

การตรวจสอบความแตกต่างของปริมาณเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ถูกเชื้อ *Aspergillus flavus* เข้าทำลายด้วย
เทคนิค VIS/NIR spectroscopy

Detections of the Differential Quantity of Maize Seed infected with *Aspergillus flavus* by VIS/NIR
spectroscopy Technique

ธวัชชัย เพชรแก้ว¹ รุ่งนภา ไกลถิ่น² ปาริชาติ เทียนจุมพล² เกวลิณ คุณาศักดากุล^{2,3} สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์^{1,2}
และ สุชาดา เวียรศิลป์^{1,2}

Thawatchai Phetkaeo¹, Rungnapha Klaitin⁴, Parichat Theanjumpol,² Kaewalin Kunasakdakul,^{1,3}
Sa-nguansak Thanapornpoonpong^{1,2} and Suchada Vearasilp^{1,2}

Abstract

Detection the spectrums of *Aspergillus flavus* infected maize seeds variety DK 888 were carried out using NIRSystem6500 model at the wavelength 400-2500 nm. Maize seed 200 gram per sample and 30 samples per treatment were used to indicate the spectrum differences among treatments of 5, 10, 15 and 20 percent of infected seed mixed with the un-inoculations (w/w). Convert data spectrum by second degree derivative and spectrum analysis technique by principle component analysis (PCA). Results indicated that spectrum of uncontaminated maize and contaminated maize clearly detected at peak wave length of 1100-2500 nm at 1162, 1200, 1420, 1706, 1914 and 2340 nm. PCA technique to distinguish the spectrum of uncontaminated maize and contaminated maize at each level of mixed samples showed that PC1 could accurately maize contaminated with *A. flavus* at over 10 percent infected seed. However, maize contaminated with *A. flavus* at 5 percent was the lowest level that showed peak wavelength at 1162 and 1914 nm. Therefore NIR spectroscopy technique was potential to detected *A. flavus* contamination in maize seed quantitatively.

Keywords: Corn or Maize, VIS/NIR spectroscopy, *Aspergillus flavus*

บทคัดย่อ

จากการตรวจสอบสเปกตรัมของตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ DK 888 ที่ถูกเชื้อรา *Aspergillus flavus* เข้าทำลายผสมกับเมล็ดข้าวโพดปกติด้วยเครื่อง NIRSystem6500 ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร โดยใช้เมล็ดข้าวโพด 200 กรัมต่อตัวอย่าง และ 30 ตัวอย่างต่อกรรมวิธีที่มีการผสมเมล็ดที่มีเชื้อเข้าทำลายต่อเมล็ดปกติในอัตราส่วน 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก จากการแปลงข้อมูลสเปกตรัมที่วัดได้ด้วยอนุพันธ์อันดับที่สอง (second derivative) และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเทคนิค Principle component analysis (PCA) พบว่าในช่วงความยาวคลื่น 1100-2500 นาโนเมตร ที่ความยาวคลื่น 1162, 1200, 1420, 1706, 1914 และ 2340 นาโนเมตร สามารถระบุพิกของสเปกตรัมในแต่ละกรรมวิธีและชุดควบคุมที่ใช้เมล็ดข้าวโพดที่ไม่ปนเปื้อนได้อย่างชัดเจน และจากการวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมด้วยเทคนิค PCA พบว่าที่ PC1 สามารถบอกความแตกต่างของสเปกตรัมในแต่ละกรรมวิธีที่มีการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ถูกเชื้อเข้าทำลายในเปอร์เซ็นต์ต่างๆ ได้อย่างชัดเจนโดยเฉพาะในกรรมวิธีที่มีการผสมเมล็ดข้าวโพดที่มีเชื้อ *A. flavus* 10 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป อย่างไรก็ตามพบว่าที่ระดับของการผสมเมล็ดข้าวโพดที่มีเชื้อ *A. flavus* เข้าทำลาย 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับต่ำที่สุดที่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของพิกที่ความยาวคลื่น 1162 และ 1914 นาโนเมตร ดังนั้น เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีจึงมีศักยภาพในการตรวจสอบความแตกต่างของปริมาณเมล็ดข้าวโพดที่ถูกเชื้อ *A. flavus* เข้าทำลายได้

คำสำคัญ: ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์, เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี, *Aspergillus flavus*

¹ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

² Department of Plant Science and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

³ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว/ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

⁴ Postharvest Technology Research Institute/Postharvest Technology Innovation Center, Chiang Mai University

⁵ ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

⁶ Department of Entomology and Plant pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

บทนำ

ปัญหาสำคัญในกระบวนการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตข้าวโพด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเก็บรักษา คือ มีการปนเปื้อน ด้วยเชื้อรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ *Aspergillus* spp. เป็นกลุ่มเชื้อราที่ทำให้เกิดความเสียหายแก่เมล็ดพืชที่เก็บรักษาในโรงเก็บมากที่สุด (สมบัติ, 2535) เชื้อรา *A. flavus* ได้สร้างปัญหาแก่เกษตรกรในการจัดการหลังการเก็บเกี่ยวเมล็ดข้าวโพด เนื่องจาก เป็นกลุ่มเชื้อราในโรงเก็บพบได้ทั่วไป เจริญและสร้างสปอร์ได้มากมายล่องลอยไปในอากาศ เมล็ดจึงมีโอกาสติดเชื้อราได้ง่าย เชื้อราเหล่านี้อาจติดอยู่ตามฝักเมล็ดหรือแทรกอยู่ตามรอยแตก รอยแยกของเปลือกเมล็ด อาจฝังตัวอยู่ในรูปของเส้นใย สปอร์ หรือโครงสร้างอื่นๆ เมื่อสภาพแวดล้อมต่างๆเหมาะสม ก็จะมีเจริญและเข้าทำลายเมล็ดให้เสียหาย (สมบัติ, 2535) ซึ่งการประเมินอัตราการปนเปื้อนและความเสียหายจากการเข้าทำลายของเชื้อราเหล่านี้กระทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากต้องอาศัยขั้นตอนของการตรวจสอบที่ใช้เวลานาน เสียค่าใช้จ่ายสูง ทั้งยังทำลายตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ จึงได้พัฒนาเทคนิค VIS/NIR spectroscopy เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของปริมาณเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อ *A. flavus* ซึ่ง VIS/NIR spectroscopy เป็นเทคนิคที่ไม่ทำลายตัวอย่าง (non-destructive) จากรายงานของ Roberts *et al.* (1987) ได้นำเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในช่วงความยาวคลื่น 1100-2500 นาโนเมตร โดยวัดการสะท้อนกลับของแสง พบว่าสามารถทำนายค่าปริมาณไคติน (chitin) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา (fungal cell wall polymer of glucosamine) ที่ปนเปื้อนในหญ้าอัลฟัลฟาแห้งได้อย่างแม่นยำ สอดคล้องกับ Wang *et al.* (2004) ได้ใช้เทคนิค VIS/NIR spectroscopy วัดแบบการสะท้อนกลับของแสง (reflectance) ช่วงความยาวคลื่น 400-1700 nm แยกเมล็ดถั่วเหลืองปกติออกจากเมล็ดที่มีการเข้าทำลายของเชื้อรา

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการทดลอง ณ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยนำตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ DK 888 จำนวน 30 กิโลกรัม แบ่งตัวอย่างเมล็ดออกเป็นสองส่วน โดยส่วนแรกนำเมล็ดมาเกลี่ยในถาดอลูมิเนียมและปลูกเชื้อด้วยการฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *A. flavus* ความเข้มข้น 0.4×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 4 มิลลิลิตร ให้กระจายอย่างทั่วถึงทุกเมล็ด ปิดถาดด้วย plastic wrap ชนิด polyvinyl chloride ปมเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 4 วัน เมื่อสังเกตเห็นการเจริญของเชื้อรา จึงนำเมล็ดที่ได้มาทดลอง ใน 4 กรรมวิธี คือ กรรมวิธีที่ 1, 2, 3 และ 4 โดยผสมเมล็ดที่มีเชื้อเข้าทำลายมาผสมกับเมล็ดข้าวโพดปกติ ในอัตราส่วน 5%, 10%, 15% และ 20% โดยน้ำหนักตามลำดับ สำหรับชุดควบคุมจะใช้เมล็ดข้าวโพดที่ไม่ได้ปลูกเชื้อและผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย สารละลาย sodium hypochlorite เข้มข้น 0.1% นาน 1 นาที ทุกกรรมวิธีใช้เมล็ดข้าวโพดน้ำหนัก 200 กรัมต่อตัวอย่าง และใช้ 30 ตัวอย่างต่อกรรมวิธี จากนั้นนำเมล็ดในแต่ละกรรมวิธีไปวัดสเปกตรัม ด้วยเครื่อง NIRSystem6500 (FOSS NIRSystem, Silver Spring, USA) ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตรด้วยอุปกรณ์เสริม Transportation module with coarse sample cell โดยวัดการสะท้อนกลับของแสง แล้วนำข้อมูลสเปกตรัมที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ของปริมาณการปนเปื้อนด้วยโปรแกรม The unscrambler © version 7.6

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมของเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ถูกเชื้อ *A. flavus* เข้าทำลายที่ระดับต่างๆ (Figure 1) พบว่า ในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตรหรือช่วงคลื่น visible สเปกตรัมของเมล็ดปกติที่ผสมกับเมล็ดที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อรา *A. flavus* ที่ระดับ 15% และ 20% ตามลำดับมีค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่าเมล็ดข้าวโพดปกติโดย เมล็ดข้าวโพดที่เริ่มมีการเข้าทำลายของเชื้อรา เมล็ดจะมีสีจางลงจากเมล็ดปกติ ซึ่ง สมบัติ (2535) กล่าวว่า เชื้อรา *A. flavus* สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของเมล็ดได้เมื่อเข้าทำลายเมล็ด ดังนั้นเมล็ดข้าวโพดที่มีระดับการผสมที่เพิ่มขึ้น ทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับ Wang *et al.* (2004) รายงานว่า ค่าการดูดกลืนแสงของเมล็ดถั่วเหลืองปกติเปรียบเทียบกับเมล็ดที่เปลี่ยนแปลงไปที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ 4 ชนิดมีค่าแตกต่างกันตามสีของเยื่อหุ้มเมล็ดและชนิดของเชื้อที่เข้าทำลาย โดยพบว่าเมล็ดที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อ *Phomopsis* และ *Personospora manshurca* Syd (Downy mildew) มีสีเขียวเทา และสีเขียวจะมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า เมล็ดปกติ, ส่วนเมล็ดที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อ *Cercospora kikuchii* และ soybean mosaic virus (SMV) เยื่อหุ้มเมล็ดจะมีสีเหลือง, ม่วงจนถึงดำและสีดำ ส่วนในช่วงความยาวคลื่น 700-1100 และ 1100-2500 นาโนเมตรหรือช่วงคลื่น near infrared พบพิกน้าชัดเจนที่ความยาวคลื่น 1460 และ 1940 นาโนเมตร ตามลำดับ โดย Iwamoto *et al.* (1995) พบว่า นำมีการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 1440 นาโนเมตร ในหมู่ฟังก์ชัน O-H ของน้ำ Shenk *et al.* (2001) รายงาน ตำแหน่งพิกน้าในสเปกตรัม NIR ของผลผลิตทางการเกษตรพบพิกน้า (ความชื้น) ชัดเจนที่ความยาวคลื่น

194 นาโนเมตรและเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การผสมเมล็ดข้าวโพดที่มีการเข้าทำลายของเชื้อราที่ระดับต่างๆ พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 1460 และ 1940 นาโนเมตร มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการผสมของเมล็ดที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อราเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลจากระดับความชื้นที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากน้ำดูดกลืนคลื่นแสง NIR ได้ดี ส่งผลให้เกิดการซ้อนทับกัน (overlapping) กับพีคของโมเลกุลขององค์ประกอบอื่นจึงทำให้ไม่พบพีคขององค์ประกอบทางเคมีชนิดอื่นในสเปกตรัมดั้งเดิม (original spectrum) ดังนั้นจึงต้องแปลงข้อมูลด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับที่สอง (second derivative) ทำให้พบพีคอื่นๆ ได้ชัดเจนขึ้น ที่ความยาวคลื่น 1162, 1200, 1420, 1706, 1914, 2060 และ 2340 นาโนเมตร (Figure 2) โดยที่ความยาวคลื่น 1162 และ 1200 นาโนเมตรสัมพันธ์กับพันธะ N-H ส่วนใหญ่จะเป็นหมู่กรดอะมิโน อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และ radical structure ที่เป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของเชื้อรา (Fernández-Ibañez *et al.*, 2009) ที่ความยาวคลื่น 1420 นาโนเมตรสัมพันธ์กับพันธะ O-H ที่พบในโมเลกุลของกลูโคสโดยเป็นส่วนหนึ่งของเส้นใยเชื้อรา (Berardo *et al.*, 2005) ที่ความยาวคลื่น 1706 นาโนเมตรสัมพันธ์กับพันธะ N-H และ O=C-N-H ที่พบในโมเลกุลของโปรตีน ที่ความยาวคลื่น 1914 นาโนเมตรสัมพันธ์กับพันธะ O-H ซึ่งพบในโมเลกุลของน้ำ (Osborn *et al.*, 1993) และที่ความยาวคลื่น 2340 นาโนเมตร สัมพันธ์กับพันธะ C-N โดยเป็นองค์ประกอบของ เอไมด์ และกลูโคซามีนซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของไคตินที่พบได้ในเชื้อรา (Roberts *et al.*, 1987; Berardo *et al.*, 2005) เมื่อระดับการผสมด้วยเมล็ดข้าวโพดที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณส่วนประกอบของเชื้อรา

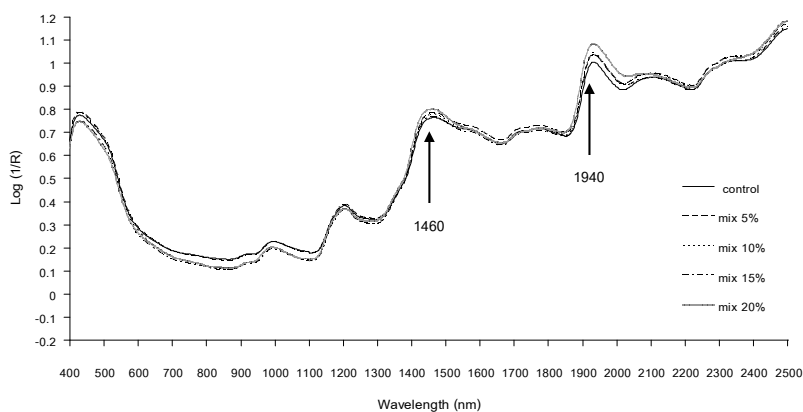


Figure 1 Original spectrum of control (normal maize) and mixing of maize infected with *A. flavus* in wavelength range 400-2500 nm.

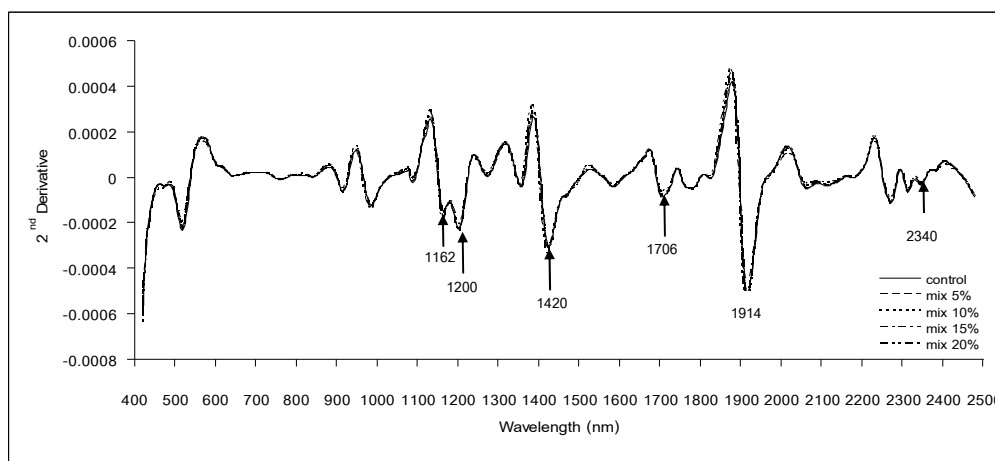


Figure 2 Second derivative of spectrum control and different levels of maize infected with *A. flavus* at wavelength range 400-2500 nm.

เมื่อนำข้อมูลสเปกตรัมที่แปลงข้อมูลด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสองมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค principle component analysis (PCA) (Figure 3) พบว่า PC1 สามารถบอกความแตกต่างของสเปกตรัมในแต่ละกรรมวิธีที่มีการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายที่ระดับต่างๆ ได้อย่างชัดเจน ในกรรมวิธีที่มีการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ถูกเชื้อ *A. flavus* เข้าทำลายที่ระดับ 10

เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป อย่างไรก็ตาม พบว่าที่ระดับการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ถูกเชื้อ *A. flavus* เข้าทำลาย 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นระดับต่ำที่สุดที่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของฟีกที่ความยาวคลื่น 1162 และ 1914 นาโนเมตรได้

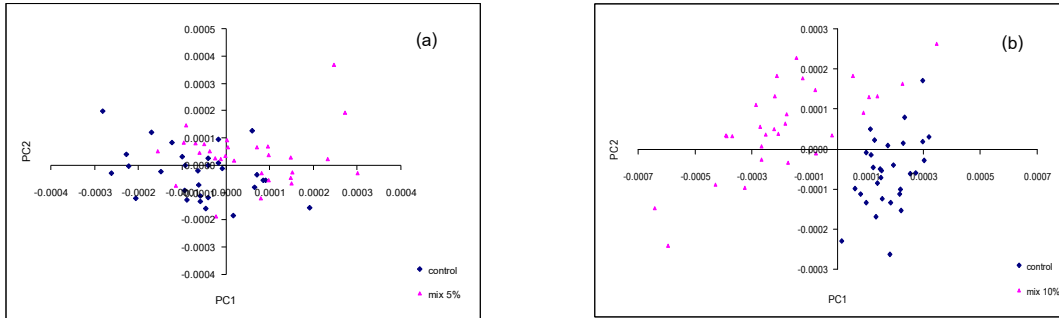


Figure 3 Principle component analysis plot (PC1 vs. PC2) of control (normal maize) and mixing of seed infected by *A. flavus* (a) 5% w/w and (b) 10% w/w.

สรุป

สเปกตรัมของเมล็ดข้าวโพดปกติและเมล็ดข้าวโพดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายมีความแตกต่างกัน โดยพบฟีกที่สัมพันธ์กับฟีกของโมเลกุลขององค์ประกอบในเซลล์ของเชื้อรา *A. flavus* ที่ความยาวคลื่น 1162, 1200, 1420, 1706, 1914, 2060 และ 2340 นาโนเมตร และเมล็ดข้าวโพดปกติกับเมล็ดข้าวโพดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายสามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจนด้วยเทคนิค PCA โดยแยกได้ตั้งแต่ระดับการผสมด้วยเมล็ดที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายที่ 10 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้สูงในการนำเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมาใช้เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของปริมาณเมล็ดข้าวโพดที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยวและบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัยและการนำเสนอผลงานในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

สมบัติ ศรีชูวงศ์. 2535. โรคหลังเก็บเกี่ยวของเมล็ดพืช (Postharvest diseases of grains). ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 127 หน้า.

Berardo, N., V. Pisacane, P. Battilani, A. Scandolaro, A. Pietri and A. Marocco. 2005. Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8128-8134.

Dowell, F. E., T. C. Pearson, E. B. Maghirang, F. Xie and D. T. Wicklow. 2002. Reflectance and transmittance spectroscopy applied to detecting Fumonisin in single corn kernels infected with *Fusarium verticillioides*. *Journal of Cereal Chemistry* 79: 222-226.

Fernández-Ibañez, A. Soldado, A. Martínez and B.de la Roza-Delgado. 2009. Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B1 in maize and barley as analytical quality assessment. *Journal of Food Chemistry* 113: 629-634.

Iwamoto, M., S. Kawano and Y. Ozaki. 1995. An overview of research and development of near infrared spectroscopy in Japan. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 3: 179-189.

Osborne, B. G., T. Fearn and P. H. Hindle. 1993. *Practical NIR spectroscopy: with Applications in Food and Beverage Analysis*. 2nd ed. Longman Singapore Publisher (Pte) Ltd, Singapore. 227 pp.

Roberts, C. A., K. J. Moore, D. W. Graffis, H. W. Kirby and R. P. Walgenbach. 1987. Quantification of mold in hay by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Dairy Science* 70: 2560-2564.

Shenk, J. S., J. J. Workman and M. O. Westerhaus. 2001. Application of NIR spectroscopy to agricultural products. pp. 419-474. In: D. A. Burns and E. W. Ciurczak (eds.) *Handbook of Near-Infrared Spectroscopy*. 2nd ed. Merce Dekker Inc., New York.

Wang, D., F. E. Dowell, M. S. Ram, W. T. Schapaugh. 2004. Classification of Fungal-Damaged Soybean Seeds Using Near-Infrared Spectroscopy. *International Journal of Food Properties* 7: 75-82.