Agricultural Sci. J. 41 : 1 (Suppl.) : 341-344 (2010) ว. วิทย. กษ. 41 : 1 (พิเศษ) : 341-344 (2553)

# ผลของการให้คลื่นความถี่วิทยุในการกำจัดเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่ติดมากับเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

# Effect of Radio Frequency Heat Treatment on *Aspergillus flavus* in Maize (*Zea mays*)

กุลธิดา ไชยสถิตวานิช[1], Wolfgang Lücke[2], สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์[1], ณัฐศักดิ์ กฤติกาเมษ[1], แสงทิวา สุริยงค์[3] และสุชาดา เวียรศิลป์[1]

Kultida Chaisathidvanich[1], Wolfgang Lücke[2], Nattasak Krittigamas[1], Sa-nguansak Thanapornpoonpong[1], Sangtiwa Suriyong[3] and Suchada Vearasilp[1]

## Abstract

The use of radio frequency (RF) heat treatment to eliminate *Aspergillus flavus* in maize seeds was investigated in this study. The spore suspension of *A. flavus* isolated from infected maize seeds was inoculated in the maize seed lot. The inoculated seed samples were treated with an RF application of (27.12 MHz) at 80, 85 and 90 ºC for both 1 min and 3 min. The percentage of fungal infection detected by the blotter and Potato Dextrose agar (PDA) methods.The percentage of moisture content, grain cracking and aflatoxin contamination was also determined and evaluated. The results showed that using heat treatments of more than 85 and 90 ºC, at duration times of 1minute and 3 minutes significantly affected the seed moisture content. Seed moisture was decreased significantly by more than 0.50 percent. The percentage of cracking was increased by 33% and 38% when the maize grains were treated with 90 ºC for 1 min and 3 min, respectively. Radio frequency heat treatment, at the temperature of 90ºC for 3 minutes, completely eliminated *A. flavus* when determined by the blotter method, whereas using the PDA method, the fungi remained contaminated at about 1%. In addition, aflatoxin contamination was not detected from all treated maize samples. Therefore, RF heat treatment at the temperature of 90ºC for 3 min is suggested for eliminating *A. flavus* in maize seed.

**Key word**: Radio frequency, *Aspergillus flavus*, aflatoxin

## บทคัดย่อ

การศึกษาผลของการใช้ความร้อนจากคลื่นความถี่วิทยุในการกำจัดเชื้อรา *Aspergillus flavus* ที่ติดมากับเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ โดยใช้ spore suspension ของเชื้อรา *A. flavus* ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวโพดงคลุกลงบนเมล็ดข้าวโพดตัวอย่าง นำเมล็ดตัวอย่างมาให้คลื่นความถี่วิทยุความถี่ 27.12 MHz. อุณหภูมิ 80, 85 และ 90ºC เป็นระยะเวลา 1 และ 3 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ความชื้น เปอร์เซ็นต์การแตกร้าวของเมล็ด และการปนเปื้อนของเชื้อราด้วยวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (Blotter method) และเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาท็อกซิน ผลการทดลองพบว่าการใช้ความร้อนจากคลื่นความถี่วิทยุที่อุณหภูมิตั้งแต่ 85ºC ขึ้นไปมีผลทำให้ความชื้นของเมล็ดลดลงมากกว่า 0.50 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การให้อุณหภูมิ 90ºC เป็นระยะเวลา 1 และ 3 นาที มีผลต่อการแตกร้าวของเมล็ดเพิ่มขึ้นถึง 33 และ 38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90ºC นาน 3 นาที สามารถกำจัดเชื้อรา *A. flavus* บนเมล็ดได้อย่างสมบูรณ์จากการตรวจการปนเปื้อนด้วยวิธี blotter ในขณะที่การตรวจการปนเปื้อนด้วยวิธี PDA ยังคงตรวจพบการเจริญของเชื้อบนเมล็ดประมาณ 1.00% นอกจากนี้ไม่พบการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาท็อกซินในตัวอย่างข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ผ่านการให้ความร้อนจากทุกกรรมวิธี ดังนั้นการให้ความร้อนด้วยคลื่นความถี่วิทยุที่อุณหภูมิ 90 ºC เป็นเวลา 3 นาที สามารถนำมาใช้ในการกำจัดเชื้อรา *A. flavus* ในข้าวโพดได้อย่างมีประสิทธิภาพ

**คำสำคัญ** คลื่นความถี่วิทยุ, *Aspergillus flavus*, อะฟลาท็อกซิน

[1] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว/ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

[1] Postharvest Technology Research Institute/Postharvest Technology Innovation Center, Chiang Mai University

[2] University of Göttingen, Department of Crop Science, Agricultural Engineering, Germany

[3] ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

[3] Department of Agronomy, Faculty of Agricultural, Chiang Mai University

## คำนำ

เชื้อรา *A. flavus* เป็นเชื้อราสำคัญที่ทำให้เกิดความเสียหายแก่เมล็ด และสามารถสร้างสารอะฟลาท็อกซิน เมื่อเกิดการปนเปื้อนเข้าไปในเมล็ดข้าวโพดจะทำให้เกิดความเสียหายทางคุณภาพและเป็นอันตรายต่อคนและสัตว์ (ชณิกา, 2547; Klich, 2007; Ainsworth and Austwick, 1973; Hesseltine, 1965; Ruiquian et al., 2004) เชื้อรานี้จะเข้าทำลายเมล็ดข้าวโพดได้ง่าย เมื่อเมล็ดข้าวโพดมีแผล และรอยแตกร้าว (สมบัติ, 2536; Pitt *et al*., 1993).ในการป้องกันและกำจัดเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดจะนิยมใช้สารเคมี และการใช้วิธีให้ลมร้อน การใช้สารเคมีเป็นวิธีการที่ดี แต่ทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพเกิดสารตกค้างเป็นผลเสียต่อสภาพแวดล้อม(Chapman and Harris,1981) ในการกำจัดเชื้อโดยการใช้น้ำร้อนนั้น พบว่าที่อุณหภูมิ 50°C สามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดในข้าวโพดได้ 71.07% (Rahman et al., 2008) อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ไม่สะดวกในการปฏิบัติเพราะต้องนำตัวอย่างลงไปจุ่มในน้ำอุณหภูมิปกติก่อน 3-4 ชั่วโมง จากนั้นจึงค่อยนำไปจุ่มในน้ำร้อนเพิ่มการควบคุมเชื้อราในเมล็ด ซึ่งทำให้เมล็ดผ่านการทำให้ชื้น แล้วทำให้แห้งมีผลต่อเนื่องให้มีความชื้นสูงขึ้นยากต่อการเก็บรักษาและต้องนำไปใช้ประโยชน์ให้เร็วขึ้น ขณะที่วิธีการให้ลมร้อนก็มีปัญหาในด้านการกระจายความร้อน ทำให้เมล็ดได้รับความร้อนไม่สม่ำเสมอ ใช้พลังงานและเวลามาก (ณัฐศักดิ์, 2543) การให้ความร้อนด้วยคลื่นความถี่วิทยุเป็นการให้ความร้อนแบบหนึ่ง ซึ่งต่างจากการให้ความร้อนโดยทั่วไป ซึ่งสามารถทำได้อย่างรวดเร็วโดยอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงพลังงานในรูปของสนามคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ามาเป็นพลังงานความร้อนในตัววัตถุโมเลกุล ทำให้วัตถุเกิดการสั่นสะเทือนทำให้เกิดความร้อนอย่างรวดเร็ว ความร้อนที่เกิดขึ้นจากใจกลางของวัตถุสู่ภายนอก มีความสม่ำเสมอ (Francesco et al., 2008; Punidase et al., 2003) Cwiklinski และ Von Horsten (1999) รายงานว่าประยุกต์ใช้คลื่นความถี่วิทยุสามารถการกำจัดเชื้อรา *Fusarium culmorum* (Smith) Saccardo ในเมล็ดพันธุ์ข้าวสาลีที่ความชื้นเริ่มต้นที่ 15 % โดยใช้อุณหภูมิ 70-75°C ระยะเวลา 150-180 วินาที และยังสามารถรักษาความงอกได้ สอดคล้องกับรายงานของ Akaranuchat et al., 2007; Janhang et al., 2005a; Vasanacharoen et al., 2006 ที่ใช้คลื่นความถี่วิทยุในการควบคุมเชื้อรา *Trichoconis padwickii* ในเมล็ดพันธุ์ข้าวบาร์เล่ย์และเชื้อรา *Fusarium semitectum* ในเมล็ดข้าวโพดได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้คลื่นความถี่วิทยุการกำจัดเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

## อุปกรณ์และวิธีการ

เตรียมตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ทำการปลูกเชื้อด้วย spore suspension ของเชื้อรา *A. flavus* ที่ความเข้มข้น 6.70 $\times 10^6$ สปอร์/มล ปรับความชื้นให้ได้ 15 % จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยคลื่นความถี่วิทยุ ที่ระดับความถี่ 27.12 MHz (Radio Frequency Generator, Sairem, France) โดยวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized design จำนวน 4 ซ้ำ ที่ 3 ระดับอุณหภูมิ คือ 80, 85, 90 ºC นาน 1 และ 3 นาที ทำการวัดความชื้นของเมล็ดพันธุ์โดยวิธีการวัดความชื้นมาตรฐานอบด้วยความร้อน (ISTA, 2006) ตรวจเปอร์เซ็นต์การแตกร้าวของเมล็ดด้วยตาเปล่า การปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* โดยวิธีเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA และวิธีเพาะบนกระดาษชื้น (ISTA, 2006) รวมถึงตรวจวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาท็อกซิน ด้วยวิธีfluorometer (Anonymous, 1997)( Fluorometer รุ่น FM 109510-33, Barnstead international, UK)

## ผลและวิจารณ์

ผลของการใช้ความร้อนด้วยคลื่นความถี่วิทยุที่มีต่อเชื้อรา *A. flavus* แสดงใน Table 1 พบว่าที่อุณหภูมิตั้งแต่ 85ºC มีผลทำให้ความชื้นของเมล็ดลดลง และการให้อุณหภูมิ 90ºC ระยะเวลา 1 และ 3 นาที ทำให้การแตกร้าวของเมล็ดมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเป็น 33 และ 38 % สอดคล้องกับ Janhang (2007) พบว่า การให้ความร้อนด้วยคลื่นความถี่วิทยุที่อุณหภูมิ 70, 75, 80 ºC นาน 1, 2 และ 3 นาที มีผลทำให้ความชื้นในข้าวลดลง 1-2% เนื่องจากความร้อนทำให้น้ำในเมล็ดระเหยออกไป การประเมินปริมาณของเชื้อรา *A. flavus* พบว่าเมื่ออุณหภูมิ 90ºC เวลา 3 นาที สามารถกำจัดเชื้อราได้ 100% จากการตรวจด้วยวิธีblotter ในขณะที่เมื่อตรวจด้วยวิธี PDA ยังคงตรวจพบการเจริญของเชื้อบนเมล็ด 1% (Figure1) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Akaranuchat et al., 2007; Janhang et al. 2005; Vasanacharoen et al., 2006; Kayimbi et al., 2007; Cwiklinski and Von Horsten, 1999 นอกจากนี้ไม่พบการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาท็อกซินในตัวอย่างข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จากทุกกรรมวิธี ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจาก ที่เชื้อรา *A. flavus* สร้าง aflatoxin ในปริมาณที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ซึ่งต้องอาศัยเวลาในการสะสมสารพิษหลังจากที่เข้าไปในพืช (Atehnkeng et al., 2008; Ahmad,1993) จากการศึกษาของ Hell et al. (2000) พบว่าปัจจัยที่สัมพันธ์กับการสร้างปริมาณสารอะฟลาท็อกซิน คือเวลาในการเก็บรักษาซึ่งต้องใช้เวลา อย่างน้อย 3-5

เดือน และขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการสร้างสาร คือ คุณสมบัติทางกายภาพ สารอาหารและ biological factors (Ruiquian *et al*., 2004)

**Table1** Moisture content and the percentage of cracked maize kernels and fungal infection.

| Treatment | MC(%) | cracking (%) | % infection | |
|---|---|---|---|---|
| | | | PDA | Blotter |
| Control | 15.62a | 25.10c | 100.00a | 100.000a |
| 80°C/1 | 15.33ab | 26.22bc | 8.50b | 1.500b |
| 80°C/3 | 15.46abc | 26.87bc | 9.00b | 1.000bc |
| 85°C/1 | 15.05bcd | 27.53bc | 4.75c | 0.500cd |
| 85°C/3 | 14.86cd | 27.66bc | 2.00cd | 0.375cd |
| 90°C/1 | 14.93cd | 33.61ab | 1.00d | 0.125d |
| 90°C/3 | 14.70d | 38.92a | 1.00d | 0.000d |
| LSD(P<0.05) | 0.50 | 7.64 | 3.19 | 0.75 |
| CV (%) | 2.25 | 17.48 | 11.91 | 3.42 |

Means followed by the same letters in a column are not significantly different (LSD)

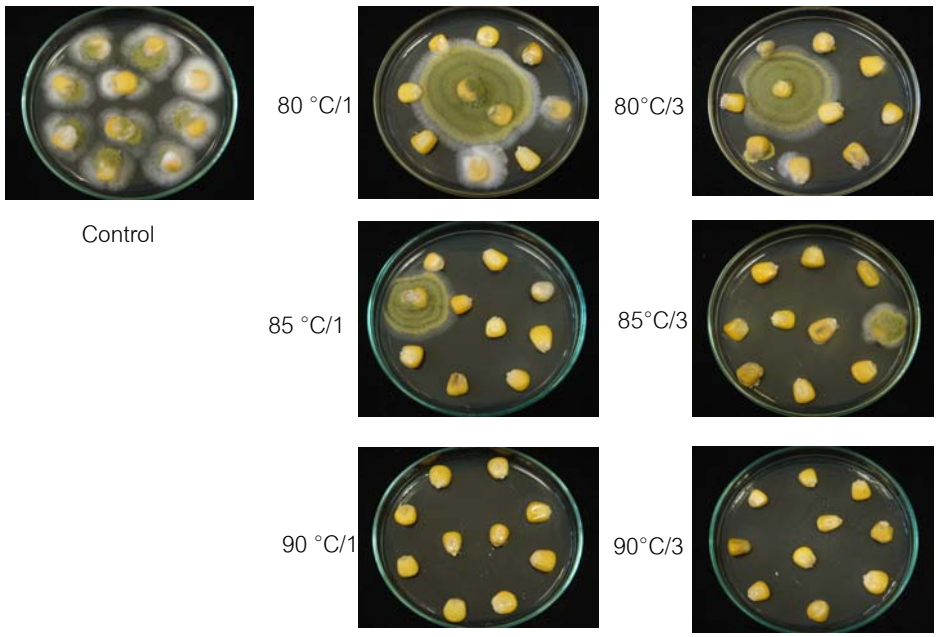


**Figure1** Growth inhibition of *A. flavus* in maize seeds, detected by PDA method, after RF heat treatment at different temperature/time (°C/min)]

## สรุป

การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90ºC นาน 3 นาที สามารถกำจัดเชื้อรา *A. flavus* บนเมล็ดได้อย่างสมบูรณ์ จากการตรวจการปนเปื้อนด้วยวิธี blotter ในขณะที่การตรวจการปนเปื้อนด้วยวิธี PDA ยังคงตรวจพบการเจริญของเชื้อราบนเมล็ด ไม่พบการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาท็อกซินในตัวอย่างข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ผ่านการให้ความร้อนจากทุกกรรมวิธี แต่ทำให้การแตกร้าวของเมล็ดเพิ่มขึ้น การให้ความร้อนด้วยคลื่นความถี่วิทยุที่อุณหภูมิ 90 ºC เป็นเวลา 3 นาทีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อรา *A. flavus* ในข้าวโพดได้

**คำขอบคุณ**

ขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัย และขอขอบคุณ Institute of Agriculture Engineer, George-August University of Goettingen, Germany ที่สนับสนุนเครื่อง Radio Frequency Generator

## เอกสารอ้างอิง

ชณิกา เอี่ยมสุภาษิต. 2547. ปัญหาแอฟลาทอกซินในข้าวโพดและแนวทางแก้ไข. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 21(3): 190-206.

ณัฐศักดิ์ กฤติกาเมษ. 2543. การใช้คลื่นความร้อน เพื่อลดความชื้น และทำลายเชื้อ *Aspergillus flavus* ในเมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง. รายงานการวิจัย. โครงการวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปี 2543. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 41 หน้า.

พัทยา จันทร์แหง. 2550. ผลของการใช้คลื่นความถี่วิทยุต่อการควบคุมเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์และคุณภาพเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105. วิทยานิพนธ์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 82 หน้า

สมบัติ ศรีชูวงศ์ . 2536. โรคหลังเก็บเกี่ยวของเมล็ดพืช . ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 127 หน้า.

Ahmad, S.K. 1993. Mycoflora changes and aflatoxin production in stored black gram seeds. *Journal of Stored Products Research*. 29:33-36.

Ainsworth G. C. and P. K. C. Austwick. 1973. Fungal disease of animal, 2nd ed. (Commonwealth Agricultural Bureau), Slough, U.K. 384 pp.

Akaranuchat P., P. Noimanee., N. Krittigamas., D. von Hörsten and S. Vearasilp. 2007. Control seed-borne fungi by radio frequency heat treatment as alternative seed treatment in barley(*Hordeum vulgare*). Deutscher Tropentag 2007. 9-11 October, Witzenhausen, Germany. pp. 511.

Anonymous. 1997. In house method by fluorometer. Vicam Aflatest Instruction manual. pp.38

Atehnkeng J., P. S. Ojiambo, M. Donner, T. Ikotun, R. A. Sikora, P. J. Cotty and R. Bandyopadhyay. 2008. *International Journal of food Microbiology*. 122: 74-84.

Center for Integrated Fungal Research. 2005. [Online] Available: http://www.aspergillusflavus.org/aflavus/index.html. (August 1, 2008)

Chapman R.A. and C.R. Harris. 1981. Persistence of four pyrethroid insecticides in a mineral and an organic soil. *Journal Environment Science Health*. 16:605-615.

Cwiklinski M, Von Horsten D (1999) Thermal treatment of seeds using microwave and radio frequency energy for eradicating seedborne fungi. ASAE/CSAE-SCGR Annual International Meeting,18–21 July, Toronto, Canada. 4 pp.

Ehrlich K. C., K. Kobbeman, B. G. Montalbano and P. J. Cotty. 2007. Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from Thailand. *International Journal of food Microbiology*. 114: 153-159.

Francesco M., L. Zhang, J. G. Lyng. 2008. Radio Frequency treatment of foods : Review of recent advances. *Journal of engineering*. Paper accepted.

Hell K., K.F. Cardwell, M. Setamou and H.-M. Poehling. 2000. The influence of storage practices on aflatoxin contamination in maize in four agroecological zones of Benin, west Africa. *Journal of Stored Products Research*. 36:365-382.

Hesseltine C. W. 1965. A millennium of fungi, food and fermentation. *Mycologia*. 57:149-197.

ISTA. 2006. International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association. Bassersdorf, CH-Switzerland. 500 pp.

Janhang P., N. Krittigamas., W. Lücke. And S. Vearasilp. 2005a. Using radio frequency heat treatment to control seed-borne *Trichoconis padwickii* in rice seed (*Oryza sativa* L.). Deutscher Tropentag 2005. 11-13 October, Stuttgart-Hohenheim, Germany. pp. 265.

Janhang P., N. Krittigamas, W. Lücke and S. Vearsilp. 2005b. Using Radio Frequency Heat Treatment to Control the Insect *Rhyzopertha dominica* (F.) During Storage in Rice Seed (*Oryza sativa* L.). Deutscher Tropentag 2005. 11-13 October, Stuttgart-Hohenheim, Germany. pp. 391.

Klich M. A. 2007. Pathogen profile Aspergillus: the major producer of alfatoxin. *Molecular Plant Pathology*. 8(6):713-722.

Pitt J.I., A.D. Hocking, K. Bhudhasamai, B.F. Miscamble, K.A. Wheeler and P. Tanboon-Ek. 1993. The normal mycoflora of commodities from Thailand.1. Nuts and oilseeds. *International Journal of FoodMicrobiology*. 20:211–226.

Punidase P., C. Dussault., T. Koutchma, H. S. Ramaswamy, G. B. Awuah. 2003. Radio Frequency Heating of foods: priciples, applications and related properties-A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43(6):587-606.

Rahman M. M. E., M.E. Ali, M.S. Ali, M.M. Rahman and M. N. Islam. 2008. Hot water thermal treatment for controlling seed-borne mycoflora of maize. International Journal of Sustainable Crop Production. 3(5):5-9.

Ruiquian L., Y. Qian, D. Thanaboripat and P. Thansukon. Biocontrol of *Aspergillus flavus* and Aflatoxin production. *KMITL science and Technology Journal*. 4(1): 238-246.

Vassanacharoen P., P. Janhang., N. Krittigamas., D. von Hörsten.,W. Lücke and S. Vearasilp. 2006. Radio frequency heat treatment to eradicate *Fusarium semitectum* in Corn Grain (*Zea mays*). *Agricultural science Journal*. 37: 5(Suppl.): 180-182.