

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อราด้วยเทคนิคทาง Microbiology

จากการศึกษาหาเชื้อที่ติดมากับเมล็ด โดยใช้วิธี agar method และ blotter method (ภาพ 4.1) พบว่าวิธี agar method มีการเจริญของเชื้อรามากกว่าวิธี blotter method เนื่องจากวิธี agar method ใช้สูตรอาหาร potato dextrose agar (PDA) เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา สอดคล้องกับปัจจัยมา (2533) กล่าวว่า PDA เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อราและแบคทีเรียบางชนิด ดังนั้นจึงเลือกวิธีดังกล่าว มาใช้ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อนำมาศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* (ภาพ 4.2)

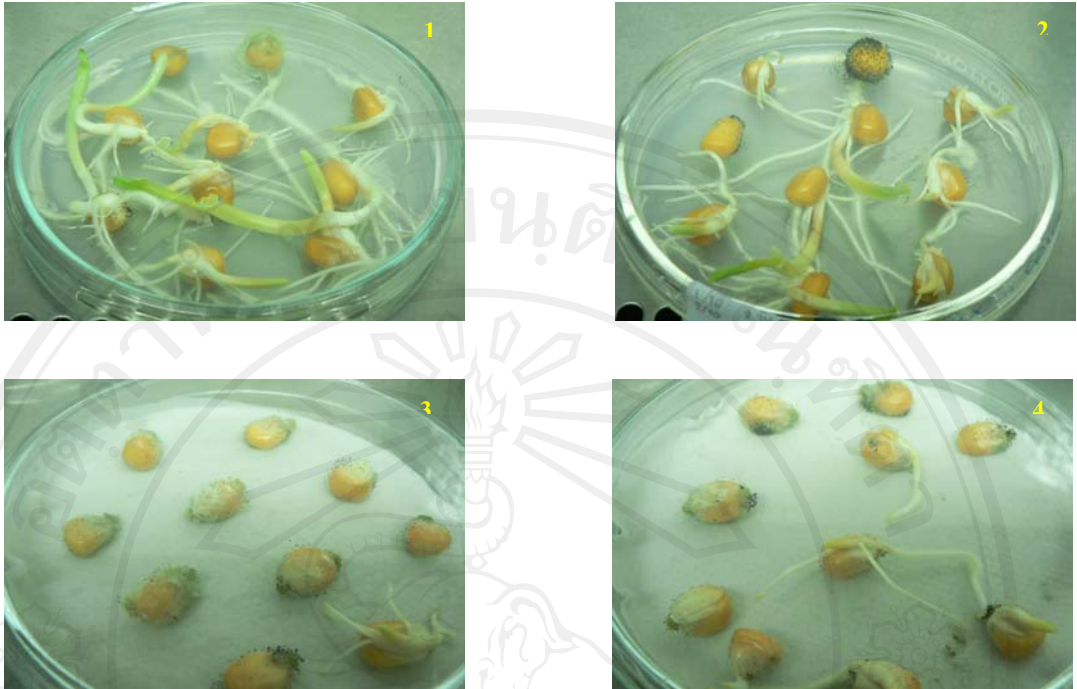
จากการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ภายใต้กล้อง stereomicroscope and accessories (ภาพ 4.3) จากวิธีการนำเส้นใยของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* มาเพาะเป็น 4 จุดในแต่ละ plate กับวิธี slide culture พบว่าลักษณะการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* สามารถสังเกตเห็นลักษณะการเจริญของโคโลนีเชื้อราได้ชัดเจน ตั้งแต่เส้นใยเริ่มมีการเจริญจากจุดกำเนิด ไปจนถึงการแผ่ขยายของโคโลนีและการสร้างสปอร์ที่เพิ่มจำนวนมากขึ้น สอดคล้องกับ ชนิดา (2536); Raper and funnel (1965) ; Klich (2002a) ได้ศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนอาหาร PDA พบว่า ในวันแรกเชื้อราจะสร้างเส้นใยสีขาว เมื่อเริ่มเข้าวันที่ 2 จะสร้างสปอร์และเจริญเต็มจานเลี้ยงเชื้อเมื่ออายุได้ 7 วัน โดยเชื้อราสร้างโคโลนีสีเขียวแกมเหลือง เป็นสีของ conidial head ที่เจริญจากเส้นใย (hyphae) ที่ไม่มีสีหรือสีเหลืองอ่อน (hyaline หรือ subhyaline) และมีผนังกัน (septum hyphae) บาง ไอโซเลต (isolate) เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วสามารถสร้างกลุ่มของเส้นใยที่อัดกันแน่นเป็นลักษณะกลม (sclerotium) กระจุกกระจายอยู่บนผิวอาหารทั่วไป มีสีน้ำตาลดำ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 400-700 μm เชื้อทั้งสองชนิดเมื่ออายุ 7-14 วัน จะสามารถสังเกตเห็นลักษณะดังนี้ เชื้อรา *A. flavus* ลักษณะของโคโลนีจะมีสีเขียวเข้มตรงกลาง ถัดมาจะมีสีเขียวที่อ่อนลง และถัดมามีสีขาวซึ่งเป็นสีของเส้นใย นอกจากนี้บริเวณผิวหน้าโคโลนีมีไอน้ำอยู่เป็นจำนวนมาก และยังพบการสร้าง sclerotium มีลักษณะเป็นก้อนสีน้ำตาล ไปจนถึงสีดำ ขนาดเล็ก รูปร่างเกือบกลมในบริเวณของโคโลนี ซึ่งสอดคล้องกับ อุดมและธรรมศักดิ์ (2528);

สมบัติ (2535) รายงานว่าโคโลนีของ เชื้อรา *A. flavus* มีสีเขียวปนเหลืองโดยบริเวณกลางโคโลนีจะมีสีเข้มที่สุด ถัดออกไปสีจะจางลง เมื่อห่างจากจุดศูนย์กลาง ทั้งนี้เนื่องจาก บริเวณดังกล่าวมี conidial head มีสีเขียวปนเหลืองขึ้นอยู่อย่างหนาแน่นและอายุแก่กว่า เส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่ในอาหารอย่างบางๆ และบริเวณส่วนกลางของโคโลนีมีเม็ด sclerotium สีน้ำตาลเข้มเกือบดำ รูปร่างกลม กระจัดกระจายอยู่ทั่วไป โคโลนีของเชื้อราได้อาหาร เลี้ยงเชื้อมีสีขาวครีมหรือเหลืองอ่อน เช่นเดียวกับ Wicklow (1983) รายงานว่า เชื้อรา *A. flavus* สามารถผลิต sclerotium เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมโดยจะงอกภายใน 48-72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25, 28 และ 37 °C ส่วนเชื้อรา *A. niger* ลักษณะของโคโลนีจะมีสีดำเข้มตรงกลาง ถัดมาจะมีสีเทา และถัดมามีสีขาวซึ่งเป็นสีของเส้นใยไม่ปรากฏการสร้าง sclerotium เหมือนในเชื้อรา *A. flavus* นอกจากนั้นบริเวณผิวหน้าโคโลนีจะค่อนข้างแห้งกว่าเชื้อรา *A. flavus* ซึ่ง Raper and Fennel (1965) รายงานว่า ได้จำแนก genus *Aspergillus* เป็นกลุ่มตามลักษณะสีของสปอร์โดย *A. niger* จะมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงดำ De Hoog and Guarro (1995) รายงานว่า กลุ่มโคโลนีได้อาหารเลี้ยงเชื้อของ *A. niger* มีลักษณะจับตัวกันอย่างหนาแน่นสีขาวหรือเหลืองและบริเวณส่วนบนมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ ส่วนของกระเปาะ (conidial heads) มีขนาดใหญ่มีสองชั้นเรียงตัวต่อเนื่องกันมีสีน้ำตาล โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร \times 15-20 μm รูปร่างกลมสีน้ำตาลดำแผ่ออกจากจุดศูนย์กลางตามลักษณะการเจริญของเชื้อราและอายุ ก้านชูสปอร์ (conidiophores) ลักษณะคล้ายผนังไม่มีสีที่เรียงตัวกัน เวสสิเคิล (vesicle) มีสีดำ สปอร์ (conidia) มีลักษณะกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5-5.0 μm มีสีน้ำตาลถึงดำ มองจากด้านบนจะมีผิวหน้าขรุขระ

ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* โดยวิธี slide culture (ภาพ 4.4) สามารถสังเกตเห็นโครงสร้างของทั้งสองสายพันธุ์ได้ชัดเจนขึ้น ตั้งแต่วันที่ 1 เชื้อทั้งสองชนิดเจริญในลักษณะการเพิ่มความยาว บริเวณปลายของก้านชูสปอร์โป่งออก และมีรูปร่างค่อนข้างกลม และในวันที่ 2 พบว่าปลายของก้านชูสปอร์ของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์เริ่มมีสีตามลักษณะเฉพาะของแต่ละเชื้อ โดยเชื้อ *A. flavus* เริ่มมีสีเขียวอ่อนและเชื้อ *A. niger* เริ่มมีสีดำ และเมื่อระยะเวลาผ่านไปปลายกระเปาะเริ่มบานออก และมีการยืดยาวออก ส่วนสีและขนาดของก้านชูสปอร์ของเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเชื้อ *A. flavus* จะมีสีที่ขาวขุ่นส่วนเชื้อ *A. niger* มีสีใส และขนาดก้านชูสปอร์ของเชื้อ *A. flavus* จะมีขนาดใหญ่กว่าของเชื้อ *A. niger* เส้นใยของเชื้อทั้งสอง

สายพันธุ์มีการเจริญยืดยาวออกพร้อมๆ กับการสร้างสปอร์ขึ้นใหม่บนเส้นใย แต่สปอร์ที่สร้างบนเส้นใยใหม่นี้จะมีขนาดของกระเปาะที่เล็กลง นอกจากนั้นเชื้อ *A. flavus* มีการยึดต่อของสปอร์เป็นลูกโซ่ซึ่งลักษณะแบบนี้ไม่พบในเชื้อ *A. niger*

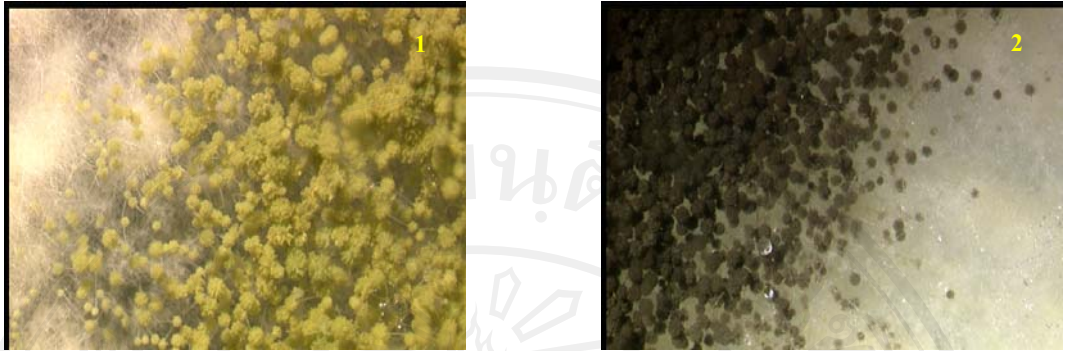
เชื้อ *A. flavus* เข้าทำลายเมล็ดข้าวโพด โดยเริ่มจากส่วนของ tip cap และบนผิวเมล็ด รวมทั้งในส่วนของเมล็ดที่จะเจริญไปเป็นต้นอ่อน (germ) และเริ่มสร้างเส้นใยแผ่ขยายปกคลุมจนทั่วทั้งเมล็ด พร้อมกับการสร้างสปอร์ โดยใช้ระยะเวลา 7 วัน ซึ่งจะส่งผลให้เมล็ดที่สามารถงอกได้มีการเจริญที่ผิดปกติ สอดคล้องกับ ชนิดาและคณะ (2536) รายงานว่าหลังจาก conidium สัมผัสกับผิวของเมล็ดข้าวโพด ต่อจากนั้นเชื้อราจะเจริญและพัฒนาสร้าง conidial head ทั้งที่บนผิวเมล็ดและบริเวณ tip cap และเจริญหนาแน่นมากหลังจาก 36 ชั่วโมง แต่ในส่วน germ และ endosperm พบเชื้อราเพียงเล็กน้อย เชื้อราเข้าทำลายในส่วนของ tip cap และ pericarp ได้มากที่สุด รองลงมาคือ ส่วนของ germ, floury endosperm และ horny endosperm เช่นเดียวกับ Tsurata *et al.* (1981) รายงานว่า บริเวณ tip cap ของเมล็ด เป็นบริเวณสำคัญที่เป็นทางเข้าสู่เมล็ดของเชื้อรา โดยศึกษาการเจริญของเชื้อรา 5 ชนิด ในเมล็ดข้าวโพดภายหลังการเก็บเกี่ยว ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า เชื้อราทั้งหมดจะเจริญบนผิวของเมล็ดที่บริเวณตรงกลางของ germ และ tip cap ในส่วนของ germ พบเส้นใยตรงกลางของ germ เส้นใยส่วนมากจะเจริญปกคลุม germ อยู่แค่ที่ผิว มีส่วนน้อยที่เจริญบนผิว แล้วแทงผ่านชั้น pericarp เข้าไป บริเวณ tip cap ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ติดกับซัง ประกอบด้วยโครงสร้าง sponge like structure โครงสร้างดังกล่าวไม่พบ cuticle พบว่าการเจริญของเชื้อ *A. flavus* และเชื้ออื่นอีก 3 ชนิด เส้นใยสามารถเจริญผ่านเข้าไปในเมล็ดและแพร่กระจายจาก tip cap ผ่าน germ ไปยัง endosperm ได้ และพบว่าเชื้อรา *A. flavus* ส่วนใหญ่จะเจริญอยู่ที่ germ (68 %) รองลงมาที่ tip cap (50 %) และน้อยที่สุดที่ endosperm (12 %) (Fennell *et al.*, 1973



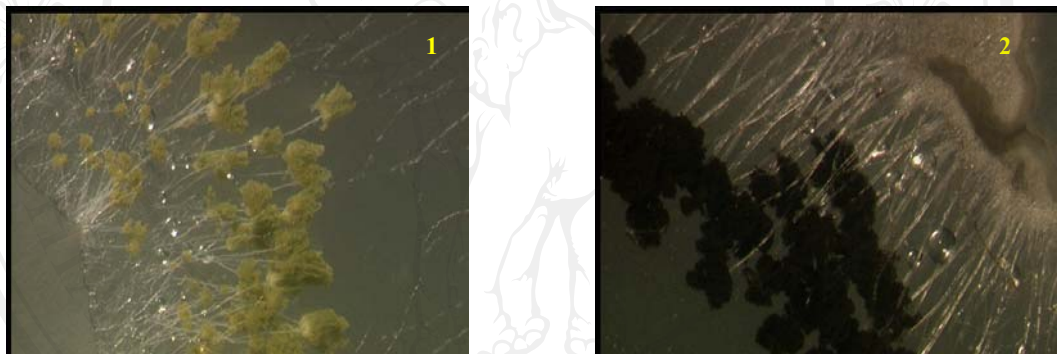
ภาพ 4.1 การตรวจสอบหาเชื้อที่ติดมากับเมล็ดโดยวิธี agar method และ blotter method ลักษณะปรากฏของ *A. flavus* (1) และ *A. niger* (2) ของเมล็ดข้าวโพด บนอาหาร PDA และ ลักษณะปรากฏของ *A. flavus* (3) และ *A. niger* (4) ของเมล็ดข้าวโพดบนกระดวยเพาะ



ภาพ 4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อ *A. flavus* (1) และ *A. niger* (2) บนอาหาร PDA



ภาพ 4.3 การเจริญของเชื้อ *A. flavus* (1) และ *A. niger* (2) ภายใต้กล้อง stereomicroscope and accessories



ภาพ 4.4 การเจริญเชื้อ *A. flavus* (1) และ *A. niger* (2) โดยวิธี slide culture

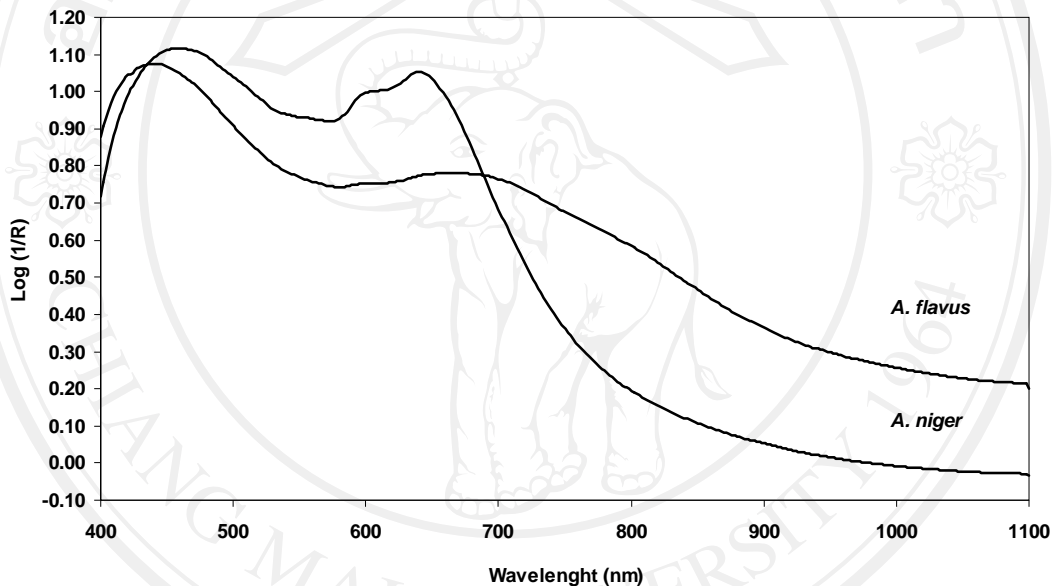


ภาพ 4.5 การเจริญของเชื้อรา *A. flavus* บนเมล็ดข้าวโพด (1) การเข้าทำลายของเชื้อราโดยเริ่มจากบริเวณ tip cap (2) ลักษณะเมล็ดที่เริ่มมีการเข้าทำลายของเชื้อราโดยปรากฏเส้นใยปกคลุมผิวเมล็ด และ (3) เมล็ดที่ถูกเชื้อเข้าทำลายเต็มเมล็ด

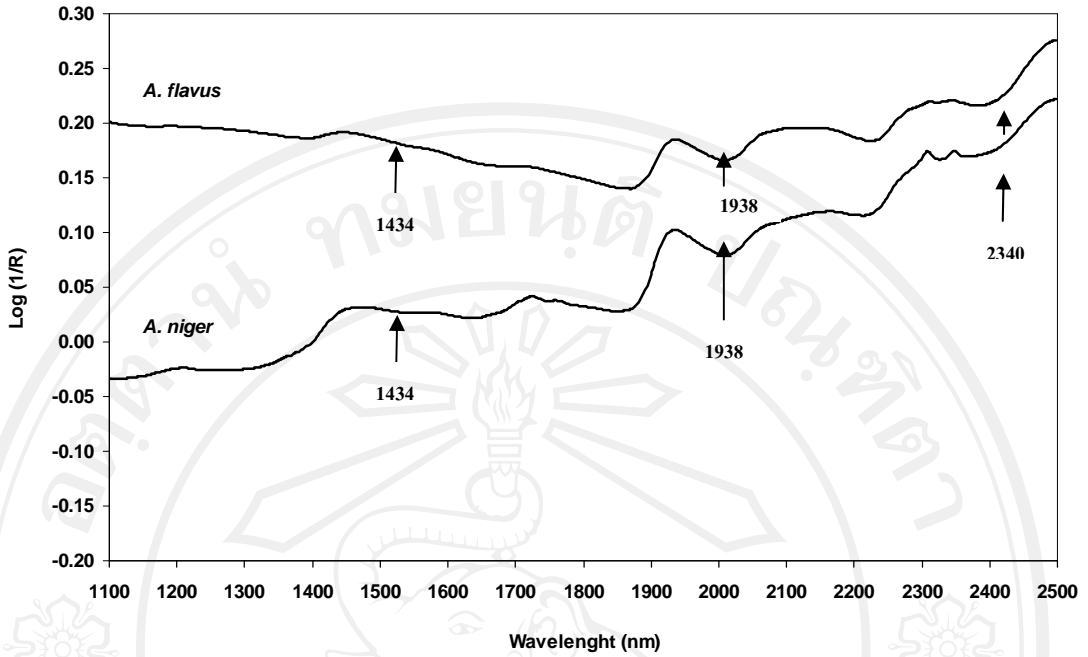
4.2 ศึกษาสเปกตรัมที่วัดได้จากเชื้อรา *A. flavus* ต่อช่วงคลื่น VIS/NIR spectroscopy

สเปกตรัมของเชื้อราสองชนิด คือ *A. flavus* และ *A. niger* เมื่อวัดด้วยเครื่อง NIRSystem6500 โดยวัดการสะท้อนกลับของแสง ในช่วงความยาวคลื่น 400-1100 นาโนเมตร และ 1100-2500 นาโนเมตร พบว่า สเปกตรัมของเชื้อราทั้งสองชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่แยกออกจากกันอย่างชัดเจนในทุกช่วงความยาวคลื่น (ภาพ 4.6) โดยในช่วงความยาวคลื่น 400 - 700 นาโนเมตร หรือช่วงคลื่น visible เชื้อ *A. niger* มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าเชื้อ *A. flavus* ซึ่งเป็นอิทธิพลของสีของเส้นใยและสปอร์เชื้อรา ซึ่งเชื้อ *A. niger* มีเส้นใยสีดำจะสามารถดูดกลืนแสงในช่วง visible ได้ดีกว่าสีเขียวของเชื้อ *A. flavus* ซึ่ง Delwiche and Hareland (2004) รายงานว่า ช่วงความยาวคลื่นที่ 480-600 นาโนเมตร เกี่ยวข้องกับสีที่เปลี่ยนแปลงของเชื้อราเมื่ออยู่ในเมล็ด ส่วนในช่วงความยาวคลื่น 1100- 2500 นาโนเมตร (ภาพ 4.6 และ ภาพ 4.7) พบว่าเชื้อ *A. flavus* มีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าเชื้อ *A. niger* ทั้งช่วงความยาวคลื่น ส่วนหนึ่งเป็นอิทธิพลของความชื้นของเชื้อทั้งสองชนิดที่ต่างกัน โดยเชื้อ *A. flavus* มีองค์ประกอบของน้ำที่มากกว่าเชื้อ *A. niger* ซึ่งข้อมูลสเปกตรัมพบพิกน้ำที่ชัดเจนที่ความยาวคลื่น 1938 นาโนเมตร สอดคล้องกับ William and Norris (2001) รายงานว่าพบ พิกน้ำชัดเจนที่สุดที่ความยาวคลื่น 1940 นาโนเมตร นอกจากนี้พิกที่ความยาวคลื่น 1434 นาโนเมตร ยังสัมพันธ์กับการดูดกลืนแสงของโมเลกุลของกลูโคสซึ่งประกอบด้วยพันธะ O-H โดยเป็นองค์ประกอบหนึ่งของเส้นใยเชื้อรา (Berardo *et al.*, 2005) และยังพบว่าพิกที่ความยาวคลื่น 2340 นาโนเมตร คือพิกของพันธะ C-N เป็นส่วนประกอบของ เอไมด์ และ กลูโคซามีนซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของไคตินที่พบได้ในเชื้อรา (Roberts *et al.*, 1987; Berardo *et al.*, 2005) เมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 1200 นาโนเมตร ของเชื้อราทั้งสองชนิด จะเห็นว่ามีความแตกต่างกัน ซึ่งคาดว่าเป็นผลจากโครงสร้างของผนังเซลล์ของเชื้อราวมทั้ง กรดอะมิโน ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์เชื้อรา โดย Delwiche and Hareland (2004) รายงานว่าช่วงความยาวคลื่นที่ 870-1200 นาโนเมตร เป็นช่วงที่สัมพันธ์กับพันธะ N-H ส่วนใหญ่จะเป็นพวกกรดอะมิโน อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และ radical structure ที่เป็นส่วนประกอบผนังเซลล์ของเชื้อรา เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค principle component analysis (PCA) ซึ่งสามารถลดจำนวนตัวแปรอิสระหรือตัวแปรที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย VIS/NIR spectroscopy ด้วยการแบ่งกลุ่มตัวแปรอิสระเดิมที่มีความสัมพันธ์กันเพื่อสร้างตัวแปรใหม่หรือ

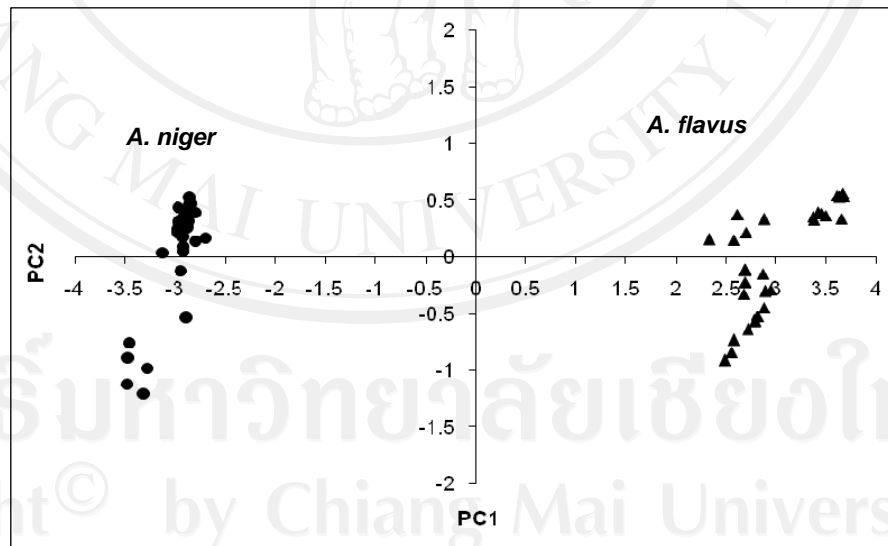
องค์ประกอบที่เรียกว่า principal combination (PC) โดยใช้ข้อมูลทั้งสเปกตรัม (full spectrum) พบว่าสเปกตรัมของเชื้อ *A. flavus* และ *A. niger* สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจนด้วย PC1 และ PC2 (ภาพ 4.8) ดังนั้น การนำเทคนิค VIS/NIR spectroscopy มาใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger* ที่แยกได้จากเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พบว่า เส้นสเปกตรัมของเชื้อราทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันและสามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCA



ภาพ 4.6 สเปกตรัมของเชื้อรา *A. flavus* และเชื้อรา *A. niger* ในช่วงความยาวคลื่น 400-1100 nm



ภาพ 4.7 สเปกตรัมของเชื้อรา *A. flavus* และเชื้อรา *A. niger* ในช่วงความยาวคลื่น 1100-2500 nm



ภาพ 4.8 principle component analysis plot (PC1 และ PC2) ของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. niger*

4.3 การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดข้าวโพดด้วยเทคนิค VIS/NIR spectroscopy

4.3.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดข้าวโพดด้วยเทคนิค VIS/NIR spectroscopy ด้วยชุดอุปกรณ์เสริม transportation module with coarse sample cell

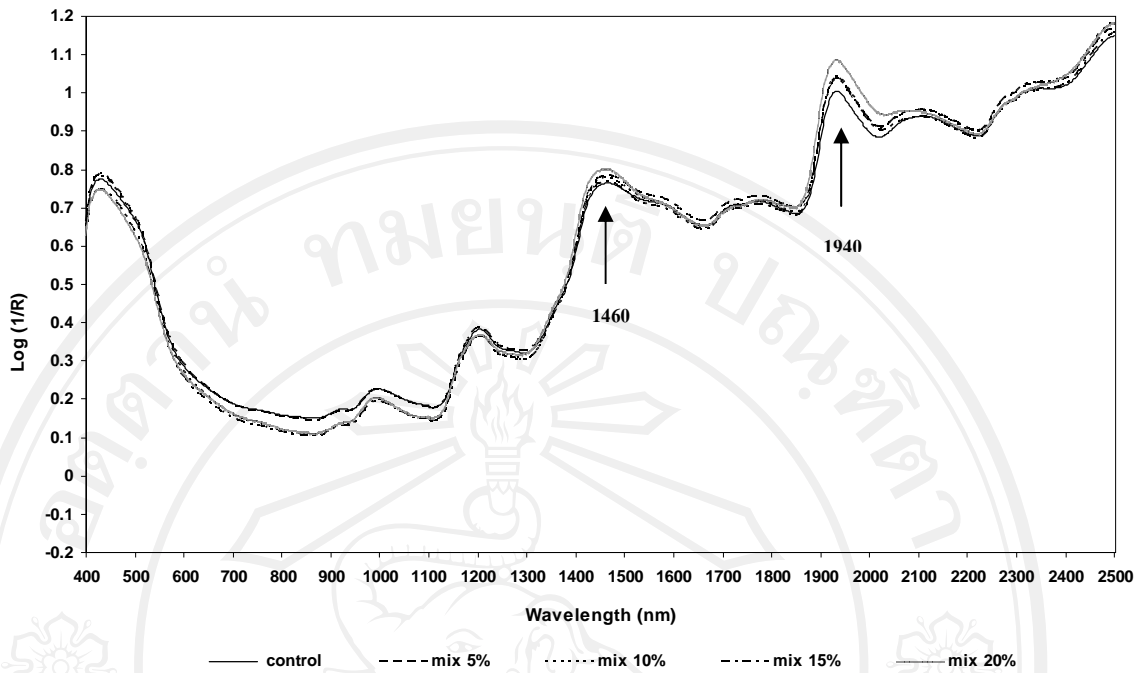
จากการวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมของเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ถูกเชื้อ *A. flavus* ปนเปื้อนที่ระดับต่างๆ (ภาพ 4.9) พบว่า ในช่วงความยาวคลื่น 400-700 นาโนเมตรหรือช่วงคลื่น visible สเปกตรัมของเมล็ดปกติที่ผสมกับเมล็ดที่ปนเปื้อนเชื้อรา *A. flavus* ที่ระดับ 15 และ 20 % ตามลำดับ มีค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำกว่าเมล็ดข้าวโพดปกติโดย เมล็ดข้าวโพดที่เริ่มมีการปนเปื้อนของเชื้อรา เมล็ดจะมีสีจางลงจากเมล็ดปกติ ซึ่ง สมบัติ (2535) กล่าวว่า เชื้อรา *A. flavus* สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของเมล็ดได้เมื่อเข้าทำลายเมล็ด ดังนั้นเมล็ดข้าวโพดที่มีระดับการผสมที่เพิ่มขึ้น ทำให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับ Wang *et al.* (2004) รายงานว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสีเมล็ดถั่วเหลืองปกติเปรียบเทียบกับสีของเมล็ดที่เปลี่ยนแปลงไปที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ 4 ชนิด มีค่าแตกต่างกันตามสีของเชื้อหุ้มเมล็ดและชนิดของเชื้อที่เข้าทำลาย โดยพบว่าเมล็ดที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อ *Phomopsis* และ *Personospora manshurca Syd* (Downy mildew) มีสีขามเทา และสีขาวจะมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า เมล็ดปกติ, ส่วนเมล็ดที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อ *Cercospora kikuchii* และ soybean mosaic virus (SMV) เชื้อหุ้มเมล็ดจะมีสีเหลือง, ม่วงจนถึงดำและสีดำ ส่วนในช่วงความยาวคลื่น 700-1100 และ 1100-2500 นาโนเมตรหรือช่วงคลื่น near infrared พบพิกน้ชัดเจนที่ความยาวคลื่น 1460 และ 1940 นาโนเมตร ตามลำดับ โดย Iwamoto *et al.* (1995) พบว่า น้ำมีการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 1440 นาโนเมตร ในหมู่ฟังก์ชัน O-H ของน้ำ Shenk *et al.* (2001) รายงานตำแหน่งพิกน้ในสเปกตรัม NIR ของผลิตภัณฑ์การเกษตรพบพิกน้ (ความชื้น) ชัดเจนที่ความยาวคลื่น 1940 นาโนเมตร และเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การผสมเมล็ดข้าวโพดที่มีการเข้าทำลายของเชื้อราที่ระดับต่างๆ พบว่าค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 1460 และ 1940 นาโนเมตร มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการผสมของเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลจากระดับความชื้นที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากน้ำดูดกลืนคลื่นแสง NIR ได้ดี ส่งผลให้เกิดการซ้อนทับกัน (overlapping) กับพิกน้ของโมเลกุลขององค์ประกอบอื่นจึงทำให้ไม่พบพิกน้ขององค์ประกอบทางเคมีชนิดอื่นในสเปกตรัมดั้งเดิม (original spectrum) ดังนั้นจึงต้องแปลงข้อมูลด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับที่สอง (second derivative) ทำให้พบพิกน้อื่นๆ ได้ชัดเจนขึ้นที่ความยาวคลื่น 1162, 1200, 1420, 1706, 1914 และ

2340 นาโนเมตร (ภาพ 4.10) โดยที่ความยาวคลื่น 1162 และ 1200 นาโนเมตรสัมพันธ์กับพันธะ N-H ส่วนใหญ่จะเป็นหมู่กรดอะมิโน อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และ radical structure ที่เป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของเชื้อรา (Fernández-Ibañez *et al.*, 2009) ที่ความยาวคลื่น 1420 นาโนเมตรสัมพันธ์กับพันธะ O-H ที่พบในโมเลกุลของกลูโคส โดยเป็นส่วนหนึ่งของเส้นใยเชื้อรา (Berardo *et al.*, 2005) ที่ความยาวคลื่น 1706 นาโนเมตรสัมพันธ์กับพันธะ N-H และ O=C-N-H ที่พบในโมเลกุลของโปรตีน ที่ความยาวคลื่น 1914 นาโนเมตรสัมพันธ์กับพันธะ O-H ซึ่งพบในโมเลกุลของน้ำ (Osborn *et al.*, 1993) และที่ความยาวคลื่น 2340 นาโนเมตร สัมพันธ์กับพันธะ C-N โดยเป็นองค์ประกอบของเอไมด์ และกลูโคซามีนซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของโคตินที่พบได้ในเชื้อรา (Roberts *et al.*, 1987; Berardo *et al.*, 2005) เมื่อระดับการผสมด้วยเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณส่วนประกอบของเชื้อรา

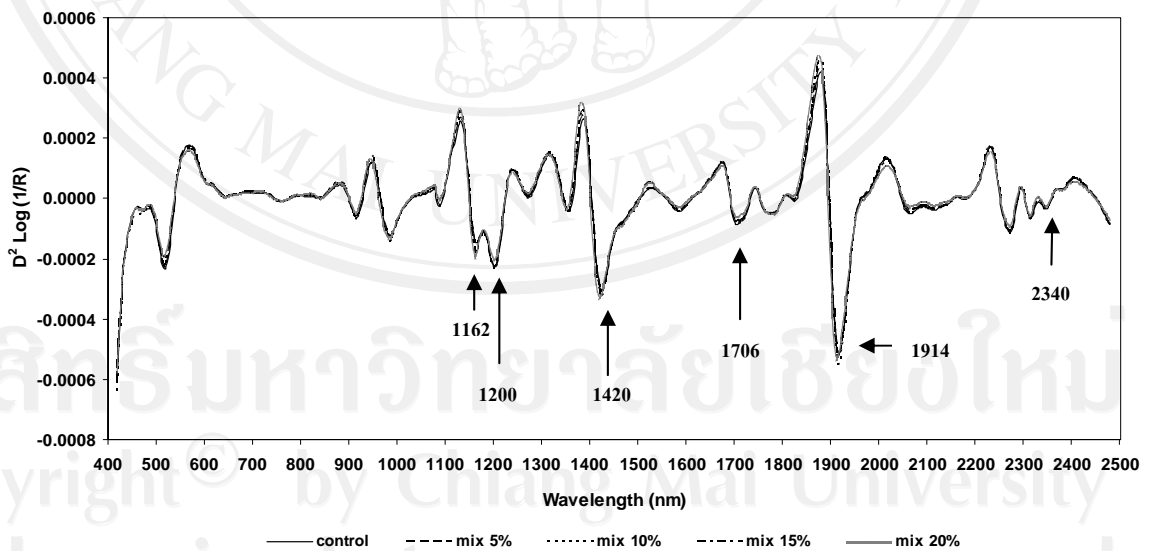
เมื่อนำตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา มาผสมกับเมล็ดข้าวโพดปกติ ในอัตราส่วน 5, 10, 15 และ 20 % โดยน้ำหนักตามลำดับและชุดควบคุม สร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยเทคนิค PLSR เพื่อทำนายปริมาณการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา พบว่า สเปกตรัมที่แปลงข้อมูลโดยใช้วิธี smoothing 10 (10 nm averaging for left and right side) ร่วมกับ 2nd derivative 5 (5 nm averaging for left and right side) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1130-2468 นาโนเมตร ให้ความแม่นยำของสมการทำนายดีกว่าการแปลงสเปกตรัมด้วยวิธี smoothing 5 (5 nm averaging for left and right side) ร่วมกับ 1st derivative 10 (10 nm averaging for left and right side) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1130-2468 นาโนเมตร โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, R) สูงเท่ากับ 0.94 และ 0.93 ตามลำดับ มีค่าความคลาดเคลื่อนจากการประเมิน (standard error of calibration, SEC) เท่ากับ 2.29 % และ 2.54 % ตามลำดับ และค่าความคลาดเคลื่อนการทำนาย (standard error of prediction, SEP) มีค่าเท่ากับ 2.74 % และ 2.51 % ตามลำดับ ซึ่งค่าอัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่ม validation set ต่อค่า SEP (ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, RPD) ในช่วงความยาวคลื่น 1130-2468 นาโนเมตรมีค่าที่สูงกว่าคือ 2.68 ดังนั้นจึงเลือกสมการที่แปลงข้อมูลด้วยวิธี smoothing 10 (10 nm averaging for left and right

side) ร่วมกับ 2^{nd} derivative 5 (5 nm averaging for left and right side) ในช่วงความยาวคลื่น 1130-2468 นาโนเมตร (ตาราง 4.1)

เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) (ภาพ 4.11) ของสมการทำนายการผสมของข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราตามอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งแปลงข้อมูลด้วยวิธี smoothing 10 (10 nm averaging for left and right side) ร่วมกับ 2^{nd} derivative 5 (5 nm averaging for left and right side) พบว่าที่ความยาวคลื่น 1900 นาโนเมตร สัมพันธ์กับกลุ่มของ CH ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกลุ่ม CH_2 กับกลุ่มของ $-\text{CH}=\text{CH}_2$ ของเบนซีน และกลุ่ม OH โดยเกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายของเชื้อรา (Berardo *et al.*, 2005) และที่ความยาวคลื่น 2360 นาโนเมตร มีความสัมพันธ์กับกลูโคซามีนซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของไคตินที่พบได้ในเชื้อรา ประกอบด้วยพันธะ C-N สอดคล้องกับ Robert *et al.* (1987; 1991) รายงานว่าพบ พิกกกลูโคซามีนที่ความยาวคลื่น 2356 นาโนเมตร จะเห็นว่ามีค่าความแตกต่างของตำแหน่งพิก ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการแปลงข้อมูลด้วยสเปกตรัมทางคณิตศาสตร์ และเมื่อระดับการผสมด้วยเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณส่วนประกอบของเชื้อรา



ภาพ 4.9 สเปกตรัมดั้งเดิมของเมล็ดข้าวโพดปกติ (non-infected) และเมล็ดข้าวโพดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร วัดด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with coarse sample cell

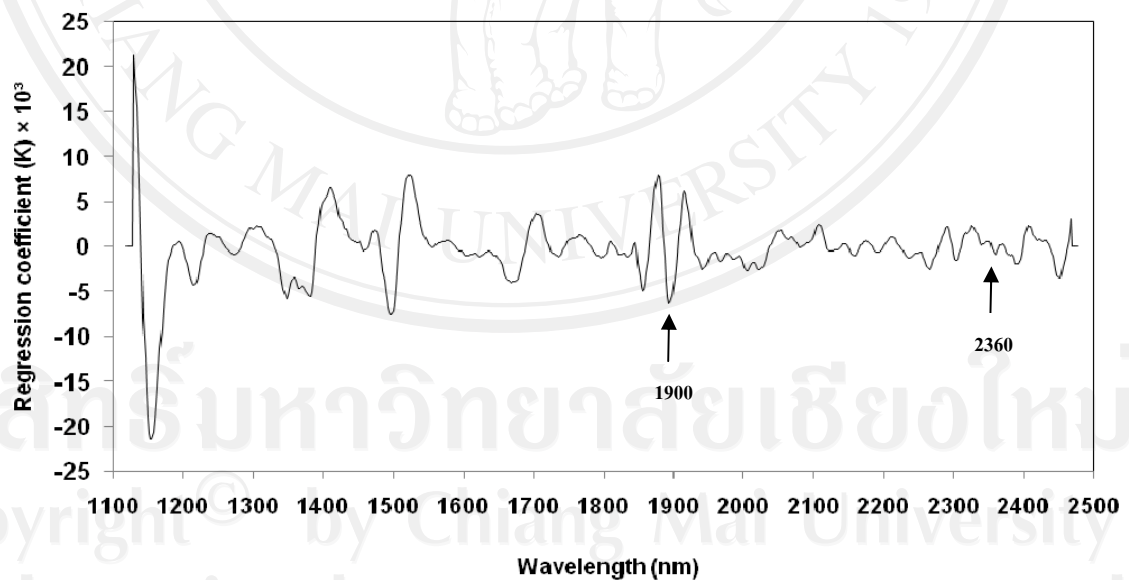


ภาพ 4.10 สเปกตรัมของเมล็ดข้าวโพดปกติ (non-infected) และเมล็ดข้าวโพดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก ด้วยอนุพันธ์อันดับที่สอง (2nd derivative) ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร วัดด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with coarse sample cell

ตาราง 4.1 ผลของสมการเทียบมาตรฐานที่สร้างด้วยวิธี PLSR สำหรับทำนายการผสมของข้าวโพดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก วัดสเปกตรัมด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with coarse sample cell

Pre-treatment	Wavelength region (nm)	F	R	SEC	SEP	Bias	RPD
Smoothing 5 + 1 st Derivative 5	1120-2478	3	0.93	2.53	2.76	0.05	2.40
Smoothing 5 + 1 st Derivative 10	1130-2468	4	0.93	2.54	2.74	-0.09	2.42
Smoothing 10 + 2nd Derivative 5	1130-2468	4	0.94	2.29	2.51	-0.02	2.68

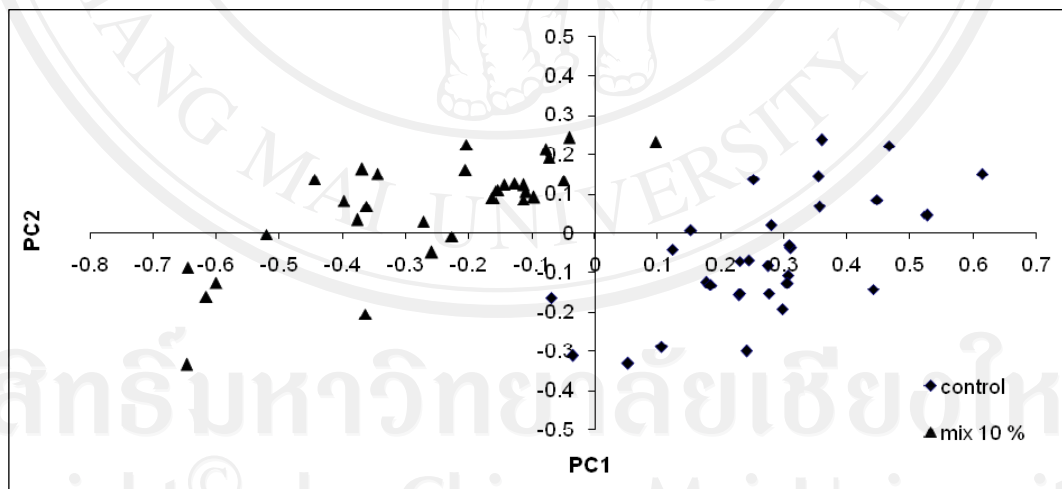
smoothing 5, 10: smooting, 1st derivative 5: first derivative, 2nd derivative 5: second derivative, F: latent variables or number of factors used in the calibration equation, R: multiple correlation coefficients, SEC: standard error of calibration, SEP: standard error of prediction, Bias: average of difference between actual value and NIR value, RPD: ratio of standard derivation of reflectance data in validation set to SEP



ภาพ 4.11 สัมประสิทธิ์การถดถอยของสมการเทียบมาตรฐาน ที่สร้างด้วย PLSR สำหรับทำนายระดับการผสมของเมล็ดข้าวโพดปกติด้วยเมล็ดข้าวโพดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก วัดด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with coarse sample cell

เมื่อนำข้อมูลสเปกตรัมที่แปลงข้อมูลด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสองมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCA (ภาพ 4.12) พบว่า PC1 สามารถบอกความแตกต่างของสเปกตรัมในกรรมวิธีที่มีการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา *A. flavus* ที่ระดับ 10 % ขึ้นไป อย่างไรก็ตาม พบว่าที่ระดับการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา *A. flavus* เข้าทำลาย 10 % เป็นระดับต่ำที่สุดที่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของพิกที่ความยาวคลื่น 1900 และ 2360 นาโนเมตรได้

ดังนั้นสร้างสมการเทียบมาตรฐานทำนายปริมาณการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราด้วยข้อมูลสเปกตรัมที่วัดด้วยเครื่อง NIR พร้อมอุปกรณ์เสริม transportation module with coarse sample cell แปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยวิธี smoothing 10 (10 nm averaging for left and right side) ร่วมกับ 2nd derivative 5 (5 nm averaging for left and right side) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1130-2468 นาโนเมตร พบว่ามีค่า R, SEC, SEP, Bias และ RPD เท่ากับ 0.94, 2.29 %, 2.51 %, -0.02 % และ 2.6 ตามลำดับ เมล็ดข้าวโพดปกติกับเมล็ดข้าวโพดที่ผสมด้วยเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราสามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจนด้วยเทคนิค PCA โดยแยกได้ตั้งแต่ระดับการผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 10 % ขึ้นไป



ภาพ 4.12 การวิเคราะห์ PCA ของสเปกตรัมของข้าวโพดปกติ (control) และข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา *A. flavus* ที่ 10% โดยน้ำหนักด้วยชุดอุปกรณ์เสริม transportation module with coarse sample cell

4.3.2 การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดข้าวโพดด้วยเทคนิค VIS/NIR spectroscopy ด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell

เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ระดับต่างๆ คือ 5, 10, 15 และ 20 % โดยน้ำหนักและชุดควบคุม (เมล็ดปกติ) ด้วยเครื่อง NIRSystem6500 และชุดอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร พบว่าสเปกตรัมดั้งเดิม (ภาพ 4.13) มีพีคฐานกว้างชัดเจนที่ความยาวคลื่น 1436, 1756 และ 1930 นาโนเมตร สัมพันธ์กับพันธะ OH ของน้ำ (Iwamoto *et al.*, 1995; Ozaki, 2002; William and Norris, 2001; Büning-Pfaue, 2003; Osborne *et al.*, 1993) เนื่องจากน้ำเป็นองค์ประกอบทางเคมีของผลผลิตเกษตรที่ดูดกลืนคลื่นแสง NIR ได้ดี ส่งผลให้เกิดการซ้อนทับ กับพีคขององค์ประกอบเคมีชนิดอื่น แต่อย่างไรก็ตามสามารถพบพีคขององค์ประกอบทางเคมีหลักของข้าวโพดที่ความยาวคลื่น 990, 2310, 2352 และ 2386 นาโนเมตร โดยที่ความยาวคลื่น 990 นาโนเมตรสัมพันธ์กับ O-H ของโมเลกุลของแป้ง ที่ความยาวคลื่น 2352 นาโนเมตรยังสัมพันธ์กับ C-H ของเซลลูโลส ที่ความยาวคลื่น 2310 และ 2386 นาโนเมตร สัมพันธ์กับ C-H ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในไขมัน (วารุณีและคณะ, 2552; Osborne *et al.*, 1993b; Shenk *et al.*, 2001; Williams and Norris, 2001) สอดคล้องกับ Severson (1988) รายงานว่า องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวโพดแสดงจาก 100 กรัม พบว่ามีปริมาณแป้งสูงถึง 72.2 กรัม น้ำ 13.8 กรัม และไขมัน 3.9 กรัม นอกจากนี้ Sandstead *et al.* (1987); Van Soest *et al.* (1979) รายงานว่าใยอาหาร (Dietary fibre) เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่พบมากในเมล็ดข้าวโพด โดยประกอบด้วยเซลลูโลส (cellulose) 25 % เมื่อวัดด้วยน้ำหนักแห้ง

โมเลกุลที่ดูดกลืนแสง NIR ดังกล่าวประกอบด้วยโมเลกุลของไฮโดรเจนเป็นส่วนใหญ่ สอดคล้องกับ Tigabu (2003) รายงานว่าโมเลกุลของไฮโดรเจนสามารถเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานการสั่นแบบโอเวอร์โทนของโมเลกุลที่ดูดกลืนแสง NIR ตามกฎการสั่นแบบแอนฮาร์โมนิก และสามารถดูดกลืนแสงในช่วง NIR ได้ดีจึงทำให้ไม่พบพีคขององค์ประกอบอื่นๆที่ต้องการตรวจวัด ดังนั้นจึงต้องแปลงข้อมูลด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับที่สอง ทำให้พบพีคอื่นๆ ได้ชัดเจนขึ้นที่ความยาวคลื่น 1168, 1206, 1420, 1774, 1912 และ 2354 นาโนเมตร (ภาพ 4.14) โดยที่ความยาวคลื่น 1168 และ 1206 นาโนเมตรสัมพันธ์กับพันธะ N-H ส่วนใหญ่จะเป็นหมู่กรดอะมิโน

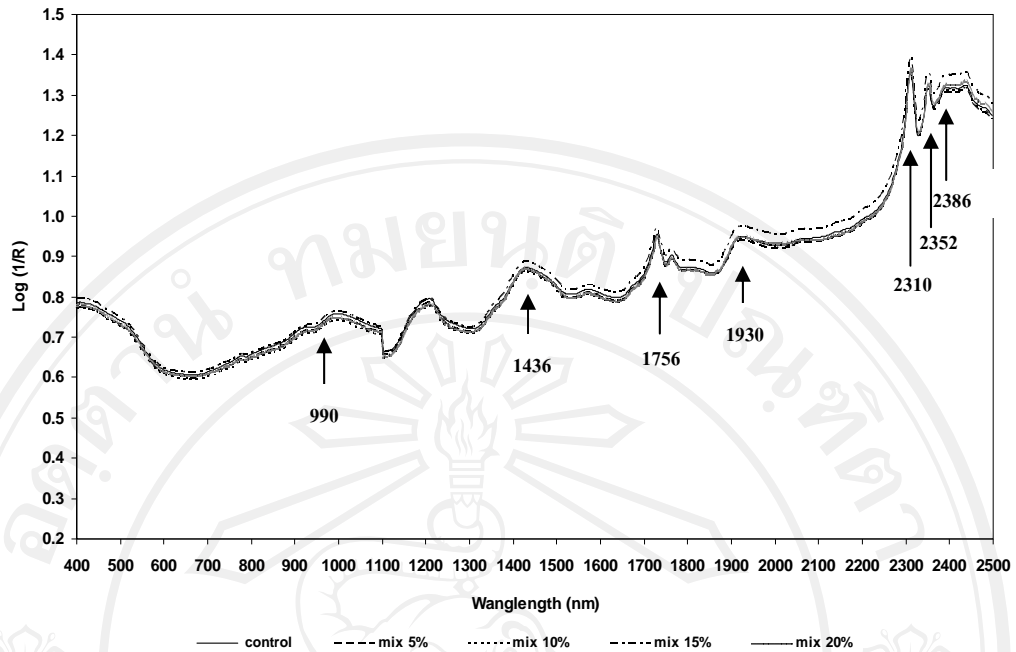
อะโรมาติกไฮโดรคาร์บอน และ radical structure ที่เป็นส่วนประกอบในผนังเซลล์ของเชื้อรา (Fernández-Ibañez *et al.*, 2009) ที่ความยาวคลื่น 1420 นาโนเมตรสัมพันธ์กับพันธะ O-H ที่พบในโมเลกุลของกลูโคส โดยเป็นส่วนหนึ่งของเส้นใยเชื้อรา (Berardo *et al.*, 2005) ที่ความยาวคลื่น 1774 นาโนเมตร สัมพันธ์กับ N-H, C-N, C-H และกลุ่ม CHO ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่พบได้ในเชื้อรา (Berardo *et al.*, 2005) ที่ความยาวคลื่น 1912 นาโนเมตรสัมพันธ์กับพันธะ O-H ซึ่งพบในโมเลกุลของน้ำ (Osborn *et al.*, 1993) และที่ความยาวคลื่น 2354 นาโนเมตร สัมพันธ์กับกลูโคซามีน ซึ่งเป็นส่วนประกอบหนึ่งของไคตินที่พบได้ในเชื้อรา (Roberts *et al.*, 1987)

เมื่อนำตัวอย่างข้าวโพดทุกรวมวิธีมาตรฐานสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยเทคนิค PLSR สร้างสมการถดถอยเชิงเส้นเพื่อทำนายปริมาณการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา (ตาราง 4.2) โดยใช้วิธี 2nd derivative 5 (5 nm averaging for left and right side) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1110-2450 นาโนเมตร ซึ่งให้ความแม่นยำของสมการทำนายดีกว่าการแปลงสเปกตรัมด้วยวิธี MSC + 2nd derivative 5 (5 nm averaging for left and right side) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1550-2488 นาโนเมตร โดยให้ค่า R เท่ากับ 0.80 และ 0.81 ตามลำดับ มีค่า SEC เท่ากับ 4.18 % และ 4.15 % ตามลำดับ และ SEP มีค่าเท่ากับ 4.08 % และ 4.58 % ตามลำดับ ซึ่งให้ผลของสมการมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกสมการที่แปลงข้อมูลด้วยวิธี 2nd derivative 5 (5 nm averaging for left and right side) ในช่วงความยาวคลื่น 1110-2450 นาโนเมตรเพราะใช้วิธีแปลงข้อมูลสเปกตรัมน้อยกว่าช่วงความยาวคลื่น 1550-2488 นาโนเมตร เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (ภาพ 4.15) ของสมการทำนายการผสมของข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราตามอัตราส่วนต่างๆ พบว่าที่ความยาวคลื่น 1470, 1806, 2144 และ 2176 นาโนเมตรสัมพันธ์กับการเข้าทำลายของเชื้อรา สอดคล้องกับ Berardo *et al.* (2005); Fernández-Ibañez *et al.* (2009) รายงานว่า ที่ความยาวคลื่น 1470, 1820, 2140 และ 2176 นาโนเมตรมีความสัมพันธ์กับการเข้าทำลายของเชื้อรา (fungal infection) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสั่นของโมเลกุล OH ของกลูโคส, กลุ่ม NH ของกรดอะมิโน และ CH จะเห็นว่ามีค่าแตกต่างของตำแหน่งพิก ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการแปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์ ที่ความยาวคลื่น 1522 นาโนเมตร เป็นผลของ OH สัมพันธ์กับ cutin และ β -glucan (Berardo *et al.*, 2005) ที่ความยาวคลื่น 1898 นาโนเมตรเป็นผลของกลุ่ม CH ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกลุ่ม CH₂ และกลุ่มของ -CH=CH₂ ของเบนซีน (benzene), กลุ่ม O-H ที่สัมพันธ์กับ hydroxyl-CH=CH-

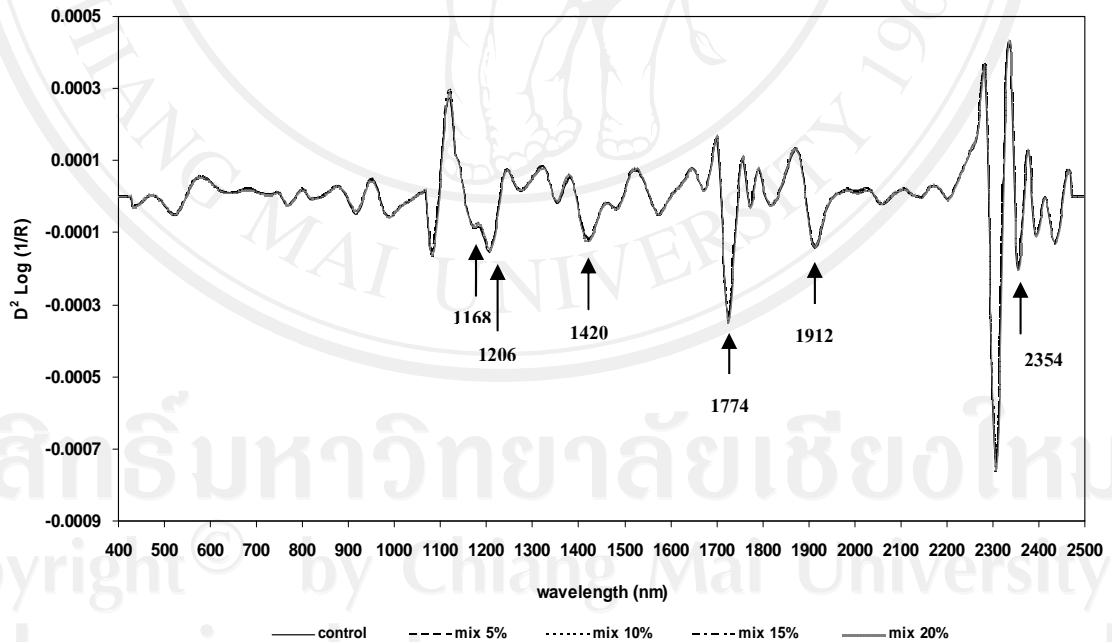
-CH=CH₂- และ CH (Berardo *et al.*, 2005) ที่ความยาวคลื่น 2110 และ 2362 นาโนเมตร มีความสัมพันธ์กับไคติน ที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของเชื้อรา *A. flavus* ประกอบด้วยพันธะ C-N และ N-H (Robert *et al.*, 1987; 1991)

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเทคนิค PCA พบว่าข้าวโพดปกติและข้าวโพดที่ถูกผสมด้วยข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราในแต่ละอัตราส่วนสามารถแยกออกเป็นสองกลุ่มอย่างชัดเจนด้วย PC1 และ PC2 (ภาพ 4.16) โดยสามารถแยกอัตราการผสมของข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา *A. flavus* ได้ตั้งแต่ที่ระดับ 5 % โดยน้ำหนักขึ้นไปได้

ดังนั้น เทคนิค VIS/NIR spectroscopy สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ดข้าวโพดได้โดยสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยเทคนิค PLSR ทำนายปริมาณการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา วัดสเปกตรัมด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell แปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยวิธี 2nd derivative 5 (5 nm averaging for left and right side) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1110-2450 นาโนเมตร พบว่ามีค่า R, SEC, SEP, Bias และ RPD เท่ากับ 0.80, 4.18 %, 4.08 %, 0.54 % และ 1.74 ตามลำดับ เมล็ดข้าวโพดปกติกับเมล็ดข้าวโพดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราสามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจนด้วยเทคนิค PCA โดยแยกได้ตั้งแต่ระดับการผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5 % ขึ้นไป



ภาพ 4.13 สเปกตรัมดั้งเดิมของเมล็ดข้าวโพดปกติ (non-infected) และเมล็ดข้าวโพดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร วัดด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell

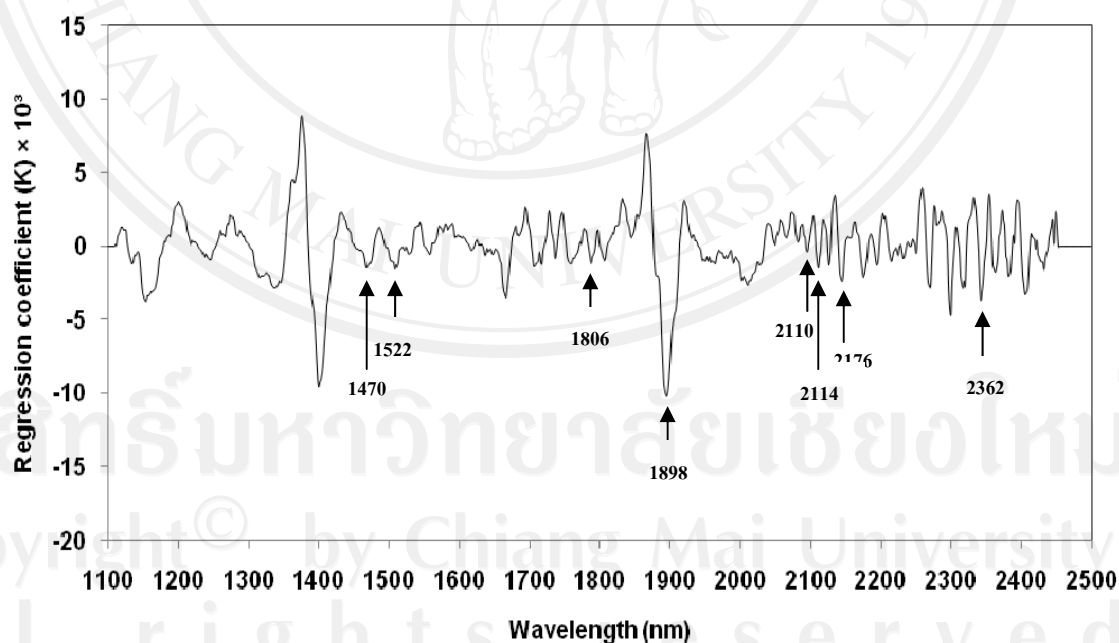


ภาพ 4.14 สเปกตรัมของเมล็ดข้าวโพดปกติ (non-infected) และเมล็ดข้าวโพดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก ด้วยอนุพันธ์อันดับที่สอง (2^{nd} derivative) ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร วัดด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell

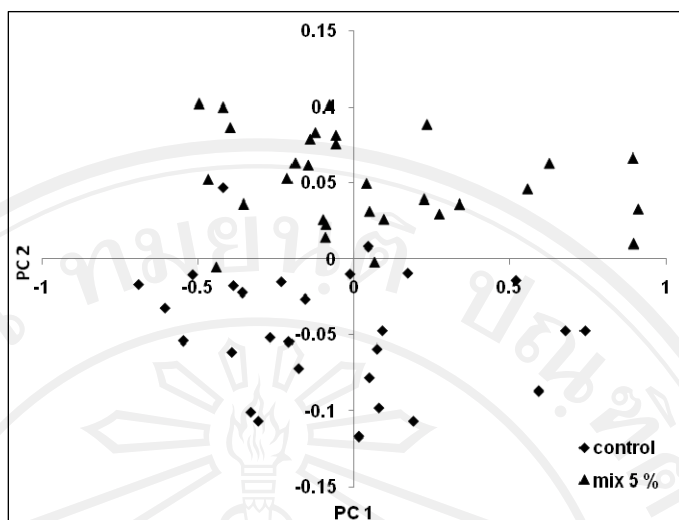
ตาราง 4.2 ผลของสมการเทียบมาตรฐานที่สร้างด้วยวิธี PLSR สำหรับทำนายการผสมของข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก วัดสเปกตรัมด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell

Pre-treatment	Wavelength region (nm)	F	R	SEC	SEP	Bias	RPD
MSC	1100-2500	4	0.79	4.35	4.36	1.11	1.63
2nd Derivative 5	1110-2450	5	0.80	4.18	4.08	0.54	1.74
MSC + 2 nd Derivative 5	1550-2488	6	0.81	4.15	4.58	0.44	1.55

MSC: multiplicative scatter correction, 2nd derivative 5: second derivative, F: latent variables or number of factors used in the calibration equation, R: multiple correlation coefficients, SEC: standard error of calibration, SEP: standard error of prediction, Bias: average of difference between actual value and NIR value, RPD: ratio of standard deviation of reflectance data in validation set to SEP



ภาพ 4.15 สัมประสิทธิ์การถดถอยของสมการเทียบมาตรฐาน ที่สร้างด้วย PLSR สำหรับทำนายระดับการผสมของเมล็ดข้าวโพดปกติด้วยเมล็ดข้าวโพดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก วัดด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell



ภาพ 4.16 การวิเคราะห์ PCA ของสเปกตรัมของข้าวโพดปกติ (control) และข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา *A. flavus* ที่ 5 % โดยนำหน้าด้วยชุดอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell

4.4 การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดข้าวโพดด้วยเทคนิค VIS/NIR spectroscopy

4.4.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดข้าวโพดด้วยเทคนิค VIS/NIR spectroscopy ด้วยชุดอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell

เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ระดับต่างๆคือ 5, 10, 15 และ 20 % โดยนำหน้าและชุดควบคุม (เมล็ดข้าวโพดปกติ) ด้วยเครื่อง NIRSystem6500 และชุดอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร พบว่าสเปกตรัมดั้งเดิม (ภาพ 4.17) มีพื้นฐานกว้างชัดเจนที่ความยาวคลื่น 1436, 1758 และ 1930 นาโนเมตรสัมพันธ์กับพันธะ OH ของน้ำ (Iwamoto *et al.*, 1995; Ozaki, 2002; William and Norris, 2001; Büning-Pfaue, 2003; Osborne *et al.*, 1993) เนื่องจากน้ำเป็นองค์ประกอบทางเคมีของผลผลิตเกษตรที่ดูดกลืนคลื่นแสง NIR ได้ดี แต่อย่างไรก็ตามก็สามารถพบพีกขององค์ประกอบทางเคมีหลักของข้าวโพดที่ความยาวคลื่น 2332 นาโนเมตรซึ่งสัมพันธ์กับการสั่นของพันธะภายในโมเลกุลคือ C-H ของกลุ่ม CH_2 และแบ่ง ที่ความยาวคลื่น 2310 นาโนเมตรสัมพันธ์กับการสั่นของพันธะภายในโมเลกุล C-H และ C-C ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบในไขมัน และที่ความยาวคลื่น 2354 นาโนเมตรสัมพันธ์กับพันธะภายในโมเลกุลของ C-H เป็นองค์ประกอบที่พบในเซลลูโลส (วารุณี

และคณะ, 2552; Osborne *et al.*, 1993b; Shenk *et al.*, 2001; Williams and Norris, 2001) สอดคล้องกับ Severson (1988) รายงานว่า องค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดข้าวโพดแสดงจาก 100 กรัม พบว่าพบปริมาณแป้งสูงถึง 72.2 กรัม, น้ำ 13.8 กรัมและไขมัน 3.9 กรัม เช่นเดียวกันกับ Boyer and Shanon (1987) รายงานว่า องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของเมล็ดข้าวโพดเป็นแป้งมากถึง 72-73 % ของน้ำหนักเมล็ด สำหรับส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตอื่นๆเช่น กลูโคส, ซูโครส และฟรุกโตส มีปริมาณที่แตกต่างกันประมาณ 1-3 % ของน้ำหนักเมล็ด นอกจากนี้ FAO. (1992) รายงานว่า ปริมาณองค์ประกอบของไขมันส่วนใหญ่มาจากส่วนที่เจริญเป็นต้นอ่อน มีการควบคุมโดยลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ พบประมาณ 3-18% รวมทั้ง Sandstead *et al.* (1987); Van Soest *et al.* (1979) รายงานว่าใยอาหาร (dietary fibre) เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่พบมาก เช่นเดียวกันในเมล็ดข้าวโพดโดยประกอบด้วยเซลลูโลส (cellulose) 25 % เมื่อวัดด้วยน้ำหนักแห้ง

นอกจากนี้ยังพบการเลื่อนตัวของสเปกตรัมในแนวแกน Y (base line shift) ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการกระเจิงของแสงเป็นปรากฏการณ์ที่ทำให้แสงเปลี่ยนทิศทาง ส่งผลกระทบต่อการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแตกต่างกัน และมีความเกี่ยวข้องกับขนาดหรือรูปร่างของตัวอย่าง (Manley *et al.*, 1994) โดยพบว่าค่า Log (1/R) ของการวัดแบบบดมีค่าต่ำกว่าการวัดแบบทั้งเมล็ด กรณีนี้เกิดจากการอัดตัวของตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดบดในถุงบรรจุตัวอย่างได้แน่นกว่ามีช่องว่างระหว่างอนุภาคของตัวอย่างน้อย ทำให้ระยะทางที่แสงผ่านเข้าไปในตัวอย่างไม่สั้นกว่าตัวอย่างของการวัดสเปกตรัมแบบทั้งเมล็ด และอนุภาคขนาดเล็กยังมีผลทำให้ตัวอย่างดูขาวหรือสว่างกว่าตัวอย่างที่มีอนุภาคขนาดใหญ่มีการสะท้อนแสงกลับได้มากกว่าจึงเกิดการดูดกลืนแสง NIR ได้ต่ำกว่า (Osborne *et al.*, 1993b) เช่นเดียวกันกับ อนุพันธ์ (2545) รายงานว่า ขนาดอนุภาคที่แตกต่างกันเป็นสาเหตุให้ปริมาณการกระเจิงของแสงต่างกันด้วย ซึ่งอนุภาคขนาดเล็กจะมีการกระเจิงของแสงมาก ทำให้ระยะทางที่แสงผ่านตัวอย่างสั้นกว่าตัวอย่างที่มีอนุภาคขนาดใหญ่ ค่าการดูดกลืนแสงจึงน้อยตามไปด้วย สอดคล้องกับการทดลองของ Norris and Williams (1984) ได้รายงานถึงผลของขนาดอนุภาคของเมล็ดโดยวัดสเปกตรัมของเมล็ดข้าวสาลีแบบสะท้อนกลับของเมล็ดปกติ และเมล็ดบดพบว่า เมล็ดปกติมีค่าการดูดกลืนแสง (Log 1/R) สูงกว่าเมล็ดบดทั้งนี้เนื่องจากอนุภาคขนาดใหญ่ (เมล็ดปกติ) สามารถสะท้อนแสงได้ต่ำกว่าอนุภาคขนาดเล็ก (เมล็ดบด) นอกจากนี้ Manley *et al.* (1994) รายงานว่าค่าการดูดกลืนแสง (Log 1/R) ของเมล็ดปกติมีค่าสูงกว่าเมล็ดบด

จากสเปกตรัมดั้งเดิมพบว่าไม่สามารถพบพิกที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อรา *A. flavus* ได้อาจเนื่องมาจากสเปกตรัมดั้งเดิม มีการซ้อนทับกันของพิก มีพิกฐานกว้างและค่าของสเปกตรัมหรือค่า Log (1/R) แตกต่างกัน สาเหตุหลักมาจากการกระเจิงของแสงและเป็นผลมาจากลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง มากกว่าความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีภายในตัวอย่าง (อนุพันธ์, 2552) ดังนั้นเมื่อแปลงข้อมูลด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับที่สอง ทำให้พบพิกอื่นๆ ได้ชัดเจนขึ้นที่ความยาวคลื่น 502, 820, 984, 1080, 1168, 1728 1772, 2062, 2130 และ 2354 นาโนเมตร (ภาพ 4.18) โดยที่ความยาวคลื่น 502 นาโนเมตรสัมพันธ์กับการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ที่ทำให้สีของเมล็ดเปลี่ยนไป สอดคล้องกับ Fernández-Ibañez *et al.* (2009) รายงานว่าที่ความยาวคลื่น 480-600 นาโนเมตรสัมพันธ์กับการเปลี่ยนสีของเมล็ดธัญพืชที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อราที่ความยาวคลื่น 820, 948, 1080 และ 1168 นาโนเมตร สัมพันธ์กับการสั่นของพันธะภายในโมเลกุลของกลุ่ม NH amino acid และ aromatic rings ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของผนังเซลล์ของเชื้อรา โดยประกอบด้วยสารประกอบฟูรานิก (furanic) หรือ ฟีนอลิก (phenolic) มีส่วนที่ทำให้เมล็ดเกิดการเสื่อมสภาพเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อรา (Fernández-Ibañez *et al.*, 2009) นอกจากนี้ Osborne and Fearn (1986) รายงานว่าความเสียหายของเมล็ดที่เกิดจากเข้าทำลายของเชื้อรายังพบที่ความยาวคลื่น 1750-1800 นาโนเมตรสัมพันธ์กับการสั่นของพันธะภายในโมเลกุลของกลุ่ม CH เหมือนกับกลุ่มของ CH₂ และที่ความยาวคลื่น 2020-2190 นาโนเมตรสัมพันธ์กับการสั่นของพันธะภายในโมเลกุลของ NH และ OH ตรงกันข้ามกับแถบความยาวคลื่นของ C=O สอดคล้องกับการทดลองที่พบพิกหัวกลับที่ความยาวคลื่น 1772, 2062 และ 2130 นาโนเมตรตามลำดับที่ความยาวคลื่น 1728 นาโนเมตรสัมพันธ์กับการสั่นของพันธะภายในโมเลกุลของกลุ่ม CH₂ เกี่ยวข้องกับ ergosterol โดยเป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา (Berardo *et al.*, 2005) และที่ความยาวคลื่น 2354 นาโนเมตรมีความสัมพันธ์กับกลูโคซามีน (glucosamine) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของไคตินที่พบได้ในผนังเซลล์ของเชื้อรา (Robert *et al.*, 1987; 1991)

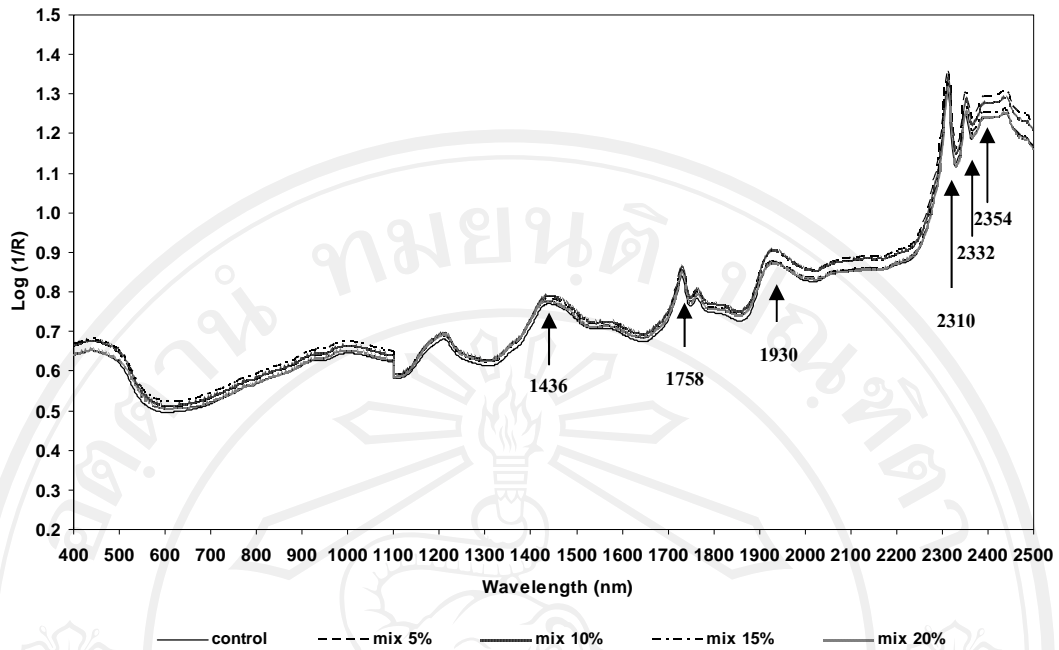
เมื่อนำตัวอย่างข้าวโพดบดทุกกรรมวิธีมาสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยเทคนิค PLSR สร้างสมการถดถอยเชิงเส้นเพื่อทำนายปริมาณการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราและแปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์ด้วยวิธีต่างๆ โดยเลือกตัดช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมคือตั้งแต่ช่วงความยาวคลื่น 1100-2500 นาโนเมตรพบว่า เทคนิคทางคณิตศาสตร์ที่สามารถใช้แปลง

ข้อมูลสเปกตรัมและให้ผลดีของสมการเทียบมาตรฐานมี 2 วิธีคือ Savitzky-Golay second derivative และ multiplicative scatter correction (MSC) (ตาราง 4.3) โดยได้สเปกตรัมที่แปลงข้อมูลสมการทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสม 3 สมการคือ MSC, 2nd derivative 10 (10 nm averaging for left and right side) และ MSC ร่วมกับ 2nd derivative 5 (5 nm averaging for left and right side) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าวิธี MSC ร่วมกับ 2nd derivative 5 (5 nm averaging for left and right side) ให้ค่า RPD สูงที่สุดคือ 5.36 สอดคล้องกับเกณฑ์การพิจารณาค่า RPD ของ Williams (2007) รายงานว่าระดับค่า RPD ตั้งแต่ 5.0-6.4 อยู่ในระดับดีและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในส่วนของการควบคุมคุณภาพ (quality control) ดังนั้นจึงเลือกเป็นสมการสำหรับใช้ในการทำนายในช่วงความยาวคลื่น 1110-2450 นาโนเมตร โดยให้ค่า R เท่ากับ 0.98 มีค่า SEC เท่ากับ 1.17 % และค่า SEP มีค่าเท่ากับ 1.32 % เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (ภาพ 4.19) ของสมการทำนายการผสมของข้าวโพดบดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราตามอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งแปลงข้อมูลด้วยวิธี MSC ร่วมกับ 2nd derivative 5 (5 nm averaging for left and right side) พบที่ความยาวคลื่น 1482, 1742, 1820, 1900, 2096, 2146, 2174, 2360 และ 2378 นาโนเมตร โดยที่ความยาวคลื่น 1482 และ 1742 นาโนเมตร สัมพันธ์กับปริมาณขององค์ประกอบที่พบในเชื้อรา (Robert *et al.*, 1987; 1991) ที่ความยาวคลื่น 1820, 2146 และ 2174 นาโนเมตร สัมพันธ์กับการเข้าทำลายของเชื้อราสอดคล้องกับ Berardo *et al.* (2005); Fernández-Ibañez *et al.* (2009) รายงานว่า ที่ความยาวคลื่น 1820, 2140 และ 2180 นาโนเมตรมีความสัมพันธ์กับการเข้าทำลายของเชื้อรา ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสิ้นของโมเลกุลของกลูโคส, กลุ่ม NH ของกรดอะมิโน และ CH จะเห็นว่ามีค่าแตกต่างของตำแหน่งพิก ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการแปลงข้อมูลด้วยสเปกตรัมทางคณิตศาสตร์ ที่ความยาวคลื่น 1900, 1954 และ 2378 นาโนเมตร สัมพันธ์กับกลุ่ม CH ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกลุ่ม CH₂ กับกลุ่ม -CH=CH₂ ของเบนซีน (benzene), กลุ่ม O-H ที่สัมพันธ์กับ hydroxyl-CH=CH-, -CH=CH₂- และ CH (Berardo *et al.*, 2005) และที่ความยาวคลื่น 2096 และ 2360 นาโนเมตร สัมพันธ์กับ กลูโคซามีน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของไคตินที่พบได้ใน เชื้อรา (Robert *et al.*, 1987; 1991)

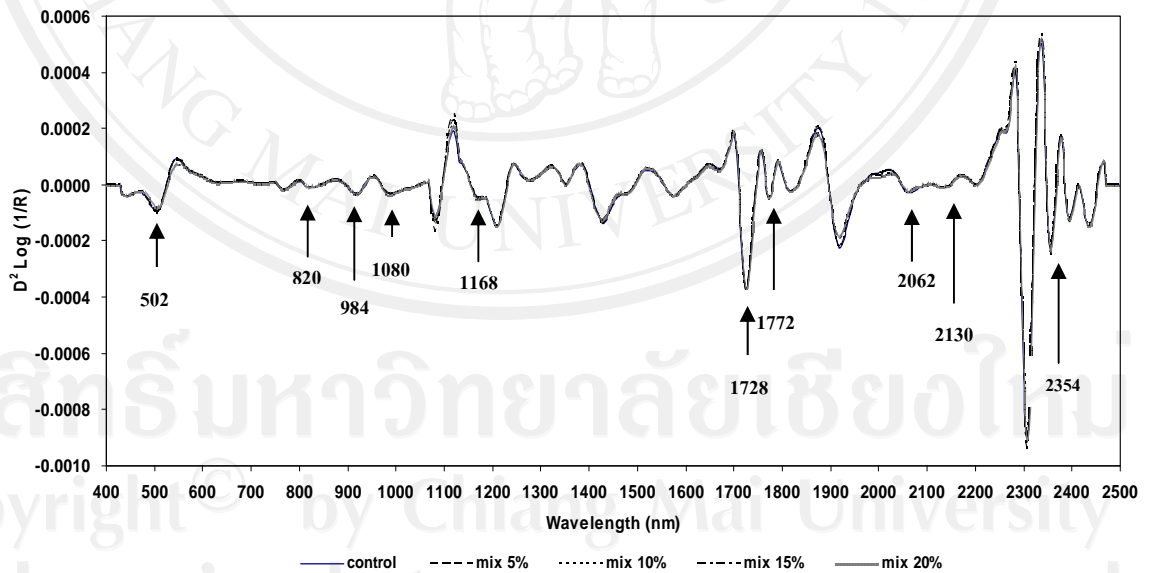
การใช้เทคนิค PCA เป็นการวิเคราะห์ผลโดยการลดจำนวนตัวแปรอิสระหรือตัวแปรที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย NIRS โดยการแบ่งกลุ่มตัวแปรอิสระเดิมที่มีความสัมพันธ์กันเพื่อสร้างตัวแปรใหม่ที่เรียกว่า principle component (PC) เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลทั้งสเปกตรัมของ

ข้าวโพดบด เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเทคนิค PCA พบว่าข้าวโพดบดปกติและข้าวโพดบดที่ถูกผสมด้วยข้าวโพดบดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราในแต่ละอัตราส่วนสามารถแยกออกเป็นสองกลุ่มอย่างชัดเจนด้วย PC1 และ PC2 (ภาพ 4.20) ส่วนใหญ่แล้ว PC1 ใช้อธิบายความแปรปรวนที่เกิดจากขนาดอนุภาคของตัวอย่างที่แตกต่างกัน (Osborne *et al.*, 1993a) มักไม่นิยมใช้ PC1 ในการแยกองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่าง จากผลการทดลองพบว่าสามารถแยกอัตราการผสมของข้าวโพดบดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา *A. flavus* ได้ตั้งแต่ที่ระดับ 5% โดยน้ำหนักขึ้นไปได้ ทั้งนี้เนื่องจากขนาดและรูปร่างของตัวอย่างเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง NIR ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระเจิงแสงของตัวอย่าง (Manley *et al.*, 1994; Pasikatan *et al.*, 2001)

ดังนั้นเทคนิค VIS/NIR spectroscopy สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ดข้าวโพดบดได้โดยสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยเทคนิค PLSR ทำนายปริมาณการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell แปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับ 2nd derivative 5 (5 nm averaging for left and right side) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1110-2480 นาโนเมตร พบว่ามีค่า R, SEC, SEP, Bias และ RPD เท่ากับ 0.98, 1.17%, 1.32%, 0.38% และ 5.36 ตามลำดับเมล็ดข้าวโพดบดปกติกับเมล็ดข้าวโพดบดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราสามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจนด้วยเทคนิค PCA โดยแยกได้ตั้งแต่ระดับการผสมด้วยเมล็ดบดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5% ขึ้นไป



ภาพ 4.17 สเปกตรัมดั้งเดิมของเมล็ดข้าวโพดปกติ (non-infected) และเมล็ดข้าวโพดปกติที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร วัดด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell



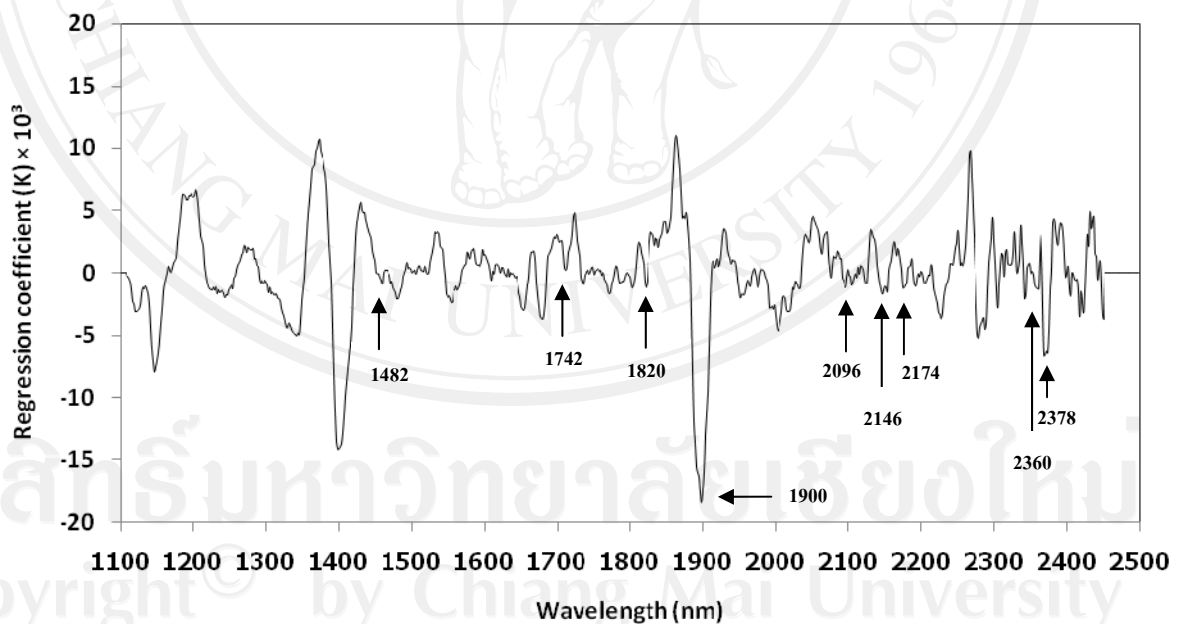
ภาพ 4.18 สเปกตรัมของเมล็ดข้าวโพดปกติ (non-infected) และเมล็ดข้าวโพดปกติที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก ด้วยอนุพันธ์อันดับที่สอง (2^{nd} derivative) ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร วัดด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell

ตาราง 4.3 ผลของสมการเทียบมาตรฐานที่สร้างด้วยวิธี PLSR สำหรับทำนายการผสมของข้าวโพดบดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก วัดสเปกตรัมด้วยอุปกรณ์เสริม

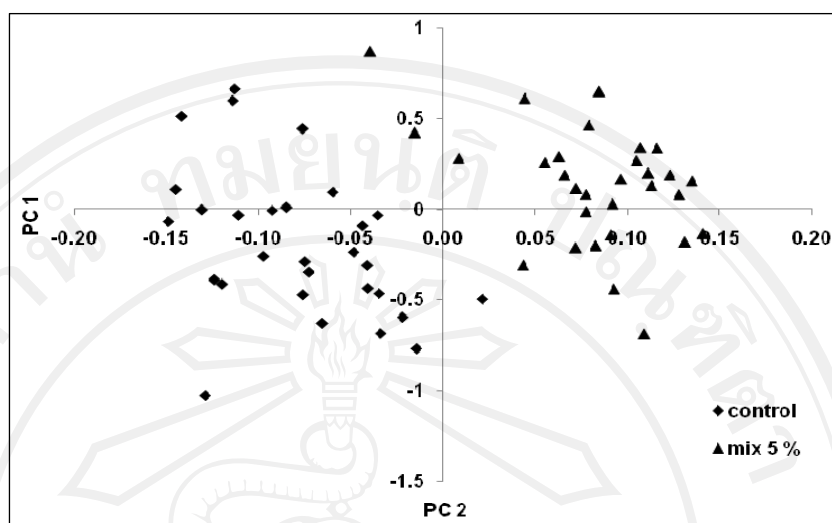
transportation module with pasting cell

Pre-treatment	Wavelength region (nm)	F	R	SEC	SEP	Bias	RPD
MSC	1100-2500	5	0.95	2.18	2.08	0.46	3.40
2 nd Derivative 5	1110-2480	7	0.98	1.22	1.34	0.43	5.28
MSC + 2nd Derivative 5	1110-2480	8	0.98	1.17	1.32	0.38	5.36

MSC: multiplicative scatter correction, 2nd derivative 5: second derivative, F: latent variables or number of factors used in the calibration equation, R: multiple correlation coefficients, SEC: standard error of calibration, SEP: standard error of prediction, Bias: average of difference between actual value and NIR value, RPD: ratio of standard derivation of reflectance data in validation set to SEP



ภาพ 4.19 สัมประสิทธิ์การถดถอยของสมการเทียบมาตรฐาน ที่สร้างด้วย PLSR สำหรับทำนายระดับการผสมของเมล็ดข้าวโพดบดปนด้วยเมล็ดข้าวโพดบดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก วัดด้วยอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell



ภาพ 4.20 การวิเคราะห์ PCA ของสเปกตรัมของข้าวโพดปกติ (control) และข้าวโพดปกติที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา *A. flavus* ที่ 5 % โดยนำหน้าหน้าด้วยชุดอุปกรณ์เสริม transportation module with pasting cell

4.4.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดข้าวโพดปกติด้วยเทคนิค VIS/NIR spectroscopy ด้วยชุดอุปกรณ์เสริม spinning module with standard cup

เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงของการผสมเมล็ดข้าวโพดปกติที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ระดับ 5, 10, 15 และ 20 % โดยนำหน้าและชุดควบคุม (เมล็ดข้าวโพดปกติ) ด้วยเครื่อง NIRSystem6500 ด้วยชุดอุปกรณ์เสริม spinning module with standard cup ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร พบว่าสเปกตรัมดั้งเดิม (ภาพ 4.21) มีพีคฐานกว้างชัดเจนที่ความยาวคลื่น 1930 นาโนเมตร สัมพันธ์กับพันธะ OH ของน้ำ (Osborne *et al.*, 1993; Iwamoto *et al.*, 1995; William and Norris, 2001; Ozaki, 2002; Büning-Pfaue, 2003) เนื่องจากน้ำเป็นองค์ประกอบทางเคมีของผลผลิตเกษตรที่ดูดกลืนคลื่นแสง NIR ได้ดี แต่อย่างไรก็ตามก็สามารถพบพีคขององค์ประกอบทางเคมีหลักของข้าวโพดที่ความยาวคลื่น 990 นาโนเมตร สัมพันธ์กับการสั่นของพันธะภายในโมเลกุลของ O-H ของแป้ง ที่ความยาวคลื่น 2100 นาโนเมตร สัมพันธ์กับการสั่นของพันธะภายในโมเลกุลของ O-H และ C-O ของแป้ง และการสั่นของพันธะภายในโมเลกุลของ C-O-O ของแป้งและเซลลูโลส

ที่ความยาวคลื่น 2352 นาโนเมตร สัมพันธ์กับการสั่นของพันธะภายในโมเลกุลของ C-H ของ เซลลูโลส และที่ความยาวคลื่น 2310 นาโนเมตร สัมพันธ์กับการสั่นของพันธะภายในโมเลกุลของ C-H (วารุณีและคณะ, 2552; Osborne *et al.*, 1993b; Shenk *et al.*, 2001; Williams and Norris, 2001) จากสเปกตรัมดั้งเดิมพบว่าไม่สามารถพบพีกที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อรา *A. flavus* ได้ อาจเนื่องมาจากมีการซ้อนทับกันของพีก มีพีกฐานกว้างและค่าของสเปกตรัมหรือค่า Log (1/R) แตกต่างกัน (อนุพันธ์, 2552)

ดังนั้นจึงต้องแปลงข้อมูลด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับที่สองเพื่อลดอิทธิพลการซ้อนทับของพีกในสเปกตรัมและการเลื่อนขึ้นของสเปกตรัม รวมทั้งช่วยลดผลกระทบจากการกระเจิงของแสง ทั้งที่เป็นผลบวก (additive effect) ที่ทำให้ขนาดสเปกตรัมเพิ่มขึ้นคงที่ตลอดช่วงความยาวคลื่นในลักษณะที่เป็นการบวกเพิ่มด้วยค่าบนเส้นตรงที่เป็นมุมเอียง ซึ่งค่าบวกเพิ่มจะน้อยที่ความยาวคลื่นสั้น และค่าบวกเพิ่มจะสูงที่ความยาวคลื่นสูง และผลเชิงคูณ (multiplicative effect) ที่ทำให้ขนาดสเปกตรัมเพิ่มขึ้นตามความยาวคลื่น ในลักษณะที่มีค่าคงที่มากคุณค่าการดูดกลืนแสง ในแต่ละความยาวคลื่น โดยจะลดผลกระทบหลังจากผลเชิงบวก เพื่อแยกจุดยอดที่เหลื่อมซ้อนกันในสเปกตรัมออกจากกัน และการลดผลกระทบที่ทำให้สเปกตรัมมีขนาดเพิ่มขึ้นตลอดช่วงความยาวคลื่นจะทำให้ได้พีกหัวกลับ (อนุพันธ์, 2552) ทำให้พบพีกอื่นๆ ได้ชัดเจนขึ้นที่ความยาวคลื่น 504, 914, 982, 1092, 1164, 1430, 1470, 1820, 2140 และ 2180 นาโนเมตร (ภาพ 4.22) โดยที่ความยาวคลื่น 504 นาโนเมตรสัมพันธ์กับลักษณะสีที่เปลี่ยนไปเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อรา สอดคล้องกับ Fernández-Ibañez *et al.* (2009) รายงานว่า ช่วงความยาวคลื่น 480-600 นาโนเมตรเกี่ยวข้องกับลักษณะสีของเมล็ดที่เปลี่ยนแปลงไปเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อรา ที่ความยาวคลื่น 914, 982, 1092, 1164 นาโนเมตรสัมพันธ์กับการสั่นของพันธะภายในโมเลกุลของกลุ่ม NH amino acid และ aromatic rings ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของผนังเซลล์ ของเชื้อราโดยประกอบด้วยสารประกอบฟูรานิก (furanic) หรือ ฟีนอลิก (phenolic) มีส่วนที่ทำให้เมล็ดเกิดการเสื่อมสภาพเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อรา (Fernández-Ibañez *et al.*, 2009) และที่ความยาวคลื่น 1430, 1470, 1820, 2140 และ 2180 นาโนเมตรเกี่ยวข้องกับการสั่นของพันธะภายในโมเลกุลของ OH ของกลูโคส, กลุ่ม NH ของกรดอะมิโน และ CH ซึ่งสัมพันธ์กับการเข้าทำลายของเชื้อรา (Berardo *et al.*, 2005)

เมื่อนำตัวอย่างข้าวโพดบดทุกกรรมวิธีมาสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยเทคนิค PLSR สร้างสมการถดถอยเชิงเส้นเพื่อทำนายปริมาณการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราโดยแปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์วิธีต่างๆ เลือกตัดช่วงความยาวคลื่นที่เหมาะสมสอดคล้องกับ Bruce *et al.* (1991) กล่าวว่า ลักษณะสเปกตรัมของคลื่นแสง NIR พบว่ามีสเปกตรัมที่ซ้อนทับกันและมีพีกที่กว้าง การสร้างสมการทำนายของคัพระกอบทางเคมีถ้าพิจารณาเพียงความยาวคลื่นเดียวหรือความยาวคลื่นน้อยๆ จะให้ผลการวิเคราะห์ที่ไม่ถูกต้องเมื่อเทียบกับการพิจารณาทั้งสเปกตรัม หรือบางช่วงของสเปกตรัม วิธีการพิจารณาดังกล่าวจะช่วยให้เพิ่มประสิทธิภาพในการประเมินค่าทางเคมีได้ถูกต้องมากขึ้น ดังนั้นจึงเลือกตัดเฉพาะช่วงคลื่นยาวคือตั้งแต่ช่วงความยาวคลื่น 1100-2500 นาโนเมตรพบว่า เทคนิคทางคณิตศาสตร์ที่สามารถใช้แปลงข้อมูลสเปกตรัมและให้ผลดีมี 2 วิธีคือ Savitzky-Golay second derivative และ multiplicative scatter correction (MSC) (ตาราง 4.4) โดยได้สเปกตรัมที่แปลงข้อมูลสมการทางคณิตศาสตร์ที่ดีที่สุด 1 สมการคือ 2nd derivative 5 เพราะเป็นวิธีการปรับแต่งสมการที่มีวิธีแปลงข้อมูลน้อยที่สุด ซึ่งถ้าหากมีการปรับแต่งสมการมากไปจะทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนของข้อมูลจากความเป็นจริงได้

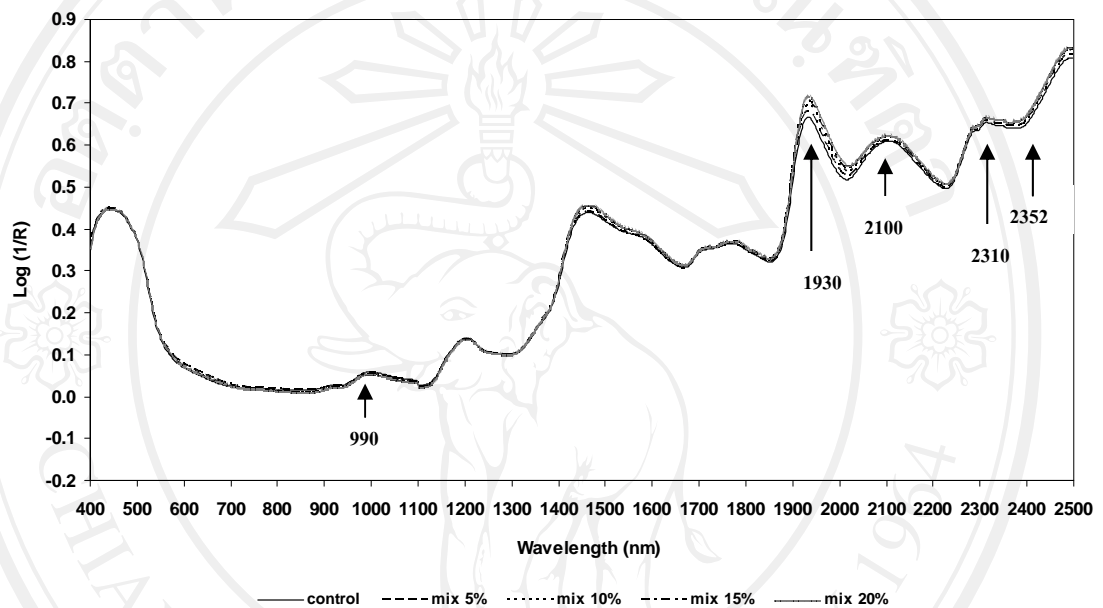
ดังนั้นจึงเลือกเป็นสมการเทียบมาตรฐานที่สร้างด้วยวิธี PLSR โดยใช้ข้อมูลสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 1110-2488 นาโนเมตร แปลงข้อมูลด้วยวิธี 2nd derivative 5 (5 nm averaging for left and right side) โดยให้ค่า RPD สูงที่สุดคือ 4.21 ค่า R เท่ากับ 0.97 มีค่า SEC เท่ากับ 1.52 % และค่า SEP มีค่าเท่ากับ 1.64 % เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (ภาพ 4.23) ของสมการทำนายการผสมของข้าวโพดบดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราตามอัตราส่วนต่างๆ พบที่ความยาวคลื่น 1238, 1410, 1516, 1738, 1812, 1900, 2364 และ 2388 นาโนเมตร โดยที่ความยาวคลื่น 1238, 1738 และ 2388 นาโนเมตรสัมพันธ์กับ ergosterol ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา (Seitz *et al.*, 1979; Pasanen *et al.*, 1999) สอดคล้องกับ Berardo *et al.* (2005) รายงานว่าที่ความยาวคลื่น 1240 และ 1738 นาโนเมตรเกี่ยวข้องกับการสั่นของพันธะภายใน โมเลกุลของ C-H, กลุ่มของ C-H และ CH₃, กลุ่มของ CH₂ ของ -CH=; -CH₂; CH ตามลำดับ โดยสัมพันธ์กับ ergosterol ที่ความยาวคลื่น 1410, 1516 และ 1812 นาโนเมตร สัมพันธ์กับการเข้าทำลายของเชื้อราสอดคล้องกับ Berardo *et al.* (2005); Fernández-Ibañez *et al.* (2009) รายงานว่า ที่ความยาวคลื่น 1410, 1510 และ 1820 นาโนเมตรมีความสัมพันธ์กับการเข้าทำลายของเชื้อรา (fungal infection) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการ

สั้นของโมเลกุล OH ของกลูโคส, กลุ่ม NH ของกรดอะมิโน และ CH ที่ความยาวคลื่น 2364 นาโนเมตรสัมพันธ์กับกลูโคซามีน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหนึ่งของไคตินที่พบได้ในเชื้อรา สอดคล้องกับ Robert *et al.* (1987; 1991) รายงานว่าพบ พิกกลูโคซามีนที่ความยาวคลื่น 2356 นาโนเมตร จะเห็นว่ามีค่าแตกต่างของตำแหน่งพิก ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการแปลงข้อมูลด้วย สเปกตรัมทางคณิตศาสตร์ และที่ความยาวคลื่น 1900 นาโนเมตรสัมพันธ์กับกลุ่ม CH ซึ่งเป็นส่วน หนึ่งของกลุ่ม CH₂ กับกลุ่มของ -CH=CH₃ ของเบนซีน, กลุ่ม O-H ที่สัมพันธ์กับ hydroxyl-CH=CH-, -CH=CH₂- และ CH (Berardo *et al.*, 2005)

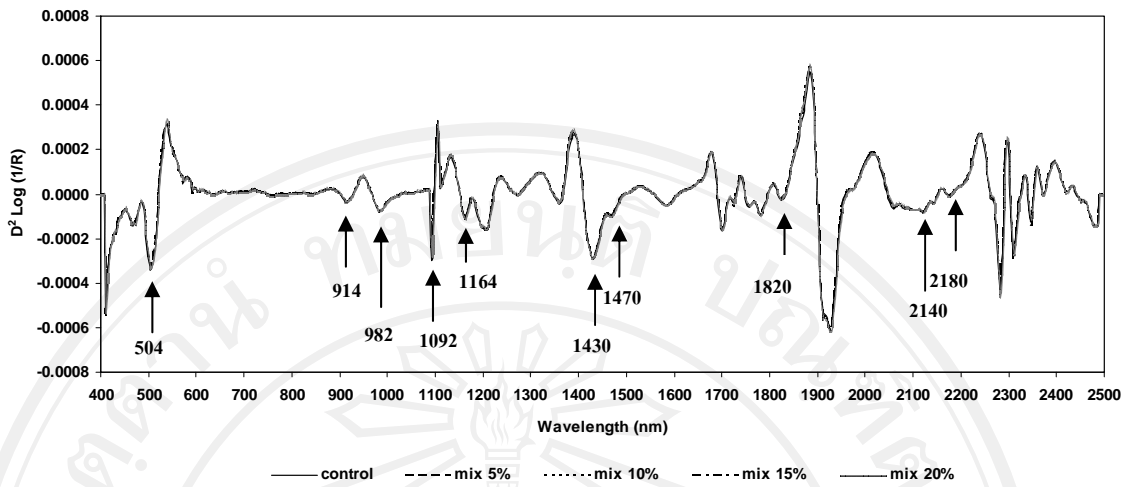
การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCA เป็นวิธีการหนึ่งทางสถิติในการวิเคราะห์ตัวแปรหลายตัว (multivariate analysis) โดยใช้เทคนิคที่อาศัยการลดจำนวนตัวแปรอิสระ (X) จึงไม่จำเป็นต้องทำการปรับแต่งสเปกตรัมก่อน (Evans *et al.*, 1993a) ด้วยการแบ่งกลุ่มตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันเพื่อสร้างตัวแปรขึ้นมาใหม่ที่เรียกว่า ปัจจัย หรือองค์ประกอบ (factors or principle components: PC) PC ที่ถูกสร้างขึ้นเป็นการสร้างโดยอาศัยความสัมพันธ์เชิงเส้นของข้อมูลเดิม แล้วนำความสัมพันธ์จากข้อมูลมาสร้าง PC (Osborne *et al.*, 1993a) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเทคนิค PCA พบว่าข้าวโพดบดปกติและข้าวโพดบดที่ถูกลมด้วยข้าวโพดบดที่ปั่นเป็นก้อนด้วยเชื้อราในแต่ละอัตราส่วนสามารถแยกออกเป็นสองกลุ่มอย่างชัดเจนด้วย PC2 และ PC1 (ภาพ 4.24) โดยระดับ 5% เป็นระดับต่ำสุดที่สามารถแยกความแตกต่างได้ สอดคล้องกับอนุพันธ์ (2552) กล่าวว่า เมื่อพิจารณาจากค่าน้ำหนักปัจจัยโดยทิศทางของความสัมพันธ์ขึ้นกับเครื่องหมายของค่าน้ำหนัก โดยถ้ามีเครื่องหมายบวก แสดงว่ามีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกัน และถ้ามีเครื่องหมายลบแสดงว่ามีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงข้ามกันและค่าคะแนนปัจจัยโดยตัวอย่างที่มีค่าคะแนนใกล้เคียงกันในแกน PC เดียวกันจะมีความคล้ายกัน ในทางกลับกันตัวอย่างที่มีค่าคะแนนแตกต่างกันมากจะมีค่าของตัวแปรเดิมแตกต่างกันด้วย

ดังนั้นเทคนิค VIS/NIR spectroscopy สามารถตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus* ในเมล็ดข้าวโพดบดได้โดยสร้างสมการเทียบมาตรฐานด้วยเทคนิค PLSR ทำนายปริมาณการผสมเมล็ดข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราด้วยอุปกรณ์เสริม spinning module with standard cup แปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยวิธี 2nd derivative 5 (5 nm averaging for left and right side) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1110-2488 นาโนเมตร พบว่ามีค่า R, SEC, SEP, Bias และ RPD เท่ากับ 0.97, 1.52 %, 1.64

%, 0.10 % และ 4.21 ตามลำดับเมล็ดข้าวโพดบดปกติกับเมล็ดข้าวโพดบดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราสามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจนด้วยเทคนิค PCA โดยแยกได้ตั้งแต่ระดับการผสมด้วยเมล็ดบดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5 % ขึ้นไป



ภาพ 4.21 สเปกตรัมดั้งเดิมของเมล็ดข้าวโพดปกติบด (non-infected) และเมล็ดข้าวโพดบดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตรวัดด้วยอุปกรณ์เสริม spinning module with standard cup

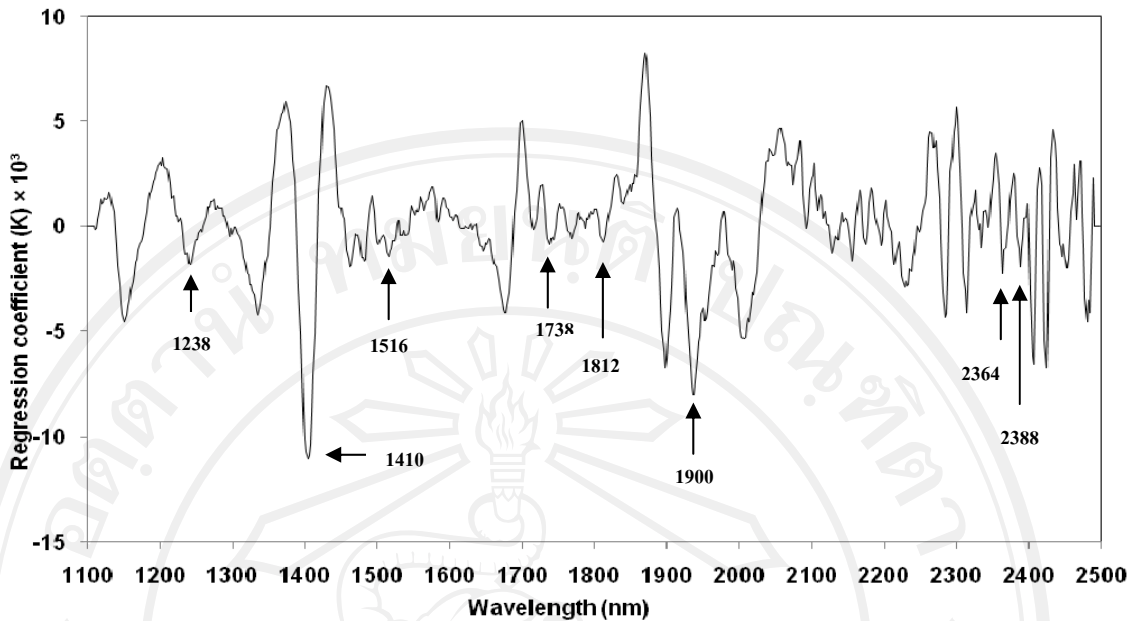


ภาพ 4.22 สเปกตรัมของเมล็ดข้าวโพดปกติ (non-infected) และเมล็ดข้าวโพดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก ด้วยอนุพันธ์อันดับที่สอง (2nd derivative) ในช่วงความยาวคลื่น 400-2500 นาโนเมตร วัดด้วยอุปกรณ์เสริม spinning module with standard cup

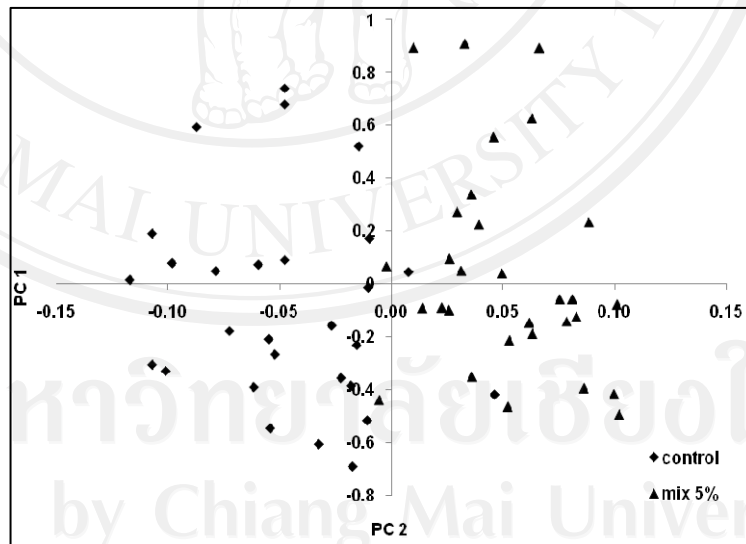
ตาราง 4.4 ค่าทางสถิติที่ได้จากการสร้างสมการทำนายการผสมของข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก ด้วยอุปกรณ์เสริม spinning module with standard cup

Pre-treatment	Wavelength region (nm)	F	R	SEC	SEP	Bias	RPD
2nd Derivative 5	1110-2488	3	0.97	1.52	1.64	0.10	4.21
MSC + 2 nd Derivative 5	1110-2488	1	0.94	2.24	1.92	0.24	3.50
MSC + 2 nd Derivative 5	1700-2488	4	0.97	1.46	1.69	0.29	3.95

MSC: multiplicative scatter correction, 2nd derivative 5: second derivative, F: latent variables or number of factors used in the calibration equation, R: multiple correlation coefficients, SEC: standard error of calibration, SEP: standard error of prediction, Bias: average of difference between actual value and NIR value, RPD: ratio of standard derivation of reflectance data in validation set to SEP



ภาพ 4.23 สัมประสิทธิ์การถดถอยของสมการเทียบมาตรฐาน ที่สร้างด้วย PLSR สำหรับทำนายระดับการผสมของเมล็ดข้าวโพดปกติกับเมล็ดข้าวโพดที่ผสมด้วยเมล็ดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อราที่ 5, 10, 15 และ 20% โดยน้ำหนัก วัดด้วยอุปกรณ์เสริม spinning module with standard cup



ภาพ 4.24 การวิเคราะห์ PCA ของสเปกตรัมของข้าวโพดปกติ (control) และข้าวโพดที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อรา *A. flavus* ที่ 5 % โดยน้ำหนักด้วยชุดอุปกรณ์เสริม spinning module with standard cup

4.5 การตรวจการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ข้าวโพดระหว่างการเก็บรักษา

4.5.1 การตรวจการเข้าทำลายของเชื้อราด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป (DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit)

จากตาราง 4.6 พบว่าปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินของข้าวโพดชุดควบคุมและชุดปลูกสปอร์เชื้อรา *A. flavus* ของการเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องของเดือนที่ 0, 1, 2 และ 3 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระยะเวลาในการเก็บรักษาและอัตราส่วนการผสมเมล็ดข้าวโพดไม่มีผลต่อปริมาณ สารพิษอะฟลาทอกซิน ทั้งนี้เป็นผลมาจากความชื้นของเมล็ดข้าวโพด โดยความชื้นฐานเปียกของเมล็ดสำหรับชุดควบคุมและชุดปลูกสปอร์เชื้อรา *A. flavus* ในเดือนที่ 0, 1, 2 และ 3 เท่ากับ 14.21 %, 13.92 %, 9.56 %, 9.30 % และ 13.24 %, 12.95 %, 10.43 %, 9.80 % ตามลำดับ จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าความชื้นหลังจากเก็บรักษาเมล็ดที่ระยะเริ่มต้น มีแนวโน้มลดลง และเป็นความชื้นที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตสารอะฟลาทอกซินโดย Diener and Davis (1970); Rambo *et al.* (1975) รายงานว่าระดับความชื้นที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินในข้าวโพดคือ 25% นอกจากนี้ กรมวิชาการเกษตร (2535) กล่าวว่า การปนเปื้อนของสารอะฟลาทอกซินในโรงเก็บหรือขณะเก็บรักษาไม่ได้มีความสัมพันธ์กับระยะเวลาการเก็บรักษาเพียงอย่างเดียว แต่ยังเกี่ยวข้องกับความชื้นเริ่มต้น ดังนั้นผลการตรวจการเข้าทำลายของเชื้อราด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป (DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit) ของข้าวโพดชุดควบคุมและชุดปลูกสปอร์เชื้อรา *A. flavus* ของการเก็บรักษาไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องของเดือนที่ 0, 1, 2 และ 3 ไม่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นว่า ปริมาณอะฟลาทอกซินของข้าวโพดในชุดปลูกเชื้อมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น

ตาราง 4.5 ความชื้นฐานเปียกในเมล็ดข้าวโพดชุดควบคุมและชุดปลูกสปอร์เชื้อรา *A. flavus* ในระหว่างการเก็บรักษา

ระยะเวลา (เดือน)	ความชื้นฐานเปียก (%)	
	ชุดควบคุม	ชุดปลูกสปอร์เชื้อรา <i>A. flavus</i>
0	14.21	13.24
1	13.92	12.95
2	9.56	10.43
3	9.30	9.80
ค่าเฉลี่ย	11.74	11.60

ตาราง 4.6 ปริมาณอะฟลาทอกซินในเมล็ดข้าวโพดชุดควบคุมและชุดปลูกสปอร์เชื้อรา *A. flavus* ตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป (DOA-Aflatoxin ELISA Test Kit)

ปริมาณอะฟลาทอกซิน		
ระยะเวลา (เดือน)	ชุดควบคุม (ppb.)	ชุดปลูกสปอร์เชื้อรา <i>A. flavus</i> (ppb.)
0	11.19	4.92
1	11.14	5.24
2	12.94	10.39
3	10.48	11.94
ค่าเฉลี่ย	11.43	8.12
	F-test	
เดือน	ns	
กรรมวิธี	ns	
เดือน × กรรมวิธี	ns	

4.5.2 ตรวจสอบการเกิดเชื้อรา (fungi infect)

จากการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อราดังแสดงในตาราง 4.7 พบว่า อายุการเก็บรักษามีผลต่อการปนเปื้อนของเชื้อราอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยยิ่งเก็บรักษามะลิคข้าวโพดไว้นานขึ้นจนถึงระยะเวลา 3 เดือน ของชุดควบคุมและชุดปลูกสปอร์เชื้อรา *A. flavus* มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนที่เพิ่มขึ้นในชุดควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน 55.75 %, 58 %, 87.25 % และ 99.75 % ตามลำดับ โดยเฉพาะในชุดปลูกสปอร์เชื้อรา *A. flavus* พบเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน 100 % ตั้งแต่การเก็บรักษามะลิคข้าวโพดตั้งแต่เดือนที่ 1 สอดคล้องกับ สมบัติ (2535) รายงานว่า ระยะเวลาการเก็บรักษามีผลต่อการปนเปื้อนของเชื้อรา ดังนั้น ระยะเวลาการเก็บรักษามีผลต่อการปนเปื้อนของเชื้อรา *A. flavus*

ตาราง 4.7 เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนของเชื้อราในเมล็ดข้าวโพดชุดควบคุมและชุดปลูกสปอร์เชื้อรา *A. flavus*

เดือน	ชุดควบคุม (%)	ชุดปลูกสปอร์เชื้อรา <i>A. flavus</i> (%)
0	55.75 ^{Db}	99.75 ^{Aa}
1	58 ^{Cb}	100 ^{Aa}
2	87.25 ^{Bb}	100 ^{Aa}
3	99.75 ^{Aa}	100 ^{Aa}
ค่าเฉลี่ย	75.18	99.93
	F-test	LSD
เดือน	***	0.025
กรรมวิธี	***	0.018
เดือน × กรรมวิธี	***	0.036

หมายเหตุ: *** แทนความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.01$)

อักษรพิมพ์ใหญ่, เล็ก แทนความแตกต่างภายในคอลัมน์และแถวตามลำดับ

4.6 การวิเคราะห์ข้อมูลและการสร้างสมการ

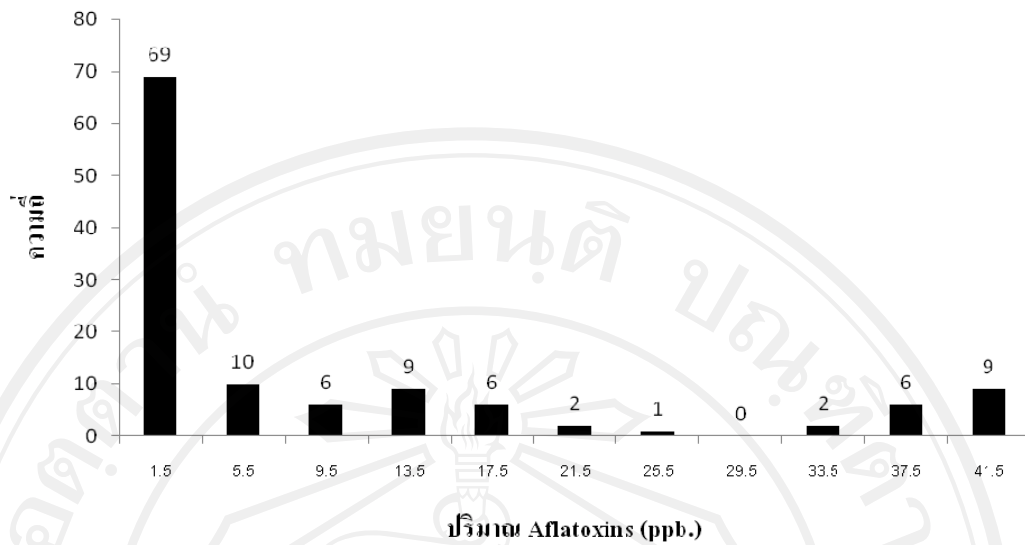
สร้างสมการ โดยหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมและปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่วิเคราะห์ได้จากวิธีเคมีของตัวอย่างข้าวโพดที่เก็บรักษาในระยะเวลา 3 เดือนของตัวอย่างทั้ง 2 กรรมวิธีโดยไม่บดและบด เดือนละ 30 ตัวอย่างดังนั้นตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการทั้งหมด 120 ตัวอย่างโดยการสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นด้วยเทคนิค PLSR หาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมกับปริมาณอะฟลาทอกซิน ด้วยโปรแกรม The unscrambler[®] และทดสอบสมการโดยใช้วิธี test set โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มสร้างสมการทำนาย และกลุ่มทดสอบสมการ มีจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการสร้างและทดสอบสมการทำนายปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน แล้วแปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์ และเลือกช่วงความยาวคลื่นที่สัมพันธ์กับปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่วิเคราะห์ได้ โดยพิจารณาค่าสถิติที่วิเคราะห์ได้จาก การสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นของตัวอย่างในกลุ่มสร้างสมการและกลุ่มทดสอบสมการ พบว่าสมการการเข้าทำลายของเชื้อรา *A. flavus* ชุดตัวอย่างข้าวโพดไม่บด โดยเลือกเฉพาะช่วงความยาวคลื่น คือ 1100-2500 นาโนเมตร แปลงข้อมูลสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับ 1st derivative 10 (10 nm averaging for left and right side)

สมการที่ให้ผลดีที่สุดสำหรับการทำนายคือความยาวคลื่น 1350-2478 นาโนเมตร โดยให้ค่า RPD สูงที่สุดคือ 0.28 ค่า R เท่ากับ 0.30 มีค่า SEC เท่ากับ 13.98 % และค่า SEP มีค่าเท่ากับ 14.78 %

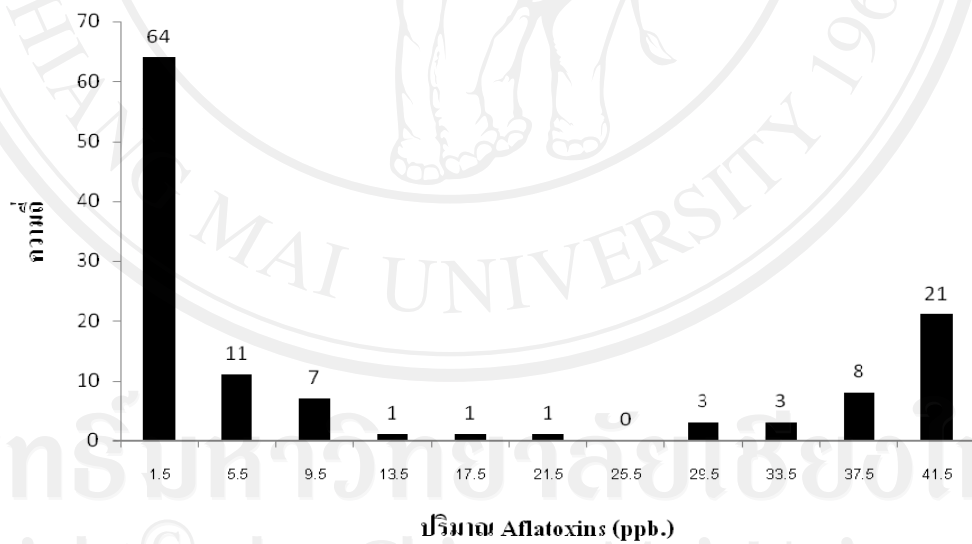
เมื่อพิจารณาชุดตัวอย่างของข้าวโพดอบค โดยเลือกตัดช่วงความยาวคลื่นเฉพาะช่วงคลื่นยาว คือตั้งแต่ช่วงความยาวคลื่น 1100-2500 นาโนเมตรพบว่า ได้สเปกตรัมที่แปลงข้อมูลสมการทางคณิตศาสตร์ที่ดีที่สุด 1 สมการคือ วิธี MSC ร่วมกับ 1^{st} derivative 10 (10 nm averaging for left and right side) ดังนั้นจึงเลือกเป็นสมการสำหรับการใช้ในการทำนายในช่วงความยาวคลื่น 1150-2478 นาโนเมตร โดยให้ค่า RPD สูงที่สุดคือ 0.40 ค่า R เท่ากับ 0.44 มีค่า SEC เท่ากับ 13.04 % และค่า SEP มีค่าเท่ากับ 15.86 %

จากเกณฑ์การพิจารณาค่า RPD และค่า R ของ Williams (2007) รายงานว่า ค่า RPD ตั้งแต่ระดับ 0.0 - 2.3 และค่า R น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.5 ไม่ควรนำมาใช้ในการทำนาย เมื่อนำข้อมูลของปริมาณอะฟลาทอกซินของข้าวโพดกรรมวิธีที่ 1 และ 2 ของเดือนที่ 0, 1, 2 และ 3 มาสร้างแผนภูมิฮิสโตแกรม (ภาพ 4.25 และ 4.26) เพื่อดูการกระจายตัวของข้อมูลพบว่า การกระจายตัวของค่าทางเคมีปริมาณอะฟลาทอกซินของข้าวโพดทั้งสองกรรมวิธีพบว่าการกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นจึงไม่สามารถทำนายปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินได้ นอกจากนี้ยังไม่สามารถทดสอบสมการที่สร้างขึ้นด้วยข้าวโพดจากแหล่งอื่นได้ เพราะไม่สามารถเปรียบเทียบค่า SEP ที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างการทดสอบสมการที่สร้างขึ้น (validation sample set) และกลุ่มตัวอย่าง unknown ที่ใช้ทดสอบสมการที่สร้างขึ้น (validation unknown sample set) ได้

ดังนั้นการสร้างสมการโดยหาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลสเปกตรัมและปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่วิเคราะห์ได้จากวิธีเคมีของตัวอย่างข้าวโพดที่เก็บรักษาไว้ 3 เดือน โดยมีตัวอย่างไม่บดและบด แปลงข้อมูลสเปกตรัมของตัวอย่างไม่บดและบด ด้วยวิธี วิธี MSC ร่วมกับ 1^{st} derivative 10 (10 nm averaging for left and right side) สำหรับตัวอย่างไม่บดในช่วงความยาวคลื่น 1350-2478 นาโนเมตร พบว่า มีค่า R, SEC, SEP, Bias และ RPD เท่ากับ 0.30, 13.98 %, 14.88 %, 0.91 % และ 0.28 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างบดในช่วงความยาวคลื่น 1150-2488 นาโนเมตร พบว่ามีค่า R, SEC, SEP, Bias และ RPD เท่ากับ 0.44, 13.04 %, 15.86 %, -0.70 % และ 0.40 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าค่า RPD และ ค่า R ของสมการปริมาณอะฟลาทอกซินของข้าวโพดกรรมวิธีที่ 1 และ 2 ของเดือนที่ 0, 1, 2 และ 3 อยู่ในระดับต่ำ ไม่สามารถทำนายปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินได้ รวมทั้งไม่สามารถทดสอบสมการที่สร้างขึ้นด้วยข้าวโพดจากแหล่งอื่นได้



ภาพ 4.25 แผนภูมิฮิสโตแกรมการกระจายตัวของค่าทางเคมีปริมาณอะฟลาทอกซินในข้าวโพดที่ไม่ได้รับการปลูกสปอร์เชื้อรา *A. flavus* (ชุดควบคุม) เดือนที่ 0, 1, 2 และ 3



ภาพ 4.26 แผนภูมิฮิสโตแกรมการกระจายตัวของค่าทางเคมีปริมาณอะฟลาทอกซินในข้าวโพดที่ได้รับการปลูกสปอร์เชื้อรา *A. flavus* เดือนที่ 0, 1, 2 และ 3