

การตรวจหาเมล็ดข้าวสารที่ถูกเชื้อ *Aspergillus flavus* เข้าทำลายด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี
Detection of Milled Rice Infected with *Aspergillus flavus* by Near Infrared Spectroscopy

รุ่งนภา ไกลถิ่น¹ ธวัชชัย เพชรแก้ว² ปาริชาติ เทียนจุมพล¹ เกวลิณ คุณาศักดากุล^{1,3} สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์^{1,2} และ
สุชาดา เวียรศิลป์^{1,2}

Rungnapha Klaitin,¹ Thawatchai Phetkao,² Parichat Theanjumpol,¹ Kaewalin Kunasakdakul^{1,3}
Sa-nguansak Thanapornpoonpong^{1,2} and Suchada Veearasilp^{1,2}

Abstract

The application of near infrared spectroscopy (NIRS) to detect the milled rice cv. Khao Dawk Mali 105 infected with *Aspergillus flavus* was investigated. The reflectance spectra of the samples, the milled rice (non-infected) and the milled rice mixed with *A. flavus* at 5, 10, 15 and 20% w/w, were scanned by NIRSystem 6500 wavelength range 700-2500 nm. The second derivative technique was used to transform the spectral data before developing the calibration equations to predict the quantity of mixing milled rice infected with *A. flavus* by Partial least squares regression (PLSR). It was found the value of the correlation coefficients (R), the standard errors of calibration (SEC), the standard errors of prediction (SEP), the averages of difference between actual and NIR values (bias) were 0.82, 4.04, 4.18 and 0.02 respectively. Chitin and protein peaks had relative with absorbance value of 2362 and 2194 nm. Principle component analysis (PCA) was used to analyze the spectral data. It was found that the spectra of milled rice (non-infected) and the mixture at each level could be separated into two groups with PC1. It was verified that the mixing at 5% w/w was the lowest level of infection that could be detected by near infrared spectroscopy.

Keywords: Milled rice, Near Infrared Spectroscopy, *Aspergillus flavus*

บทคัดย่อ

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาเมล็ดข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยสแกนเมล็ดข้าวสารปกติ (ไม่ถูกทำลายด้วยเชื้อ) และข้าวสารที่มีการผสมด้วยเมล็ดข้าวสารที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายที่ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ด้วยเครื่อง NIRSystem6500 วัดการสะท้อนกลับของแสงในช่วงคลื่น 700-2500 นาโนเมตร แปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยอนุพันธ์อันดับที่สอง (second derivative) แล้วสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยเทคนิค Partial least square regression (PLSR) เพื่อทำนายปริมาณการผสมเมล็ดข้าวสารที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย ซึ่งผลการทดลองพบว่า สมการเทียบมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R), ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้างสมการ (SEC), ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ (SEP) และ ค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIR (Bias) เท่ากับ 0.82, 4.04, 4.18 และ 0.02 ตามลำดับ โดยพบพีกที่ความยาวคลื่น 2362 และ 2194 นาโนเมตรสัมพันธ์กับการดูดกลืนแสงของไคตินและโปรตีนตามลำดับ การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเทคนิค Principle component analysis (PCA) พบว่าสเปกตรัมของเมล็ดข้าวสารปกติและเมล็ดข้าวสารที่ถูกผสมในแต่ละระดับ แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มด้วย PC1 ซึ่งอัตราการผสมของเมล็ดข้าวสารที่ถูกเชื้อ *A. flavus* เข้าทำลายที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเป็นระดับต่ำสุดที่สามารถตรวจหาได้ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

คำสำคัญ: ข้าวสาร, เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี, *Aspergillus flavus*

¹ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว/ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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

² ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

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

³ ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

³ Department of Entomology and Plant pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

คำนำ

ปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อ การส่งออกข้าวสารสู่ตลาดโลกในปัจจุบันคือ การปนเปื้อนของเชื้อราและสารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้น โดยเฉพาะสารอะฟลาทอกซินจัดเป็น secondary metabolite ที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus flavus* ซึ่งเชื้อราชนิดนี้สามารถผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ถือว่าอันตรายที่สุดเพราะสามารถทำให้เกิดเป็นก้อนมะเร็งที่ตับ (นิธิยา และ วิบูลย์, 2543) เชื้อรา *A. flavus* ในรูปของสปอร์ (conidia) จะปนเปื้อนไปกับเมล็ดตั้งแต่ก่อนการเก็บเกี่ยว ขณะเก็บเกี่ยว รวมทั้งแพร่กระจายทั่วไปในอากาศ และปนเปื้อนติดไปกับแมลงในโรงเก็บ เชื้อนี้เจริญอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียสในสภาพที่มีความชื้นสัมพัทธ์ของอากาศมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ (Richard and Payne, 2003) สร้างความเสียหายให้แก่ผลผลิตจำนวนมากรวมทั้งก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์อีกด้วย ที่ผ่านมากการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราที่ติดมากับเมล็ดพืชมักใช้วิธี Agar method หรือ Blotter method ซึ่งต้องใช้สารเคมี และระยะเวลาในการตรวจสอบที่ยาวนาน และยังทำลายตัวอย่างที่ใช้ทดสอบด้วย ดังนั้นจึงได้นำเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy; NIRS) ซึ่งเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ามาตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดข้าวสาร เนื่องจากไม่ทำลายตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ รวดเร็ว แม่นยำ และลดการใช้สารเคมี ที่ผ่านมากเทคนิคนี้ถูกนำมาใช้ในการตรวจการปนเปื้อนของเชื้อราทั้งในเมล็ดและต้นพืช เช่น การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราที่ติดมากับต้น alfalfa แห่งที่มีโคตินเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อรา สร้างสมการถดถอยเชิงเส้น มีค่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) = 0.86 สัมพันธ์กับความยาวคลื่น 1630, 2114, 2246 และ 2356 นาโนเมตร (Robert *et al.*, 1987) และต่อมา Robert *et al.* (1991) ใช้เทคนิค MLR สร้างสมการถดถอยเชิงเส้น โดยใช้ปริมาณกลูโคซามีนซึ่งเป็นโพลีเมอร์ในโคตินของเชื้อรา *Aspergillus ochraceus* ทำลายในเมล็ดข้าวบาร์เลย์ ได้ค่า R = 0.86 สัมพันธ์กับความยาวคลื่น 2356 นาโนเมตร

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการทดลอง ณ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยใช้ตัวอย่างเมล็ดข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แบ่งตัวอย่างเมล็ดออกเป็นสองส่วน โดยส่วนที่หนึ่งคือเมล็ดข้าวสารปกติ (ไม่ได้ปลูกเชื้อรา) และผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลาย sodium hypochlorite เข้มข้น 0.1% ระยะเวลา 1 นาที และส่วนที่สองคือเมล็ดข้าวสารที่ถูกปลูกเชื้อรา *A. flavus* โดยนำเมล็ดมาเกลี่ยในถาดอลูมิเนียมแล้วฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา ความเข้มข้น 0.20×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 1.4 มิลลิลิตรให้กระจายอย่างทั่วถึงทุกเมล็ด จากนั้นนำเมล็ดข้าวสารดังกล่าวไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 วันเมื่อสังเกตเห็นการเจริญของเชื้อราจึงนำเมล็ดส่วนที่สองมาผสมกับเมล็ดส่วนที่หนึ่งที่ 0, 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยใช้จำนวนต่อตัวอย่างเท่ากับ 30 ตัวอย่างต่อระดับการผสม น้ำหนักตัวอย่างละ 200 กรัม จากนั้นนำมาบรรจุใน coarse sample cell แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIRSystem6500 (FOSS NIRSystem, Silver Spring, USA) ในช่วงความยาวคลื่น 700-2500 นาโนเมตร โดยวัดการสะท้อนกลับของแสง แล้วจึงหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมของระดับการผสมเมล็ดที่ถูกทำลายด้วยเชื้อรา *A. flavus* เพื่อสร้างสมการเทียบมาตรฐานการผสมของเมล็ดข้าวสารที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายด้วยโปรแกรม The unscrambler © version 7.6

ผลการทดลองและวิจารณ์

เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของการผสมเมล็ดข้าวสารที่มีเชื้อราที่ระดับต่างๆ คือ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักและชุดควบคุม (เมล็ดปกติ) ด้วยเครื่อง NIRSystem6500 ในช่วงคลื่น 700-2500 นาโนเมตร พบว่าสเปกตรัมดั้งเดิม (original spectrum) (Figure 1) มีพีคฐานกว้างที่เด่นชัดที่ความยาวคลื่น 1426 และ 1904 นาโนเมตร ซึ่งสัมพันธ์กับพันธะ O-H ของน้ำ (Osborn *et al.*, 1993) เนื่องจากน้ำเป็นองค์ประกอบทางเคมีของผลิตภัณฑ์ดูดกลืนคลื่นแสง NIR ได้ดีส่งผลให้เกิดการซ้อนทับ (overlapping) กับพีคของโมเลกุลขององค์ประกอบอื่น เมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของเมล็ดข้าวสารปกติกับเมล็ดที่ผสมด้วยข้าวสารที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย จะเห็นว่าเมล็ดข้าวสารที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าเมล็ดข้าวสารปกติ และมีค่าลดลงเมื่อระดับการผสมเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ Osborn *et al.* (1993) พบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะลดลง เนื่องจากเมล็ดข้าวสารที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายเกิดการแตกหักอนุภาคขนาดเล็กจะอัดตัวกันแน่น ทำให้เกิดการกระเจิงแสงน้อยกว่าอนุภาคขนาดใหญ่ การสะท้อนกลับของแสงมากทำให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าชุดควบคุม (เมล็ดปกติ) ดังนั้นจึงต้องแปลงข้อมูลสเปกตรัมก่อนนำเทคนิค Partial least square regression (PLSR) สร้างสมการถดถอยเชิงเส้น (Table 1) โดยใช้วิธี Smoothing 10 ร่วมกับ 2nd Derivative 5 ที่ช่วงความยาวคลื่น 1420-2468 นาโนเมตรซึ่งให้ความแม่นยำของสมการทำนายดีกว่าการแปลงสเปกตรัมด้วยวิธี Smoothing 10 ร่วมกับ 2nd Derivative 15 ที่ช่วงความยาวคลื่น 1520-2448 นาโนเมตร โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; R) สูงเท่ากับ 0.82 มีค่าความผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่ม

สร้างสมการ (standard error of calibration; SEC) เท่ากับ 4.04 และ 4.09 ตามลำดับ และค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ (standard error of prediction; SEP) มีค่าเท่ากับ 4.18 และ 4.24 ตามลำดับ ซึ่งค่า SEC และ SEP ในช่วงความยาวคลื่น 1420-2468 นาโนเมตร มีค่าต่ำกว่า ดังนั้นจึงเลือกสมการที่แปลงข้อมูลด้วยวิธี Smoothing 10 ร่วมกับ 2nd Derivative 5 ในช่วงความยาวคลื่น 1420-2468 นาโนเมตร เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์การถดถอย (regression coefficient) (Figure 2) ของสมการทำนายการผสมของข้าวสารที่มีเชื้อราเข้าทำลายตามอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งแปลงข้อมูลด้วยวิธี Smoothing 10 ร่วมกับ 2nd Derivative 5 พบว่าที่ความยาวคลื่น 2194 นาโนเมตร มีความสัมพันธ์กับโปรตีน ซึ่งประกอบด้วยพันธะ N-H และ O=C-NH ในโมเลกุล (Hecht and Wood, 1956) และความยาวคลื่น 2362 นาโนเมตร มีความสัมพันธ์กับไคติน ที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของเชื้อรา *A. flavus* ประกอบด้วยพันธะ C-N และ N-H (Roberts et al., 1987) สอดคล้องกับ Hecht and Wood. (1956) พบพีกโปรตีนที่ความยาวคลื่น 2180 นาโนเมตร ส่วน Roberts et al. (1987) พบพีกไคตินที่ความยาวคลื่น 2356 นาโนเมตร จะเห็นว่ามีค่าความแตกต่างของตำแหน่งพีก ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการแปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์

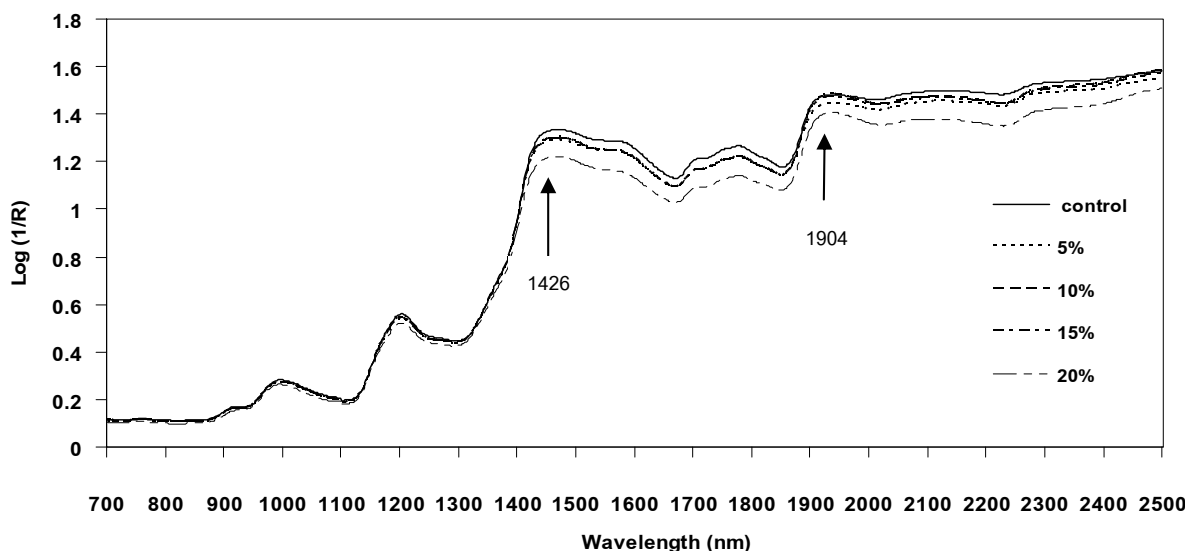


Figure 1 Original spectrum of milled rice (non-infected) and mixing of milled rice infected with *A. flavus* at 5, 10, 15 and 20% w/w in wavelength range 700-2500 nm

Table 1 PLSR calibration results for detect milled rice infected by *A. flavus* using spectra pretreatments.

| Pre-treatment | Wavelength region (nm) | F | R | SEC | SEP | Bias |
|--|------------------------|---|------|------|------|-------|
| Smoothing 5 + 2 nd Derivative 5 | 1120-2246 | 4 | 0.81 | 4.12 | 4.38 | 0.05 |
| Smoothing 10 + 2 nd Derivative 15 | 1520-2448 | 4 | 0.81 | 4.09 | 4.24 | -0.07 |
| Smoothing 10 + 2 nd Derivative 5 | 1420-2468 | 4 | 0.82 | 4.04 | 4.18 | 0.02 |

F: number of factors used in the calibration equation, R: multiple correlation coefficients, SEC: standard error of calibration, SEP: standard error of prediction, Bias: average of difference between actual value and NIR value

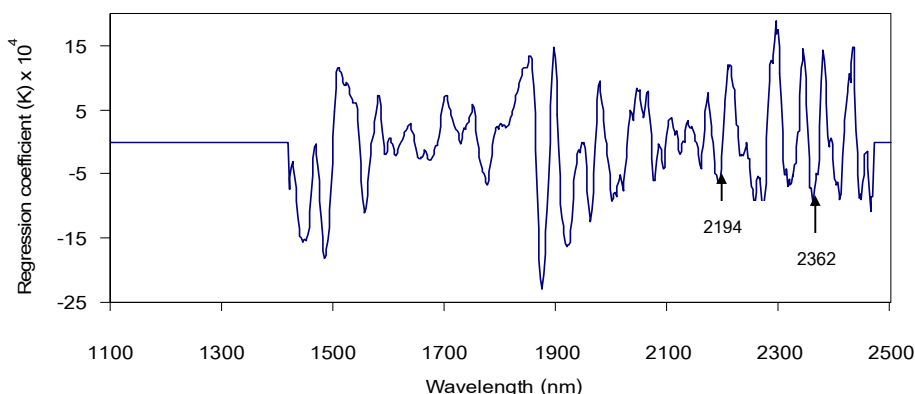


Figure 2 Regression coefficient plots for milled rice infected by *A. flavus* calibration equation.

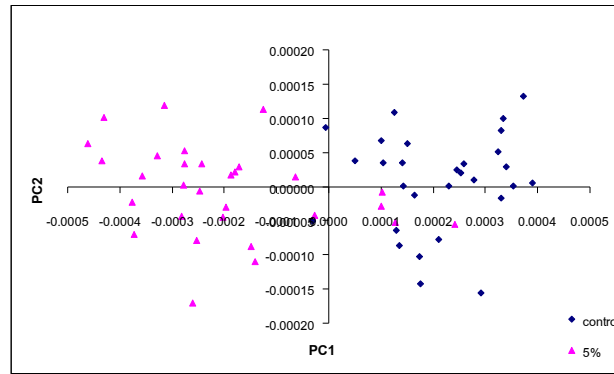


Figure 3 Principle component plot (pc1 vs. pc2) of milled rice (non-infected) and mixing of milled rice infected with *A. flavus* at 5 % w/w.

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเทคนิค principle component analysis (PCA) พบว่าข้าวสารปกติและข้าวที่ถูกผสมด้วยข้าวที่มีเชื้อราเข้าทำลายในแต่ละอัตราส่วนสามารถแยกออกเป็นสองกลุ่มอย่างชัดเจนด้วย PC1 และ PC2 (Figure 4) โดยสามารถแยกอัตราการผสมของข้าวที่ถูกเชื้อ *A. flavus* เข้าทำลายได้ตั้งแต่ที่ระดับ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักขึ้นไปได้

สรุป

จากการนำเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีมาใช้ในการตรวจสอบหาเมล็ดข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่มีการเข้าทำลายด้วยเชื้อ *Aspergillus flavus* ที่ผสมกับเมล็ดปกติในระดับต่างๆ พบว่าสมการทำนายที่ได้มีค่า R, SEC, SEP และ Bias เท่ากับ 0.82, 4.04, 4.18 และ 0.02 ตามลำดับ พิกของโคตินและโปรตีนสัมพันธ์กับความยาวคลื่น 2362 และ 2194 นาโนเมตรตามลำดับ และพบว่าสามารถแยกเมล็ดปกติกับเมล็ดที่มีระดับการปนขึ้นต่ำสุดคือ ตั้งแต่ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักขึ้นไปได้โดยวิเคราะห์ด้วย PCA ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเทคนิคนี้มาใช้ในการตรวจการผสมหรือการปนของเชื้อราในเมล็ดข้าวสารได้ เพื่อเป็นการคัดกรองคุณภาพของเมล็ดอย่างมีประสิทธิภาพ

คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว/ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการในการทำวิจัยและสนับสนุนทุนในโครงการวิจัยการพัฒนาเทคนิคที่แม่นยำเพื่อการจัดการข้าวและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หลังการเก็บเกี่ยว

เอกสารอ้างอิง

- นิธิยา รัตนานนท์ และวิบูลย์ รัตนานนท์. 2543. สารพิษในอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร. 270 น.
- Hecht, K. T. and D. L. Wood. 1956. The Near Infrared Spectrum of the Peptide Group. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences, London, England. p.174-188.
- 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.
- Richard, I. L. and G. A. Payne. 2003. Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems. Council of Agricultural Science and Technology Task Force report No.139. Ames, Iowa, USA. 199 p.
- 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. Dairy Science 70: 2560-2564
- Roberts, C. A., R. R. Marquardt, A. A. Frohlich, R. L. McGraw, R. G. Rotter and J. C. Henning. 1991. Chemical and spectral quantification of mold in contaminated barley. Cereal Chemistry 68: 272-275.