Agricultural Sci. J. 42 : 1 (Suppl.) : 369-372 (2011) ว. วิทย. กษ. 42 : 1 (พิเศษ) : 369-372 (2554)

การประยุกต์ใช้เทคนิค VIS/NIR spectroscopy เพื่อระบุเอกลักษณ์ของเชื้อ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวโพด

Application of VIS/NIR spectroscopy to Specify Identity of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* Isolated from Maize Seed

ธวัชชัย เพชรแก้ว[1] รุ่งนภา ไกลถิ่น[2] ปาริชาติ เทียนจุมพล[2] เกวลิน คุณาศักดากุล[2,3] สงวนศักดิ์ ธนาพรพูนพงษ์[1,2]และ สุชาดา เวียรศิลป์[1, 2]

Thawatchai Phetkaeo[1], Rungnapha Klaithin[2], Parichat Theanjumpol[2], Kaewalin Kunasakdakul[2, 3]
Sa-nguansak Thanapornpoonpong[1, 2] and Suchada Vearasilp [1, 2]

Abstract

VIS/NIR spectroscopy was applied to specify the identity of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* isolated from maize seed. Mycelia and spores of the fungi were used for VIS/NIR spectroscopy detection based on reflectance. Two wavelengths were used i.e. short-wavelength and long-wavelength at 400-1100 nm and 1100-2500 nm respectively. Using visible light (400-700 nm), results indicated the difference between the two fungi in which the absorbance value of *A. niger* was higher than *A. flavus*. In the near infrared spectra (700-1100 nm and 1100-2500 nm), the absorbance value of *A. flavus* was higher than *A. niger*. The principle component analysis (PCA) clearly showed separated identity spectrums of *A. flavus* and *A. niger*. Therefore, near infrared technique, VIS/NIR spectroscopy was capable to identify *Aspergillus* spp. fungi which caused the post harvest diseases of maize seed.

Keywords: Maize seed, VIS/NIR spectroscopy, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*

บทคัดย่อ

จากการตรวจหาเอกลักษณ์ของเชื้อรา *Aspergillus* ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์โดยใช้เทคนิค VIS/NIR spectroscopy โดยตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus niger* ในช่วงความยาวคลื่น 400-1100 นาโนเมตร และ 1100-2500 นาโนเมตร พบว่าในช่วงความยาวคลื่น 400 – 700 นาโนเมตร หรือช่วงคลื่น visible เชื้อ *A. niger* มีค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) สูงกว่าเชื้อ *A. flavus* ส่วนในช่วงความยาวคลื่น 700-1100 นาโนเมตร และ 1100– 2500 นาโนเมตร หรือช่วงคลื่น near infrared พบว่าเชื้อ *A. flavus* มีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าเชื้อ *A. niger* เมื่อนำแถบค่าการดูดกลืนแสง (spectrum) ของเชื้อราทั้ง 2 ชนิด มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Principle Component Analysis (PCA) พบว่า spectrum ของเชื้อ *A. flavus* และ *A. niger* สามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำเทคนิค VIS/NIR spectroscopy มาใช้ในการระบุเอกลักษณ์ของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคหลังการเก็บเกี่ยวของเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

คำสำคัญ: ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์, เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*

คำนำ

เมล็ดพืชที่เก็บรักษาไว้ในโรงเก็บมักเกิดความเสียหายอยู่เสมอ หากมีการเก็บรักษาในสภาพที่ไม่เหมาะสม ซึ่งจุลินทรีย์เป็นสาเหตุสำคัญที่สร้างความเสียหายต่อเมล็ดพืชได้มาก โดยจุลินทรีย์ที่พบว่าเข้าทำลายเมล็ดพืชส่วนใหญ่คือ เชื้อรา (fungi) ปัจจุบันพบว่ามีเชื้อรามากกว่า 150 ชนิด (species) เข้าทำลายเมล็ดธัญพืชและเมล็ดพืช อื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *Aspergillus* spp. เป็นกลุ่มเชื้อราที่ทำให้เกิดความเสียหายแก่เมล็ดพืชที่เก็บรักษาในโรงเก็บมากที่สุด (สมบัติ, 2535) หากเก็บเมล็ดในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิและความชื้นไม่เหมาะสม (Richard and Payne, 2003) แหล่งของเชื้อราที่พบมากจะอยู่ใน

[1] ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[1] Department of Plant science and natural resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University
[2] สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว/ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[2] Postharvest Technology Research Institute/Postharvest Technology Innovation Center, Chiang Mai University
[3] ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[3] Department of Entomology and Plant pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University

รูปของสปอร์ที่เกิดการปนเปื้อนไปกับเมล็ดตั้งแต่ก่อนการเก็บเกี่ยวขณะเก็บเกี่ยว รวมถึงการปนเปื้อนจากเชื้อราที่แพร่กระจายทั่วไปในอากาศ ติดไปกับภาชนะที่บรรจุ และปนเปื้อนติดไปกับแมลงในโรงเก็บ (Scheidegger and Payne, 2003) โดยทั่วไปการประเมินอัตราการปนเปื้อนและความเสียหายจากการเข้าทำลายของเชื้อราเหล่านี้กระทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากต้องอาศัยขั้นตอนของการตรวจสอบที่ใช้เวลานาน ดังนั้น การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบชนิดของเชื้อราที่ปนเปื้อนในเมล็ดพืช ให้มีความรวดเร็วแม่นยำ ไม่ทำลายตัวอย่าง และลดการใช้สารเคมีอันจะช่วยลดต้นทุนการผลิตในระยะยาว เพื่อสร้างความปลอดภัยในการควบคุมคุณภาพเมล็ดพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งจากรายงานของ Wang *et al.* (2004) ได้ใช้เทคนิค VIS/NIR spectroscopy ในการวัดแบบ reflectance ช่วงความยาวคลื่น 400-1700 nm แยกเมล็ดถั่วเหลืองปกติออกจากเมล็ดที่ถูกทำลายโดยเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ สอดคล้องกับ Berardo *et al*. (2005) ที่ใช้เทคนิค VIS/NIR spectroscopy ในการจำแนกตัวอย่างของเมล็ดข้าวโพดที่ถูกเชื้อรา *Fusarium verticillioides* เข้าทำลาย รวมทั้งตรวจหาสารพิษที่เกิดจากเชื้อราได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำเทคนิค VIS/NIR spectroscopy มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *A. flavus* และ *A. niger* ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการวิจัย ณ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ แยกเชื้อราจากเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ด้วยวิธี Agar method (เกวลิน, 2547) บ่มเมล็ดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้น ตรวจสอบชนิดของเชื้อราที่เจริญบนเมล็ดโดยดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ โดยนำเส้นใยเชื้อราไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ตรวจดูลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* (สมบัติ, 2535) เพิ่มปริมาณเชื้อที่จำแนกได้โดยเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำส่วนของเส้นใยและสปอร์เชื้อราแต่ละชนิดไปลดความชื้นใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววางบนกระดาษกรองชนิด Whatman Glass Microfibre filters (Whatman,GF/C) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 37 มิลลิเมตร นำมาบรรจุใน standard cup โดยให้มีความหนาของเส้นใยและสปอร์เชื้อราประมาณ 1 มิลลิเมตร (Figure 1) ใช้จำนวนตัวอย่างของเชื้อราจำนวน 30 ตัวอย่างต่อชนิดของเชื้อ วัดสเปกตรัมด้วยเครื่อง NIRSystem6500 (FOSS NIRSystem, Silver Spring, USA) ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร โดยวัดการสะท้อนกลับของแสงด้วยอุปกรณ์เสริม spinning module with standard cup จากนั้นนำข้อมูลสเปกตรัม (spectrum) ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม The unscrambler ® version 7.6

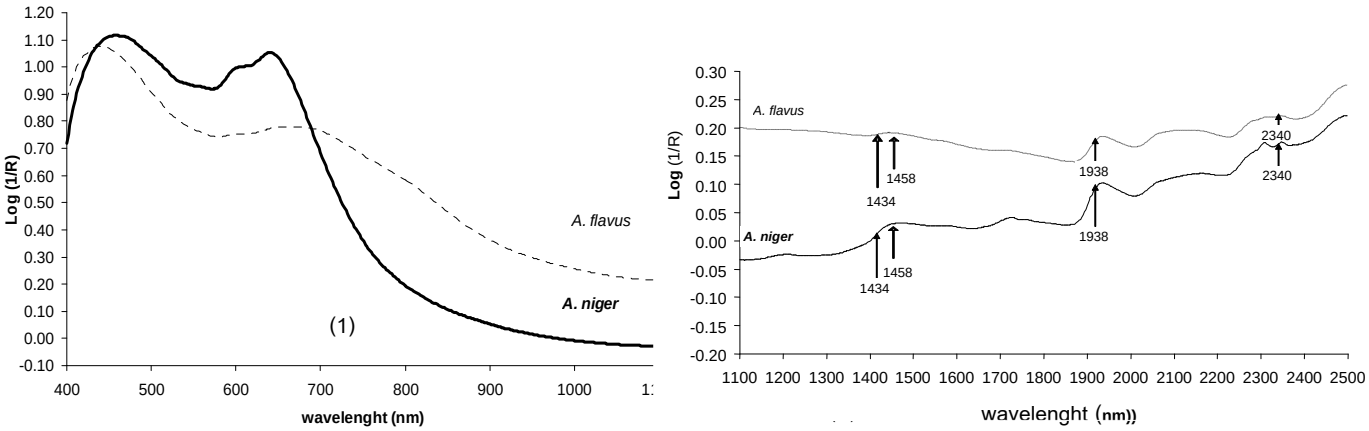
ผลการทดลองและวิจารณ์

สเปกตรัมของเชื้อราสองชนิด คือ *A. flavus* และ *A. niger* เมื่อวัดด้วยเครื่อง NIRSystem6500 โดยวัดการสะท้อนกลับของแสง ในช่วงความยาวคลื่น 400-1100 nm และ 1100-2500 nm พบว่า สเปกตรัมของเชื้อราทั้งสองชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่แยกออกจากกันอย่างชัดเจนในทุกช่วงความยาวคลื่น (Figure 2) โดยในช่วงความยาวคลื่น 400 – 700 nm หรือช่วงคลื่น visible เชื้อ *A. niger* มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าเชื้อ *A. flavus* ซึ่งเป็นอิทธิผลของสีของเส้นใยและสปอร์เชื้อรา ซึ่งเชื้อ *A. niger* มีเส้นใยสีดำจะสามารถดูดกลืนแสงในช่วง visible ได้ดีกว่าสีเขียวของเชื้อ *A. flavus* ซึ่ง Delwiche and Hareland (2004) รายงานว่า ช่วงความยาวคลื่นที่ 480-600 nm เกี่ยวข้องกับสีที่เปลี่ยนแปลงของเชื้อราเมื่ออยู่ในเมล็ด ส่วนในช่วงความยาวคลื่น 700-1100 nm และ 1100– 2500 nm หรือช่วงคลื่น near infrared พบว่าเชื้อ *A. flavus* มีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าเชื้อ *A. niger* ทั้งช่วงความยาวคลื่น ส่วนหนึ่งเป็นอิทธิพลของความชื้นของเชื้อทั้งสองชนิดที่ต่างกัน โดยเชื้อ *A. flavus* บริเวณผิวหน้าของโคโลนีมีปริมาณไอน้ำมากกว่าเชื้อ *A. niger* ซึ่งข้อมูลสเปกตรัมพบพีกน้ำที่ชัดเจนที่ความยาวคลื่น 1458 และ 1938 nm สอดคล้องกับ William and Norris (2001) รายงานว่าพบ พีกน้ำชัดเจนที่สุดที่ความยาวคลื่น 1450 และ 1940 nm นอกจากนี้พีกที่ความยาวคลื่น 1434 nm ยังสัมพันธ์กับการดูดกลืนแสงของโมเลกุลของกลูโคสซึ่งประกอบด้วยพันธะ O-H และยังพบว่าพีกที่ความยาวคลื่น 2340 nm เป็นพีกของพันธะ C-N ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเอไมด์ (Barardo *et al*., 2005) เมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 1200 nm ของเชื้อราทั้งสองชนิดจะเห็นว่ามีความแตกต่างกัน ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากโครงสร้างของผนังเซลล์ของเชื้อรารวมทั้งกรดอะมิโน ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์เชื้อรา โดย Delwiche and Hareland (2004) รายงานว่าช่วงความยาวคลื่นที่ 870-1200 nm เป็นช่วงที่สัมพันธ์กับพันธะ N-H ส่วนใหญ่จะเป็นพวกกรดอะมิโน อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และ radical structure ที่เป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของเชื้อรา เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค principle component analysis (PCA) ซึ่งสามารถลดจำนวนตัวแปรอิสระหรือตัวแปรที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย VIS/NIR spectroscopy ด้วยการแบ่งกลุ่มตัวแปรอิสระเดิมที่มีความสัมพันธ์กันเพื่อสร้างตัวแปรใหม่หรือ

องค์ประกอบที่เรียกว่า principal combination (PC) โดยใช้ข้อมูลทั้งสเปกตรัม (full spectrum) พบว่าสเปกตรัมของเชื้อ *A. flavus* และ *A. niger* สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจนด้วย PC1 และ PC2 (Figure3)

1 2

Figure 1 Mycelium and spore of *A. flavus* (1) and *A. niger* (2) were packed in the standard cup.



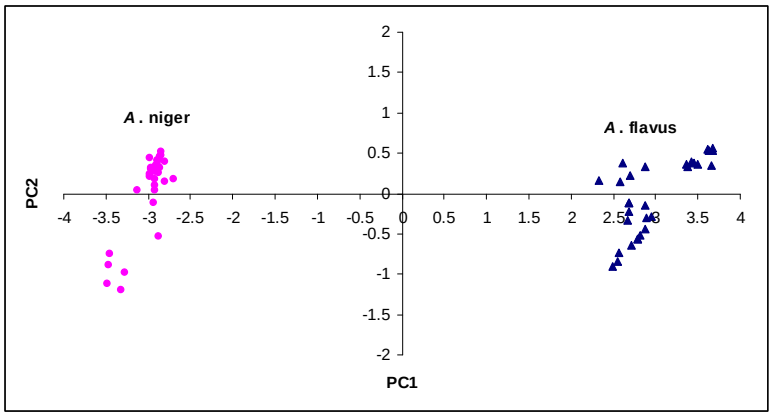


Figure 3 principle component plot (pc1 vs. pc2) of *A. flavus* and *A. niger*.

สรุป

จากการนำเทคนิค VIS/NIR spectroscopy มาใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พบว่าเส้นสเปกตรัมของเชื้อราทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันและสามารถแยกจากกันอย่างชัดเจนเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเทคนิค PCA ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้สูงในการนำเทคนิค VIS/NIR spectroscopy มาใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อรา ปริมาณเชื้อรา รวมถึง สารพิษที่เกิดจากเชื้อรา

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สถาบันวิจัยเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัยในโครงการวิจัยการพัฒนาเทคนิคที่แม่นยำเพื่อการจัดการข้าวและข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หลังการเก็บเกี่ยว

เอกสารอ้างอิง

เกวลิน คุณาศักดากุล. 2547. เทคนิคโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 90 หน้า.

สมบัติ ศรีชูวงศ์. 2535. โรคหลังเก็บเกี่ยวของเมล็ดพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 127 หน้า.

Berardo, N, V. Pisacane, P. Battilani, A. Scandolara, A. Pietri and A. Marocco. 2005. Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by Near-Infrared reflectance spectroscopy. Journal of Agriculture and Food Chemistry 53: 8128-8134.

Delwiche, S. R. and G. A. Hareland 2004. Detection of scab-damaged hard red spring wheat kernels by near-infrared reflectance. journal of Cereal Chemistry 81: 643–649.

Richard, J. L. and G. A. Payne. 2003. Mycotoxins: Risk in plant, animal and human systems. Council of Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA. 199 p.

Scheidegger, K. A. and G. A. Payne. 2003. Unlocking the secrets behind secondary metabolism: A review of Aspergillus flavus from pathogenicity to functional genomics. Journal of Toxicology-Toxin Reviews 22: 423-459.

Wang, D., F. E. Dowell, M. S. Ram and W. T. Schapaugh. 2004. Classification of fungal-damaged soybean seeds usingnear-infrared spectroscopy.International journal of food properties.7:75-82.

William, P. and K. Norris. 2001. Near-infrared Technology in the Agricultural and Food Industries. 2nd ed. American Associationof Cereal Chemists, USA. 296 p.