควรรีบ กำจัดต้นพืชหรือส่วนของพืชที่เป็นโรคทิ้งก่อนที่จะ ลูกกลมแพร่กระจาย ซึ่งทำได้โดยถอนทำลายต้น พืช นำมาเผาไฟหรือนำไปทิ้งให้ไกลจากแหล่งปลูก พืช ขณะเดียวกันต้องหมั่นดูแลทำความสะอาด แปลงปลูก อย่าให้มีวัชพืชขึ้นรกเพื่อป้องกันการ สะสมโรคและแมลง

2) การปรับสภาพแวดล้อมไม่ให้เป็นเหมาะสม กับการเกิดโรค เช่น การตัดแต่งกิ่งองุ่นไม่ให้ทับ

จนเกินไป เพื่อให้อากาศระบายถ่ายเท การลด ความชื้นสามารถทำได้โดยให้น้ำแบบระบบน้ำหยด จะช่วยป้องกันและลดการปนเปื้อนเชื้อราบนต้น องุ่นและผลองุ่น

3) ควรนำกิ่งที่เป็นโรค และผลองุ่นที่เน่า เสียที่ตัดทิ้งออกจากแปลงปลูก นำไปเผาทำลาย เพื่อลดปริมาณเชื้อราและป้องกันมิให้เชื้อราแพร่ กระจายในระยะต่อมาได้

สรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อรา บนผลองุ่นพันธุ์แบล็คโอปอลและพันธุ์ชีราส ในทุกระยะการเจริญเติบโต พบการปนเปื้อนของ เชื้อราในกลุ่มที่สร้างสารโอคราทอกซิน เอ คือ *A. aculeatus* และ *Penicillium* spp. ตั้งแต่ใน แปลงปลูก โดยพบการปนเปื้อนทุกระยะการเจริญ เติบโตขององุ่น และมีการสะสมของเชื้อรา *A. aculeatus* และ *Penicillium* spp. ในดินและ อากาศบริเวณแปลงปลูกปริมาณสูง และผลองุ่นทุก ระยะการเจริญเติบโต พบว่า มีการปนเปื้อนสารโอครา ทอกซิน เอ ในระยะต่าง ๆ โดยระยะผลดิบมี ปริมาณสารโอคราทอกซิน เอ มากกว่าผลสุก ดังนั้น ควรมีระบบการจัดการที่ดีตั้งแต่เริ่มปลูกจนถึงเก็บ เกี่ยว เช่น การตัดแต่งผลองุ่นที่เน่าเสีย ควรนำออกไป เผาทำลายนอกแปลงปลูก เพื่อเป็นการลดปริมาณเชื้อ ราและป้องกันมิให้เชื้อราแพร่กระจาย

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2560. สารพิษจากเชื้อราใน ผลิตผลเกษตร. โรงพิมพ์เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ. 90 หน้า
ชีวานันท์ เดชอุปการ. 2555. โอคราทอกซิน เอ ในองุ่นและไวน์. วารสารวิชาการเกษตร 30(1): 91-109.

- สุพี วนศิริกุล เนตรา สมบูรณ์แก้ว อัจฉราพร ศรีจุฑานุ และอมรา ชินภูติ. 2557. ศึกษา การปนเปื้อนของเชื้อราและสารโอครา ทอกซิน เอ ในผลไม้อบแห้งและการลด ปริมาณสารพิษโดยใช้วิธีทางกายภาพ. *วารสารวิชาการเกษตร* 32(2): 188-200.
- อรอุมา เพี้ยชัย. (บรรณาธิการ). 2555. *บัญชี รายการทรัพย์สินชีวภาพรา*. สำนักพัฒนา เศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ (องค์การมหาชน). กรุงเทพฯ. 76 หน้า
- Anon. 2005. Commission regulation (EC) no 123/2005 of 26 January 2005. Amending regulation (CE) no 466/2001 as regards ochratoxin A. *J. of the Eur. Union*: L25/3-25/5.
- Bisson, L., 2001. *Optimail grape maturity*. Department of Enology and Viticulture, AOAC Davis, 1: 11.
- IARC. 1993. *Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some naturally occurring substance: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins*. International Agency for Research on Cancer. 56: 489.
- Meca, G., G. Blaiotta, and A. Ritieni. 2010. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control* 21(4): 579-583.
- Mounjouenpou, P., D. Gueule, A. Fontana-Tachon, B. Guyot, P.R. Tondie and J.P. Guiraud. 2008. Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in comeroon. *Int. J. Food Microbiol.* 121: 234-241.
- Raper, K.B. and D.I. Fennell. 1965. *The genus Aspergillus*. The William & Wilkins Company: Baltimore.
- Reddy, K.R.N., C.S. Reddy, H.K. Abbas, C.A. Able and K. Muralidharan. 2008. Mycotoxigenic fungi mycotoxins and management of rice grains. *J. Toxicol. Toxin Rev.* 27: 287-317.
- SCOOP European commission. 2002. *Task 3.2.7. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states*. Rome.
- Serra, R., C. Mendonca, and A. Venancio. 2006. Ochratoxin A occurrence and formation in Portuguese wine grapes at various stages of maturation. *Int. J. Food Microbiol.* 111: 35-39.
- Terrier, N., F.X. Sauvage, A. Ageorges and C. Romieu. 2001. Changes in acidity and in proton transport at the tonoplast of grape berries during development. *Planta.* 213: 20-28.
- Zhang, X., Y. Li, H. Wang, X. Gu, X. Zheng, Y. Wang, J. Diao, Y. Peng and H. Zhang. 2016. Screening and Identification of Novel Ochatoxin A-Producing Fungi from Grapes. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27845758>. pdf. Accessed: 11/01/2018.
- Zimmerli, B. and R. Dick. 1996. Ochratoxin A in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit. Contam.* 13: 655-668.