

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประยุกต์ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรด
สเปกโทรสโกปีในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของรา
และสารพิษจากราในผลผลิตทางการเกษตร

โดย ชีวานันท์ เดชอุปการ

มิถุนายน 2556



สัญญาเลขที่ MRG5480149

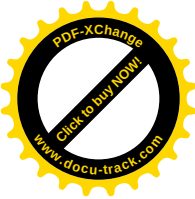
รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประยุกต์ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรด
สเปกโทรสโกปีในการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของรา
และสารพิษจากราในผลผลิตทางการเกษตร

ชิวานันท์ เดชอุปการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย
สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)



บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5480149

ชื่อโครงการ : การประยุกต์ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจวิเคราะห์
การปนเปื้อนของราและสารพิษจากราในผลผลิตทางการเกษตร

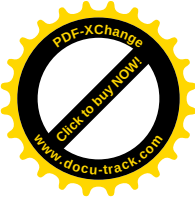
ชื่อนักวิจัย และสถาบัน : ชีวานันท์ เดชอุปการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : Cheewanun.D@chula.ac.th, cheewanun@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ คือ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีตรวจหาการปนเปื้อนของรา *Aspergillus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และตรวจวิเคราะห์สารพิษดังกล่าวในข้าว เริ่มจากการสร้างแบบจำลองเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของรา ได้จากการนำเส้นสเปกตรัมแบบการดูดกลืนแสงที่ได้จากการสแกนตัวอย่างข้าวจริง และตัวอย่างข้าวที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วย *Aspergillus* ไปวิเคราะห์และสร้างแบบจำลองทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา (% infection) และปริมาณราในข้าว (CFU/g) ด้วยวิธี Partial least square regression (PLSR) แบบจำลองในการทำนายเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด ที่สร้างจากสเปกตรัมที่ไม่ผ่านการจัดการทางคณิตศาสตร์ให้ผลการทำนายได้ดีและแม่นยำมากที่สุด ให้ค่า Correlation coefficient (r), Standard error of prediction (SEP) และ Bias สำหรับการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด คือ 0.668, 28.874% และ -0.101% และสำหรับทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 คือ 0.437, 18.066% และ 4.613% ตามลำดับ ในขณะที่แบบจำลองในการทำนายปริมาณของราทั้งหมดและปริมาณของราที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ให้ผลการทำนายที่ไม่ดีนัก สำหรับแบบจำลองในการตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าว ทำได้โดยการนำเส้นสเปกตรัมแบบการดูดกลืนแสงจากการสแกนตัวอย่างข้าวจริง และข้าวที่ทำการปรับปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ แล้วสร้างแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงกับค่าปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 พบว่าแบบจำลองในการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ที่สร้างจากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธี Standard normal variate ร่วมกับ Detrending ให้ผลการทำนายได้ดีและแม่นยำที่สุด โดยมีค่า Correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9573, Root mean square error of cross validation (RMSECV) เท่ากับ 1.9024 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ Bias เท่ากับ -0.0040 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม

คำหลัก : เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี, อะฟลาทอกซินบี 1, รา *Aspergillus*, ข้าว



Abstract

Project Code : MRG5480149

Project Title : Application of near infrared spectroscopy for determination of molds and mycotoxins in agricultural products

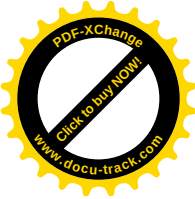
Investigator : Cheewanun Dachoupakan, Chulalongkorn University

E-mail Address : Cheewanun.D@chula.ac.th, cheewanun@hotmail.com

Project Period : 2 years

This research focuses on the possibilities to use Near Infrared Spectroscopy (NIRS) for determination of AFB₁ and *Aspergillus* species in rice. Firstly, a model for determination of *Aspergillus* contamination was developed from the relationship between the values obtained from microbiological analysis and optical data obtained from NIRS of the rice samples obtained in nature and the rice samples artificially inoculated with *Aspergillus* species. Calibration models for the total fungal infection and the fungal numeration (CFU/g) were developed using the original and pretreated absorbance spectra in conjunction with partial least square regression (PLSR). The statistical model developed from the untreated spectra provided the greatest accuracy in prediction, with a correlation coefficient (r) of 0.668, a standard error of prediction (SEP) of 28.874%, and a bias of -0.101%. For yellow-green *Aspergillus* infection, the most accurate predictive statistical model was developed using a pretreated (maximum normalization) NIR spectra, with the following statistical characteristics ($r = 0.437$, $SEP = 18.723\%$ and bias = 4.613%). Whereas, the models for total fungal numeration and yellow-green *Aspergillus* numeration provided the very poor accuracy in prediction, secondly, another model for determination of AFB₁ which was developed from the relationship between the values obtained from chemical analysis and the optical data obtained from NIRS of the rice samples obtained in nature and the rice samples artificially contaminated with AFB₁ in different concentration levels. The statistical model developed from the treated spectra (standard normal variate and detrending; SNVD) provided the best accuracy in prediction, with a correlation coefficient (r) of 0.9573, a root mean square error of cross validation (RMSECV) of 1.9024 $\mu\text{g/kg}$ and a bias of -0.0040 $\mu\text{g/kg}$.

Keywords : near infrared spectroscopy, aflatoxin B1, *Aspergillus*, rice



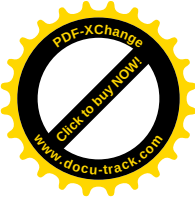
Executive Summary

สารพิษจากรา (mycotoxin) คือ สารที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมทุติยภูมิของราสายใย มีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ ปนเปื้อนในอาหารและสินค้าเกษตรหลายชนิดซึ่งรวมถึงข้าวด้วย อะฟลาทอกซินบี 1 (aflatoxin B₁, AFB₁) เป็นหนึ่งในสารพิษจากราที่พบในข้าวที่มีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์มากที่สุด คือ เป็นสารก่อมะเร็ง ราสำคัญที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 คือ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ซึ่งเจริญได้ดีในเขตร้อนชื้นอย่างประเทศไทย

เนื่องจากในปัจจุบันหลายประเทศมีข้อกำหนดเกี่ยวกับระดับการปนเปื้อนของสารพิษจากราในอาหารไว้อย่างชัดเจนและเข้มงวด อีกทั้งผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากข้าวของไทยที่ส่งออกไปต่างประเทศประสบปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษจากราเป็นอันดับสองรองจากปัญหาด้านสิ่งปลอมปน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจหาสารพิษจากราที่ปนเปื้อนอยู่ในสินค้าเกษตร ทั้งวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์แปรรูป ซึ่งนิยมใช้วิธีทางเคมีวิเคราะห์ เช่น high-performance liquid chromatography (HPLC) thin-layer chromatography (TLC) และ gas chromatography (GC) ควบคู่กับการใช้ fluorescence detector หรือ mass spectrometry (MS) ซึ่งวิธีการเหล่านี้มีความถูกต้องและแม่นยำในการวิเคราะห์สูง แต่เป็นเครื่องมือราคาแพง ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ และยังใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างและการวิเคราะห์ จึงไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง แต่ในปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ในประเทศไทยต้องสั่งซื้อชุดทดสอบจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูง สำหรับการตรวจหาสารพิษจากราที่ผลิตสารพิษนั้นนิยมใช้วิธีทางจุลชีววิทยาโดยการนับจำนวนรา คัดแยกจากตัวอย่างและจำแนกชนิดของราโดยวิธีทางห้องปฏิบัติการ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญและใช้เวลานานในการตรวจสอบ หรือใช้วิธีทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลซึ่งสารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์มีราคาสูง

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy: NIRS) เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการดูดกลืนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของสารในช่วงย่านใกล้อินฟราเรดที่มีความยาวคลื่นช่วง 780-2500 นาโนเมตร เทคนิคนี้ถูกนำมาใช้วิเคราะห์หาสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบของอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหลายชนิด งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในช่วงคลื่น 1100-2500 นาโนเมตร ในการตรวจวิเคราะห์อะฟลาทอกซินบี 1 และการตรวจหาการปนเปื้อนของราที่ผลิตสารพิษดังกล่าวในข้าว โดยไม่ทำลายตัวอย่างที่ใช้ตรวจ ให้ผลรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ ทดแทนการวิเคราะห์แบบดั้งเดิม และไม่ต้องใช้สารเคมีในกระบวนการทดสอบจึงลดการทำลายสิ่งแวดล้อม สามารถวัดค่าคุณภาพและปริมาณสารที่ต้องการ ได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว เหมาะสมสำหรับนำไปพัฒนาใช้กับอุตสาหกรรมเกษตรและอาหารเพื่อลดต้นทุนในการใช้สารเคมี และประหยัดเวลาได้มากขึ้น

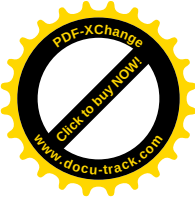
โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ คือ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีตรวจหาการปนเปื้อนของรา *Aspergillus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 โดยวัดจากเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา (% infection) และปริมาณราในข้าว (CFU/g) และตรวจวิเคราะห์สารพิษ



ดังกล่าวในข้าว และเพื่อสร้างแบบจำลองเพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของราและตรวจวิเคราะห์สารพิษดังกล่าวในข้าวโดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

สำหรับการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนของรา เริ่มด้วยการตรวจวัดสเปกตรัมของตัวอย่างข้าวที่ใช้ศึกษาด้วยวิธีการสะท้อนแบบแพร่ (Diffuse Reflection) ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ครั้ง จำนวน 106 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ 30 ตัวอย่าง ข้าวขาว 30 ตัวอย่าง ข้าวกล้อง 30 ตัวอย่าง และข้าวที่ทำการปรับปริมาณอีก 16 ตัวอย่าง จากนั้นนำเส้นสเปกตรัมแบบการดูดกลืนแสง (Absorbance spectra) ไปวิเคราะห์และสร้างแบบจำลองทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา (% infection) และปริมาณราในข้าว (CFU/g) ด้วยวิธี Partial least square regression (PLSR) จากการวิเคราะห์และสร้างแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงกับค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดและราที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และปริมาณราทั้งหมดและราที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าว ที่พัฒนาจากสเปกตรัมที่ยังไม่ผ่านการจัดการและผ่านการจัดการทางคณิตศาสตร์โดยวิธี Normalization, Derivative, Baseline, Standard Normal Variate (SNV) หรือ Multiple Scatter Correction (MSC) พบว่า แบบจำลองในการทำนายเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดที่สร้างจากสเปกตรัมที่ไม่ผ่านการจัดการทางคณิตศาสตร์ให้ผลการทำนายได้ดีและแม่นยำมากที่สุด โดยมีค่า Correlation coefficient (r), Standard error of prediction (SEP) และ Bias สำหรับการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด คือ 0.668, 28.874% และ -0.101% ตามลำดับ และสำหรับทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 คือ 0.437, 18.066% และ 4.613% ตามลำดับ ในขณะที่แบบจำลองในการทำนายปริมาณของราทั้งหมดและราที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 นั้นให้ผลการทำนายที่ไม่ดีนัก ดังนั้นจึงนำแบบจำลองในการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดมาวิเคราะห์เชิงคุณภาพ เพื่อการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของรา โดยนำข้อมูลกลุ่มสร้างแบบจำลองการปนเปื้อนของราจากค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดมาแบ่งเป็น 4 กลุ่ม (0-12%, 26-50%, 51-75%, 76-100%) แล้วสร้าง Classification model โดยวิธี PCA (Principle Component Analysis), SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy) และ PLS-DA (Partial Least Square-Discriminant Analysis) ผลการแบ่งกลุ่มพบว่าการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA มีเปอร์เซ็นต์การทำนายโดยรวมดีที่สุด 57.07- 83.78 เปอร์เซนต์

สำหรับการศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าว เริ่มด้วยการตรวจวัดสเปกตรัมของตัวอย่างข้าวที่ใช้ศึกษาด้วยวิธีการสะท้อนแบบแพร่ (Diffuse Reflection) ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ครั้ง จำนวน 105 ตัวอย่าง ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ 30 ตัวอย่าง ข้าวขาว 30 ตัวอย่าง ข้าวกล้อง 30 ตัวอย่าง และข้าวที่ทำการปรับปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 อีก 15 ตัวอย่าง จากนั้นนำเส้นสเปกตรัมแบบการดูดกลืนแสง (Absorbance spectra) ไปวิเคราะห์และสร้างแบบจำลองทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ด้วยวิธี Partial least square regression (PLSR) โดยใช้ตัวอย่างทั้งหมดในการสร้างแบบจำลอง จากการวิเคราะห์และสร้างแบบจำลองความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงกับค่าปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวที่พัฒนาจากสเปกตรัมที่ยังไม่ผ่านการจัดการทางคณิตศาสตร์ พบว่าแบบจำลองในการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ที่สร้างจากสเปกตรัมที่ผ่านการจัดการทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธี Standard normal variate ร่วมกับ Detrending ให้ผลการทำนายได้ดีและแม่นยำมากที่สุด ทั้งนี้โดยการพิสูจน์แบบจำลองด้วยวิธี Full Cross validation ให้



ค่า Correlation coefficient (r), Root mean square error of calibration (RMSEC) และ Bias คือ 0.9662, 1.6952 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 5.5270E-06 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ให้ผลการทำนายได้ดีและแม่นยำที่สุด โดยมีค่า Correlation coefficient (r), Root mean square error of cross validation (RMSECV) และ Bias สำหรับการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 คือ 0.9573, 1.9024 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ -0.0040 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ผลและสร้างแบบจำลองทำนายความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงกับค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดและราเขียวอมเหลืองและปริมาณราทั้งหมดและราเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าว พบว่าแบบจำลองในการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวที่สร้างจากสเปกตรัมที่ไม่ผ่านการปรับแต่งให้การทำนายได้ดีและแม่นยำ แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองนี้มีความเป็นไปได้ในการพัฒนาและปรับใช้ได้จริงในการตรวจหาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าว ในขณะที่แบบจำลองในการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราเขียวอมเหลืองที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวนั้นยังให้การทำนายไม่แม่นยำและมีความแม่นยำต่ำ แต่อย่างไรก็ตามแบบจำลองนี้มีโอกาสที่จะพัฒนาให้ดีขึ้นโดยการเพิ่มจำนวนของตัวอย่างให้มากขึ้น และเพิ่มการตรวจวัดสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในช่วงความยาวคลื่น 700-2500 nm ซึ่งครอบคลุมช่วงคลื่นสั้นและช่วงคลื่นยาวของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี รวมถึงการศึกษาความสัมพันธ์ของความชื้นในตัวอย่างข้าวต่อการปนเปื้อนดังกล่าวด้วย

สำหรับแบบจำลองในการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวให้ผลการทำนายที่ดีมากและความแม่นยำมาก ซึ่งให้เห็นว่าแบบจำลองนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงในการตรวจการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าว อย่างไรก็ตามแบบจำลองนี้สามารถพัฒนาให้ดียิ่งขึ้นไปอีก โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างจริงที่มีการปนเปื้อนของสารพิษจากราดังกล่าวให้มากขึ้น



สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทัศนวิสัยการกรม	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	8
บทที่ 4 ผลการทดลอง	13
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	25
รายการอ้างอิง	26
ภาคผนวก	29

เนื้อหางานวิจัย

บทที่ 1 บทนำ

สารพิษจากรา (mycotoxin) คือ สารที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของราหลายสายใย มีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ พบบ่อยในธรรมชาติและปนเปื้อนในอาหารและสินค้าเกษตรหลายชนิดซึ่งรวมถึงข้าวด้วย สารพิษจากราที่พบในข้าวมีหลายชนิด แต่ที่มีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์มากที่สุด คือ อะฟลาทอกซินบี₁ (aflatoxin B₁, AFB₁) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ราสำคัญที่ผลิตสารพิษดังกล่าวเป็นรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ซึ่งเจริญได้ดีในเขตประเทศร้อนชื้นอย่างประเทศไทย เนื่องจากในปัจจุบันหลายประเทศมีข้อกำหนดเกี่ยวกับการปนเปื้อนของสารพิษจากราในอาหารไว้อย่างชัดเจนและเข้มงวด อีกทั้งผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากข้าวของไทยที่ส่งออกไปยังต่างประเทศ ประสบปัญหาเรื่องการปนเปื้อนของสารพิษจากราเป็นอันดับสองรองจากปัญหาด้านสิ่งปลอมปน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบหาปริมาณสารพิษจากราที่ปนเปื้อนอยู่ในสินค้าเกษตรทั้งในรูปของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์แปรรูป ซึ่งการตรวจหาที่ผลิตสารพิษและสารพิษจากราตั้งแต่ในวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตหรือระหว่างกระบวนการผลิต เป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนสารพิษจากราในห่วงโซ่การผลิต โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีทางเคมีวิเคราะห์ เช่น thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography และ gas chromatography เป็นต้น ควบคู่กับการใช้ fluorescence detector หรือ mass spectrometry ซึ่งวิธีการเหล่านี้มีความถูกต้องและแม่นยำในการวิเคราะห์สูง แต่เป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง (ค่าใช้จ่ายในการเตรียมและการวิเคราะห์ตัวอย่าง ประมาณ 2,000 บาทต่อตัวอย่าง) และต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ อีกทั้งยังใช้เวลานานในการ วิเคราะห์และการเตรียมตัวอย่างก่อนการวิเคราะห์ (ประมาณ 1-2 ชั่วโมงต่อตัวอย่าง) จึงไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมาก นอกจากนี้ยังมีวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา Enzyme-linked immunosorbent assays ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง แต่ต้องสั่งซื้อชุดทดสอบจากต่างประเทศซึ่ง มีราคาสูง สำหรับการตรวจหาที่ผลิตสารพิษนั้นนิยมใช้วิธีจุลชีววิทยาทางห้องปฏิบัติการ โดยการนับจำนวนรา คัดแยกจากตัวอย่าง และจำแนกชนิดของราที่พบโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะที่มองเห็นด้วยตาเปล่า และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หรือใช้วิธีทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล อย่างไรก็ตามวิธีการต่างๆ ที่กล่าวมานี้มีค่าใช้จ่ายสูงในเรื่องของสารเคมีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ นอกจากนี้ยังใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์

เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy: NIRS) เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการดูดกลืนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของสารในช่วงย่านใกล้อินฟราเรดที่มีความยาวคลื่น 780-2500 นาโนเมตร เทคนิคนี้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารและผลผลิตทางการเกษตรที่เป็นสารอินทรีย์หลายชนิด เทคนิคดังกล่าวมีคุณสมบัติเด่น คือ ไม่ต้องใช้สารเคมีในกระบวนการทดสอบ จึงไม่ทำลายตัวอย่างสินค้าที่ตรวจสอบ ลดการทำลายสิ่งแวดล้อม สามารถวัดค่าคุณภาพและปริมาณสารที่ต้องการได้ภายในเวลาอันรวดเร็ว (ตัวอย่างละประมาณ 1-2 นาที) และรู้ผลหลายตัวแปรในเวลาเดียวกัน มีความแม่นยำสูง เหมาะสำหรับนำไปพัฒนาใช้กับอุตสาหกรรมเกษตรและอาหารเพื่อลดต้นทุนในการใช้สารเคมีและประหยัดเวลาได้มากขึ้น



วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 และตรวจวิเคราะห์สารพิษดังกล่าวในข้าว ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ทำลายตัวอย่าง ช่วยให้ประหยัดเวลาและลดค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์
2. เพื่อสร้างแบบจำลองในการตรวจหาการปนเปื้อนของราสกุล *Aspergillus* ที่ผลิตสารพิษอะฟลาทอกซินบี 1 และตรวจวิเคราะห์สารพิษดังกล่าวในข้าว โดยใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

บทที่ 2 ทัศนัวรรณกรรม

ข้าวกับเศรษฐกิจไทย

ข้าวเป็นอาหารหลักของมนุษย์ทั่วโลก ผลผลิตข้าวสารทั่วโลกมีประมาณ 46.1 ล้านตัน จาก 111 ประเทศ ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตข้าวอันดับที่ 6 ของโลก โดยในปี 2553 มีปริมาณการผลิตข้าวสาร 20.26 ล้านตัน (FAS, 2011) และมีพื้นที่เพาะปลูกข้าวทั้งหมดประมาณ 73 ล้านไร่ ทำให้การปลูกข้าวเป็นอาชีพหลักของเกษตรกรไทย ในปี 2554 มีปริมาณผลผลิตข้าวรวม 2.2 ล้านตันข้าวสาร คิดเป็น 4.6 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตข้าวทั่วโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) ประเทศไทยมีการบริโภคข้าวประมาณ 52 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตที่ได้ ข้าวจึงเป็นอาหารหลักของคนไทย ปริมาณการบริโภคข้าวโดยเฉลี่ยประมาณคนละ 103 กิโลกรัมต่อปี หรือประมาณวันละ 300 กรัม (FAO, 2010) นอกจากนี้ข้าวยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สร้างรายได้ให้แก่ประเทศไทยจำนวนไม่น้อย เนื่องจากผลผลิตข้าวส่วนที่เหลือจากการบริโภคผลิตเพื่อการส่งออก ซึ่งประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกข้าวอันดับ 1 ของโลก ในปี 2553 โดยมีปริมาณการส่งออกสูงถึง 9,047 แสนตัน รองลงมา คือ เวียดนาม และปากีสถาน มีปริมาณการส่งออก 6,734 และ 4,000 แสนตัน ตามลำดับ (FAS, 2012) ข้าวยังเป็นสินค้าส่งออกอันดับ 1 ของประเทศไทย มีมูลค่าการส่งออกเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ในปี 2551 มูลค่าการส่งออกข้าวสารของประเทศไทยสูงถึง 203,219 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2553)

ปัญหาของข้าวไทยเพื่อการส่งออก

ปัจจุบันประเทศไทยยังประสบปัญหาในเรื่องโครงสร้างพื้นฐานที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตข้าว เช่น การเลือกพื้นที่ปลูกข้าว การเตรียมพื้นที่ปลูก การเลือกพันธุ์ข้าวและการเตรียมเมล็ดพันธุ์ การเลือกช่วงเวลาปลูก วิธีการปลูกข้าว การดูแลรักษาข้าวระหว่างปลูก การเก็บเกี่ยว และการเก็บรักษาข้าวหลังการเก็บเกี่ยว สาเหตุเหล่านี้ทำให้ผลผลิตข้าวมีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐานไม่เหมาะสมสำหรับการส่งออก และส่งผลต่อราคาข้าวตกต่ำ (บุญหงส์ จงคิด, 2547)

นอกจากนี้ เรื่องความปลอดภัยของอาหารเป็นอีกหนึ่งปัญหาสำคัญของข้าวไทยที่ส่งออกไปต่างประเทศ ปัจจุบันข้าวไทยที่ส่งออกไปยังต่างประเทศประสบปัญหาเรื่องการปนเปื้อนสารพิษจากราเป็นอันดับสองรองจากปัญหาด้านสิ่งปลอมปน (ศุภรัตน์ ไข่มิตรเจริญกุล และคณะ, 2546) จากเว็บไซต์ Japan times ประเทศญี่ปุ่น ในวันที่ 20 ธันวาคม 2552 รายงานว่า กระทรวงการเกษตร การป่าไม้และการประมงของญี่ปุ่นได้ตรวจพบอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวสารที่นำเข้าจากไทย ในเดือนตุลาคม 2552 ซึ่งมีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในระดับความเข้มข้น 0.04 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งไม่เป็นไปตามกฎหมายความปลอดภัยของอาหารในประเทศญี่ปุ่นที่ได้กำหนดไว้ว่า จะต้องไม่พบอะฟลาทอกซินปนเปื้อนอยู่เลย (Kyodo News, 2009) นอกจากนี้ในปี 2554 สำนักงานส่งเสริมการค้าในต่างประเทศ ณ กรุงโคเปนเฮเกน ประเทศสวีเดน รายงานการตรวจพบอะฟลาทอกซินในข้าวกล้องหอมมะลิที่นำเข้าจากไทย ที่ความเข้มข้น 8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งสูงกว่าระดับสูงสุดที่กำหนดไว้ (2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) (สำนักงานส่งเสริมการค้าในต่างประเทศ ณ กรุงโคเปนเฮเกน ประเทศสวีเดน, 2554) เหตุการณ์เช่นนี้ทำให้ผู้นำเข้าไม่เชื่อถือในคุณภาพข้าวไทย ดังนั้นการปนเปื้อนสารพิษจากราในข้าวไทยจึงเป็นปัญหาที่ต้องตระหนักถึงเป็นอย่างมาก เนื่องจากส่งผลกระทบต่อภาพลักษณ์และเศรษฐกิจของประเทศผู้ส่งออกข้าวอันดับหนึ่งของโลก

สารพิษจากรา (mycotoxin)

สารพิษจากรา (mycotoxin) คือ สารที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมทุติยภูมิของราสายใย มีความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ ในอาหารและสินค้าเกษตรมักพบการปนเปื้อนของสารพิษจากราหลายชนิด เช่น aflatoxins ochratoxins fumonisins trichothecenes zearalenone citrinin patulin (Castegnaro and Pfohl-Leszkowicz, 2002) มีรายงานการปนเปื้อนราและสารพิษจากราในอาหารและสินค้าทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศในเขตร้อนชื้นและประเทศใกล้เขตร้อน ซึ่งมีสภาพภูมิอากาศเหมาะสมต่อการเจริญของราและการผลิตสารพิษของรา (Kumar et al., 2008) ราในสกุล *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* และ *Alternaria* เป็นราที่พบได้ในธรรมชาติทั้งในอากาศและดินในบริเวณพื้นที่ทำการเกษตร พบการปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรบ่อยครั้งและสามารถสร้างสารพิษได้อีกด้วย (Castegnaro and Pfohl-Leszkowicz, 2002) ตัวอย่างสินค้าทางการเกษตรที่ได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของสารพิษจากรา ได้แก่ ธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าวโพด ข้าว ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต โกโก้ เครื่องเทศ เมล็ดน้ำมัน ถั่วและผลไม้ นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของสารพิษจากราในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตร เช่น แป้ง ผลิตภัณฑ์อาหารจากธัญพืช ขนมปัง เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ และไวน์ ซึ่งเป็นผลจากการใช้วัตถุดิบที่ถูกปนเปื้อนด้วยสารพิษจากราในการผลิต นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของสารพิษจากราในเนื้อหมูและสัตว์ปีกรวมถึงผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น ไข่ นม และ เนยแข็ง (Jorgensen, 1998; Skaug, 1999; Abul-Eneinet et al., 2000; Chiavaro et al., 2002) เมื่อคนหรือสัตว์ได้รับสารพิษจากราเข้าไปในร่างกายจะทำให้เกิดการเจ็บป่วยได้ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง สารพิษจากรบางชนิดสามารถก่อให้เกิดพิษรุนแรงต่อตับ พิษต่อเซลล์และระบบภูมิคุ้มกัน พิษต่อระบบประสาทและกล้ามเนื้อ พิษต่อไต ทำให้เกิดการผ่าเหล่าทางพันธุกรรม และที่ร้ายแรงที่สุด คือ เป็นสารก่อมะเร็ง

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxins หรือ AFs)

อะฟลาทอกซินเป็นกลุ่มของสารพิษที่เกิดจากรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* ซึ่งเจริญได้ดีในเขตประเทศร้อนชื้น และพบการปนเปื้อนอยู่ในพืชและผลผลิตที่สำคัญทางการเกษตร เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ถั่วลิสง และผลิตภัณฑ์แปรรูปแทบทุกชนิดที่ใช้วัตถุดิบทางการเกษตร เช่น ผลิตภัณฑ์จากแป้ง และถั่วลิสง ผักและผลไม้อบแห้ง เช่น พริกแห้ง พริกไทย งา เมล็ดมะม่วงหิมพานต์และถั่วต่างๆ รวมถึงอาหารแห้งที่มาจากสัตว์ เช่น ปลาแห้ง กุ้งแห้ง (Murphy et al., 2006) อะฟลาทอกซินแบ่งออกได้หลายชนิด เช่น อะฟลาทอกซินบี (AFB₁, AFB₂) อะฟลาทอกซินจี (AFG₁, AFG₂) และอะฟลาทอกซินเอ็ม (AFM₁, AFM₂) ซึ่ง *A. flavus* ผลิตเฉพาะอะฟลาทอกซินบีเท่านั้น ส่วน *A. parasiticus* ผลิตได้ทั้งอะฟลาทอกซินบีและอะฟลาทอกซินจี (Tekinsen, 2005) สำหรับอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 พบได้ในน้ำมันและผลิตภัณฑ์จากนม เกิดจากการเมแทบอลิซึมของอะฟลาทอกซินบี 1 ในสัตว์ที่กินอาหารที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ซึ่งเป็นชนิดที่มีพิษร้ายแรงมากที่สุด องค์การ International Agency for Research on Cancer (IARC) ได้จัดให้อะฟลาทอกซินบี 1 เป็นสารก่อมะเร็ง (Murphy et al., 2006)

เนื่องจากสารพิษจากรชนิดนี้มีความสำคัญต่อสุขภาพของคนและสัตว์โดยตรง คณะกรรมาธิการยุโรป (EU) จึงออกข้อกำหนดระดับการปนเปื้อนสูงสุดของอะฟลาทอกซินในสินค้าเกษตรและ

อาหารหลายชนิด เช่น ธัญพืชและผลิตภัณฑ์ แปรรูปธัญพืช ถั่วลิสง (อะฟลาทอกซินบี 1 ไม่เกิน 2 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) ข้าวโพด ข้าวและเครื่องเทศ (อะฟลาทอกซินบี 1 ไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) นมดิบ (อะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ไม่เกิน 0.05 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) เป็นต้น (Regulation (EU) No 165/2010) ส่วนในประเทศไทย มีข้อกำหนดเฉพาะอะฟลาทอกซินรวมทุกชนิดในอาหารทุกประเภทอยู่ที่ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในขณะที่การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินค่อนข้างมากในอาหารและผลผลิตทางการเกษตร ทั้งในรูปวัตถุดิบและแปรรูปของสินค้าเกษตรกลุ่มธัญพืชและถั่วซึ่งรวมถึงข้าวด้วย ทั้งที่จำหน่ายในท้องตลาดและส่งออกต่างประเทศ Tanaka และคณะ (2007) ได้ศึกษาพบว่าข้าวไทยถูกปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซินบี 1 มากที่สุด

การตรวจหาการปนเปื้อนของราและราที่ผลิตสารพิษในอาหาร

การตรวจหาการปนเปื้อนของราและสารพิษจากราตั้งแต่ในวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต หรือระหว่างกระบวนการผลิต เป็นสิ่งสำคัญที่จะลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนสารพิษจากราในห่วงโซ่การผลิต วิธีการต่างๆได้รับการพัฒนาและนำมาใช้เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของราในอาหาร ส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีทางจุลชีววิทยาทางห้องปฏิบัติการ โดยการนับจำนวนรา คัดแยกจากตัวอย่าง จำแนกและระบุชนิดของราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characterization) ได้แก่ ลักษณะที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (Macroscopic characters) เช่น ลักษณะ ขนาด และสีของโคโลนี และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic characters) เช่น ลักษณะของ conidia, conidiophore และ conidial heads (Samson et al., 2004, 2006; Pitt and Hocking, 2009) อย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้ต้องใช้เวลานาน และต้องอาศัยเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่มีความเชี่ยวชาญ นอกจากนี้ยังมีปัญหาเกี่ยวกับมาตรฐานการทดสอบ รวมทั้งข้อผิดพลาดที่เกิดจากการปนเปื้อนระหว่างการทดสอบ (Atkins and Clark, 2004)

ปัจจุบันการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction, PCR) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากมีความจำเพาะและความไวสูง (Paterson 2006; Niessen 2007) เทคนิคนี้ถูกนำมาใช้สำหรับจัดจำแนกและระบุชนิดของ *Aspergillus* (Geiser et al., 2007; Samson et al., 2006) และใช้ในการตรวจหาชนิดของ *Aspergillus* ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร (Sartori et al., 2006) อย่างไรก็ตาม เทคนิคดังกล่าวยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ความซับซ้อนของวิธีการ ค่าใช้จ่ายในเรื่องเครื่องมือและสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ และการเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมเฉพาะเจาะจงสำหรับราแต่ละชนิด (Santos et al., 2010)

การตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราที่ปนเปื้อนในอาหาร

การตรวจวิเคราะห์สารพิษจากราในอาหารโดยทั่วไปนิยมใช้วิธีทางเคมีวิเคราะห์ เช่น thin-layer chromatography (TLC) เป็นวิธีที่แรกๆที่นำมาใช้ตรวจอะฟลาทอกซิน (Marutoiu et al., 2004) ซึ่งทำได้ง่าย จึงนิยมใช้เป็นวิธีการสำหรับงานประจำของห้องปฏิบัติการต่างๆ (บดินทร์ บุตรอินทร์, 2555), high-performance liquid chromatography (HPLC) และ gas chromatography (GC) ควบคู่กับการใช้ fluorescence detector หรือ mass spectrometry (MS) (Turner et al., 2009) ซึ่งเป็นที่นิยมใช้ ให้ผลที่ถูกต้องแม่นยำสูงและเชื่อถือได้ (Jaimez et al., 2000) แต่มีข้อเสียในส่วน

ของขั้นตอนที่ยุ่งยาก ใช้เวลานานในการเตรียมตัวอย่างก่อนและระหว่างการวิเคราะห์ ใช้สารเคมีจำนวนมาก (ฟีไล และคณะ, 2551) ค่าใช้จ่ายสูง และต้องการผู้เชี่ยวชาญในการทดสอบ นอกจากนี้ยังมีวิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) ซึ่งเป็นวิธีที่มีความจำเพาะสูง สะดวกรวดเร็ว (Lee et al., 2004) แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสียในเรื่องของราคาแพง การใช้งานที่มีระยะเวลาจำกัด (Abbas et al., 2004) ไม่มีความเสถียรของน้ำยาทดสอบเมื่อมีการทดสอบเป็นเวลานาน (Fernández-Ibañez, 2009)

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy: NIRS)

เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการดูดกลืนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของสสารในช่วงย่านใกล้อินฟราเรดที่มีความยาวคลื่น 780-2500 นาโนเมตร การที่จะมองเห็นความเปลี่ยนแปลงในรูปแบบการดูดกลืนแสงโดยตรงนั้นเป็นไปได้ยาก เนื่องจากมีรูปแบบการดูดกลืนแสง (Absorption band) ขององค์ประกอบต่างๆที่อาจซ้อนทับกัน ดังนั้นจึงต้องนำการใช้หลักการทาง Chemometric คือ เทคนิคการวิเคราะห์ข้อมูลแบบตัวแปรพหุ (Multivariate analysis) มาช่วยในการจัดตัวแปรบนแกนออกไปแล้วสร้างแบบจำลองในการทำนาย (Calibration model) ซึ่งเทคนิค NIRS นี้เป็นวิธีทดสอบที่ไม่ทำลายตัวอย่าง วิธีการเตรียมตัวอย่างไม่ยุ่งยาก ทำให้รวดเร็ว ประหยัดระยะเวลา และเนื่องจากเป็นวิธีทดสอบที่ไม่ใช้สารเคมีจึงปลอดภัย เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ลดค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่มีความแม่นยำและเชื่อถือได้ (วารุณี ชนะแพสย์, 2555)

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาองค์ประกอบของอาหารและผลผลิตทางการเกษตรที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น โปรตีนในข้าว (Zhang et al., 2007) ปริมาณเพคตินในสาหร่ายญี่ปุ่น (Sirisomboon et al., 2007) ปริมาณน้ำตาลในผลไม้ (Camps and Christen, 2009) ปริมาณของ แฉ่งที่ละลายได้ (ความหวาน) ของน้ำผึ้ง (Sirisomboon and Howvimanporn, 2009) น้ำมันหอมระเหยที่เปลือกส้มโอ (Sirisomboon and Duangchang, 2009) และหาแบคทีเรียในน้ำผลไม้ (Al-Holy et al., 2006) นอกจากนี้ เนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปียังถูกนำมาประยุกต์ในการตรวจหาสารพิษในอาหารหลายเรื่อง เช่น Berardo et al. (2005) ใช้ NIRS ในการตรวจหาเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดและ *Fusarium verticilloides* ในเมล็ดข้าวโพดและข้าวโพดป่น ซึ่งแบบจำลองที่ได้ผลดีที่สุดให้ค่า Correlation coefficient (r^2) = 0.75 และ 0.79 และค่า Standard error of cross validation (SECV) = 7.43 และ 10.95 สำหรับเมล็ดข้าวโพดและข้าวโพดป่น ตามลำดับ Santos et al. (2010) ใช้เทคนิคดังกล่าวในการตรวจหา *Fusarium moniliforme* และ *A. flavus* ที่สร้างสารพิษในข้าวโพด และ Del Fiore et al. (2010) ที่ศึกษาการใช้เทคนิคดังกล่าวร่วมกับการวิเคราะห์ภาพแบบ hyperspectral imaging analysis เพื่อตรวจหาที่ผลิตสารพิษในข้าวโพด ได้แก่ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ที่ผลิตอะฟลาทอกซิน, *Aspergillus niger* ที่ผลิตและไมผลิตโอคราทอกซินเอ และ *Fusarium graminearum* และ *F. verticilloides* ที่ผลิต trichothecenes นอกจากนี้ เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปียังมีความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เพื่อตรวจหาการปนเปื้อนของราทั้งหมดและราที่ผลิตอะฟลาทอกซินมี 1 ในข้าว (Dachoupakan Sirisomboon et al., 2013)

นอกจากนี้ เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปียังถูกนำมาใช้ในการตรวจหาสารพิษจากอะฟลาทอกซินมี 1 ในข้าวโพดและข้าวบาร์เลย์ (Fernández-Ibañez et al., 2009) โดยใช้ช่วงคลื่น



1112-2500 นาโนเมตร ผลการทำนายสำหรับข้าวโพดของแบบจำลองโดยใช้วิธี standard normal variate and detrending (SNVD) จัดการกับสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดได้ผลดีที่สุด โดยมีค่า Correlation coefficient (r^2) = 0.80 และ 0.82 ค่า Standard error of cross validation (SECV) = 0.211 และ 0.200 สำหรับ เครื่อง NIR Spectrometer แบบ grating และแบบ FT-NIRS ตามลำดับ สำหรับข้าวบาร์เลย์แบบจำลองซึ่งพัฒนาโดยใช้เครื่องแบบ grating โดยใช้วิธี SNVD จัดการกับสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดได้ผลดีที่สุดโดยมีค่า r^2 = 0.85 และ ค่า SECV = 0.176 สำหรับแบบจำลองที่พัฒนาด้วยเครื่อง FT-NIRS โดยใช้สเปกตรัมดั้งเดิมได้ผลดีที่สุดโดยมีค่า r^2 = 0.84 และ ค่า SECV = 0.183



บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง
2. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนของราในข้าว
 - 2.1 การเตรียมตัวอย่าง
 - 2.2 การสแกนตัวอย่างด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด
 - 2.3 การตรวจหาการปนเปื้อนของราในข้าวตัวอย่างโดยวิธี Direct plating และ Dilution plating
 - 2.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายระดับการปนเปื้อนของรา
 - 2.5 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของรา
3. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าว
 - 3.1 การเตรียมตัวอย่าง
 - 3.2 การสแกนตัวอย่างด้วยคลื่นเนียร์อินฟราเรด
 - 3.3 การตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวตัวอย่างโดยวิธี HPLC
 - 3.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายระดับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างข้าว 3 ประเภท ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ ข้าวขาว และข้าวกล้อง จากห้างสรรพสินค้า ตลาดสด และโรงสีข้าวหรือโกดัง ตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม โดยแต่ละแหล่งจะเก็บจำนวน 60 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 180 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นตัวอย่างสำหรับการศึกษาในข้อ 2 จำนวน 90 ตัวอย่าง และในข้อ 3 จำนวน 90 ตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ในกล่องมีฝาปิดสนิทที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการทดลองขั้นต่อไป โดยเร็วที่สุด

2. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนของราในข้าว

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของราตามธรรมชาติ (Naturally contaminated sample) เป็นตัวอย่างที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในข้อ 1 รวมทั้งสิ้น 90 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยรา (Artificially contaminated sample) เป็นตัวอย่างที่ได้จากการเติมสารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 10^2 , 10^4 , 10^6 และ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ของรา *Aspergillus flavus* M3T8R4G3 ลงในตัวอย่างข้าวที่ไม่พบการปนเปื้อนของรา ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 วัน รวมทั้งสิ้น 16 ตัวอย่าง

2.2 การสแกนตัวอย่างคลิ่นเนียร์อินฟราเรด

นำตัวอย่างจากข้อ 2.1 รวมทั้งสิ้น 106 ตัวอย่าง บรรจุลงในถ้วยเปิดสำหรับ สแกนตัวอย่าง แล้วนำไปวางบนตำแหน่งรับคลิ่นเนียร์อินฟราเรดช่วงความยาวคลิ่น 950-1650 นาโนเมตร ในแบบ diffuse reflectance เพื่อให้ได้สเปกตรัมของการสะท้อนกลับ เพื่อนำไปวิเคราะห์ทาง chemometric ต่อไป ทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ครั้ง นำตัวอย่างที่สแกนเสร็จแล้วไปตรวจหาการปนเปื้อนของราในขั้นตอนต่อไปทันที

2.3 การตรวจหาการปนเปื้อนของราในข้าวตัวอย่างโดยวิธี Direct plating และ Dilution plating

2.3.1 Direct plating method

วิธีการ direct plating เป็นหนึ่งในเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสำหรับการตรวจสอบ นับจำนวน และคัดแยกราที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหาร เช่น เมล็ดธัญพืชและถั่ว (Pitt and Hocking, 2009; Samson et al., 2004) โดยนำเมล็ดข้าว 50 เมล็ดต่อหนึ่งตัวอย่าง วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ DG18 (Dichloran 18% glycerol agar) โดยวาง 10 เมล็ดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 จาน ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (aseptic technique) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน นับจำนวนเมล็ดข้าวที่พบการเจริญของรา เพื่อคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา (% infection) เชี่ยวราที่มีโคโลนีสีเขียวมเหลืองขึ้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA (Malt extract agar) และ CYA (Czapek yeast agar) เพื่อใช้ในการจัดจำแนกราดต่อไป

2.3.2 Dilution plating method

ชั่งตัวอย่างข้าว จำนวน 50 กรัม ใส่ในถุงใส่ตัวอย่างสำหรับตีบดผสมอาหาร (stomacher bag) เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water ปริมาตร 450 มิลลิลิตร แช่นาน 30 นาที แล้วตีผสมกันด้วยเครื่องตีบดผสมอาหาร (stomacher) นาน 2 นาที จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้เจือจางให้เหมาะสม และทำการ spread plate โดยเกลี่ยให้ทั่วเพลทบนอาหารเลี้ยง DG18 ทำ 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน ตรวจดูลักษณะโคโลนี นับจำนวนโคโลนีทั้งหมด และนับจำนวนราที่มีโคโลนีสีเขียวมเหลืองแล้วรายงานผลในหน่วยของ Colony Forming Units (CFU) ต่อเมล็ดข้าว 1 กรัม

2.3.3 การจำแนกรา

นำราที่มีโคโลนีสีเขียวมเหลืองที่แยกได้จากข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ซึ่งคาดว่าจะมีความสามารถในการผลิตอะฟลาทอกซินมีมาจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characterization) ได้แก่ ลักษณะที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (Macroscopic characters) เช่น ลักษณะ ขนาด และสีของโคโลนี และโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic characters) ได้แก่ ลักษณะของ conidia, conidiophores และ conidial heads ตามวิธีของ Samson และคณะ (2004) และ Pitt และ Hocking (2009) คัดเลือกรามีโคโลนีสีเขียวมเหลืองที่จำแนกในสกุล *Aspergillus* section *Flavi* ซึ่งเป็นราที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินเพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.3.4 การศึกษาความสามารถในการผลิตสารพิษของราที่แยกได้

นํารวที่จำแนกจากข้อ 2.3.3 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ปมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเก็บสปอร์ โดยใช้ 0.85% NaCl + 0.01% Tween 80 ปลอดเชื้อ เจือจางให้มีจำนวนสปอร์ 10^6 spore/mL โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ในการนับสปอร์ หยอดสารแขวนลอยสปอร์จำนวน 5 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน

เมื่อครบเจ็ดวัน เจาะตรงกลางโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร จำนวน 3 ชิ้น ใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดสนิทขนาด 5 มิลลิตร ซึ่งนำหนักขึ้นวันแล้วเติมเมทานอลปริมาตร 2.5 มิลลิตร สกัดอะฟลาทอกซินบี 1 ในอ่างอัลตราโซนิก เป็นเวลา 15 นาที กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 แล้วระเหยเมทานอลด้วยแก๊สไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเฟสเคลื่อนที่ (น้ำปลอดประจุอะซีโตไนไตรล์:เมทานอล (60:20:20)) และกรองสารสกัดที่ได้ด้วยหัวกรองสำเร็จขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วส่งวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ทันที ด้วยวิธี HPLC ผ่านคอลัมน์ C18 (150x4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) โดยใช้เครื่องตรวจวัดชนิดฟลูออเรสเซนซ์ ความยาวคลื่น excision (λ_{exc}) 365 และ emission (λ_{em}) 435 นาโนเมตร, อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่เท่ากับ 1.0 มิลลิตร/นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ retention time (RT) ของอะฟลาทอกซินบี 1 เท่ากับ 7 นาที

2.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายระดับการปนเปื้อนของรา

นำข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราและค่า CFU) มาตรวจสอบค่าผิดปกติ (outlier) โดยใช้เงื่อนไข

$$\frac{x - \bar{x}}{SD} \geq 3$$

เมื่อ x คือ ค่าที่วิเคราะห์ได้จากห้องปฏิบัติการของแต่ละตัวอย่าง

$\bar{x}$ คือ ค่าเฉลี่ยของตัวอย่างทั้งหมด

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของตัวอย่างทั้งหมด

นำข้อมูลเชิงแสง (optical data) มาตรวจสอบค่าผิดปกติ (outlier) โดยใช้การสังเกตสเปกตรัมด้วยตาเปล่าและโดยการหาสเปกตรัมผิดปกติโดยใช้วิธี principle component analysis (PCA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Unscrambler 9.8 (Camo, Norway)

แบ่งข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและข้อมูลเชิงแสงที่ตัดค่าผิดปกติออกแล้วเป็นสองกลุ่ม คือ กลุ่มสร้างแบบจำลอง (calibration set) และกลุ่มทำนาย (prediction set) โดยใช้อัตราส่วน 7:3

นำข้อมูลกลุ่มสร้างแบบจำลองมาสร้างความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการและข้อมูลเชิงแสง โดยวิธี partial least square regression (PLSR) โดยข้อมูลสเปกตรัมที่สร้างแบบจำลองเป็นสเปกตรัมดั้งเดิม หรือผ่านการจัดการทางคณิตศาสตร์โดยวิธี Multiplicative

Scatter Correction (MSC), Normalization (Mean, Maximum, Range), First Derivative by Savitzky-Golay (11, 21 points), Second Derivative by Savitzky-Golay (11, 21 points), Standard Normal Variate (SNV), SNV+Detrending (SNVD) และ Baseline offset เมื่อได้แบบจำลองแล้ว นำกลุ่มทำนายมาทดสอบความแม่นยำของแบบจำลอง จากนั้นคัดเลือกแบบจำลองที่ดีที่สุดด้วยเงื่อนไขค่า Standard error of calibration (SEC) ต่ำที่สุด และค่า coefficient of correlation (r) สูงที่สุด ทั้งนี้การวิเคราะห์และสร้างแบบจำลองใช้โปรแกรม Unscrambler 9.8 (Camo, Norway)

$$SEC = \frac{\sqrt{\sum (X - Y)^2}}{n - 2}$$

$$r = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{n}}{\sqrt{\left[\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{n} \right] \left[\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{n} \right]}}$$

เมื่อ X คือ ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมี

Y คือ ค่าที่ได้จากการทำนายด้วย NIRS

n คือ จำนวนตัวอย่าง

2.5 การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของรา

นำข้อมูลกลุ่มสร้างแบบจำลองการปนเปื้อนของรามามาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของรา และกลุ่มที่ 2 ไม่มีการปนเปื้อน แล้วสร้าง Classification model โดยวิธี PCA (Principle Component Analysis), SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy) และ PLS-DA (Partial Least Square-Discriminant Analysis) เมื่อได้แบบจำลองแล้วนำกลุ่มทำนายมาทดสอบความแม่นยำของแบบจำลอง จากนั้นคัดเลือกแบบจำลองที่ได้จากวิธีที่ดีที่สุดด้วยเงื่อนไขค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องสูงที่สุด

3. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าว

3.1 การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ตามธรรมชาติ (Naturally contaminated sample) เป็นตัวอย่างที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในข้อ 1 รวมทั้งสิ้น 90 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ถูกทำให้ปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซินบี 1 (Artificially contaminated sample) เป็นตัวอย่างที่ได้จากการเติมสารมาตรฐานอะฟลาทอกซินบี 1 ให้มีความเข้มข้น 1, 5, 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ลงในตัวอย่างข้าวที่ไม่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ความเข้มข้นละ 3 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง

3.2 การสแกนตัวอย่างคลื่นเนียร์อินฟราเรด

นำตัวอย่างจากข้อ 3.1 รวมทั้งสิ้น 106 ตัวอย่าง บรรจุลงในถ้วยเปิดสำหรับสแกนตัวอย่าง แล้วนำไปวางบนตำแหน่งรับคลื่นเนียร์อินฟราเรดช่วงความยาวคลื่น 950-1650 นาโนเมตร ในแบบการสะท้อนแบบแพร่ (Diffuse reflectance) เพื่อให้ได้สเปกตรัมของการสะท้อนกลับ เพื่อนำไปวิเคราะห์ทาง chemometric ต่อไป ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ครั้ง นำตัวอย่างที่สแกนเสร็จแล้วไปตรวจหาอะฟลาทอกซินบี 1 ในขั้นตอนต่อไปทันที

3.3 การตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวโดยวิธี HPLC

บดข้าวตัวอย่างให้ละเอียด 50 กรัม ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ 5 กรัม แล้วใส่ในโถปั่น เติมสารละลายผสมเมทานอล: น้ำปราศจากไอออน (80:20) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปั่นที่ความเร็วสูงเป็นเวลา 1 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นดูดสารละลายเจือจางที่ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในกระบอกฉีดยาที่ต่อกับอิมมูโนแอฟฟินิตีคอลัมน์ (immune-affinity column) (AflaTest, VICAM, USA) โดยปรับให้มีอัตราการไหล 1 หยดต่อวินาที และล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อชะสารอะฟลาทอกซิน บี 1 ออกจากคอลัมน์ตามวิธีของ VICAM (2003) จากนั้น ระเหยเมทานอลให้แห้งด้วยก๊าซไนโตรเจน แล้วเติมสารละลายผสมอะซีโตนไตรส:น้ำปราศจากไอออน:เมทานอล (20:60:20) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วกรองสารละลายด้วย syring filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ลงในขวด vial และส่งวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ทันที ด้วยวิธี HPLC ผ่านคอลัมน์ C18 (25x4.6 มิลลิเมตร, 5 ไมโครเมตร) โดยใช้ fluorescence detector ตามวิธีของ Hejri et al. (2010)

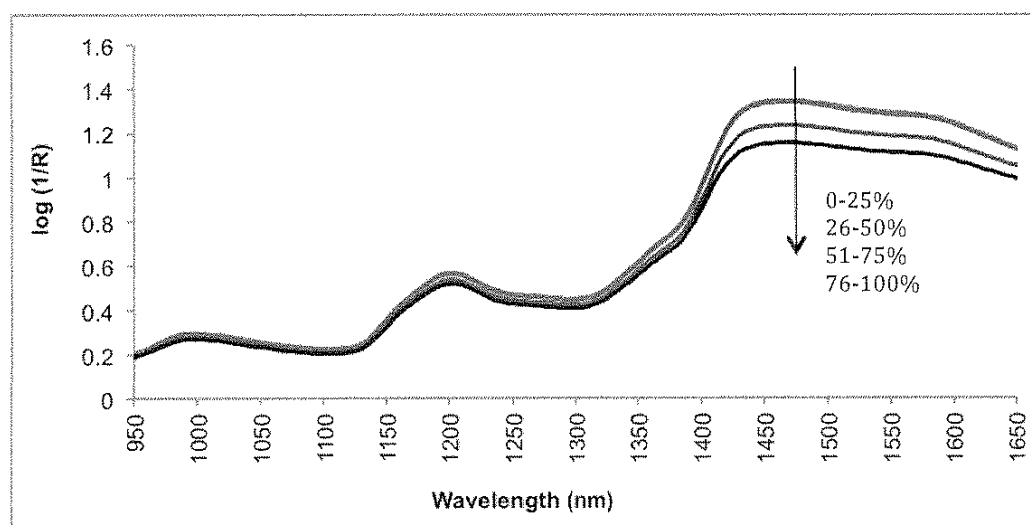
3.4 การสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายระดับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1

นำข้อมูลจากการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ (ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1) มาตรวจสอบค่าผิดปกติโดยใช้เงื่อนไขรวมทั้งวิธีการสร้างแบบจำลองตามข้อ 2.4

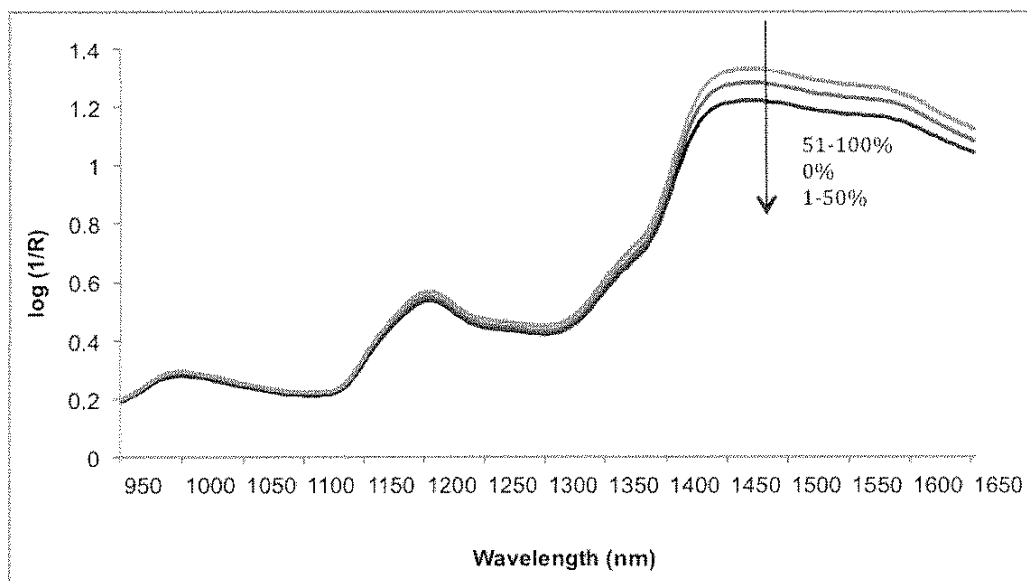
บทที่ 4 ผลการทดลอง

1. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนของราในข้าว

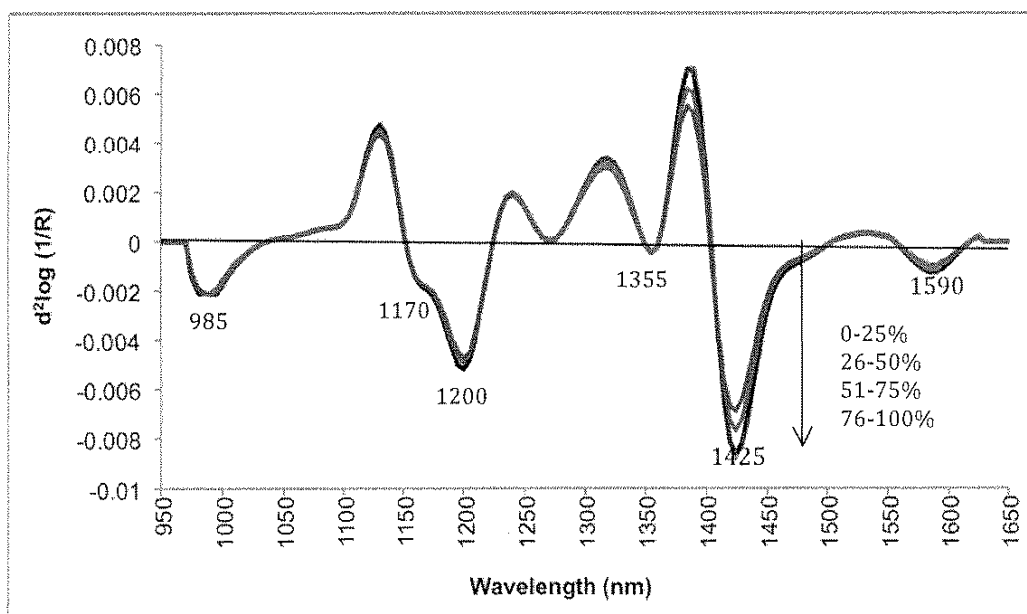
การสแกนตัวอย่างข้าวด้วยคลื่นอินฟราเรดย่านใกล้ (near infrared หรือ NIR) ในช่วงคลื่น 950-1650 นาโนเมตร ได้สเปกตรัมที่ไม่ได้ปรับแต่งแสดงในรูปที่ 1. และรูปที่ 2. และผลของการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี second derivative ก่อนการวิเคราะห์แสดงในรูปที่ 3. สำหรับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด และรูปที่ 4. สำหรับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเชื่อมโยงมเหืองที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 พบว่ากราฟทั้งสี่ (รูปที่ 1., 2., 3. และ 4.) มีความคล้ายคลึงกัน โดยปรากฏพีคทั้งหมด 6 พีคที่ความยาวคลื่น 985-990, 1165-1170, 1200, 1355-1360, 1425, และ 1585-1590 นาโนเมตร (รูปที่ 3. และ 4.) ซึ่งที่ 990 นาโนเมตร เป็นตำแหน่งที่มีการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching second overtone ที่เป็นองค์ประกอบของแป้ง (Osborne and Fearn, 1986), พีคที่ 1200 นาโนเมตร อาจเป็นความยาวคลื่น 1195 นาโนเมตร ที่ขยับมาซึ่งเป็นการสั่นสะเทือนของพันธะ C-H stretching second overtone ของ CH_3 (Osborne and Fearn, 1986) ซึ่งหมู่ฟังก์ชัน CH_3 พบได้ในโครงสร้างของโคตินซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของผนังเซลล์ของรา (รูปที่ 5.), พีคที่ 1425 นาโนเมตรอาจเป็นความยาวคลื่น 1450 นาโนเมตร ซึ่งเป็นการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching first overtone ของแป้งและน้ำ (Osborne and Fearn, 1986) ที่ขยับมาจะเห็นว่ามีการเรียงลำดับของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (% infection) ของราทั้งหมดซึ่งยืนยันให้เห็นว่าความชื้นในข้าวมีผลต่อการติดเชื้อรา, และพีคที่ความยาวคลื่น 1585 นาโนเมตร เป็นพีคที่พบการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching first overtone ของโมเลกุลแป้งและกลูโคส (Osborne and Fearn, 1986)



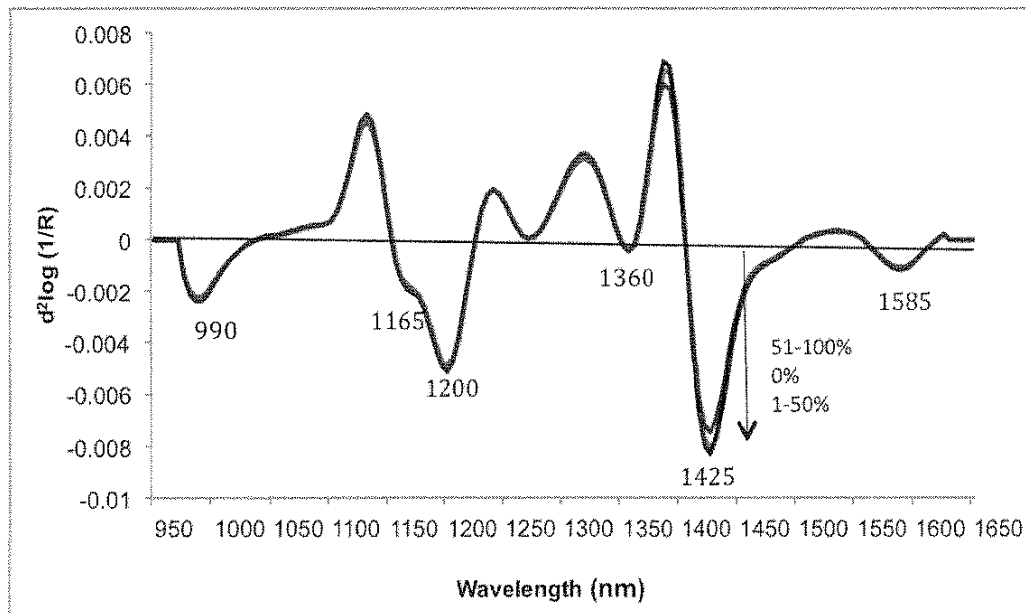
รูปที่ 1. สเปกตรัมของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (% infection) ของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าว



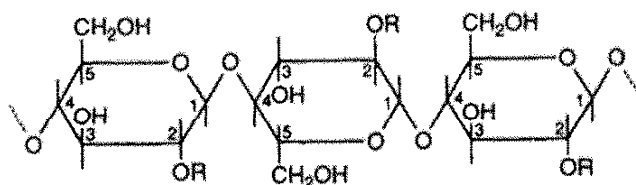
รูปที่ 2. สเปกตรัมของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (% infection) ของราเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าว



รูปที่ 3. Second derivative ของสเปกตรัมของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (% infection) ของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าว



รูปที่ 4. Second derivative ของสเปกตรัมของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (% infection) ของราเชื้อยีสในตัวอย่างข้าว



รูปที่ 5. โครงสร้างของโคทิน เมื่อ R คือ $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$ (Carlile et al., 2001)

จากตารางที่ 1. และ ตารางที่ 2. แสดงข้อมูลทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด และปริมาณราทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเชื้อยีสและปริมาณราเชื้อยีสตามลำดับ โดยแบ่งเป็นสองกลุ่ม คือ Calibration set และ Prediction set

ตารางที่ 1. ข้อมูลทางสถิติของราทั้งหมดจากตัวอย่างข้าว

Parameters	Calibration set					Prediction set				
	n	min	max	mean	SD	n	min	max	mean	SD
% infection	222	0	100	50.387	39.844	93	0	100	50.828	39.583
CFU	222	0	1.375E+05	5.713E+03	2.085E+04	93	0	1.045E+05	1.099E+03	1.809E+04

ตารางที่ 2. ข้อมูลทางสถิติของราเชื้อวมเห็องจากตัวอย่างข้าว

Parameters	Calibration set					Prediction set				
	n	min	max	mean	SD	n	min	max	mean	SD
% infection	222	0	100	8.301	20.849	93	0	100	7.698	19.542
CFU	222	0	7.900E+04	2.320E+03	1.140E+04	93	0	5.000E+04	1.574E+03	8.297E+03

ตารางที่ 3. และ ตารางที่ 4. แสดงผลของการทำ PLS regression สำหรับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดและปริมาณราทั้งหมดตามลำดับ พบว่าแบบจำลองในการทำนายเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดที่ดีที่สุดได้จากสเปกตรัมที่ไม่ผ่านการปรับแต่ง (Raw spectra) โดยมีค่า Correlation coefficient (r), Standard error of calibration (SEC) และ Bias คือ 0.747, 26.491% และ -0.0008% ตามลำดับ ให้ผลการทำนายได้ดีและแม่นยำ โดยมีค่า Correlation coefficient (r), Standard error of prediction (SEP) และ Bias สำหรับการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด คือ 0.688, 28.874% และ -0.101% ตามลำดับ ในขณะที่แบบจำลองในการทำนายปริมาณราทั้งหมดนั้นให้ผลการทำนายที่ไม่ดีนัก

ตารางที่ 3. ผลของการทำ PLS regression สำหรับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (% infection) ของราทั้งหมด

Pretreatment	PCs	Calibration			Prediction			RPD	RER
		r	SEC	Bias	r	SEP	Bias		
Raw spectra	11	0.747	26.491	-0.0008	0.688	28.874	-0.101	1.371	3.463
Multiplicative scatter correction (MSC)	2	0.576	32.562	1.280E-06	0.510	34.223	0.130	1.157	2.922
Mean Normalization	1	0.546	33.374	-1.306E-06	0.455	35.436	-0.138	1.117	2.822
Max Normalization	1	0.543	33.464	-5.155E-07	0.455	35.409	-0.225	1.118	2.824
Range Normalization	1	0.545	33.416	-2.749E-07	0.442	35.759	0.152	1.107	2.797
1 st Derivative (11 point)	8	0.706	28.237	1.905E-05	0.685	28.944	0.221	1.368	3.455
1 st Derivative (21 point)	3	0.623	31.177	3.394E-06	0.570	32.681	-0.263	1.211	3.060
2 nd Derivative (11 point)	5	0.668	29.659	-1.882E-06	0.650	30.178	-0.157	1.312	3.314
2 nd Derivative (21 point)	7	0.687	28.965	-2.099E-05	0.656	30.025	0.212	1.318	3.331
Baseline	9	0.727	27.378	0.0003	0.701	28.249	-0.803	1.401	3.540
Standard normal variate (SNV)	2	0.576	32.562	-1.423E-05	0.510	34.223	0.128	1.157	2.922
SNV+Detrending (SNVD)	3	0.578	32.514	-5.928E-07	0.515	34.072	-0.183	1.162	2.935
Detrending	8	0.721	27.610	-8.282E-05	0.706	28.068	-1.746	1.410	3.563

ตารางที่ 4. ผลของการทำ PLS regression สำหรับจำนวนราทั้งหมด (CFU/g)

Pretreatment	PCs	Calibration			Prediction			RPD	RER
		r	SEC	Bias	r	SEP	Bias		
Raw spectra	4	0.397	19135.520	0.011	0.306	17763.260	1536.893	1.019	5.883
Multiplicative scatter correction (MSC)	3	0.356	19486.350	-0.005	0.217	18335.020	1206.588	0.987	5.699

ตารางที่ 5. และ ตารางที่ 6. แสดงผลของการทำ PLS regression สำหรับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเขียวอมเหลืองที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 และปริมาณราเขียวอมเหลืองที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซิน ปี 1 ตามลำดับ พบว่าแบบจำลองในการทำนายเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเขียวอมเหลืองที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ที่ดีที่สุดได้จากการพัฒนาสเปกตรัมด้วยวิธีแบบ Max Normalization โดยมีค่า Correlation coefficient (r), Standard error of calibration (SEC) และ Bias คือ 0.660, 15.668% และ -0.002% ตามลำดับ ให้ผลการทำนายได้ตีปานกลาง โดยมีค่า Correlation coefficient (r), Standard error of prediction (SEP) และ Bias สำหรับการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด คือ 0.437, 18.723% และ 4.613% ตามลำดับ ในขณะที่แบบจำลองในการทำนายปริมาณราทั้งหมดนั้นให้ผลการทำนายที่ไม่ดีนัก

ตารางที่ 5. ผลของการทำ PLS regression สำหรับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (% infection) ของราเขียวอมเหลือง

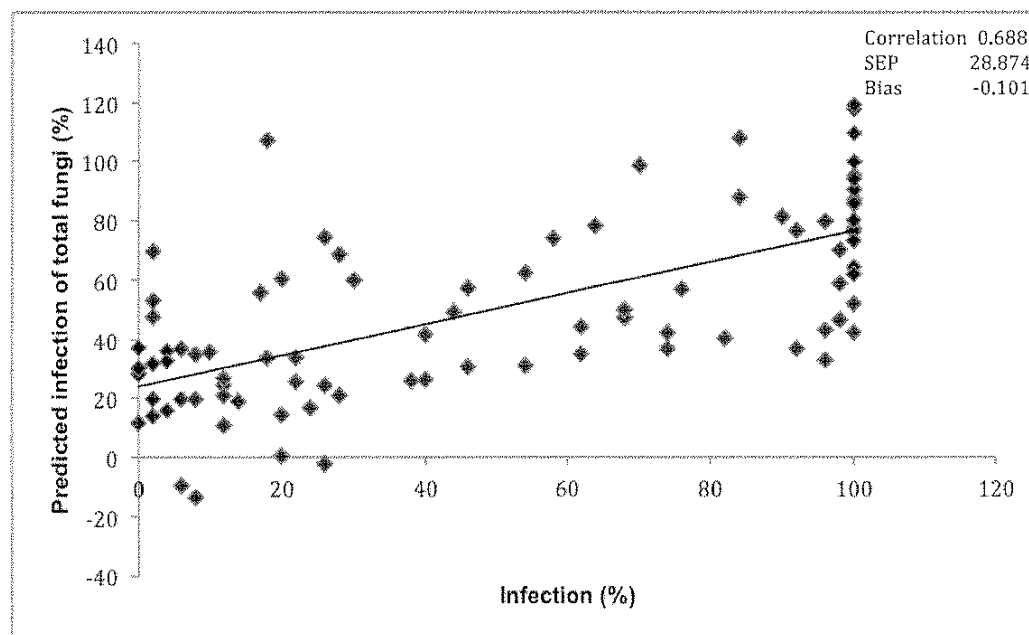
Pretreatment	PCs	Calibration			Prediction			RPD	RER
		r	SEC	Bias	r	SEP	Bias		
Raw spectra	6	0.415	18.970	1.378E-05	0.423	17.712	2.848	0.435	5.646
Multiplicative scatter correction (MSC)	12	0.658	15.693	-0.0002	0.430	18.808	4.505	0.409	5.317
Mean Normalization	12	0.651	15.831	-9.924E-05	0.429	18.740	4.552	0.411	5.336
Max Normalization	13	0.660	15.668	-0.002	0.437	18.723	4.613	0.411	5.341
Range Normalization	7	0.436	18.760	-0.0002	0.380	18.181	2.614	0.424	5.500
1 st Derivative (11 point)	14	0.622	16.326	-9.865E-06	0.457	18.066	4.870	0.426	5.535
1 st Derivative (21 point)	13	0.588	16.867	-0.0001	0.415	18.297	4.368	0.421	5.465
2 nd Derivative (11 point)	4	0.419	18.932	3.808E-06	0.446	17.506	2.145	0.440	5.713
2 nd Derivative (21 point)	4	0.408	19.035	-3.018E-06	0.430	17.653	2.393	0.436	5.665
Baseline	5	0.411	19.010	-4.052E-05	0.422	17.723	2.719	0.434	5.643
Standard normal variate (SNV)	12	0.646	15.908	-0.0004	0.475	17.926	3.604	0.430	5.579
SNV+Detrending (SNVD)	6	0.434	18.783	4.773E-06	0.392	18.170	2.130	0.424	5.504
Detrending	6	0.429	18.829	2.902E-06	0.419	17.767	2.852	0.433	5.629

ตารางที่ 6. ผลของการทำ PLS regression สำหรับจำนวนราเขียวอมเหลือง (CFU/g)

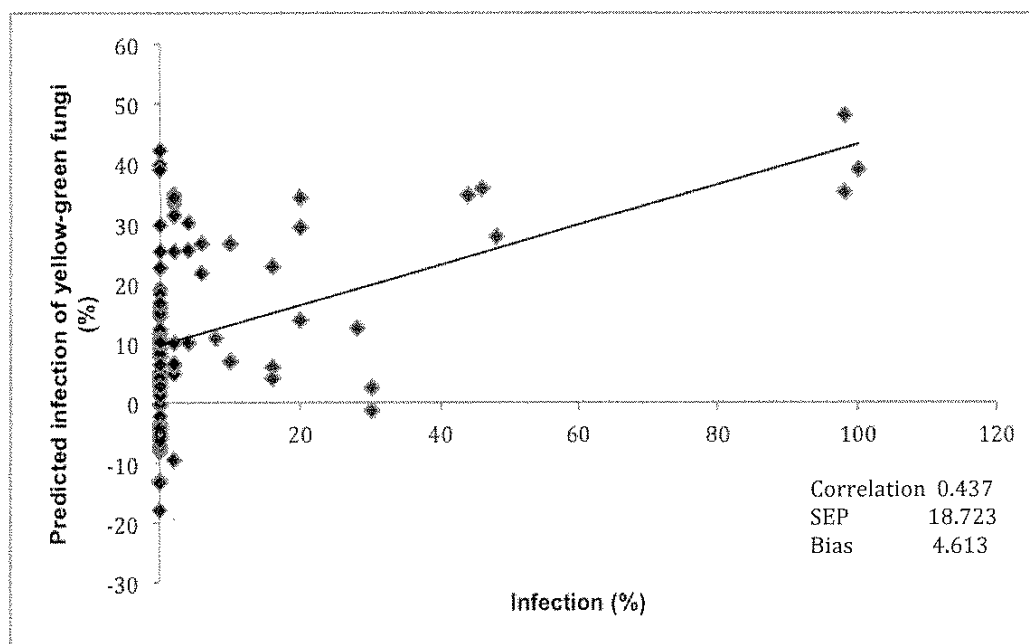
Pretreatment	PCs	Calibration			Prediction			RPD	RER
		R	SEC	Bias	R	SEP	Bias		
Raw spectra	3	0.238	11076.480	-0.0004	0.264	8021.542	449.085	1.034	6.233
Multiplicative scatter correction (MSC)	2	0.201	11171.030	0.003	0.275	7977.208	292.162	1.040	6.268

รูปที่ 6. และ รูปที่ 7. แสดงการเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าว ระหว่างค่าได้วิเคราะห์จริงกับค่าที่ได้จากการทำนายจากแบบจำลองด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี รูปที่ 8. และ รูปที่ 9. แสดง regression coefficient ที่ได้จากการทำ PLSR ของเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเขียวอมเหลืองที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินปี 1 ตามลำดับ พบว่ากราฟทั้งสองปรากฏ

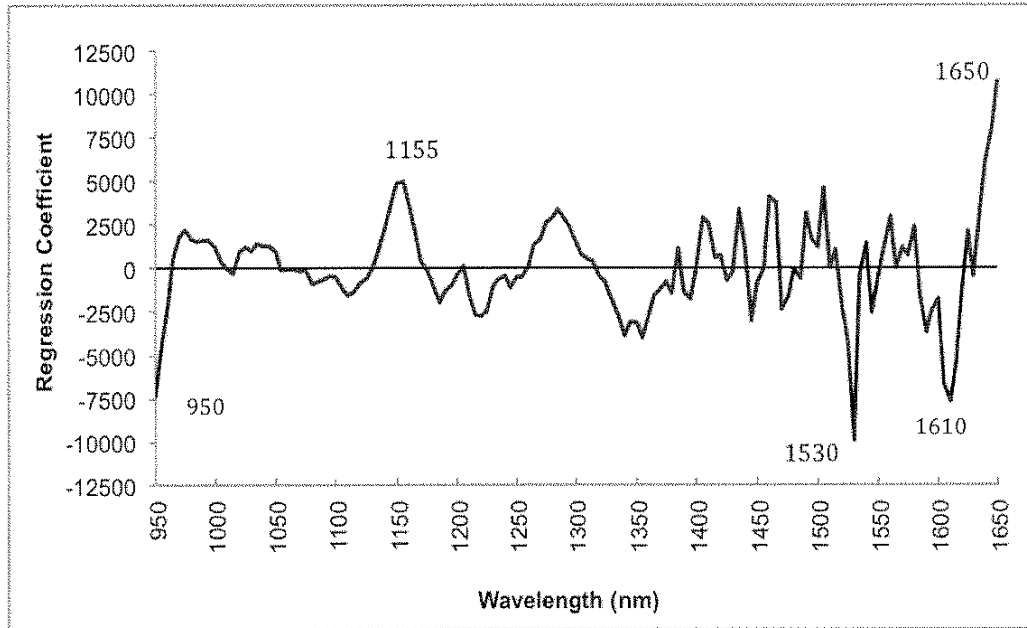
ฟีดบางฟีดที่ใกล้เคียงกัน เช่นที่ 950, 1155, 1530-1540 และ 1610 นาโนเมตร แสดงถึงการดูดซับคลื่นที่ฟีดดังกล่าวมีผลอย่างมากต่อการทำนายค่าทั้งสอง



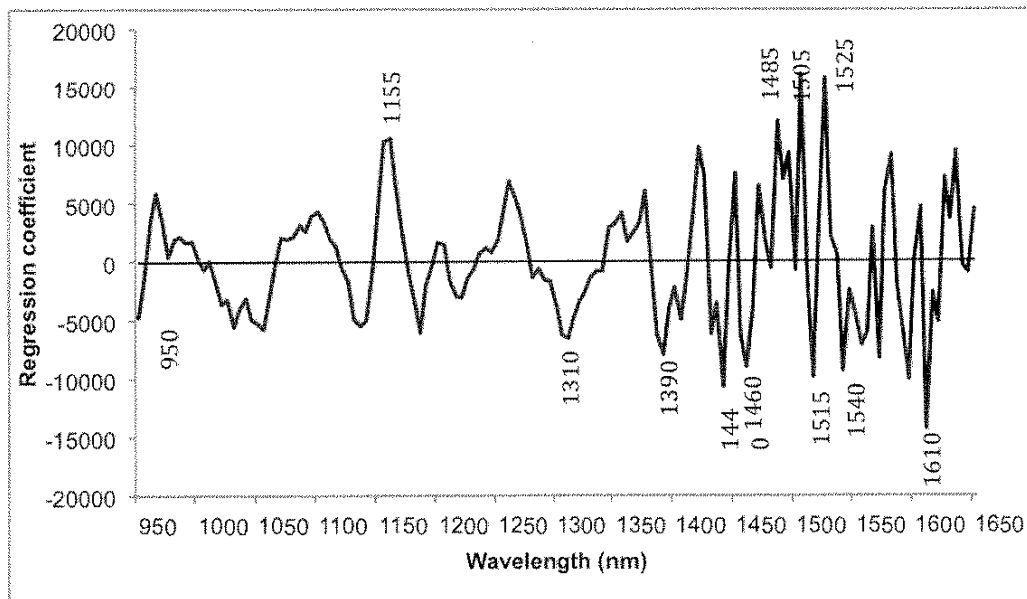
รูปที่ 6. การเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดในตัวอย่างข้าว ระหว่างค่าที่ได้จากการวัดจริงกับค่าที่ได้จากการทำนายด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี



รูปที่ 7. การเปรียบเทียบค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าว ระหว่างค่าที่ได้จากการวัดจริงกับค่าที่ได้จากการทำนายด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี



รูปที่ 8. ค่า Regression coefficient ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของแบบจำลองเพื่อวัดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (% infection) ของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าว



รูปที่ 9. ค่า Regression coefficient ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของแบบจำลองเพื่อวัดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (% infection) ของราเขียวอมเหลืองในตัวอย่างข้าว

2. การสร้างแบบจำลองเพื่อการวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของรา

จากผลการทดลองในข้อ 1 เมื่อวิเคราะห์ผลและสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายความสัมพันธ์ระหว่างการดูดกลืนแสงกับค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดและราเชื้อยวมเหลือง และปริมาณราทั้งหมดและราเชื้อยวมเหลืองในตัวอย่างข้าว พบว่าแบบจำลองในการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของราทั้งหมดในตัวอย่างข้าวที่สร้างจากสเปกตรัมที่ไม่ผ่านการปรับแต่งให้การทำนายได้ดี และแม่นยำ ซึ่งให้เห็นว่าแบบจำลองนี้มีความเป็นไปได้ในการพัฒนาและปรับใช้ได้จริงในการตรวจหาการปนเปื้อนของราในตัวอย่างข้าว ดังนั้นจึงนำแบบจำลองนี้มาวิเคราะห์เชิงคุณภาพเพื่อการแบ่งกลุ่มการปนเปื้อนของราทั้งหมด โดยนำข้อมูลกลุ่มสร้างแบบจำลองการปนเปื้อนของราจากค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดมาแบ่งกลุ่มเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของราทั้งหมด อยู่ในช่วง 0-25%

กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของราทั้งหมด อยู่ในช่วง 26-50%

กลุ่มที่ 3 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของราทั้งหมด อยู่ในช่วง 51-75%

กลุ่มที่ 4 ตัวอย่างที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของราทั้งหมด อยู่ในช่วง 76-100%

แล้วสร้าง Classification model โดยวิธี PCA (Principle Component Analysis), SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy) และ PLS-DA (Partial Least Square-Discriminant Analysis) เมื่อได้แบบจำลองแล้วนำกลุ่มทำนายมาทดสอบความแม่นยำของแบบจำลอง คัดเลือกแบบจำลองที่ได้จากวิธีที่ดีที่สุดด้วยเงื่อนไขค่าเปอร์เซ็นต์การแบ่งกลุ่มถูกต้องสูงที่สุด

ผลการแบ่งกลุ่มของการปนเปื้อนของราจากเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดด้วยวิธี SIMCA และ PLS-DA แสดงไว้ใน ตารางที่ 7. และ ตารางที่ 8. ตามลำดับ การแบ่งกลุ่มด้วยวิธี SIMCA แบบจำลองทั้งหมดที่สร้างขึ้นนั้นยังมีเปอร์เซ็นต์การทำนายที่ไม่แม่นยำ เมื่อเทียบกับการแบ่งกลุ่มด้วยวิธี PLS-DA ที่มีเปอร์เซ็นต์การทำนายถูกต้องโดยรวม 57.07- 83.78 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า การแบ่งกลุ่มเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดในข้าวด้วยวิธี PLS-DA มีเปอร์เซ็นต์การทำนายโดยรวมดีที่สุด จากตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่า หากใช้แบบจำลองแต่ละกลุ่มทำนายการแบ่งกลุ่ม สามารถทำนายกลุ่มการติดเชื้อรา 0-25% ได้ถูกต้องถึง 93.06% แต่ทำนายกลุ่ม 76-100% ได้ถูกต้องเป็นลำดับที่สอง (81.06%) ส่วนกลุ่ม 51-75% และ 76-100% มีจำนวนตัวอย่างน้อยกว่ามาก จึงอาจเป็นสาเหตุให้ทำนายได้ถูกต้องน้อยลง ดังนั้นการนำแบบจำลองไปประยุกต์ใช้จริงจะใช้ได้เมื่อมีการติดเชื้อราในช่วง 0-25% และ 76-100%

ตารางที่ 7. ผลการทำนายเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดในข้าวโดยวิธี SIMCA

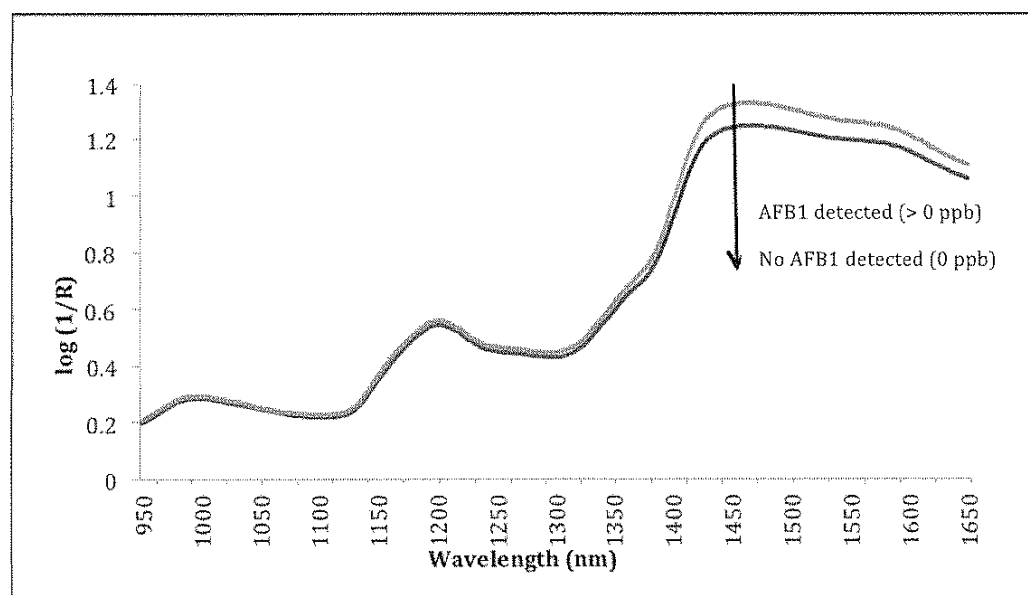
%infection	Number	Model			
		0-25%	26-50%	51-75%	76-100%
0-25%	36	88.89	8.33	8.33	11.11
26-50%	9	11.11	100.00	0	55.56
51-75%	9	22.22	11.11	100.00	0
76-100%	33	60.61	45.45	24.24	75.76
% overall correct classification		45.71	41.22	33.14	35.61

ตารางที่ 8. ผลการทำนายเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดในข้าวโดยวิธี PLS-DA

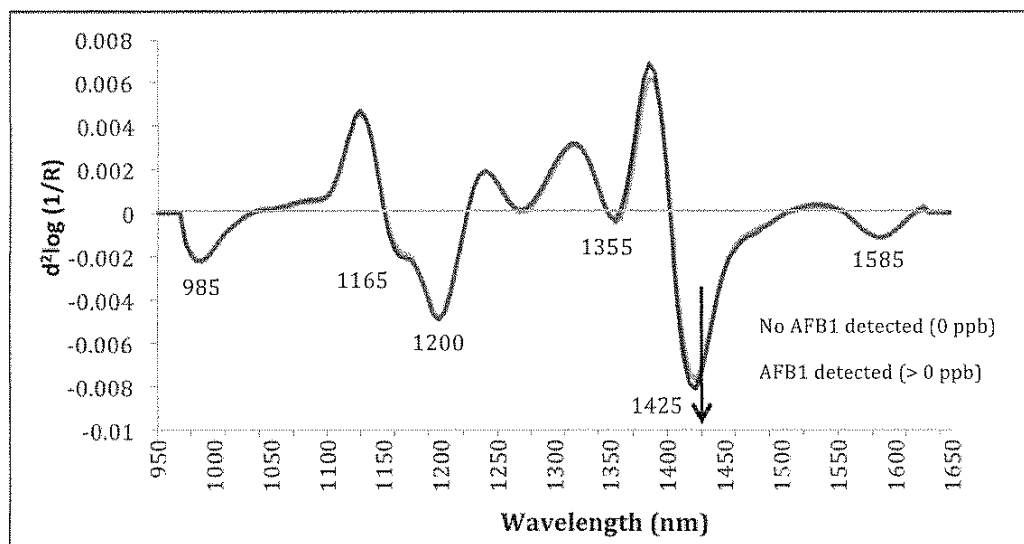
%infection	Number	Model				% correct classification
		0-25%	26-50%	51-75%	76-100%	
0-25%	36	80.56	100.00	100.00	91.67	93.06
26-50%	9	0	0	100.00	100.00	50.00
51-75%	9	77.78	100.00	0	88.89	66.67
76-100%	33	69.70	100.00	100.00	54.55	81.06
% overall correct classification		57.07	75.00	75.00	83.78	

3. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าว

การสแกนตัวอย่างข้าวด้วยคลื่นอินฟราเรดย่านใกล้ (near infrared หรือ NIR) ในช่วงคลื่น 950-1650 นาโนเมตร ได้สเปกตรัมที่ไม่ได้ปรับแต่งแสดงในรูปที่ 10. และผลของการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี second derivative ก่อนการวิเคราะห์แสดงในรูปที่ 11. พบว่ากราฟทั้งสอง (รูปที่ 10., และ 11.) มีความคล้ายคลึงกันกับรูปที่ 1., 2., 3., และ 4. โดยปรากฏพีคทั้งหมด 6 พีคที่ความยาวคลื่น 985-990, 1165-1170, 1200, 1355-1360, 1425, และ 1585-1590 นาโนเมตร (รูปที่ 11.)



รูปที่ 10. สเปกตรัมของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าว



รูปที่ 11. Second derivative (21 point) ของสเปกตรัมของการดูดกลืนคลื่นเนียร์อินฟราเรดของปริมาณ อะฟลาทอกซินบี 1

จากตารางที่ 9. แสดงข้อมูลทางสถิติของปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวทั้งหมด โดยแบ่งเป็นสองกลุ่ม คือ Calibration set และ Prediction set แต่เนื่องจากตัวอย่างจริงที่พบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินมีจำนวนน้อย จึงใช้ข้อมูลของตัวอย่างทั้งหมดสำหรับสร้างแบบจำลอง (calibration model) และทดสอบสมการ (cross validation) ตารางที่ 10 แสดงผลของการทำ PLS regression สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าว รวมถึงการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีต่างๆ พบว่าแบบจำลองที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 สร้างจากสเปกตรัม NIR ที่ปรับแต่งด้วยวิธี Standard normal variate (SNV) ร่วมกับ Detrending (SNVD) ใช้ 8 แฟกเตอร์ ให้ค่า Correlation coefficient (r), Root mean square error of calibration (RMSEC) และ Bias คือ 0.9662, 1.6952 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 5.5270E-06 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ให้ผลการทำนายได้ดีและแม่นยำที่สุด โดยมีค่า Correlation coefficient (r), Root mean square error of cross validation (RMSECV) และ Bias สำหรับการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 คือ 0.9573, 1.9024 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ -0.0040 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ จากผลในตารางที่ 10. สมการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวให้ค่าสถิติใกล้เคียงกันมาก ทั้งค่า r และ RMSECV

ตารางที่ 9. ข้อมูลทางสถิติของปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าว

	n	min	max	mean	SD
All samples	210	0.0000	41.9900	2.2019	6.5949
Calibration set	150	0.0000	41.9900	2.5924	7.4102
Prediction set	60	0.0000	17.7600	1.2257	3.7466

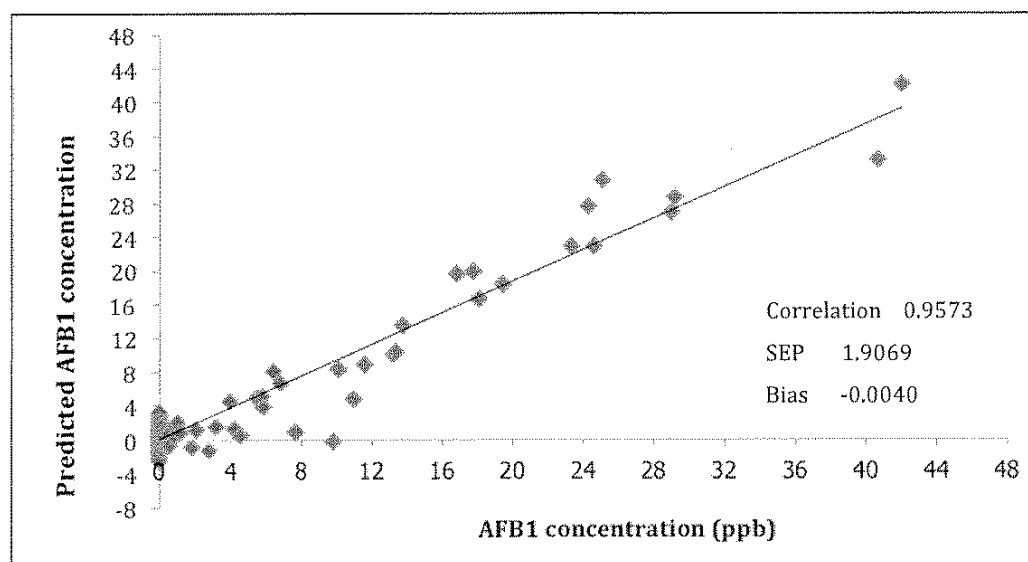
ตารางที่ 10. ผลของการทำ PLS regression จากตัวอย่างทั้งหมด สำหรับปริมาณอะฟลาทอกซินบี

1

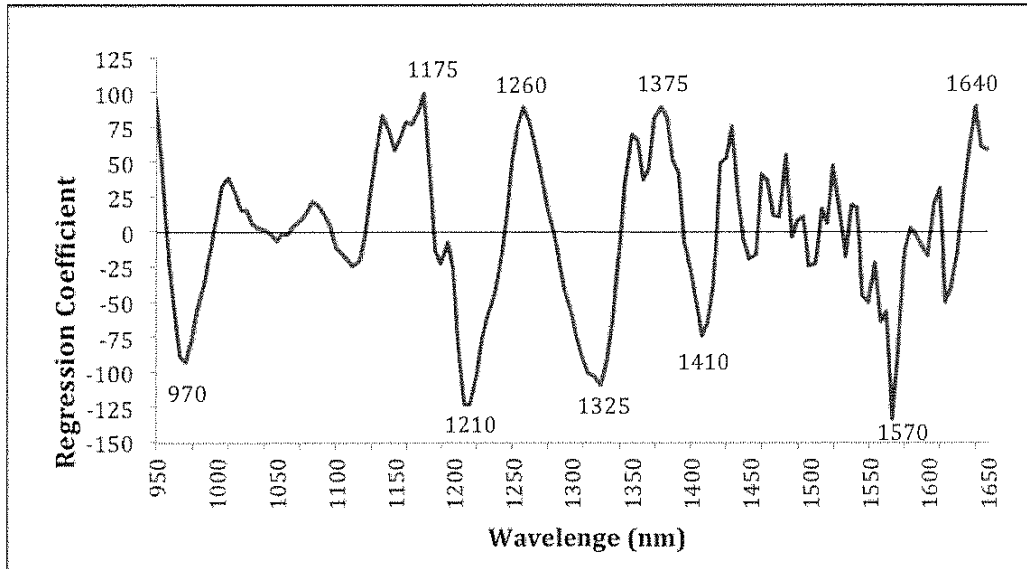
Pretreatment	PC	Calibration			Prediction			RPD	RER
		r	RMSEC	Bias	r	RMSEP	Bias		
Raw spectra	10	0.9618	1.8015	8.6980E-06	0.9463	2.1333	0.0146	3.0914	19.6828
Multiplicative scatter correction (MSC)	7	0.9582	1.8831	2.2020E-05	0.9496	2.0634	-0.0274	3.1962	20.3501
Mean Normalization	9	0.9635	1.7618	-2.9960E-05	0.9527	1.9998	0.0037	3.2978	20.9975
Max Normalization	9	0.9624	1.7869	8.8030E-06	0.9521	2.0133	-0.0045	3.2756	20.8558
Range Normalization	7	0.9546	1.9590	-1.7520E-05	0.9474	2.1071	-0.0037	3.1298	19.9275
1 st Derivative (11 point)	9	0.9585	1.8658	1.4630E-06	0.9456	2.1441	0.0019	3.0758	19.5840
1 st Derivative (21 point)	6	0.9388	2.3022	3.9260E-06	0.9221	2.5486	0.0289	2.5877	16.4759
2 nd Derivative (11 point)	9	0.9649	1.7269	-1.8700E-06	0.9502	2.0532	0.0124	3.2120	20.4511
2 nd Derivative (21 point)	9	0.9597	1.8488	2.3350E-06	0.9461	2.1355	0.0148	3.0882	19.6625
Baseline	11	0.9705	1.5861	-2.8070E-06	0.9572	1.9079	-0.0036	3.4566	22.0084
Standard normal variate (SNV)	7	0.9583	1.8804	6.6170E-06	0.9497	2.0600	-0.0245	3.2014	20.3834
SNV+Detrending (SNVD)	8	0.9662	1.6952	5.5270E-06	0.9573	1.9024	-0.0040	3.4666	22.0721
Detrending	8	0.9597	1.8495	-6.4020E-06	0.9453	2.1499	0.0032	3.0675	19.5307

รูปที่ 12. แสดงการเปรียบเทียบค่าปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวระหว่างค่าที่ได้วิเคราะห์จริงกับค่าที่ได้จากการทำนายจากแบบจำลองด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

รูปที่ 13 แสดง regression coefficient ที่ได้จากการทำ PLS regression ของปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ปรากฏพิกัดที่มีผลอย่างมากต่อการทำนายค่าดังกล่าว ได้แก่ที่ 970, 1175, 1210, 1260, 1325, 1327, 1410, 1570 และ 1640



รูปที่ 12. การเปรียบเทียบปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าว ระหว่างค่าที่ได้จากการวัดจริงกับค่าที่ได้จากการทำนายด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี



รูปที่ 13. ค่า Regression coefficient ที่ความยาวคลื่นต่างๆ ของแบบจำลองเพื่อวัดปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าว

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

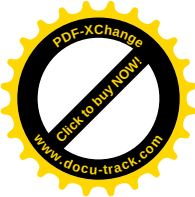
จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการตรวจหาการปนเปื้อนของราและอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าว โดยการตรวจวัดสเปกตรัมของตัวอย่างข้าวที่ใช้ศึกษาด้วยวิธีการสะท้อนแบบแพร่ จำนวน 106 ตัวอย่าง (สำหรับการปนเปื้อนรา) และ 105 ตัวอย่าง (สำหรับการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1) สเปกตรัมที่ได้มีพีคที่ 1450 นาโนเมตร เป็นการสั่นสะเทือนของพันธะ O-H stretching first overtone ของน้ำและแป้ง (รูปที่ 3., รูปที่ 4., การปนเปื้อนของรา และรูปที่ 11. การปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1) มีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราและปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ซึ่งยืนยันว่าความชื้นและแป้งมีผลกระทบต่อการเข้าทำลายของราและการสร้างสารพิษ ซึ่งความชื้นของอาหารเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารพิษจากรา (Pitt and Hocking, 2009)

จากนั้นนำเส้นสเปกตรัมแบบการดูดกลืนแสงที่ได้ไปวิเคราะห์ และสร้างแบบจำลองทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรา (% infection) และปริมาณราในข้าว (CFU/g) ด้วยวิธี Partial least square regression (PLSR) พบว่าแบบจำลองในการทำนายเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมดที่สร้างจากสเปกตรัมที่ไม่ผ่านการจัดการทางคณิตศาสตร์ให้ผลการทำนายได้ดีและแม่นยำมากที่สุด โดยมีค่า Correlation coefficient (r), Standard error of prediction (SEP) และ Bias สำหรับการทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด คือ 0.668, 28.874% และ -0.101% และสำหรับทำนายค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 คือ 0.437, 18.066% และ 4.613% ตามลำดับ ซึ่งผลการทำนายต่ำกว่าค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อราทั้งหมด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการกระจายของกลุ่มตัวอย่างที่ไม่ดี จำนวนตัวอย่างที่มีการติดเชื้อราที่คาดว่าจะผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 มีน้อยเกินไปและค่าเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อที่ต่ำเกินไป (ค่าเฉลี่ย = 7.698%) ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในการวิเคราะห์ระดับการปนเปื้อนของราที่ผลิตอะฟลาทอกซินบี 1 ในข้าวได้ อย่างไรก็ตามแบบจำลองนี้มีโอกาสที่จะพัฒนาให้ดีขึ้นโดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นและเพิ่มการตรวจวัดสเปกตรัมเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีในช่วงความยาวคลื่น 700-2500 นาโนเมตร ซึ่งครอบคลุมช่วงคลื่นสั้นและช่วงคลื่นยาวของเนียร์อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ของความชื้นในตัวอย่างข้าวต่อการปนเปื้อนดังกล่าวด้วย

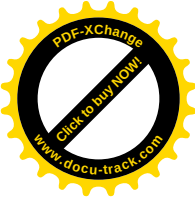
สำหรับแบบจำลองในการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าวให้ผลการทำนายที่ดีมากและความแม่นยำมาก โดยมีค่า Correlation coefficient (r), Root mean square error of cross validation (RMSECV) และ Bias สำหรับการทำนายปริมาณอะฟลาทอกซินบี 1 คือ 0.9573, 1.9024 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ -0.0040 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ค่า r ของแบบจำลองที่ได้บ่งบอกถึงความสามารถของแบบจำลองอยู่ในระดับที่น่าไปทำนายเพื่องานวิจัยและงานทั่วไปหรืออาจเพื่อการประกันคุณภาพ (quality assurance) ได้ (William, 2001) แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงเพื่อตรวจการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินบี 1 ในตัวอย่างข้าว อย่างไรก็ตามแบบจำลองนี้สามารถพัฒนาให้ดียิ่งขึ้นไปอีก โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างจริงที่มีการปนเปื้อนของสารพิษจากราดังกล่าวให้มากขึ้น

รายการอ้างอิง

- บุญหงส์ จงคิด. 2547. ข้าวและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- วารุณี ธนะแพทย์, 2555. สถานการณ์การใช้ประโยชน์เทคโนโลยีสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในประเทศไทย. เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร, 1-1-1-8.
- ศุภรัตน์ โฆษิตเจริญกุล, รัตนา สุทธยาคม และสุชุม ขวัญยืน. 2546. สถานการณ์การเกิดสารพิษจากเชื้อราในข้าวเปลือกและข้าวสาร.งานวิจัยกลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตรกรรมวิชาการเกษตร.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2553. นำเข้าและส่งออกสินค้าที่สำคัญ [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export.php [5 พฤศจิกายน 2553]
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2554. ข้อมูลพื้นฐานทางการเกษตร [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th/main.php?filename=index> [24 พฤศจิกายน 2554]
- สำนักงานส่งเสริมการค้าในต่างประเทศ ณ กรุงโคเปนเฮเกน ประเทศสวีเดน. 2554. รายงานการตรวจพบการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในข้าวกล้องหอมมะลิไทย [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <http://www.mfa.go.th/web/479.php?id=184> [14 ธันวาคม 2554]
- Al-Holy, M.A., Mengshi, L., Cavinato, A.G., Rasco, B.A., 2006. The use of Fourier transform infrared spectroscopy to differentiate *Escherichia coli* O157:H7 from other bacteria inoculated into apple juice. Food Microbiology, 23, 162-168.
- Atkins, S.D., Clark, I.M., 2004. Fungal molecular diagnostic: a mini review. Journal of Applied Genetics 45, 3-15.
- Berardo, N., Pisacane, V., Battilani, P., Scandolara, A., Pietri, A., & Marocco, A., 2005. Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by near-infrared reflectance spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 8128-8134.
- Camps, C., Christen, D., 2009. Non-destructive assessment of apricot fruit quality by portable visible-near infrared spectroscopy. LWT - Food Science and Technology, 42, 1125-1131.
- Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W., 2001. The fungi. 2nd ed. London. Academic Press.
- Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A., 2002. Les mycotoxines : Contaminations omniprésentes dans l'alimentation animales et humaines. La sécurité alimentaire du consommateur, Lavoisier, Tec & doc., Moll & Moll Eds., Paris.



- Chiavaro, E., Lepiani, A., Colla, F., Bettoni, P., Pari, E., Spotti, E., 2002. Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and quick fluorimetric method. *Food additives and Contaminants*, 19, 575-581.
- Dachoupakan Sirisomboon, C., Putthang, R., Sirisomboon, P., 2013. Application of near infrared spectroscopy to detect aflatoxigenic fungal contamination in rice. *Food Control*, 33, 207-214.
- Del Fiore, A., Reverberi, M., Ricelli, A., Pinzari, F., Serranti, S., Fabbri, A.A., Bonifazi, G., Fanelli, C., 2010. Early detection of toxigenic fungi on maize by hyperspectral imaging analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 64-71.
- FAO. 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Bridging the rice yield gap in Thailand [online]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/003/x6905e/x6905e0d.htm> [2010, October 22]
- FAS. 2011. Foreign Agricultural Service. Rice area yield and production world and selected countries and regions [online]. Available from: <http://www.fas.usda.gov> [2011, October 23]
- FAS. 2012. Foreign Agricultural Service. Current World Production, Markets, and Trade Reports [online]. Available from: <http://www.fas.usda.gov/report.asp> [2012, January 10]
- Fernández-ibañez, V., Soldado, A., Martínez-Fernández, A., de la Roza-Delgado, B., 2009. Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B1 in maize and barley as analytical quality assessment. *Food Chemistry*. 113, 629-634.
- Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J., Samson, R.A., 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 59, 1-10.
- Jorgensen, K., 1998. Survey of pock, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, 15, 550-554.
- Kumar, V., Basu, M.S., Rajendran, T.P., 2008. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 27, 891-905.
- Kyodo News, 2008. Food maker detects aflatoxin in Thai rice, prevents shipment. The Japan Times Online. <http://search.japantimes.co.jp/cgi-bin/nn20081220a8.html>.
- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C.M., 2006. Food mycotoxins: An update. *Journal of Food Science*, 71, R51-R56.
- Niessen, L., 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 38-46.
- Osborne, B.G., Fearn, T., 1986. Near infrared spectroscopy in food analysis. *Longman Scientific & Technical*, Yew York, USA.
- Paterson, R.R.M., (2006). Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry*, 41, 1467-1474.



- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 2009. Fungi and food spoilage. 3rd edition, Aspen Publishers, Inc., the United Kingdom.
- Regulation (EU) No 165/2010. Commission Regulation (EC) No 165/2010 of 26 February 2010. Amending Regulation (EU) No 1881/2006 Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of The European Union, 27.2.2010, L 50/8-L50/12.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., 2004. Introduction to food borne fungi. 7th edition, Centraalbureau voor Schimmelfcultures, Netherlands.
- Samson, R.A., Hong, S.B., Frisvad, J.C., 2006. Old and new concept of species differentiation in *Aspergillus*. Medical Mycology, 44, s133-s148.
- Santos, C., Fraga, M.E., Kozakiewicz, Z., Lima, N., 2010. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. Research in Microbiology 161, 168-175.
- Sirisomboon P., Duangchang J., 2009. Prediction and analysis of peel essential oil of pomelo by NIR spectroscopy. 10th International Conference of Thailand Society of Agricultural Engineering on "Innovations of Agricultural, Food and Renewable Energy Productions for Mankind" 1-3 April 2009, Suranaree University of Technology, THAILAND.
- Sirisomboon P., Howvimanporn S., 2009. Determination of soluble solids of honey by near infrared spectroscopy. 10th International Conference of Thailand Society of Agricultural Engineering on "Innovations of Agricultural, Food and Renewable Energy Productions for Mankind" 1-3 April 2009, Suranaree University of Technology, THAILAND.
- Sirisomboon P., Tanaka M., Fujita S., Kojima T., 2007. Evaluation of pectin constituents of Japanese pear by near infrared spectroscopy, J. Food Engineering 78(2): 701-707.
- Skaug, M.A., 1999. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. Food additives and Contaminants, 16, 75-78.
- Tanaka, K., Sago, Y., Zheng, Y., Nakagawa, H., Kushiro, M., 2007. Mycotoxins in rice. International Journal of food Microbiology, 119, 59-66.
- Tekinsen, K.K., Tekinsen, O.C., 2005. Aflatoxin M1 in white pickle and van otlu (herb) cheeses consumed in southeastern Turkey. Food Control, 16, 565-568.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A., 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. Analytica Chimica Acta, 632, 168-180.
- Zhang, H.J., Wu, J.H., Li, J., Hua Yang, L., Yu, X.Q., Wang, X.S., Chen, L., Mei, H.W., 2007. Comparison of Near Infrared Spectroscopy Models for Determining Protein and Amylose Contents Between Calibration Samples of Recombinant Inbred Lines and Conventional Varieties of Rice. Agricultural Sciences in China, 6, 941-948.



Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ชื่อผู้แต่ง Dachoupan Sirisomboon, C., Putthang, R., Sirisomboon, P.

ชื่อเรื่อง Application of near infrared spectroscopy to detect aflatoxigenic fungal contamination in rice

ชื่อวารสาร Food Control (Impact factor = 2.656)

ปี 2013

เล่มที่ 33

หน้า 207-214

2. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

The World Mycotoxin Forum meets IUPAC 2012 ณ Rotterdam ราชอาณาจักร

จักรเนเธอร์แลนด์ ระหว่างวันที่ 5-9 พฤศจิกายน 2555 ในรูปแบบโปสเตอร์



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont



Application of near infrared spectroscopy to detect aflatoxigenic fungal contamination in rice



C. Dachoupakan Sirisomboon^{a,*}, R. Putthang^a, P. Sirisomboon^b

^a Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phaya Thai Road, 10330 Bangkok, Thailand

^b Curriculum of Agricultural Engineering, Department of Mechanical Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, 10520 Bangkok, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 November 2012

Received in revised form

20 February 2013

Accepted 26 February 2013

Keywords:

Near infrared spectroscopy

Rice

Aflatoxin B₁

Aspergillus

ABSTRACT

The objective of this research was to apply the near infrared spectroscopy (NIRS), with a wavelength range between 950 and 1650 nm, to determine the percentage of fungal infection found in rice samples. The total fungal infection and yellow-green *Aspergillus* infection, which is often indicative of aflatoxigenic fungal infection, are the focus of this research. Spectra were obtained on 106 rice samples, by reflection mode, including 90 naturally contaminated samples, and 16 artificially contaminated samples. Calibration models for the total fungal infection were developed using the original and pretreated absorbance spectra in conjunction with partial least square regression (PLSR). The statistical model developed from the untreated spectra provided the greatest accuracy in prediction, with a correlation coefficient (*r*) of 0.668, a standard error of prediction (SEP) of 28.874%, and a bias of −0.101%. For yellow-green *Aspergillus* infection, the most accurate predictive statistical model was developed using a pretreated (maximum normalization) NIR spectra, with the following statistical characteristics (*r* = 0.437, SEP = 18.723% and bias = 4.613%). Therefore, the result showed that the NIRS could be used to detect aflatoxigenic fungal contamination in rice with caution and the technique should be improved to get better prediction model. However, there is an evident from NIR spectra that the moisture and starch content in rice affects the overall extent of fungal infection.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aflatoxin B₁ (AFB₁) is a naturally occurring mycotoxin that can result in detrimental side effects if consumed by humans or animals. AFB₁ is produced by filamentous fungi corresponding to *Aspergillus* section *Flavi* particularly *Aspergillus flavus* (Godet & Munaut, 2010). AFB₁ is found in a wide range of agricultural products including rice, with greater prevalence in tropical and humid climates (Reddy, Reddy, & Muralidharan, 2009). The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified AFB₁ as a carcinogen for animals and humans (IARC, 1993) and many countries have strict legal regulations concerning AFB₁ contamination in food and agricultural products. Indeed, the European Commission (EU) has fixed the maximum limit for AFB₁ contamination in cereals, grains, beans and groundnuts at 2 µg/kg, while for corn, rice and spices it is set at 5 µg/kg (Regulation (EU) No 165/2010).

The early detection of aflatoxigenic fungal infection in post-harvest or stored cereals and grains represents a key opportunity to reduce the risk of AFB₁ infection from the food chain. As such, various methods have been developed and utilized to determine fungal contamination in food. Traditionally, mycotoxigenic fungal infection in food has been detected using microbiological methods in a laboratory setting. This includes fungal enumerating using plate-counting or direct plating techniques, isolating in appropriate media and identifying the genus and species level by morphological characterization, including macroscopic characters (color, size, colony appearance) and microscopic characters (conidia, conidiophore, conidial heads) (Samson, Hoekstra, & Frisvad, 2004, p. 64, 2006; Pitt & Hocking, 2009, p. 19). However, these methods are time consuming, requiring a well equipped laboratory and skilled laboratory staff. There are also difficulties regarding assay standardization and errors arising from contamination (Atkins & Clark, 2004). Currently, the polymerase chain reactions (PCR) method is considered a good alternative option for fungal molecular diagnostics due to high specificity and sensitivity (Niessen, 2007; Paterson, 2006). PCR techniques have been used for classification and identification of *Aspergillus* (Geiser et al., 2007; Samson, Hong, & Frisvad, 2006) and for the detection of these strains from

* Corresponding author. Tel.: +66 2 218 5094; fax: +66 2 252 7576.
E-mail addresses: Cheewanun.D@chula.ac.th, cheewanun@hotmail.com (C. Dachoupakan Sirisomboon).

agricultural samples (Sartori et al., 2006). However, PCR-based techniques have some technical limits due to protocol complexities, reagent costs and the choice of specific primers for each species (Santos, Fraga, Kozakiewicz, & Lima, 2010). Thus, cost effective methods are still highly desirable.

Near-infrared spectroscopy (NIRS) is a powerful technique for characterizing the chemical composition of very complex materials including food and agricultural products. It is a fast, nondestructive, environmental friendly and highly accurate method that requires little expert training. It has been used to analyze proteins in rice (Zhang et al., 2007), sugar content in fruits (Camps & Christen, 2009), pectin in Japanese pears (Sirisomboon, Tanaka, Fujita, & Kojima, 2007) and to detect microorganisms in fruit juices (Al-Holy, Mengshi, Cavinato, & Rasco, 2006). This technique has been successfully applied to detect mycotoxins and mycotoxigenic fungal contamination in agricultural products, including the studies of deoxynivalenol content in wheat kernels (Pettersson & Aberg, 2003), aflatoxins and ochratoxin A in red paprika (Hernández-Hierro, García-Villanova, & González-Martín, 2008) and AFB₁ in maize and barley (Fernández-Ibañez, Soldado, Martínez-Fernández, & de la Roza-Delgado, 2009). Berardo et al. (2005) described the application of NIR to assess maize, detecting the fungal contamination *Fusarium verticillioides*, which can lead to the production of the toxin fumonisin. Singh, Jayas, Paliwal, and White (2012) used a short-wave NIR hyperspectral imaging system in the range of 700–1100 nm to detect storage fungi in wheat, including *Penicillium* spp., *Aspergillus glaucus* and *Aspergillus niger*.

The studies described above collectively show the potential for the development of a NIR method for the detection of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in agricultural products, particularly cereals and cereal products. However, the application of NIRS for detection of aflatoxins and aflatoxigenic fungi in rice has not been reported so far. Thus, the objective of this research was to apply the near infrared spectroscopy (NIRS) to detect the total fungal infection (%) and yellow-green *Aspergillus*, potentially aflatoxigenic fungi, infection (%) in rice samples.

2. Materials and methods

2.1. Samples

2.1.1. Natural infection

Between 1 and 2 kg of rice samples were purchased from different markets and supermarkets in and around Bangkok, as well as at local mills in central Thailand. Ninety separate rice samples were purchased in total, consisting of 30 Jasmine rice samples, 30 white rice samples and 30 brown rice samples.

2.1.2. Artificial infection

Sixteen artificially contaminated rice samples were created by adding droplets of a fungal suspension containing 10^2 , 10^4 , 10^6 and 10^8 spores/ml of *A. flavus* M3T8R4G3 aflatoxigenic strain isolated from rice. The strain was supplied by the culture collection of the Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand. The concentration of fungal suspension of 10^2 , 10^4 , 10^6 and 10^8 spores/ml provided the ranges of percentage of fungal infection of 0–4%, 2–10%, 20–52% and 92–100%, respectively, which was covered the minimum to the maximum of the percentage of fungal infection (0–100%).

2.2. Near-infrared scanning

The 106 separate rice samples (90 natural and 16 artificially contaminated) were subjected to NIR scanning. Each scan consisting of a sample of 150 g of rice being placed in an open cup with

diameter of 75 mm, up to a depth of 25 mm and the sample was then scanned using NIR with a wavelength range of 950–1650 nm by a NIR spectrometer (DA 7200 NIR Diode Array Analyzer, Perten Instruments AB, Sweden) in diffuse reflection mode. Each rice sample was analyzed in triplicate (318 sub-samples). The scanning was done three times on each sub-sample and the average reflection spectra were used for data analysis.

2.3. Reference method

The direct plating method is considered one of the most effective techniques for detecting, enumerating and isolating fungi from particulate food such as grains and nuts (Pitt & Hocking, 2009, p. 19; Samson et al., 2004, p. 64). Thus, the total fungi contamination and yellow-green fungi contamination (representative *Aspergillus* section *Flavi* as aflatoxin B₁ producer) were also determined using this technique for all the rice samples under investigation in this study.

The standard protocol recommended by the International Commission of Food Mycology (ICFM) was used. Fifty rice grains were randomly selected from each rice sample and aseptically put directly onto the surface of a DG18 (Dichloran 18% glycerol agar) culture medium (10 grains/plate). The plates were incubated at 25 °C for 5–7 days. After incubation, the number of infected rice grains was counted and the results were expressed as a percentage. Yellow-green spore-producing filamentous fungi were isolated and identified using the identification key of Samson et al. (2004: p. 64) and Pitt and Hocking (2009: p. 19).

2.4. Data analysis

Prior to the development of the NIR chemometric models, the total fungal infection (%) and the yellow-green *Aspergillus* infection (%) of the 318 reference data were checked for outliers using Eq. (1) (Sirisomboon, Tanaka, Kojima, & Williams, 2012)

$$\frac{x - \bar{x}}{SD} \geq 3 \quad (1)$$

which is the Z score and when the Z score is ≥ 3 , it means that the x value is outside the $\pm 3SD$ range where 99.7% of data is. Then the x value will be considered as outlier. x is the reference value of total fungal infection or yellow-green *Aspergillus* infection, $\bar{x}$ is the average total fungal infection or yellow-green *Aspergillus* infection, and SD is the standard deviation.

All spectral analyses were carried out using The Unscrambler 9.8 (Camo, Norway). The NIR reflection spectra were transformed to absorption spectra and subjected to principal component analysis (PCA) to detect spectrum outliers. Then, the reference data were merged with NIR reflection spectra. The total spectra data were separated into two sets: calibration and prediction sets in ratio of 7:3. The calibration set, both with and without spectral pretreatment, was used to develop partial least square regression (PLSR) models. Two separate models were generated, the first on the total fungal infection (%) and the second on the yellow-green fungal infection (%).

Pretreatment was performed using one of the following methods: multiplicative scatter correction (MSC), normalization (mean, maximum, range), first derivative according to Savitzky–Golay (11 and 21 wavelength points with polynomial order of 2), second derivative according to Savitzky–Golay (11 and 21 wavelength points with polynomial order of 2), standard normal variate (SNV), SNV + detrending (SNVD) and baseline offset.

Independent validation of the calibration models was achieved using the prediction set. The model with the highest correlation (r), lowest standard error of calibration (SEC), standard error of prediction (SEP), and bias was selected as being optimal. The

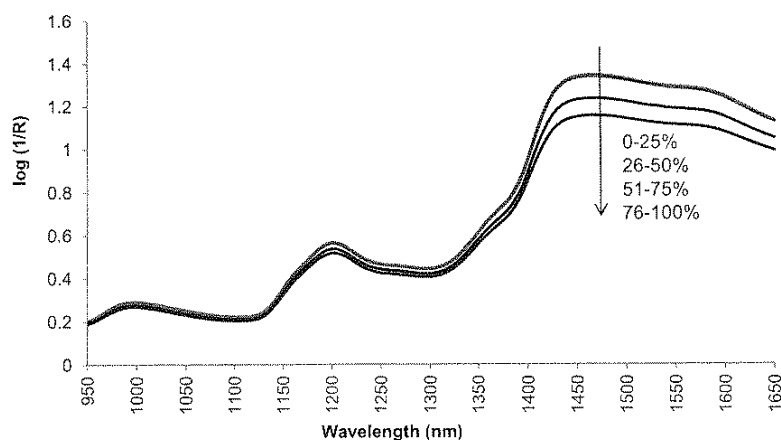


Fig. 1. Average NIR spectra of rice samples, clustered based on the percent total fungal infection present in the sample.

performance of each model was determined by the ratio of the standard deviation of reference data in the validation sample set to the standard error of prediction (RPD), and the ratio of the range to the SEP (RER).

3. Results and discussion

There was no outlier in the reference data. However, three spectral outliers were found and removed. The average NIR spectra of rice samples obtained over a wavelength range between 950 and 1650 nm are reported in Figs. 1 and 2, with the data clustered according to the percentage of infection. Illustrated are the raw absorption spectra without pre-mathematical treatment based on the total fungi infection (%) (Fig. 1) and yellow-green *Aspergillus* infection (%) (Fig. 2). The average NIR spectra of rice pre-treated by applying the second derivative method of Savitzky–Golay at different total fungi infection (%) are shown in Fig. 3, and at different yellow-green fungal infection (%) in Fig. 4. The two figures show 6 similar peaks at 985–990, 1165–1170, 1200, 1355–1360, 1425 and 1585–1590 nm (Figs. 3 and 4). The peak at 990 nm can be assigned to the second overtone from the O–H stretching mode of starch (Osborne & Fearn, 1986, p. 36). The peak at 1200 nm may be a shifted peak corresponding to the overtone from the C–H stretching of a CH₂ group (typically found at 1215 nm) or corresponding to the second overtone of C–H stretching of CH₃ group

(typically found at 1195 nm) (Osborne & Fearn, 1986, p. 36). This functional group is present in the chitin molecule, an important cellular compound that contributes in fungal cell walls (Fig. 5). The peak at 1425 nm may represent a shifted peak of 1450 nm which was corresponding to the absorption band of water and starch, due to corresponding to the first overtone of O–H stretching (Osborne & Fearn, 1986, p. 36). The last observed peak was found at 1585 nm, which could correspond to the absorbance band of starch and glucose molecules. The first overtone of the OH stretching mode is at 1580 nm (Osborne & Fearn, 1986, p. 36). From Figs. 3 and 4, this particular absorbance region correlates most strongly with the total fungal infection (%). This appears to confirm that the moisture and starch content in rice affects the overall extent of fungal infection. The moisture content of substrate is one of the most important factors governing the fungal growth and their mycotoxin production (Pitt & Hocking, 2009, p. 19). In rice grains stored in tropical conditions, *Penicillium*, *Aspergillus* and *Eurotium* are the most common fungi. These species are ubiquitous and often rapid colonizers and so will cause spoilage whenever moisture content too high (Pitt & Hocking, 2009, p. 19). Among the *Aspergilli* isolated from 90 milled rice samples in Brazil, *Aspergillus parasiticus* was the most frequent species isolated from samples with moisture contents of 14–17% and *A. flavus* was the second most frequent species, isolated in samples with 14–16% of moisture content (Almeida, Gambale, Correa, Paula, & Asevedo, 1991). The critical moisture

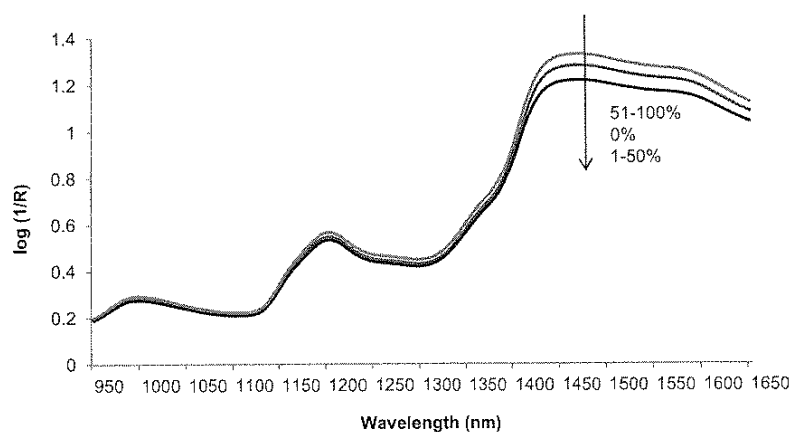


Fig. 2. Average NIR spectra of rice samples, clustered based on the percent yellow-green *Aspergillus* infection present in the sample.

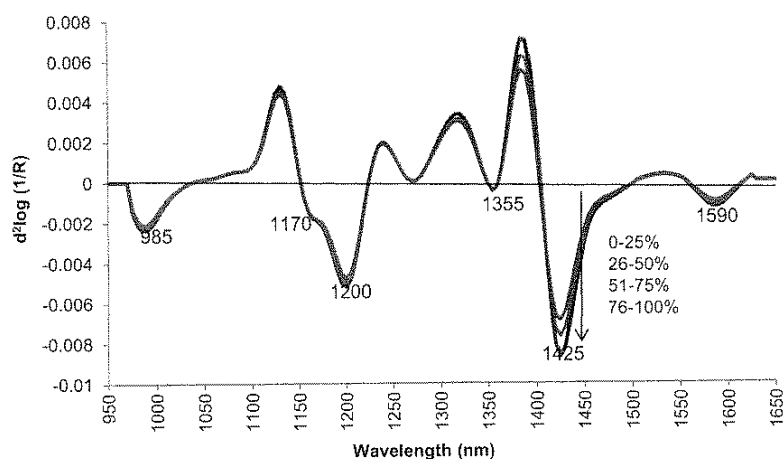


Fig. 3. Average second derivative NIR spectra of rice samples, clustered based on the percent of total fungal infection present in the sample.

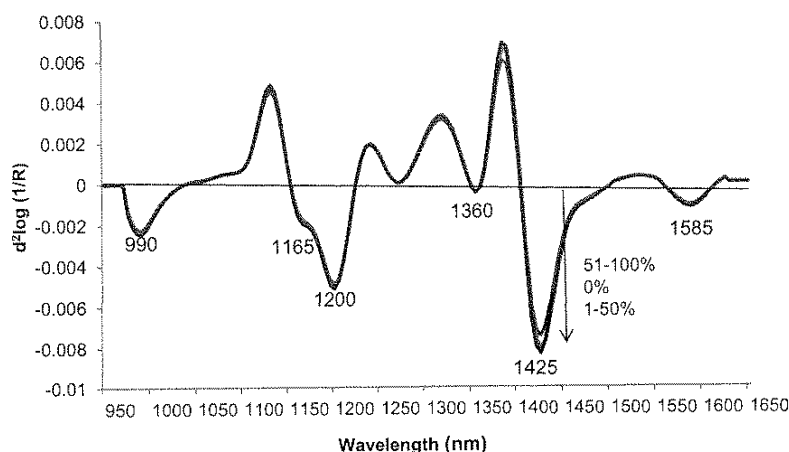


Fig. 4. Average second derivative of NIR spectra of rice samples, clustered based on the percent of yellow-green *Aspergillus* infection present in the sample.

contents to be maintained at 25 °C that will not allow fungal growth were found to be 13.0% for rice grains (Abdullah, Nawawi, & Othman, 2000). Therefore, the low-moisture-content storage can be recognized as a safe storage system (Genkawa, Uchino, Inoue, Tanaka, & Hamanaka, 2008). Fungi cause mainly spoilage of carbohydrate-rich substrate. Rice presents a favorable substrate for fungal growth and toxinogenesis since it is used as a reference culture medium of FDA method to test the toxigenic potential of fungal isolates (Tournas, Stack, Mislivec, Koch, & Bandler, 2001).

Table 1 shows the statistical values of fungal infection (%) (total fungal infection and yellow-green *Aspergillus* infection) within the calibration and prediction sets. Total fungal infection ranged from 0 to 100% for all sets, with a mean of 50.39% for the calibration set and of 50.83% for the prediction set, whereas the means incidence of yellow-green *Aspergillus* of all sets were low, with 8.30% and 7.70% for the calibration and prediction sets, respectively. Table 2 shows PLSR for total fungal infection. The results indicate that the model most capable of predicting total fungal infection (%) is the

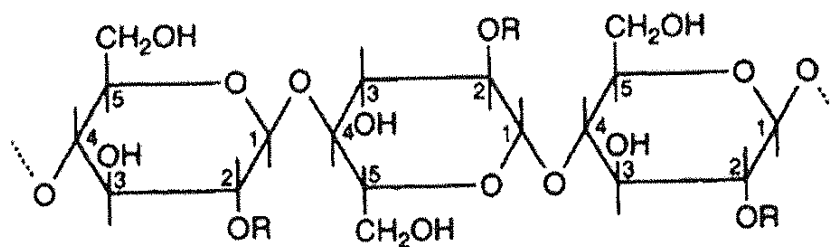


Fig. 5. Chitin structure, R = NH-CO-CH_3 (Carlisle, Watkinson, & Gooday, 2001, p. 99).

Table 1

Percentage infection (total fungi & yellow-green *Aspergillus*) in the calibration and prediction set.

Parameters	Calibration set					Prediction set				
	n	Min	Max	Mean	SD	n	Min	Max	Mean	SD
Total fungi	222	0	100	50.387	39.844	93	0	100	50.828	39.538
Yellow-green fungi	222	0	100	8.301	20.849	93	0	100	7.698	19.542

Table 2

PLS regression results obtained for the total fungal infection model.

Pretreatment	Calibration				Prediction			RPD	RER
	PCs	r	SEC	Bias	r	SEP	Bias		
Raw spectra	11	0.747	26.491	−0.0008	0.688	28.874	−0.101	1.371	3.463
Multiplicative scatter correction (MSC)	2	0.576	32.562	1.280E-06	0.510	34.223	0.130	1.157	2.922
Mean normalization	1	0.546	33.374	−1.306E-06	0.455	35.436	−0.138	1.117	2.822
Max normalization	1	0.543	33.464	−5.155E-07	0.455	35.409	−0.225	1.118	2.824
Range normalization	1	0.545	33.416	−2.749E-07	0.442	35.759	0.152	1.107	2.797
1st derivative (11 point)	8	0.706	28.237	1.905E-05	0.685	28.944	0.221	1.368	3.455
1st derivative (21 point)	3	0.623	31.177	3.394E-06	0.570	32.681	−0.263	1.211	3.060
2nd derivative (11 point)	5	0.668	29.659	−1.882E-06	0.650	30.178	−0.157	1.312	3.314
2nd derivative (21 point)	7	0.687	28.965	−2.099E-05	0.656	30.025	0.212	1.318	3.331
Baseline	9	0.727	27.378	0.0003	0.701	28.249	−0.803	1.401	3.540
Standard normal variate (SNV)	2	0.576	32.562	−1.423E-05	0.510	34.223	0.128	1.157	2.922
SNV + detrending (SNVD)	3	0.578	32.514	−5.928E-07	0.515	34.072	−0.183	1.162	2.935
Detrending	8	0.721	27.610	−8.282E-05	0.706	28.068	−1.746	1.410	3.563

one developed from the raw NIR spectra, without any pre-mathematical treatment. This model uses 11 principal components (PCs), for which r , SEC and bias were 0.747, 26.491% and $−0.0008\%$, respectively. This model was validated and its predictive capacity was checked on the independent prediction set. The r , SEP and bias in prediction of the latter set were 0.688, 28.874% and $−0.101\%$, respectively. The prediction capacity of the model was determined using the ratio performance deviation (RPD) parameter which is defined as the ratio between the standard deviation (SD) of the reference method and the SEP. The RPD and RER values for the prediction set were 1.371 and 3.463, respectively.

The PLSR results obtained for yellow-green *Aspergillus* infection are given in Table 3. The best performing models for predicting yellow-green *Aspergillus* infection were developed from pretreated NIR spectra rather than from the raw data. The best model obtained used the maximum normalization pretreated spectra. It fitted 13 PCs, and the values obtained for r , SEC and bias were 0.660, 15.668% and $−0.002\%$, respectively. The r , SEP and bias found on the independent prediction set were 0.437, 18.723% and 4.613%, respectively. The RPD and RER values for prediction were 0.411 and 5.341, respectively.

Previous studies show the possibility to develop a NIR method to detect mycotoxins and mycotoxigenic fungi in agricultural products, particularly cereals and cereal products. Berardo et al. (2005) described the application of NIR, to detect the contamination of fumonisin producer *F. verticillioides* in maize. The best predictive ability for the percentage of total fungal infection and *F. verticillioides* was obtained using a calibration model utilizing maize kernels ($r^2 = 0.75$ and $SECV = 7.43$) and maize meals ($r^2 = 0.79$ and $SECV = 10.95$), respectively. Singh et al. (2012) used a short-wave NIR hyperspectral imaging system in the short wavelength of 700–1100 nm to detect storage fungi in wheat, including *Penicillium* spp., *A. glaucus* and *A. niger*. The wavelength of 870.0 nm was considered to be significant and was used in feature extraction and classification. The results gave high classification accuracy for identifying fungal-damaged wheat kernels in two-way classification with false positive errors of 6.3–11.3%.

Figs. 6 and 7 show the correlations between the measured reference values (percentage of total fungi infection and yellow-green *Aspergillus* infection, respectively) versus the predicted values from the NIR based PLSR models. Figs. 8 and 9 show the regression coefficients obtained from the PLSR model for total

Table 3

PLS regression results obtained for the yellow-green *Aspergillus* fungal infection model.

Pretreatment	Calibration				Prediction			RPD	RER
	PCs	r	SEC	Bias	r	SEP	Bias		
Raw spectra	6	0.415	18.970	1.378E-05	0.423	17.712	2.848	0.435	5.646
Multiplicative scatter correction (MSC)	12	0.658	15.693	−0.0002	0.430	18.808	4.505	0.409	5.317
Mean normalization	12	0.651	15.831	−9.924E-05	0.429	18.740	4.552	0.411	5.336
Max normalization	13	0.660	15.668	−0.002	0.437	18.723	4.613	0.411	5.341
Range normalization	7	0.436	18.760	−0.0002	0.380	18.181	2.614	0.424	5.500
1st derivative (11 point)	14	0.622	16.326	−9.865E-06	0.457	18.066	4.870	0.426	5.535
1st derivative (21 point)	13	0.588	16.867	−0.0001	0.415	18.297	4.368	0.421	5.465
2nd derivative (11 point)	4	0.419	18.932	3.808E-06	0.446	17.506	2.145	0.440	5.713
2nd derivative (21 point)	4	0.408	19.035	−3.018E-06	0.430	17.653	2.393	0.436	5.665
Baseline	5	0.411	19.010	−4.052E-05	0.422	17.723	2.719	0.434	5.643
Standard normal variate (SNV)	12	0.646	15.908	−0.0004	0.475	17.926	3.604	0.430	5.579
SNV + detrending (SNVD)	6	0.434	18.783	4.773E-06	0.392	18.170	2.130	0.424	5.504
Detrending	6	0.429	18.829	2.902E-06	0.419	17.767	2.852	0.433	5.629

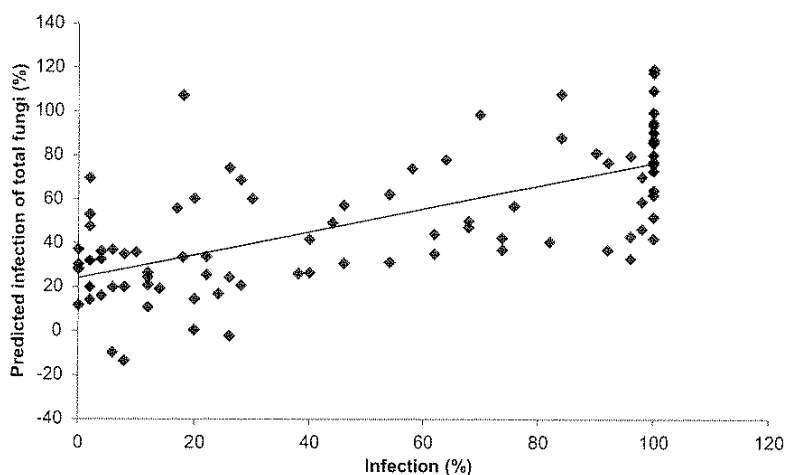


Fig. 6. Correlation regression plot of the measured versus predicted total fungi infection (%).

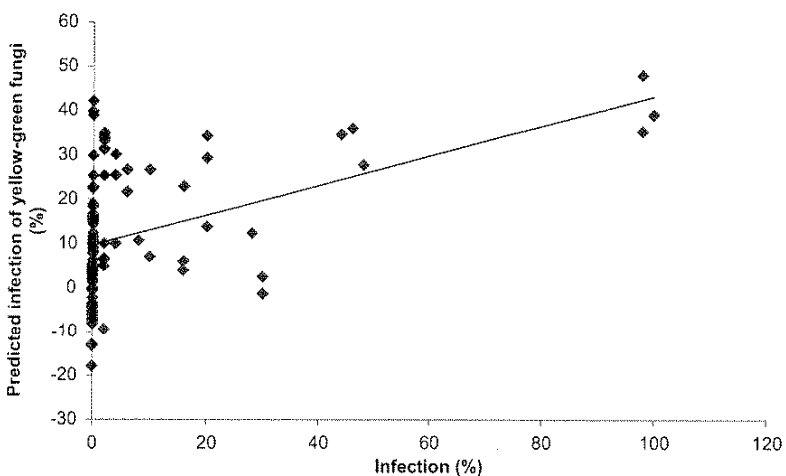


Fig. 7. Correlation regression plot of measured versus predicted yellow-green *Aspergillus* infection (%).

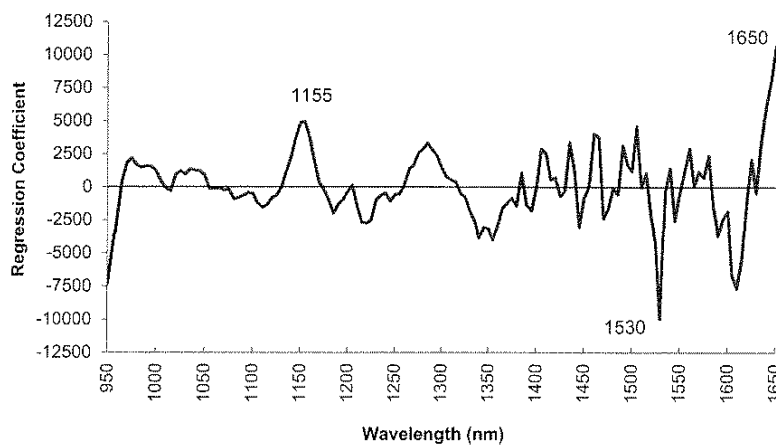


Fig. 8. Regression coefficient plot for the total fungal infection PLSR model.

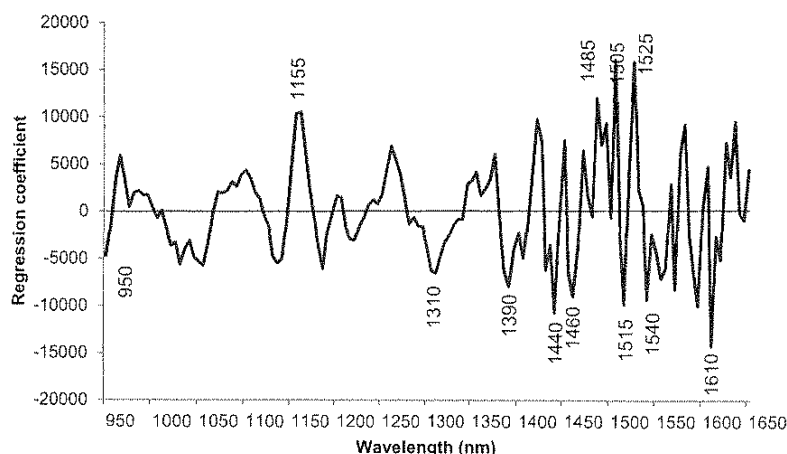


Fig. 9. Regression coefficient plot for the yellow-green *Aspergillus* infection PLSR model.

fungal infection and yellow-green *Aspergillus* infection, respectively. The graphs show that some similar spectral wavelengths, such as at 950, 1530–1540 and 1610 nm, have a strong effect on both models.

In an email on 10 July 2012, Phil Williams stated that in case of yellow-green *Aspergillus* infection, the distribution of samples is very poor. There is a very high proportion of low samples. The mean of 7.698 is biased by a small number of high samples. It looks as if application of NIRS will not be applicable to reliable prediction of the yellow-green fungi. The classification (Discriminant) analysis may be able to detect whether the proportion of yellow-green fungi is high enough to merit further analysis by the reference method.

4. Conclusions

The application of NIRS for detection of fungi and aflatoxigenic fungi in rice has been studied in this research. From the study, the NIR spectra show that the moisture and starch content in rice affects the overall extent of fungal infection. Consequently, to improve the accuracy of the model these parameters should be considered. Additional rice samples contaminated with naturally mycotoxigenic fungi, inoculated samples, as well as normal uncontaminated samples from different origins of samples such as different rice mills, supermarkets and local markets from different regions should be further assessed. Also the shortwave NIR (700–1100 nm) should be applied.

Acknowledgment

The authors gratefully acknowledge the financial support provided by a Research Career Development Grant provided by The Thailand Research Fund (TRF, MRG5480149). The authors would also like to thank Charpa Techcenter Co., LTD., Thailand and Perten Instruments AB, Sweden for providing the NIR spectrometer (DA 7200 NIR Diode Array Analyzer) to be used in this research.

References

- Abdullah, N., Nawawi, A., & Othman, I. (2000). Fungal spoilage of starch-based foods in relation to its water activity (aw). *Journal of Stored Products Research*, 36, 47–54.
- Al-Holy, M. A., Mengshi, L., Cavinato, A. G., & Rasco, B. A. (2006). The use of Fourier transform infrared spectroscopy to differentiate *Escherichia coli* O157:H7 from other bacteria inoculated into apple juice. *Food Microbiology*, 23, 162–168.
- Almeida, R. M. A., Gambale, W., Correa, B., Paula, C. R., & Asevedo, I. G. (1991). Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* sp. isolated from rice. *Microbiologia*, 22(2), 161–163.
- Atkins, S. D., & Clark, I. M. (2004). Fungal molecular diagnostic: a mini review. *Journal of Applied Genetics*, 45(1), 3–15.
- Berardo, N., Pisacane, V., Battilani, P., Scandolara, A., Pietri, A., & Marocco, A. (2005). Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8128–8134.
- Camps, C., & Christen, D. (2009). Non-destructive assessment of apricot fruit quality by portable visible-near infrared spectroscopy. *LWT – Food Science and Technology*, 42, 1125–1131.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C., & Gooday, G. W. (2001). *The fungi* (2nd ed.). London: Academic Press. pp. 99–100.
- Fernández-Ibañez, V., Soldado, A., Martínez-Fernández, A., & de la Roza-Delgado, B. (2009). Application of near infrared spectroscopy for rapid detection of aflatoxin B1 in maize and barley as analytical quality assessment. *Food Chemistry*, 113, 629–634.
- Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J., & Samson, R. A. (2007). The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 59, 1–10.
- Genkawa, T., Uchino, T., Inoue, A., Tanaka, F., & Hamanaka, D. (2008). Development of a low-moisture-content storage system for brown rice: storability at decreased moisture contents. *Biosystems Engineering*, 99, 515–522.
- Godet, M., & Munaut, F. (2010). Molecular strategy for identification in *Aspergillus* section Flavi. *FEMS Microbiology Letters*, 304, 157–168.
- Hernández-Hierro, J. M., García-Villanova, R. J., & González-Martín, I. (2008). Potential of near infrared spectroscopy for the analysis of mycotoxins applied to naturally contaminated red paprika found in the Spanish market. *Analytica Chimica Acta*, 622, 189–194.
- IARC. (1993) *Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins*, Vol. 56, IARC (International Agency for Research on Cancer), 489.
- Niessen, L. (2007). PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 38–46.
- Osborne, B. G., & Fearn, T. (1986). *Near infrared spectroscopy in food analysis*. New York: Longman Scientific & Technical. pp. 36–40.
- Paterson, R. R. M. (2006). Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry*, 41, 1467–1474.
- Pettersson, H., & Aberg, L. (2003). Near infrared spectroscopy for determination of mycotoxins in cereals. *Food Control*, 14, 229–232.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (3rd ed.). New York: Springer. pp. 19–5, 275–295.
- Reddy, K. R. N., Reddy, C. S., & Muralidharan, K. (2009). Detection of *Aspergillus* spp. and aflatoxin b1 in rice in India. *Food Microbiology*, 26, 27–31.
- Regulation (EU) No 165/2010. Commission Regulation (EC) No 165/2010 of 26 February. (27.2.2010). Amending regulation (EU) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of The European Union*, L50/8–L50/12.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Frisvad, J. C. (2004). *Introduction to food borne fungi* (7th ed.). Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelfcultures. pp. 64–97, 283–298.
- Samson, R. A., Hong, S. B., & Frisvad, J. C. (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 44, S133–S148.
- Santos, C., Fraga, M. E., Kozakiewicz, Z., & Lima, N. (2010). Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology*, 161, 168–175.



- Sartori, D., Furlaneto, M. C., Martins, M. K., Paula, M. R. F., Pizzirani-Kleiner, A. A., Taniwaki, M. H., et al. (2006). PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Research in Microbiology*, 157, 350–354.
- Singh, C. B., Jayas, D. S., Paliwal, J., & White, N. D. G. (2012). Fungal damage detection in wheat using short-wave near-infrared hyperspectral and digital colour imaging. *International Journal of Food Properties*, 15, 11–24.
- Sirisomboon, P., Tanaka, M., Fujita, S., & Kojima, T. (2007). Evaluation of pectin constituents of Japanese pear by near infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 78(2), 701–707.
- Sirisomboon, P., Tanaka, M., Kojima, T., & Williams, P. (2012). Nondestructive estimation of maturity and textural properties on tomato 'Momotaro' by near infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering*, 112, 218–226.
- Tournas, V., Stack, M. E., Misiewicz, P. V., Koch, H. A., & Bandler, R. (2001). *Bacteriological analytical manual online*. US Food & Drug Administration. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-18.html>.
- Zhang, H. J., Wu, J. H., Luc Li-jun, Y., Hua Yang, L., Yu, X. Q., Wang, X. S., et al. (2007). Comparison of near infrared spectroscopy models for determining protein and amylose contents between calibration samples of recombinant inbred lines and conventional varieties of rice. *Agricultural Sciences in China*, 6, 941–948.

Application of Near Infrared Spectroscopy to Detect Aflatoxigenic Fungal Contamination in Rice

Dachoupan Sirisomboon C.^a, Puttan R.^a, Sirisomboon P.^b

^a Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

^b Curriculum of Agricultural Engineering, Department of Mechanical Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

INTRODUCTION

Early detection of aflatoxigenic fungi at the beginning of the process is important for the elimination of aflatoxin B₁ from the food chain. The methods in laboratory for detection of mycotoxigenic fungal contamination in food are time consuming, requiring a well equipped laboratory and skilled laboratory staffs. Near-infrared spectroscopy (NIRS) is a powerful technique for characterizing the chemical composition of very complex materials including food and agricultural products. It is a fast, nondestructive, environmental friendly and highly accurate method that requires little expert training.

The aim of this study was to apply the NIRS technique to detect the total fungal infection (%) and yellow-green *Aspergillus*, potentially aflatoxigenic fungi, infection (%) in rice samples.

METHODS

106 rice samples
(jasmine rice, white rice, brown rice)
Natural and artificial infections

• Near-Infrared Scanning

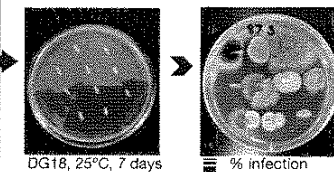
950-1650 nm
in diffuse
reflection mode

DA7200 NIR Diode
Array Analyzer,
Perten Instruments
Inc., USA.

- Each rice sample was analyzed in triplicate (318 sub-samples).
- The scanning was done three times on each sub-sample and the average reflection spectra were used for data analysis.

• Reference Method

Direction Plating Method (Samson et al., 2004)



• Data Analysis

- Outlier checking
- Calibration and prediction sets (7:3)
- Partial least square regression (PLSR) models
 - Total fungal infection (%)
 - Yellow-green fungal infection (%)
- Pretreatments
 - Correlation (r), lowest standard error of calibration (SEC), standard error of prediction (SEP), bias

RESULTS

There was no outlier in the reference data. Three spectral outliers were removed. The average NIR spectra of rice samples obtained over a wavelength range between 950-1650 nm are reported in Fig. 1(A-B). The average NIR spectra of rice pre-treated by applying the second derivative method of Savitzky-Golay are shown in Fig. 1(C-D) with 6 similar peaks at 985-990, 1165-1170, 1200, 1355-1360, 1425 and 1585-1590 nm.

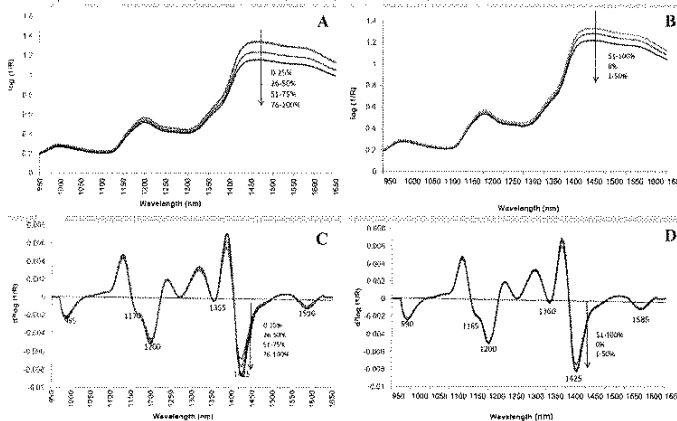


Fig. 1: A-B: Average NIR spectra of rice samples clustered based on the percent total fungal infection (A), and the percent yellow-green *Aspergillus* infection (B), present in the sample. C-D: Average second derivative NIR spectra of rice samples, clustered based on the percent of total fungal infection (C), and the percent yellow-green *Aspergillus* infection (D), present in the sample.

The peak at 1425 nm may represent a shifted peak of 1450 nm which was corresponding to the absorption band of water and starch, due to corresponding to the first overtone of O-H stretching (Osborne and Fearn, 1986). From Fig. 1(C-D) this particular absorbance region correlates most strongly with the total fungal infection (%). This appears to confirm that the moisture and starch content in rice affects the overall extent of fungal infection.

Table 1: PLS regression results obtained for the total fungal infection model.

Pretreatment	PCA	Calibration		Prediction		RPD	SEER
		SEC	SEP	SEC	SEP		
Raw spectra	1	0.74	16.43	0.698	18.57	1.77	1.681
Multiple scatter correction (MSC)	2	0.74	15.65	0.698	18.57	1.77	1.681
Mean Normalization	1	0.54	13.34	0.608	16.55	1.57	1.511
Max Normalization	1	0.54	13.34	0.608	16.55	1.57	1.511
Range Normalization	1	0.54	13.34	0.608	16.55	1.57	1.511
1 st Derivative (11 point)	8	0.70	16.13	0.608	16.55	1.57	1.511
1 st Derivative (13 point)	8	0.62	14.17	0.548	15.01	1.51	1.509
2 nd Derivative (11 point)	5	0.68	15.65	0.615	16.55	1.57	1.511
2 nd Derivative (13 point)	5	0.68	15.65	0.615	16.55	1.57	1.511
Baseline	9	0.72	17.35	0.699	19.05	1.80	1.549
Standard normal variate (SNV)	3	0.76	15.65	0.615	16.55	1.57	1.511
SNV+Derivative (SNV+D)	3	0.76	15.65	0.615	16.55	1.57	1.511
Derivative	8	0.72	17.35	0.699	19.05	1.80	1.549

Table 2: PLS regression results obtained for the yellow-green *Aspergillus* infection model.

Pretreatment	PCA	Calibration		Prediction		RPD	SEER
		SEC	SEP	SEC	SEP		
Raw spectra	1	0.49	18.73	0.49	18.73	1.77	1.681
Multiple scatter correction (MSC)	2	0.49	18.73	0.49	18.73	1.77	1.681
Mean Normalization	1	0.49	18.73	0.49	18.73	1.77	1.681
Max Normalization	1	0.49	18.73	0.49	18.73	1.77	1.681
Range Normalization	1	0.49	18.73	0.49	18.73	1.77	1.681
1 st Derivative (11 point)	8	0.49	18.73	0.49	18.73	1.77	1.681
1 st Derivative (13 point)	8	0.49	18.73	0.49	18.73	1.77	1.681
2 nd Derivative (11 point)	8	0.49	18.73	0.49	18.73	1.77	1.681
2 nd Derivative (13 point)	8	0.49	18.73	0.49	18.73	1.77	1.681
Baseline	9	0.49	18.73	0.49	18.73	1.77	1.681
Standard normal variate (SNV)	3	0.49	18.73	0.49	18.73	1.77	1.681
SNV+Derivative (SNV+D)	3	0.49	18.73	0.49	18.73	1.77	1.681
Derivative	8	0.49	18.73	0.49	18.73	1.77	1.681

For yellow-green *Aspergillus* infection, the most accurate predictive statistical model was developed using a pretreated (maximum normalization) NIR spectra, with the following statistical characteristics ($r = 0.437$, $SEP = 18.723\%$ and bias = 4.613%) (Table 2).

Fig. 2 (A-B) shows the correlations between the measured reference values versus the predicted values from the NIR based PLSR models. Fig. 3 (A-B) shows the regression coefficients obtained from the PLSR model. The graphs show that some similar spectral wavelengths, such as at 950, 1530-1540 and 1610 nm, have a strong effect on both models.

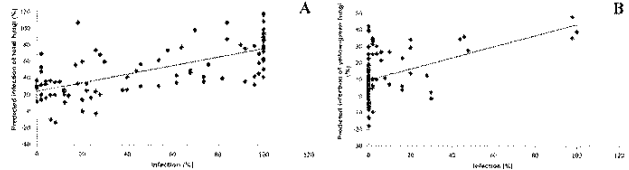


Fig. 2: Correlation regression plot of the measured versus predicted total fungi infection (%) (A) and predicted yellow-green *Aspergillus* infection (%) (B).

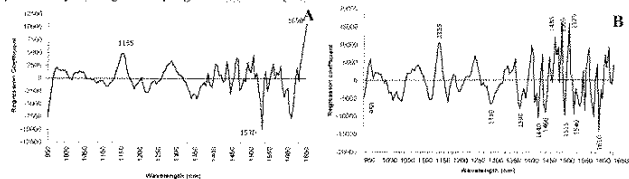


Fig. 3: Regression coefficient plot for the total fungal infection PLSR model (A) and for yellow-green *Aspergillus* infection PLSR model (B).

In case of yellow-green *Aspergillus* infection, the distribution of samples is very poor. There is a very high proportion of low samples. The mean of 7.698 is biased by a small number of high samples. It looks as if application of NIRS will not be applicable to reliable prediction of the yellow-green fungi. The classification (Discriminant) analysis may be able to detect whether the proportion of yellow-green fungi is high enough to merit further analysis by the reference method.

CONCLUSION

The application of NIRS for detection of fungi and aflatoxigenic fungi in rice has been studied in this research. However, further development work is needed to improve the accuracy of the model. Additional rice samples contaminated with naturally mycotoxigenic fungi, inoculated samples, as well as normal uncontaminated samples from different origins of samples such as different rice mills, supermarkets and local markets from different regions should be further assessed.

REFERENCES

- Osborne, B.G., & Fearn, T. (1986). Near infrared spectroscopy in food analysis. (pp. 36-40). Longman Scientific & Technical, New York.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., & Friess, J.C. (2004). Introduction to food borne fungi. (7th ed., pp. 64-87, 263-268). Centraalbureau voor Schimmecultures, Netherlands.