



รายงานการวิจัย เรื่อง

การตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในใบโหระพาอย่างรวดเร็วด้วย
เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

Rapid determination of aerobic bacteria, yeast and mold in sweet basil by near
infrared spectroscopy (NIRS)

ชัยวัฒน์ บันไดเพชร

บุศรากรณ์ มหาโยธี

ปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ

Chaiwat Bandaiphet

Busarakorn Mahayothee

Pramote Khuwijitjaru

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ภายใต้ชุดโครงการวิจัยเรื่องการตรวจสอบอันตรายในอาหารอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปี
อินฟราเรดย่านใกล้

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2559

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในใบโหระพาอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

ชื่อผู้วิจัย ชัยวัฒน์ บรรดิษฐ์¹, บุศราภรณ์ มหาโยธี², ปราโมทย์ คุวิจิตรจารุ²

หน่วยงานที่สังกัด ¹ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, ²ภาควิชาเทคโนโลยีอาหารคณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2558 สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ พ.ศ. 2559

ประเภทการวิจัย การวิจัยประยุกต์

สาขาวิชา สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มอุตสาหกรรมเกษตร

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS) และการถ่ายภาพสเปกตรัม (HSI) ซึ่งเป็นวิธีการที่รวดเร็ว และไม่ทำลายตัวอย่างมาประยุกต์ใช้ในการทำนายความชื้นและตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด *Escherichia coli* (*E.coli*) ยีสต์ และรา ในใบโหระพา โดยการเตรียมตัวอย่าง 2 รูปแบบคือ ตัวอย่างใบโหระพาที่เลียนแบบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ โดยจะทำการวัดสเปกตรัมของตัวอย่างใบโหระพาสด ด้วยเครื่อง FT-NIR (800-2500 นาโนเมตร) ในระบบการวัดแบบสะท้อนกลับ (reflectance) และการถ่ายภาพสเปกตรัมด้วยกล้องถ่ายภาพสเปกตรัม (400-1000 นาโนเมตร) 1 ภาพต่อ 15 ใบ สำหรับการสร้างสมการทำนายปริมาณความชื้น จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด *Escherichia coli* (*E.coli*) ยีสต์และรา ในใบโหระพา สร้างสมการทำนายโดยใช้วิธีการถดถอยกำลังสองน้อยที่สุดบางส่วน (partial least squares, PLS) จากการศึกษาพบว่าเทคนิค NIRS มีความเหมาะสมในการนำมาตรวจสอบปริมาณความชื้น จำนวนยีสต์และราได้ โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination, R^2) เท่ากับ 0.65 และ 0.83 ตามลำดับ และมีค่าความคลาดเคลื่อนในการทำนาย (root mean square error of prediction, RMSEP) เท่ากับ 0.963 % และ 3.18×10^4 cfu/g ตามลำดับ และจากผลการศึกษาด้วยเทคนิค HSI พบว่าเทคนิค HSI ยังไม่สามารถใช้ในการตรวจสอบปริมาณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด *Escherichia coli* (*E.coli*) ยีสต์และรา ในใบโหระพา ได้เนื่องจากให้ค่า R^2 ที่ต่ำ โดยให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.37, 0.29, และ 0.11 ตามลำดับ และให้ค่า RMSEP ที่สูงเท่ากับ 1.2×10^7 cfu/g 6.1×10^8 cfu/g และ 3.9×10^5 cfu/g ตามลำดับ

คำสำคัญ: แบคทีเรีย ยีสต์ รา .ใบโหระพา การปนเปื้อน อาหารปลอดภัย

Abstract

Research Title Rapid determination of aerobic bacteria, yeast and mold in sweet basil by near infrared spectroscopy (NIRS)

Researcher Chaiwat Bandaipheth¹, Busarakorn Mahayothee² and Pramote Khuwijitjaru²

Office ¹Department of Biotechnology and ²Department of Food Technology, Faculty of Engineering and Industrial technology, Silpakorn University

Research Grant Fiscal Year 2015 Research and Development Institute, Silpakorn University

Year of completion 2016

Type of research Applied research

Subjects Agriculture and Biology, Sub-group: Agro-industry

The objective of this study was to use near-infrared spectroscopy (NIRS) and hyperspectral imaging (HSI) as rapid and non-destructive techniques to analyze moisture content, total microbial, *E. coli*, yeast and mold in flesh sweet basil. Total sweet basil were taken for spectrum acquisition using an FT-NIR spectrometer (800 - 2500 nm) in reflectance mode with a nominal resolution of 16 cm⁻¹ and scan time of 32 and the samples were imaged by reflectance HSI at the wavelength of 400 - 1000 nm. Then sample was examined for moisture contents, total microbial, *E. coli*, yeast and mold in flesh of sweet basil. Calibration and validation models of both techniques were built using a partial least square regression analysis. It was found that NIRS was suitable for determining the moisture content, total microbial, *E. coli*, yeast and mold that provided the coefficient of determination (R^2) of 0.65 and 0.83 respectively and gave the root squares error of prediction (RMSEP) of 0.963 % and 3.18x10⁴ cfu/g fresh weight, respectively. While, the HSI could not be used for determining moisture content, total microb, *E. coli*, yeast and mold in flesh of sweet basil, due to low R^2 of 0.37, 0.29 and 0.11, respectively and high RMSEP of 1.2 x10⁷ cfu/g 6.1 x10⁸ cfu/g and 3.9 x10⁵ cfu/g fresh weight, respectively.

Keywords: bacteria, yeast, mold, sweet basil, contamination, food safety

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของชุดโครงการวิจัยเรื่อง “การตรวจสอบอันตรายในอาหารอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้” ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 จากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญ

บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1	1
บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 สมมติฐานของการศึกษา	2
1.4 ขอบเขตของการศึกษา	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2	3
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผักสด	3
2.2 เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้	3
2.3 เทคนิคภาพถ่ายสเปกตรัม (Hyperspectral imaging; HSI)	6
บทที่ 3	9
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	9
3.1 วัสดุดิบ	9
3.2 สารเคมี	9
3.2 อุปกรณ์	9
3.3 วิธีการทดลอง	9
3.2 อุปกรณ์	9
บทที่ 4	14
ผลและการอภิปรายผลการทดลอง	14
4.1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในใบโหระพาอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้	14
4.2 การตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในใบโหระพาอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคภาพถ่ายเชิงสเปกตรัม	22
บทที่ 5	332
สรุปผลการทดลอง	332

เอกสารอ้างอิง	334
ภาคผนวก ก.....	35
วิธีการวิเคราะห์.....	35
ประวัติผู้วิจัย	36

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 การแบ่งช่วงคลื่นย่านอินฟราเรด	5
ตารางที่ 2 ค่าทางสถิติของปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา ปริมาณเชื้อ <i>E.coli</i> และปริมาณความชื้น ที่ใช้การสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในใบโพธิ์ระพา.....	14
ตารางที่ 3 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR).....	16
ตารางที่ 4 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณยีสต์และราด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR).....	18
ตารางที่ 5 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณเชื้อ <i>E.coli</i> ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR).....	19
ตารางที่ 6 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณความชื้นของใบโพธิ์ระพาด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR)	21
ตารางที่ 7 ค่าทางสถิติของปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา และปริมาณเชื้อ <i>E.coli</i> ที่ใช้การสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัมในใบโพธิ์ระพา.....	25
ตารางที่ 8 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดด้วยเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัม (HSI)	26
ตารางที่ 9 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณยีสต์และราด้วยเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัม (HSI)	28
ตารางที่ 10 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณเชื้อ <i>E.coli</i> ด้วยเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัม (HSI)	30

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของเครื่องสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้.....	4
ภาพที่ 2 รูปแบบการวัด (1) transmittance, (2) reflectance, (3) transreflectance และ (4) interactance	5
ภาพที่ 3 Hypercube แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมกับพิกเซลของภาพ	7
ภาพที่ 4 ส่วนประกอบของเทคนิค HSI	7
ภาพที่ 5 วิธีการถ่ายภาพ HSI และโหมดการวัด	8
ภาพที่ 6 การเตรียมตัวอย่างใบโหระพา.....	10
ภาพที่ 7 การนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บนแผ่น (1) 3M Petrifilm aerobic count (2) Petrifilm™ <i>E. coli</i> Count Plates และ (3) 3M Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plates	11
ภาพที่ 8 ระบบการวัด HSI ของใบโหระพา	12
ภาพที่ 9 ตำแหน่ง ROI ของภาพถ่ายสเปกตรัม	13
ภาพที่ 10 เส้นสเปกตรัมเฉลี่ยของใบโหระพาที่ได้จากเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้.....	15
ภาพที่ 11 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด จากการปรับแต่ง สเปกตรัมด้วยวิธี SNV.....	17
ภาพที่ 12 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณยีสต์และรา จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV	18
ภาพที่ 13 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อ <i>E.coli</i> จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV ร่วมกับวิธี first derivative.....	20
ภาพที่ 14 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับวิธี first derivative	21
ภาพที่ 15 การแบ่งกลุ่มใบโหระพาที่มีการปนเปื้อน <i>E.coli</i> และ ไม่ปนเปื้อน <i>E.coli</i> ด้วยเทคนิค PCA.....	22
ภาพที่ 16 ภาพถ่ายสเปกตรัมจากเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัมของใบโหระพา	23
ภาพที่ 17 เส้นสเปกตรัมเฉลี่ยที่ได้จากเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัมของใบโหระพา	24
ภาพที่ 18 เส้นสเปกตรัมที่ได้จากเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับ สองของ ใบโหระพา	24
ภาพที่ 19 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด จากการปรับแต่ง สเปกตรัมด้วยวิธี SNV ร่วมกับวิธี first derivative.....	27
ภาพที่ 20 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณยีสต์และรา จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี อนุพันธ์อันดับสอง.....	39
ภาพที่ 21 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อ <i>E.coli</i> จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี multiplicative scatter correction (MSC) ร่วมกับวิธีอนุพันธ์อันดับ 1.....	31

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม เป็นแหล่งผลิตและส่งออกผลิตผลสดทางการเกษตรที่สำคัญของโลก ในช่วงเดือนมกราคม-ธันวาคม 2555 ผลิตผลโดยรวมจากการส่งออกสินค้าเกษตรกรรม มีมูลค่าสูงถึงเกือบ 4 แสนล้านบาท ผลิตผลจำพวกผักสด แะเย็น แะแข็งและแห้งมีมูลค่าการส่งออกเป็นลำดับที่ 9 คิดเป็นร้อยละ 1.12 ของมูลค่าการส่งออกสินค้าเกษตรกรรม ผักที่มีการส่งออกมาก ได้แก่ หน่อไม้ฝรั่ง หอมหัวใหญ่ หอมหัวเล็ก กระเทียม พริก ข้าวโพดฝักอ่อน กระเจี๊ยบขาว เห็ด พืชตระกูลถั่ว ข้าวโพดหวาน อย่างไรก็ตามในการส่งออกพืชผักประเทศไทยยังประสบปัญหาด้านสุขอนามัยในส่งออก โดยเฉพาะผักใบที่ใช้เป็นเครื่องเทศ เช่น โหระพา กะเพรา ผักชี สะระแหน่ และผักสลัดต่างๆ ที่มักตรวจพบวัตถุอันตรายทางการเกษตรเกินระดับปริมาณสารพิษตกค้างสูงสุด และจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคซึ่งส่งผลต่อภาพลักษณ์ด้านมาตรฐานสินค้า

ปัญหาสารตกค้างและปนเปื้อนในสินค้าผักจากไทยมีมากขึ้น โดยในปี 2552 สหภาพยุโรปมีการตรวจที่เข้มงวดขึ้นทำให้มีการตรวจพบสารตกค้างและปนเปื้อนในสินค้าผัก 716 ครั้ง ในสินค้าผัก ผลไม้ และไม้ดอกการตรวจเข้มงวดมากขึ้นสำหรับการนำเข้าจากไทยสำหรับผักสด 16 ชนิดโดยแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ 1) กะเพรา โหระพา แมงลัก ยี่หระ 2) พริกหยวก พริกชี้ฟ้า พริกชี้หนู 3) มะเขือเปราะ มะเขือยาว มะเขือม่วง มะเขือเหลือง มะเขือขาว มะเขือขื่น 4) มะระจีน มะระขี้นก และ 5) ผักชีฝรั่ง (สำนักงานส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ ณ กรุงลอนดอน, 2560)

วิธีการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตผลทางการเกษตรทั่วไปที่นิยมใช้ได้แก่การตรวจวัดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) และการตรวจวัดจำนวนยีสต์รา ซึ่งเป็นวิธีที่มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างและเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่อนข้างยุ่งยาก และใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบนาน ทำให้ส่งผลกระทบต่อ การส่งออกผลิตผลทางการเกษตรเนื่องจากต้องรอผลการวิเคราะห์ ดังนั้นการหาเทคนิคในการวิเคราะห์ที่รวดเร็วสามารถการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์และไม่ต้องทำลายตัวอย่างจึงเป็นทางเลือกที่จะช่วยเพิ่มศักยภาพในการส่งออกและควบคุมคุณภาพในผักใบได้

เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near Infrared Spectroscopy, NIRS) เป็นเทคนิคที่มีการพัฒนาขึ้น สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างได้รวดเร็ว โดยไม่ต้องทำลายตัวอย่าง และไม่ต้องใช้สารเคมี สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบหลายอย่างหรือสารออกฤทธิ์พร้อมกันได้ในตัวอย่างและเวลาเดียวกัน เคยมีการศึกษาพบว่าเทคนิค NIRS มีศักยภาพในการทำนายจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในกะหล่ำปลีหั่นฝอย โดยมีค่าความผิดพลาดในการทำนาย (Standard error of prediction, SEP) ที่ 0.46 log cfu/g (Suthiluk และคณะ, 2008) นอกจากนี้สามารถทำนายปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในปลาแซลมอนได้อย่างแม่นยำที่ R^2 เท่ากับ 0.95 และมีความผิดพลาดในการทำนายเท่ากับ 0.12 log cfu/g (Tito และคณะ, 2012) ดังนั้นการใช้เทคนิค NIR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผักใบเช่น ใบโหระพาจึงมีความเป็นไปได้

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อประยุกต์ใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (Near infrared spectroscopy, NIRS) และเทคนิคการถ่ายภาพเชิงสเปกตรัม (Hyperspectral imaging, HSI) ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ *Escherichia coli* (*E. coli*) ยีสต์และรา ในใบโหระพา

1.3 สมมติฐานของการศึกษา

เทคนิค near infrared spectroscopy (NIRS) เป็นเทคนิควิเคราะห์ตัวอย่างแบบไม่ทำลาย และรวดเร็วที่สามารถตรวจสอบองค์ประกอบภายในของตัวอย่างที่มีธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจนและไนโตรเจนได้ ดังนั้นน่าจะนำมาใช้วิเคราะห์อันตรายทางชีวภาพ การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งมีองค์ประกอบของเซลล์เมมเบรนที่มีธาตุข้างต้นอยู่ได้ เพื่อทดแทนวิธีการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ แบบปัจจุบันที่ยุ่งยาก ซับซ้อน ราคาแพงและใช้เวลานาน

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

1.4.1 ผักใบที่เลือกศึกษา ได้แก่ ใบโหระพา ซึ่งพบการปัญหาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บ่อยครั้ง โดยเลือกซื้อจากแหล่งผลิตและจำหน่ายแตกต่างกัน ได้แก่ เกษตรกร ตลาดกลางสินค้าเกษตร ตลาดสด ห้างค้าปลีกขนาดใหญ่ บริษัทส่งออก และร้านค้าผักปลอดสาร เป็นต้น

1.4.2 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่เลือกศึกษา ได้แก่ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยและมีการปนเปื้อนเสมอ รวมไปถึงยีสต์และรา

1.4.3 มาตรฐาน (reference method) ที่ใช้ในการวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ได้แก่ วิธีตรวจหาเชื้อ *E. coli* ด้วยวิธี Petrifilm *E. coli* Count plate ตาม AOAC INTERNATIONAL *E. coli* และ จำนวนยีสต์และรา โดยวิธีการ Petrifilm

1.4.4 การวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น NIR (750-2500 nm) ของตัวอย่างจะมีการควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้จริงในภาคอุตสาหกรรม คือที่อุณหภูมิการเก็บรักษาผักใบตัดแต่ง ที่ 7 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 89 ± 2 ศึกษาประสิทธิภาพในการตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในใบโหระพาด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIRS)

1.4.5 ศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในใบโหระพา ด้วยเทคนิคการถ่ายภาพเชิงสเปกตรัม (HSI)

1.4.6 สร้างสมการทำนายการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในใบโหระพา โดยใช้เทคนิคทางเคมีทริกซ์ (chemometrics) ซึ่งสมการที่มีประสิทธิภาพการทำนายสูงควรมี coefficient of determination (R^2) สูง standard error of calibration (SEC) หรือ standard error of prediction (SEP) ต่ำ นอกจากนี้ควรมีค่า RPD (ratio between standard deviation and SEP) อยู่ในช่วงระหว่าง 2-3

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลที่เป็นแนวทางในการพัฒนาการตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในใบโหระพาอย่างรวดเร็วโดยการใช้เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในผักสด

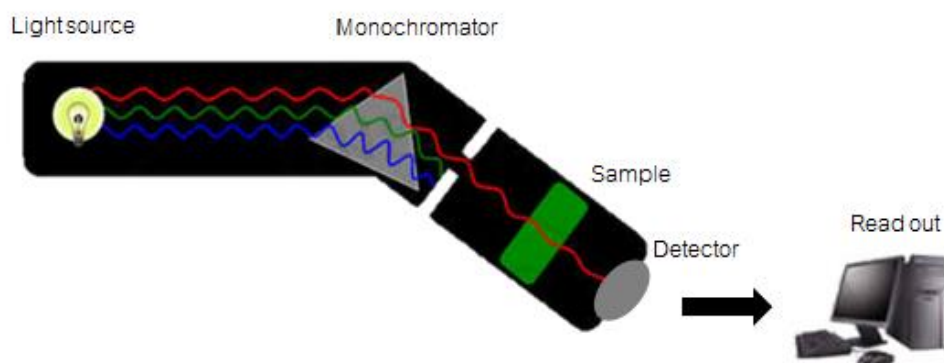
เชื้อจุลินทรีย์ที่มีการปนเปื้อนในผักสดของประเทศไทย ได้แก่ เชื้อ *E. coli* ที่ทำให้เกิดอาการท้องเสีย และเป็นเชื้อที่บ่งชี้ว่ามีสุขลักษณะการผลิตที่ไม่เหมาะสม เชื้อ *Salmonella spp.* เป็นเชื้อโรคร้ายแรงทำให้เกิดโรคไทฟอยด์และท้องร่วงรุนแรง เชื้อทั้งสองชนิดดังกล่าวเป็นเชื้อที่พบในประเทศไทย และมีหลายสายพันธุ์ อาจพบได้ในน้ำ และในดินจึงทำให้มีโอกาสปนเปื้อนในระบบการผลิตพืชผักหลายชนิด และนอกจากนี้ยังมี *Vibrio cholera*, *L.monocytogens* เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้พบทั่วไปในธรรมชาติ หากเข้าสู่ร่างกายอาจทำให้เกิดการเจ็บป่วยได้ ตัวอย่างการตรวจพบอันตรายจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้มีผู้เสียชีวิตคือในปี 2549 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกาพบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ *E. coli* O157: H7 ในผักโขม (Spinach) จากแหล่งเดียว ทำให้มีผู้เสียชีวิตถึง 3 ราย และผู้ป่วยจำนวน 202 ราย เหตุการณ์ดังกล่าวส่งผลกระทบต่อความเชื่อมั่นของผู้บริโภคเป็นอย่างมาก สำหรับประเทศไทยเคยถูกประเทศนอร์เวย์ประกาศห้ามนำเข้าสินค้าผักจากประเทศไทยเป็นการชั่วคราว สาเหตุเนื่องจากการตรวจพบเชื้อ *E. coli* และ *Salmonella spp.* ในผักสดจากประเทศไทยที่ส่งออกไปยังประเทศนอร์เวย์ ฟินแลนด์ และไอซ์แลนด์ การแก้ไขคือกำหนดให้ผักสดจากไทยต้องมีใบรับรองปลอดเชื้อจุลินทรีย์กำกับตั้งแต่ปี 2548 ดังนั้น กรมวิชาการเกษตรจึงกำหนดหลักเกณฑ์วิธีการ และเงื่อนไขการส่งออกผักรวม 23 ชนิด ได้แก่ ผักชีไทย ผักชีฝรั่ง ใบกระเพรา ใบโหระพา ผักแขยง ใบสะระแหน่ ผักแพรว ต้นหอม ผักคื่นช่าย ใบกุยช่าย ดอกกุยช่าย ชะอม ตะไคร้ ผักบุ้ง ผักแว่น ผักกระเฉด ใบบัวบก ใบชะพลู ผักโขมแดง ถั่วฝักยาว หน่อไม้ฝรั่ง พริกชี้หนู และ ผักปลั่ง ให้มีการผลิตที่เป็นระบบสามารถตรวจสอบได้ทั้งระบบ ตั้งแต่วันที่ 24 พฤศจิกายน 2549

การปนเปื้อนจุลินทรีย์เกิดขึ้นได้ทุกขั้นตอน ตั้งแต่ในแปลงปลูก การเก็บเกี่ยวการทำความสะดวก การคัดบรรจุ ไปจนถึงการขนส่งผลิตผล การแก้ไขโดยนำเอาการจัดการคุณภาพและมาตรฐานอาหารปลอดภัย (Food safety) เช่น GAP และ GMP มาใช้ สำหรับในผลผลิตที่มีการปนเปื้อนสูงมักทำการล้างด้วยน้ำคลอรีน หรือโอโซน

2.2 เทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

เทคนิค NIR เป็นเทคนิคที่อาศัยช่วงคลื่นอินฟราเรดย่านใกล้ในช่วงความยาวคลื่น 700 ถึง 2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น (wave number) ระหว่าง 4000 ถึง 14300 cm^{-1} (ตารางที่ 1) ในการวิเคราะห์โมเลกุลแบบไม่ทำลายตัวอย่าง (Schwanninger, 2009; Ellekjaer และคณะ, 1994) แสดงส่วนประกอบของเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในภาพที่ 1 โดยอาศัยการตรวจวัดปริมาณแสงที่ถูกดูดกลืนในพันธะของโมเลกุลสารตัวอย่าง กล่าวคือ เมื่อฉายแสงในช่วงความยาวคลื่น NIR ลงไปบนตัวอย่าง แสงที่มีพลังงานเพียงพอจะถูกดูดกลืนและกระตุ้นให้เกิดการสั่นของโมเลกุลในหมู่ฟังก์ชันต่างๆ 2 ลักษณะคือ การยืดหด (stretching) และการเปลี่ยนมุม (blending) ที่ช่วงความถี่ overtones และ combination ของหมู่ฟังก์ชัน O-H, C-H, N-H และ O=H (Osborne และคณะ, 1993; Osborne, 2007; Nicolai และคณะ, 2007; Huang, Yu และ Ying, 2008; Ellekjaer และคณะ, 1994) ซึ่งเป็นโมเลกุลหลักของสารอินทรีย์ โดยปริมาณพลังงานและช่วงความยาวคลื่นที่จำเพาะต่อหมู่ฟังก์ชันนั้นเพียงเท่านั้นที่จะทำให้

เกิดการสั่นของพันธะของหมู่ฟังก์ชันด้วยเหตุนี้จึงทำให้เทคนิค NIR สามารถวิเคราะห์สารประกอบที่มีหมู่ C, H, O และ N เป็นองค์ประกอบได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องรวดเร็วและมีความน่าเชื่อถือ



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของเครื่องสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้
ที่มา: Osborne และคณะ (1993)

รูปแบบที่ตัวอย่างเกิดปฏิกิริยาต่อแสงเนียร์อินฟราเรด (NIRs)

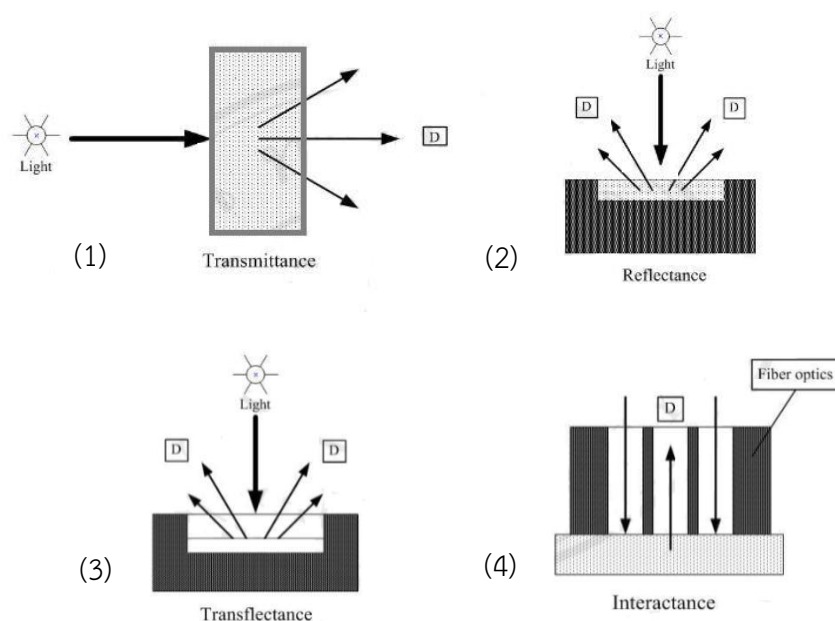
เมื่อเครื่อง NIRs ปล่อยแสงผ่านลงมาตัวอย่างจะเกิดการกระทบกับกับสารได้หลายแบบ ดังนั้นควรมีการจัดการวางตัวอย่างในการใช้เทคนิค NIRs เพื่อให้ได้สเปกตรัมที่สัมพันธ์กับปริมาณค่าทางเคมีที่สนใจ ดังนี้ (ศุมาพร, 2552)

transmittance แสงตกกระทบตัวอย่างด้านหนึ่ง โดยที่ detector จะวัดปริมาณแสงที่ผ่านออกมาจากตัวอย่างด้านตรงข้ามกัน

reflectance แสงจะตกกระทบที่ผิวของตัวอย่างและอาจแพร่กระจายในปริมาณหนึ่งก่อน แล้ววัดปริมาณแสงสะท้อนกลับออกมาที่ detector

transflectance แสงจากแหล่งกำเนิดแสงตกกระทบตัวอย่างและส่องผ่านตัวอย่างลงไปตกกระทบวัตถุที่ไม่ดูดกลืนแสง ที่อยู่ด้านล่างของตัวอย่าง แล้วสะท้อนกลับมายัง detector

interactance เป็นการใช้หัววัดใยนำแสง (fiber optic probe) แสงจะออกมาจากส่วนวงแหวนด้านนอกของหัววัดมาตกกระทบตัวอย่าง และแสงที่สะท้อนออกมาจากเนื้อตัวอย่าง จะถูกส่งไปยัง detector



ภาพที่ 2 รูปแบบการวัด (1) transmittance, (2) reflectance, (3) transflectance และ (4) interactance

ที่มา: Kawano (2002)

ตารางที่ 1 การแบ่งช่วงคลื่นย่านอินฟราเรด

Region	Characteristic transitions	Wavelength range (nm)	Wavenumber range (cm^{-1})
Near-infrared (NIR)	Overtones, combination bands	700 - 2500	14300 – 4000
Mid-infrared (MIR)	Fundamental vibrations	250 – 25000	4000 – 400
Far-infrared (FIR)	Rotations	25000 - 1000000	400 - 10

ที่มา: Schwanninger (2009)

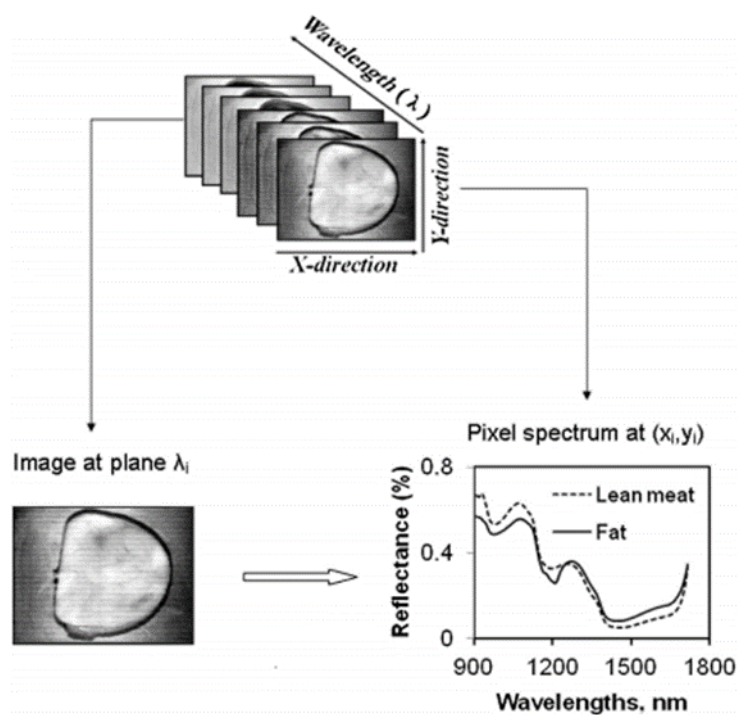
ขั้นตอนในการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค NIR ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอน คือ การสร้างข้อมูลสเปกตรัมโดยนำตัวอย่างไปทำการวัดในช่วงคลื่น NIR และการสร้างข้อมูลทางเคมีโดยนำตัวอย่างบริเวณที่ผ่านการวัด NIR ไปทำการวิเคราะห์ทางเคมีด้วยวิธีมาตรฐาน เมื่อได้ข้อมูลครบแล้วจึงนำไปหาความสัมพันธ์เพื่อสร้างเป็นสมการทำนายค่า (Calibration model) ด้วยวิธีทางสถิติ จากนั้นทำการตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของสมการทำนายที่ได้ (Validation) และทำการทำนายค่า (Prediction) ต่อไป

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเทคนิค NIR มีศักยภาพในการทำนายจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในกะหล่ำปลีหั่นฝอย โดยมีค่าความผิดพลาดในการทำนาย (SEP) ที่ $0.46 \log \text{ cfu/g}$ (Suthiluk และคณะ, 2008) จารูวรรณ และจารูรัตน์ได้ทำการประเมินเชื้อ *E. coli* ในน้ำล้างผักสดพบว่า NIRS มีประสิทธิภาพในการทำนายได้อย่างแม่นยำ โดยมี $R = 0.84$ และ $\text{SEC } 0.37 \text{ cfu/g}$ นอกจากนี้สามารถทำนายปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในปลาแชลมอนได้อย่างแม่นยำที่ R^2 เท่ากับ 0.95 และมีความผิดพลาดในการทำนายเท่ากับ $0.12 \log \text{ cfu/g}$ (Tito และคณะ, 2012) แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เทคนิค NIR ในการตรวจเชื้อจุลินทรีย์ในผักใบยังมีจำกัด จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาให้กว้างขวางยิ่งขึ้นเพื่อการใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

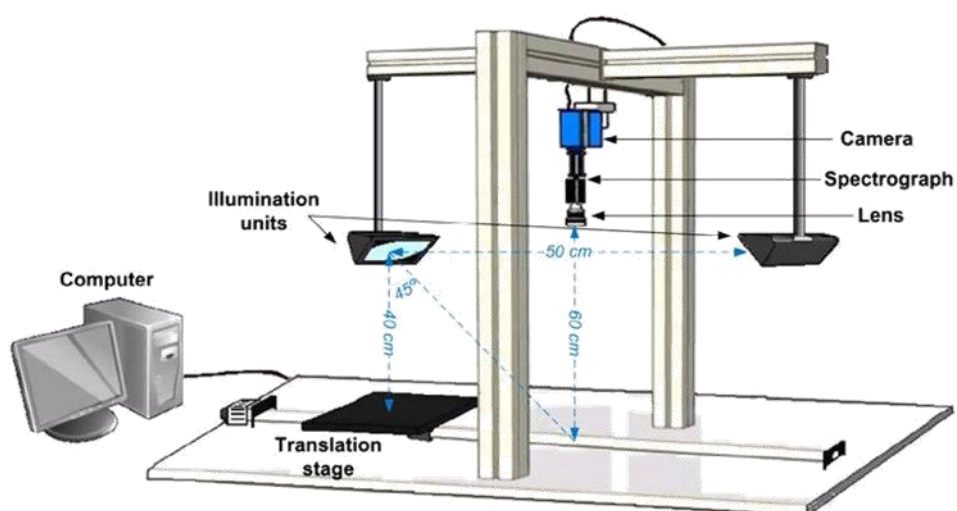
2.3 เทคนิคภาพถ่ายสเปกตรัม (Hyperspectral imaging; HSI)

เทคนิค Hyperspectral imaging (HSI) เป็นเทคนิคที่รวมเอาเทคนิคสเปกโตรสโกปี และเทคนิคการถ่ายภาพเข้าไว้ด้วยกัน ซึ่งจะให้ทั้งข้อมูลที่เป็นภาพและข้อมูลที่เป็นสเปกตรัมจากตัวอย่าง โดยภาพที่ถ่ายได้จากเทคนิคนี้จะเรียกว่า Hyperspectral image ซึ่งเป็นภาพที่ประกอบไปด้วยข้อมูลภาพและข้อมูลสเปกตรัม ในทุกๆ pixel ของ Hyperspectral image จะประกอบไปด้วยสเปกตรัม 1 สเปกตรัม โดยสเปกตรัมเหล่านี้สามารถแสดงถึงลักษณะเฉพาะขององค์ประกอบใน pixel นั้นๆได้ เทคนิค HSI จะสร้างข้อมูลที่เป็นลูกบาศก์สามมิติขึ้นมาเรียกว่า hypercube หรือ datacube ซึ่งประกอบด้วย Hyperspectral image ของวัตถุเดียวกันหลายๆภาพซ้อนกัน โดยแต่ละภาพจะมีความยาวคลื่นที่ต่างกัน สองมิติแรกจะเป็นมิติของภาพคือ x, y ส่วนมิติที่สามจะเป็นภาพที่ความยาวคลื่นต่างๆคือ λ (ElMasry และ Sun, 2010) โดยจากภาพที่ 2 เป็นภาพของ hypercube ซึ่งจะแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมค่าการสะท้อนกับข้อมูลในพิกเซลของตัวอย่างแฮมที่ตำแหน่งต่างกัน โดยพบว่าแต่ละตำแหน่งหากมีองค์ประกอบต่างกัน เส้นสเปกตรัมดังกล่าวก็จะมีลักษณะที่ต่างกันด้วย (Iqbal และคณะ, 2014)

เทคนิค HSI จะมีส่วนประกอบคือ กล้องถ่ายภาพ CCD สเปกโตรกราฟซึ่งเชื่อมต่อกับเลนส์ใกล้วัตถุ แหล่งกำเนิดแสง (เช่น halogen lamp) และคอมพิวเตอร์ซึ่งมีซอฟต์แวร์ที่ใช้รับภาพ โดยที่กล้องสเปกโตรกราฟ ฐานวางตัวอย่าง และแหล่งกำเนิดแสงจะกำหนดช่วงคลื่นของระบบ ซึ่งมีทั้งความยาวคลื่นช่วงสั้น (Vis-NIR) มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 400-1000 nm และความยาวคลื่นช่วงยาว 900-1700 nm แสดงดังภาพที่ 3 นอกจากนี้เทคนิคนี้มีหลักการพื้นฐานคล้ายเทคนิค NIR โดยเมื่อแสงกระทบกับตัวอย่างจะทำให้โมเลกุลเกิดการสั่นและทำให้เกิดการดูดกลืน แล้วส่วนที่ไม่ถูกดูดกลืนก็จะสะท้อนออกมาเข้าสู่เลนส์ใกล้วัตถุซึ่งมีหน้าที่ในการรับแสง โดยแสงจะผ่านเข้าไปในสเปกโตรกราฟทาง slit ซึ่งเป็นช่องที่ให้แสงผ่านเข้าไปสู่ grating ที่สามารถแยกลำแสงที่สะท้อนกลับออกมาเป็นทีละความยาวคลื่น จากนั้นจะเข้าสู่ detector คือกล้อง CCD ซึ่งทำการถ่ายภาพทุกๆความยาวคลื่น โดยจะเก็บไปที่ละความยาวคลื่น (λ) ข้อมูลที่ได้จะถูกส่งไปที่คอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป



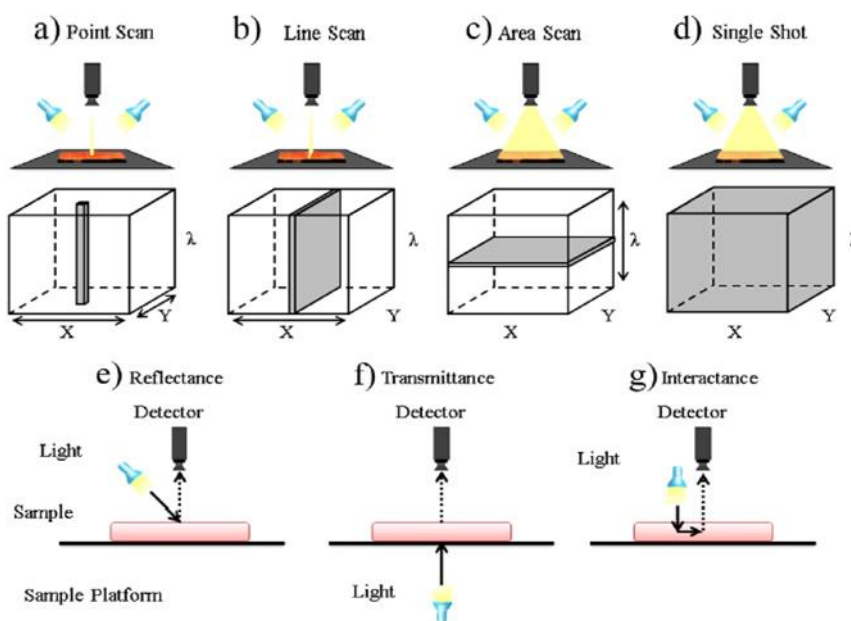
ภาพที่ 2 Hypercube แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมกับพิกเซลของภาพ
ที่มา: Iqbal และคณะ (2014)



ภาพที่ 3 ส่วนประกอบของเทคนิค HSI
ที่มา: Talens และคณะ (2013)

วิธีการถ่ายภาพด้วยเทคนิค HSI เพื่อที่จะได้ข้อมูลเป็น 3-D hyperspectral image cube (hypercube) มีอยู่ 4 วิธี ได้แก่ point scanning, line scanning, area scanning และ single shot แสดงดังภาพที่ 4 โดยวิธีแรก ได้แก่ point scanning (ภาพที่ 4a) หรือเป็นที่รู้จักในอีกชื่อหนึ่งคือ whiskbroom จะเป็นการสแกนไปที่พิกเซลหนึ่งๆ เพื่อให้ข้อมูลสเปกตรัมจากพิกเซลนั้นๆ ส่วนพิกเซลหรือจุดอื่นๆจะถูกสแกนโดยการเคลื่อนที่ของ detector หรือตัวอย่างก็ได้ ซึ่งวิธีนี้เหมาะกับการที่ต้องการจะวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมในแต่ละพิกเซล แต่มีข้อเสียคือใช้เวลานาน และต้องการเทคโนโลยีขั้นสูงเพื่อรองรับ วิธีสอง line scanning หรือ pushbroom (ภาพที่ 4b) จะเป็นการบันทึกเป็นเส้นตามแนวแกน x ซึ่งเหมาะกับไลน์การผลิตอาหารที่มีระบบสายพานลำเลียง วิธีที่ 3 area scanning หรือ plane scanning (ภาพที่ 4c) จะได้ข้อมูลเชิงพื้นที่ทั้งหมดที่หนึ่งความยาวคลื่นในการถ่ายเพียงครั้งเดียว และวิธี single shot (ภาพที่ 4d) จะให้ข้อมูลเชิงพื้นที่ทั้งหมดของทุกๆความยาวคลื่นในการถ่ายภาพเพียงครั้งเดียว ซึ่งข้อมูลที่ได้จะมีปริมาณมาก

นอกจากนี้เทคนิค HSI ยังมีโหมดการวัดอีก 3 แบบ ได้แก่ แบบสะท้อนกลับ (reflectance) แบบส่องผ่าน (transmittance) และแบบอินเตอร์แอคแทนซ์ (Interactance) (ภาพที่ 4e, f และ g)



ภาพที่ 4 วิธีการถ่ายภาพ HSI และโหมดการวัด
ที่มา: Wu และ Sun (2013)

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่เลือกศึกษาได้แก่ ใบโหระพา โดยเลือกซื้อจากแหล่งผลิตและจำหน่ายแตกต่างกัน ได้แก่ เกษตรกร ตลาดกลางสินค้าเกษตร ตลาดสด ห้างค้าปลีกขนาดใหญ่

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (RCI Labscan Limited, ประเทศไทย)
- 3.2.2 เอทานอล (AR grade, RCI Labscan Limited, ประเทศไทย)
- 3.2.3 3M Petrifilm™ *E. coli* Count Plates (3M, ประเทศไทย)
- 3.2.4 3M Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plates (3M, ประเทศไทย)
- 3.2.5 3m Petrifilm aerobic count plate (3M, ประเทศไทย)
- 3.2.6 เปปโทน
- 3.2.7 น้ำปราศจากไอออน (Deionized Water) (HPLC grade, บริษัท VUNIQUE, ประเทศไทย)

3.3 อุปกรณ์

- 3.3.1 เครื่องสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (FT-NIR Spectrometer) (MPA, Bruker, Germany)
- 3.3.2 ตู้อบลมร้อน (Binder, Germany)
- 3.3.3 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบตัวเลข แบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Digital balance KERN& Sohn GmbH, Balingen, Germany)
- 3.3.4 เครื่องชั่งน้ำหนักแบบตัวเลข แบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital balance รุ่น BP 221S, Sartorius, Germany)
- 3.3.5 เครื่องตีบดผสมตัวอย่าง (stomacher)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 ตอนที่ 1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในใบโหระพาอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

3.4.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างใบโหระพาเพื่อใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง NIR สำหรับการศึกษาคือความเป็นไปได้ในการตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ เตรียมตัวอย่างในรูปแบบใบเดี่ยวดังนี้

1. ล้างใบโหระพา สะเด็ดน้ำบนตะแกรง

2. ตัวอย่างใบโหระพาจะถูกเตรียม 2 แบบคือ แบบไม่เติมเชื้อ *E.coli* และแบบเติมเชื้อ *E.coli*

2.1 การเตรียมตัวอย่างแบบไม่เติมเชื้อ

นำตัวอย่างใบโหระพาบรรจุในภาดโฟมตัวอย่างละ 15 ใบแล้วปิดด้วยพลาสติกให้สนิทนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 7 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 5 และ 7 วัน

2.2 การเตรียมตัวอย่างแบบเติมเชื้อ

นำเชื้อ *E.coli* จำนวน 1 loop ใส่ลงใน peptone 10 มิลลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ Initial subculture จากนั้นดูดมา 2 ml ใส่ลงใน peptone 100 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างใบโหระพาจุ่มลงใน peptone ที่มีเชื้อนาน 2 นาที แล้วนำไปสะเด็ดน้ำให้แห้ง บรรจุในภาดโฟมตัวอย่างละ 15 ใบ แล้วปิดด้วยพลาสติกให้สนิทเก็บที่อุณหภูมิ 7 ± 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วันแสดงรูปการเตรียมตัวอย่างแบบเติมเชื้อ *E.coli* แสดงดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 การเตรียมตัวอย่างใบโหระพา

3.4.1.2 ขั้นตอนการวัดสเปกตรัมใบโหระพา

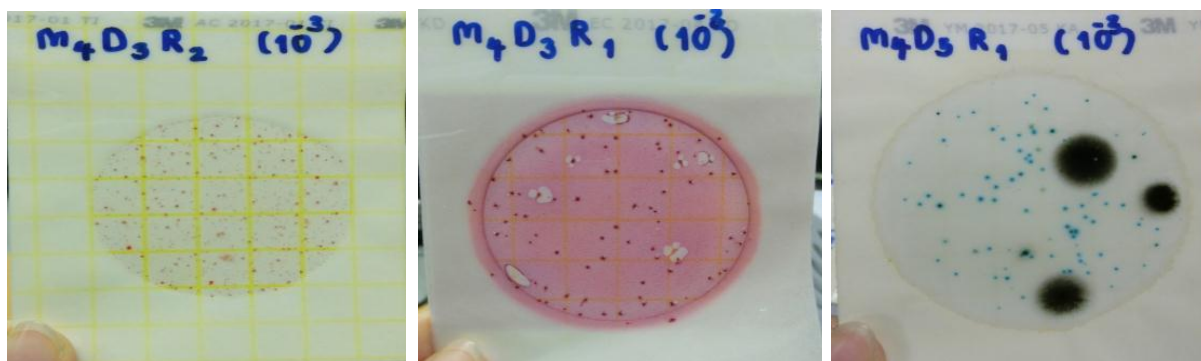
ในระหว่างการเก็บรักษาแต่ละวัน ตัวอย่างใบโหระพาจะถูกเตรียมตัวอย่างตามข้อ

3.4.1.1 ถูกควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น NIR ที่ความยาวคลื่น 700-2500 นาโนเมตรหรือ $12000-4000\text{ cm}^{-1}$ ด้วยเครื่อง FT-NIR รุ่น MPA (Bruker, Germany) ในระบบการวัดแบบส่องผ่านและสะท้อนกลับ ค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละตัวอย่างจะได้รับการวัดมีความละเอียด (resolution) เท่ากับ 16 cm^{-1} และจำนวนครั้งของการสแกนตัวอย่าง (scan time) เท่ากับ 32 ครั้ง จากนั้นค่าการดูดกลืนแสง 15 ใบ จะนำไปเฉลี่ยเป็นค่าการดูดกลืนแสงของ 1 ตัวอย่าง

3.4.1.3 ศึกษาคุณภาพของวัตถุดิบ และวิธีการวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

วิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา และปริมาณเชื้อ *E.coli* โดยหลังจากตัวอย่างถูกวัดค่าการดูดกลืนแสงจะนำไปใส่ถุงพลาสติกสำหรับตีปั่นตัวอย่าง เติมน้ำ 0.85% โซเดียมคลอไรด์ อัตราส่วนตัวอย่างต่อ 0.85% โซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 1:10 ตีปั่นตัวอย่างเป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงบน Petrifilm™ *E. coli* Count Plates, 3M Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plates และ 3M Petrifilm aerobic count

plate บ่มไว้ที่ 25 สำหรับยีสต์และราเป็นเวลา 3-5 วัน บ่มไว้ที่ 38 องศาเซลเซียสสำหรับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดแสดงวิธีการนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ดังภาพที่ 7 และปริมาณ เชื้อ *E.coli* เป็นเวลา 2 วัน และหาปริมาณความชื้นของตัวอย่างโดยใช้วิธีอบลมร้อน (ดูภาคผนวก ก)



ภาพที่ 7 การนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์บนแผ่น (1) 3M Petrifilm aerobic count (2) Petrifilm™ *E. coli* Count Plates และ (3) 3M Petrifilm™ Yeast and Mold Count Plates

3.4.1.4 ขั้นตอนการสร้างสมการทำนายและการวิเคราะห์แยกกลุ่ม

เมื่อตัวอย่างผ่านการวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นและปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในข้อ 3.4.1.3 บันทึกไว้เป็นส่วนของค่ามาตรฐาน ส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ หรือค่าสเปกตรัมที่ได้จากเครื่อง FT-NIR จะถูกนำไปทำการปรับแต่งให้เหมาะสมด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์ เช่นการปรับเรียบ หรือการทำอนุพันธ์หนึ่งและอันดับสอง เป็นต้น จากนั้นข้อมูลทั้ง 2 ชุด (ค่าสเปกตรัมและค่าทางเคมี) จะถูกนำไปหาความสัมพันธ์กัน สมการทำนายปริมาณ PLS โดยใช้โปรแกรม OPUS (Bruker Optics, Germany) สมการทำนายตรวจสอบ (external validation) และสมการทำนายปริมาณที่ได้จะใช้เป็นสมการพื้นฐานในการตรวจสอบ (prediction)

3.4.2 ตอนที่ 2 การตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในใบโหระพาอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคภาพถ่ายเชิงสเปกตรัม

3.4.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่างใบโหระพาเพื่อใช้ในการถ่ายภาพด้วยเทคนิค HSI สำหรับการศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคภาพถ่ายเชิงสเปกตรัมเตรียมตัวอย่างในรูปแบบใบเดี่ยวดังนี้

1. ล้างใบโหระพา สะเด็ดน้ำบนตะแกรง
2. ตัวอย่างใบโหระพาจะถูเตรียม 2 แบบคือ แบบไม่เติมเชื้อ *E.coli* และแบบเติมเชื้อ *E.coli*

2.1 การเตรียมตัวอย่างแบบไม่เติมเชื้อ

นำตัวอย่างใบโหระพาบรรจุในภาตโคมตัวอย่างละ 15 ใบแล้วปิดด้วยพลาสติกให้สนิทนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 7 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 วัน

2.2 การเตรียมตัวอย่างแบบเติมเชื้อ

นำเชื้อ *E.coli* จำนวน 1 loop ใส่ลงใน peptone 10 มิลลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ Initial subculture จากนั้นดูดมา 2 ml ใส่ลงใน peptone 100 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างใบโหระพาลงใน peptone ที่มีเชื้อนาน 2 นาที่ แล้วนำไปสะเด็ดน้ำให้แห้งบรรจุในภาตโคมตัวอย่างละ 15 ใบ แล้วปิดด้วยพลาสติกให้สนิทเก็บที่อุณหภูมิ 7 ± 1 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน

3.4.2.2 ขั้นตอนการถ่ายภาพใบโหระพาด้วยระบบ HIS

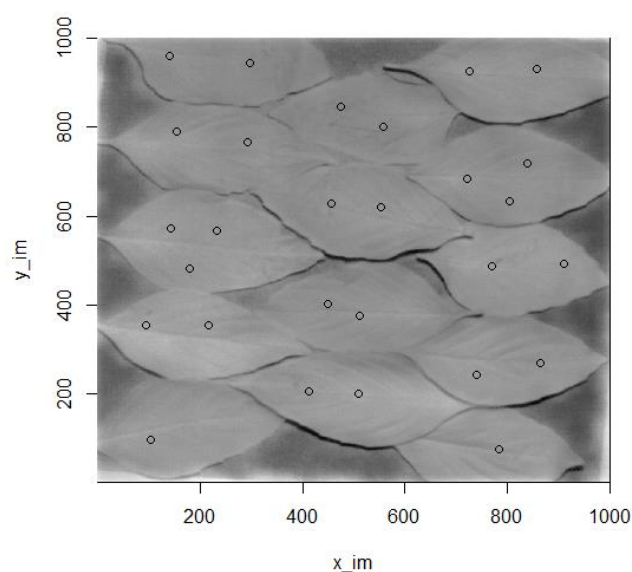
ตัวอย่างจะถูกนำมาถ่ายภาพสเปกตรัม ซึ่งจะใช้การถ่ายภาพแบบทั้งใบ (Focal plane scanning image) ด้วยระบบการวัดแบบสะท้อนกลับ (Reflectance) ช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 400 – 1000 นาโนเมตร แสดงดังภาพที่ 8 การถ่ายภาพจะใช้โปรแกรม GUI ซึ่งขั้นตอนแรกก่อนถ่ายภาพจะต้องทำการปรับเทียบเครื่องมือด้วยการทำ dark reference (นำฟิวเจอร์บอร์ดสีดำไปปิดที่เลนส์ของกล้องแล้วทำการถ่ายภาพ) และ white reference (ถ่ายภาพผ้าใบสีขาว) เมื่อทำการถ่ายภาพแล้ว ข้อมูลที่ได้จะถูก export ได้ภาพที่มีไฟล์ .cue และ .hdr



ภาพที่ 8 ระบบการวัด HSI ของใบโหระพา

3.4.2.3 ศึกษาความเป็นไปได้ในการตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคภาพถ่ายเชิงสเปกตรัม

เมื่อตัวอย่างผ่านการถ่ายภาพแล้วจะนำไปทำการวิเคราะห์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีเดียวกันกับข้อ 3.4.1.3 บันทึกไว้เป็นส่วนหนึ่งของข้อมูลค่ามาตรฐาน ส่วนภาพถ่ายที่ได้จะถูกนำไปแปลงข้อมูลให้กลายเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ หรือค่าสเปกตรัม เพื่อสร้างเป็นสมการทำนายตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม Rx64 3.3.1 ในการเปิดไฟล์ภาพที่เป็น .cue และ .hdr จะเลือกเส้นสเปกตรัมจากตำแหน่งที่สนใจ (region of interest; ROI) โดยแต่ละภาพจะเลือก ROI ทั้งหมด 30 จุด แสดงดังภาพที่ 9 ข้อมูลสเปกตรัมที่ได้จะถูกนำไปปรับแต่งสเปกตรัมด้วยเทคนิคทางคณิตศาสตร์โดยใช้ซอฟต์แวร์ unscramble software (CAMO Software AS, Oslo, Norway) จากนั้นทดสอบสมการโดยใช้วิธี full cross validation



ภาพที่ 9 ตำแหน่ง ROI ของภาพถ่ายสเปกตรัม

บทที่ 4

ผลและการอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ตอนที่ 1 การตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในใบโหระพาอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

4.1.1 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ยีสต์และราในใบโหระพา

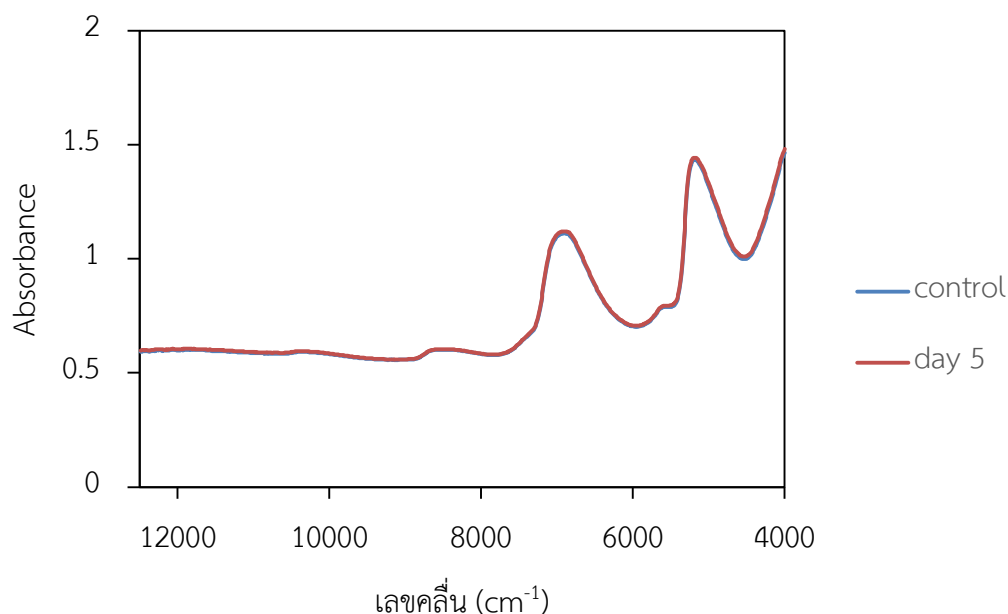
จากตัวอย่างใบโหระพาจำนวน 96 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 4 แหล่ง ได้แก่ Big C, Tops ตลาดกลางบางใหญ่และสวนจังหวัดนนทบุรี พบว่ามีปริมาณ Total aerobic count สูงสุด 7.8×10^6 cfu/g, ปริมาณยีสต์และราสูงสุด 2.8×10^5 cfu/g, ปริมาณ *E.Coli* สูงสุด 6×10^2 cfu/g และปริมาณความชื้นสูงสุด 90.68 % wet basis ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าทางสถิติของปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา ปริมาณเชื้อ *E.coli* และปริมาณความชื้น ที่ใช้การสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ในใบโหระพา (n=96)

องค์ประกอบที่วิเคราะห์	ต่ำสุด – สูงสุด	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
จุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (cfu/g)	2.35×10^4 - 7.80×10^6	$1.29 \times 10^6 \pm 1.75 \times 10^5$
ยีสต์และรา (cfu/g)	1.00×10^2 - 2.80×10^5	$5.50 \times 10^4 \pm 8.80 \times 10^4$
<i>E.coli</i> (cfu/g)	0.00 – 6.00×10^2	$74.00 \pm 1.40 \times 10^2$
ปริมาณความชื้น (%)	85.17 - 90.68	88.15 ± 1.58

4.1.2 ลักษณะเส้นสเปกตรัม

สเปกตรัมจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงจากตัวอย่างใบโหระพาที่เก็บเป็นเวลา 0 และ 5 วัน เมื่อวัดด้วยเครื่อง NIRS โดยวัดแบบส่องผ่านและสะท้อนกลับของแสง ช่วงความยาวคลื่น 800-2500 นาโนเมตร หรือเลขคลื่น 12000 ถึง 4000 cm^{-1} โดยเป็นสเปกตรัมที่ยังไม่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมมีองค์ประกอบของน้ำ ซึ่งเป็นการดูดกลืนของเลขคลื่น 6900 cm^{-1} O-H First overtone พบการดูดกลืนที่เลขคลื่น 5300 cm^{-1} เป็น O-H ซึ่งเป็น cellulose จะมีความสัมพันธ์กับโครงสร้างขององค์ประกอบของผนังเซลล์ของพืช (Osborne และคณะ, 1993) ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 เส้นสเปกตรัมเฉลี่ยของใบโพธิ์ที่ได้จากเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้

4.1.3 การสร้างสมการทำนายด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR)

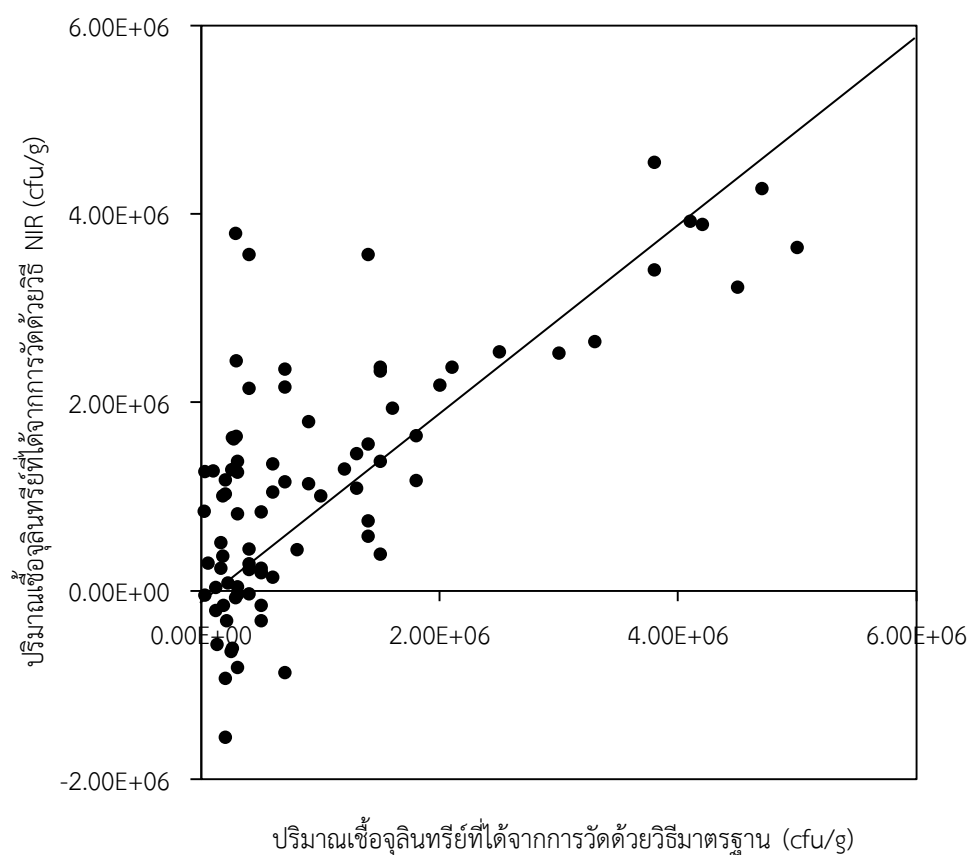
จากการนำใบโพธิ์มาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIR สเปกตรัมที่ได้จากการวัดการดูดกลืนในช่วงอินฟราเรดจะมีลักษณะการทับเหลื่อมซ้อนกัน (overlapping) อีกทั้งยังมีอิทธิพลของปัจจัยอื่นๆ เช่น การกระเจิงแสง อุณหภูมิ ความชื้น ที่มีผลทำให้ลักษณะการดูดกลืนแสงของสเปกตรัมแตกต่างกัน โดยลักษณะสเปกตรัมที่เกิดขึ้น เช่น การเลื่อนตัวขึ้นของสเปกตรัมตามแนวแกน y หรือ การดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นตลอดช่วงความยาวคลื่นที่เพิ่มขึ้น (multiplicative scattering) ดังนั้นก่อนการนำสเปกตรัมมาสร้างสมการทำนายปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด จึงต้องมีการปรับแต่งเส้นสเปกตรัม โดยการพิจารณาวิธีการปรับแต่งเส้นสเปกตรัมที่เหมาะสมคือ เมื่อสร้างสมการทำนายปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยเทคนิค PLS สมการที่ให้ค่า R^2 และ RPD สูง และให้ค่า RMSEP ต่ำ โดยพบว่าสมการที่ดีที่สุดคือสมการทำนายปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี Standard Normal Variate (SNV) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1063.39- 1333.62 นาโนเมตร และ 1630.76-1836.19 นาโนเมตร (ตารางที่ 3) ซึ่งการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 1780 และ 1820 เป็นการดูดกลืนของเซลลูโลส และจากการทดลองของ Fernando Camara-Martos และคณะ (2015) ได้ศึกษาการตรวจสอบคุณภาพของน้ำนมวัวโดยตรวจสอบเชื้อ *E.coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ พบว่าช่วงความยาวคลื่นที่ถูกนำมาเลือกใช้ในการสร้างสมการแบ่งกลุ่มด้วยเทคนิค Principle component analysis (PCA) คือช่วง 1002.99- 1385.04 นาโนเมตร

ตารางที่ 3 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR)

วิธีการปรับแต่งสเปกตรัม	จำนวน ตัวแปร	สมการเทียบมาตรฐาน		สมการทวนสอบ			RPD
		R ²	RMSEC (cfu/g)	R ²	RMSECV (cfu/g)	Bias (cfu/g)	
Raw	7	0.61	1.13x10 ⁶	0.34	1.41x10 ⁶	-5.49x10 ⁴	1.24
First derivative	8	0.82	6.74x10 ⁵	0.47	1.09x10 ⁶	-1.72x10 ⁴	1.37
Second derivative	3	0.49	1.28x10 ⁶	0.27	1.49x10 ⁶	-1.52x10 ⁴	1.17
SNV	10	0.88	6.12x10 ⁵	0.58	1.06x10 ⁶	-1.76x10 ⁴	1.56
SNV+ first derivative	1	0.20	1.51x10 ⁶	0.22	1.53x10 ⁶	-416	1.13
MSC	8	0.82	6.79x10 ⁵	0.47	1.09x10 ⁶	-1.72x10 ⁴	1.37
Straight line subtraction	10	0.89	5.80x10 ⁵	0.58	1.07x10 ⁶	-2.43x10 ⁶	1.55

หมายเหตุ: R²: coefficients of determination, RMSEC: root mean square error of calibration, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction, SNV: standard normal variate

สำหรับแผนภาพการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด แสดงในภาพที่ 11 จะพบว่าข้อมูลบางส่วนมีแนวโน้มไปทางเดียวกับเส้น target line แต่ข้อมูลส่วนมากจะกระจายอยู่บริเวณปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีค่าต่ำ



ภาพที่ 11 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV

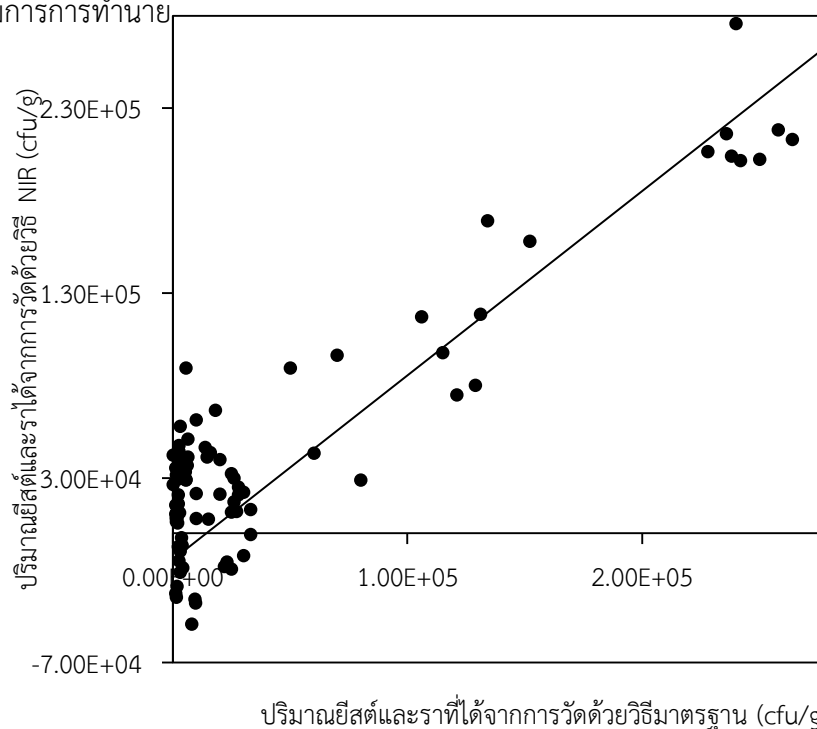
จากการนำไปโหระพามาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIR แล้วนำมาสร้างสมการทำนายปริมาณยีสต์และราด้วยเทคนิค PLS พบว่าสมการที่ให้ค่า R^2 RMSEP และ RPD ที่ดีที่สุดคือสมการทำนายที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี Standard Normal Variate (SNV) ที่ช่วงความยาวคลื่น 1638.78- 1836.10 นาโนเมตร และ 2171.31-2356.88 นาโนเมตร (ตารางที่ 4) ซึ่งให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.83 และ RPD เท่ากับ 2.43 ตามลำดับ ซึ่ง Williams (2007) ได้อธิบายค่า R^2 ไว้ว่า R^2 ในช่วง 0.83-0.90 สามารถใช้ในการทำนายเพื่องานวิจัยได้ อย่างไรก็ตามการนำเทคนิค NIR ในการประยุกต์ใช้ในการติดตามปริมาณยีสต์และราพิจารณาการนำไปใช้งานขึ้นกับช่วงการยอมรับในการทำนายค่าปริมาณยีสต์และราผิดพลาด

ตารางที่ 4 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณยีสต์และราด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR)

วิธีการปรับแต่งสเปกตรัม	จำนวน ตัวแปร	สมการเทียบมาตรฐาน		สมการทวนสอบ			RPD
		R^2	RMSEC (cfu/g)	R^2	RMSECV (cfu/g)	Bias (cfu/g)	
Raw	9	0.79	3.67×10^4	0.72	4.02×10^4	-0.877	1.90
First derivative	10	0.83	3.32×10^4	0.70	4.16×10^4	1.97×10^3	1.84
Second derivative	9	0.85	3.15×10^4	0.69	4.24×10^4	2.46×10^3	1.81
SNV	7	0.87	2.93×10^4	0.83	3.18×10^4	143	2.43
SNV+ first derivative	7	0.85	3.10×10^4	0.79	3.52×10^4	1.73×10^3	2.20
MSC	6	0.81	3.51×10^4	0.75	3.81×10^4	27	2.00
Straight line subtraction	6	0.74	4.06×10^4	0.69	4.24×10^4	-490	1.80

หมายเหตุ: R^2 : coefficients of determination, RMSEC: root mean square error of calibration, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction, SNV: standard normal variate

สำหรับแผนภาพการกระจายของสมการทำนายปริมาณยีสต์และรา แสดงในภาพที่ 12 จะพบว่าข้อมูลมีแนวโน้มไปทางเดียวกับเส้น target line แต่ข้อมูลส่วนใหญ่จะกระจายอยู่บริเวณปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีค่าต่ำ ดังนั้นถ้าหากในการทำงานวิจัยในอนาคตเพื่อพัฒนาการตรวจสอบปริมาณยีสต์และราด้วยเทคนิค NIR ให้มีความแม่นยำมากขึ้น ควรเพิ่มตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อยีสต์และรามากขึ้นสำหรับสร้างสมการการทำนาย



ภาพที่ 12 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณยีสต์และรา จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV

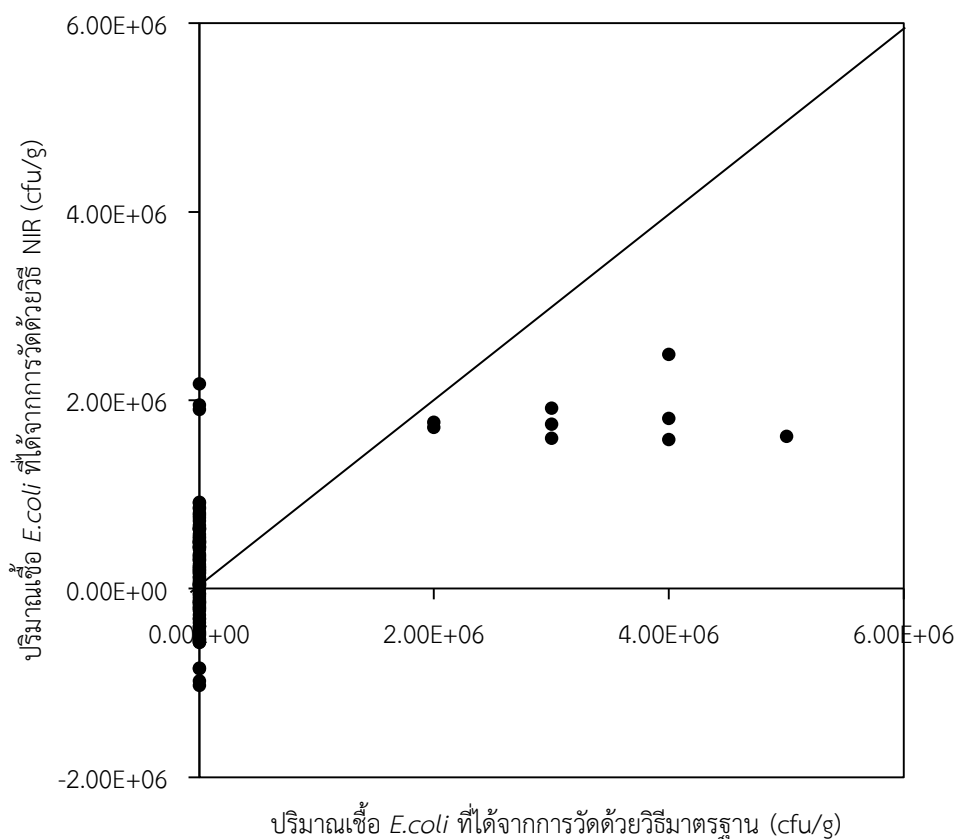
จากการนำไบโهرพามาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIR แล้วนำมาสร้างสมการทำนายปริมาณเชื้อ *E.coli* ด้วยเทคนิค PLS พบว่าสมการที่ให้ค่า R^2 RMSEP และ RPD ที่ดีที่สุดคือสมการทำนายที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี Standard Normal Variate (SNV) ร่วมกับ การปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ที่ช่วงความยาวคลื่น 1063.39 – 1333.61 นาโนเมตร และ 2171.31-2356.88 นาโนเมตร (ตารางที่ 5) ซึ่งให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.39 และ RPD เท่ากับ 1.28 ตามลำดับ ซึ่ง Williams (2007) ได้อธิบายค่า R^2 ไว้ว่า R^2 ในช่วง 0.26-0.49 หมายถึง เป็นความสัมพันธ์ที่ไม่ดี ไม่สามารถใช้ทำนายปริมาณเชื้อ *E.coli* ได้ และจากการทดลองของ Fernando Camara-Martos และคณะ (2015) ได้ศึกษาการตรวจสอบคุณภาพของน้ำนมวัวโดยตรวจสอบเชื้อ *E.coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ พบว่าช่วงความยาวคลื่นที่ถูกนำมาเลือกใช้ในการสร้างสมการแบ่งกลุ่มด้วยเทคนิค Principle component analysis (PCA) คือช่วง 1002.99- 1385.04 นาโนเมตร และ เมื่อใช้เทคนิค PLS ในการสร้างสมการทำนายปริมาณเชื้อ *E.coli* ปริมาณเชื้อ *E.coli* ในน้ำนมวัวมีค่าอยู่ในช่วง 6-9 log cfu/ml ซึ่งมีปริมาณของจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ความเข้มข้นสูงจึงให้ค่า R^2 และ slope เข้าใกล้หนึ่งคือเท่ากับ 0.94 และ 0.96 ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณเชื้อ *E.coli* ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR)

วิธีการปรับแต่งสเปกตรัม	จำนวนตัวแปร	สมการเทียบมาตรฐาน		สมการทวนสอบ			RPD
		R^2	RMSEC (cfu/g)	R^2	RMSECV (cfu/g)	Bias (cfu/g)	
Raw spectra	8	0.44	8.11×10^5	0.30	8.55×10^5	-9.36×10^3	1.20
First derivative	2	0.50	7.64×10^5	0.36	8.24×10^5	1.97×10^3	1.25
Second derivative	3	0.49	7.48×10^5	0.33	8.40×10^5	4.79×10^3	1.22
SNV	6	0.51	7.43×10^5	0.38	8.10×10^5	1.47×10^3	1.27
SNV+ first derivative	6	0.52	7.39×10^5	0.39	8.04×10^5	1.97×10^3	1.28
MSC	6	0.51	7.57×10^5	0.35	8.27×10^5	6.79×10^3	1.24
Straight line subtraction	6	0.48	7.71×10^5	0.37	8.18×10^5	7.11×10^3	1.26

หมายเหตุ: R^2 : coefficients of determination, RMSEC: root mean square error of calibration, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction, SNV: standard normal variate

สำหรับแผนภาพการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อ *E.coli* แสดงในภาพที่ 13 จะพบว่า ข้อมูลไม่มีแนวโน้มไปทางเดียวกับเส้น target line และกระจายออกจากเส้น target line แต่ข้อมูลส่วนใหญ่จะกระจายอยู่บริเวณปริมาณเชื้อเชื้อมีค่าต่ำ



ภาพที่ 13 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อ *E.coli* จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV ร่วมกับวิธี first derivative

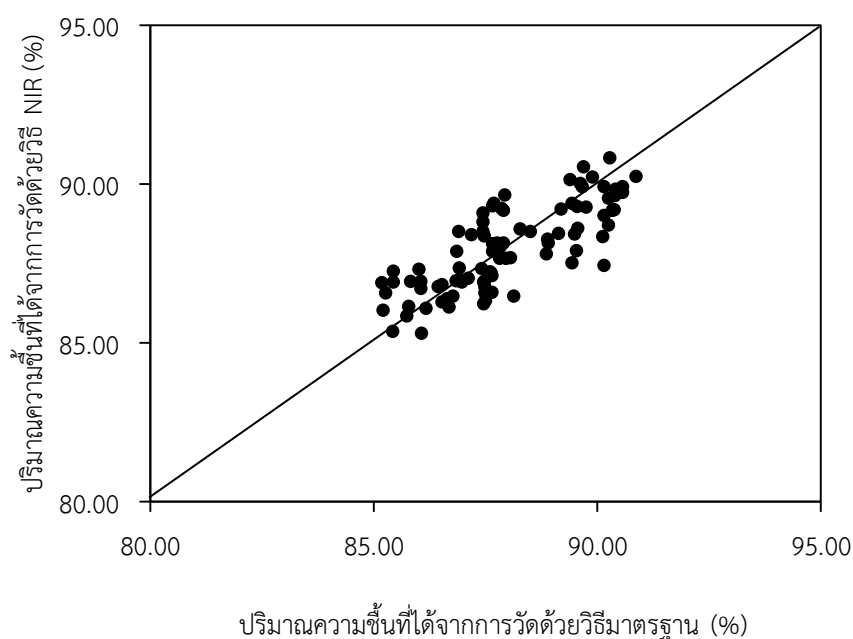
จากการนำใบโหระพานาวัตค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง NIR แล้วนำมาสร้างสมการทำนายปริมาณความชื้นด้วยเทคนิค PLS พบว่าสมการที่ให้ค่า R^2 RMSEP และ RPD ที่ดีที่สุดคือสมการทำนายที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับ first derivative ที่ช่วงความยาวคลื่น 1063.39 – 1333.61 นาโนเมตร 1638.78- 1836.10 นาโนเมตร และ 2171.31-2356.88 นาโนเมตร (ตารางที่ 6) ซึ่งให้ค่า R^2 เท่ากับ 0.65 และ RPD เท่ากับ 1.61 ตามลำดับ ซึ่ง Williams (2007) ได้อธิบายค่า R^2 ไว้ว่า R^2 ในช่วง 0.65-0.81 สามารถใช้ในการทำนายเพื่อแบ่งระดับปริมาณ อย่างไรก็ตามการนำเทคนิค NIR ในการประยุกต์ใช้ในการติดตามปริมาณความชื้นพิจารณาการนำไปใช้งานขึ้นกับช่วงการยอมรับในการทำนายค่าปริมาณความชื้นผิดพลาดมีค่าต่ำ เท่ากับ 0.913%

ตารางที่ 6 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณความชื้นของใบโพธิ์ด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้ (NIR)

วิธีการปรับแต่งสเปกตรัม	จำนวน ตัวแปร	สมการเทียบมาตรฐาน		สมการทวนสอบ			RPD
		R^2	RMSEC (%wet basis)	R^2	RMSECV (%wet basis)	Bias %	
Raw Spectra	9	0.71	0.882	0.55	1.040	0.008	1.49
First derivative	9	0.72	0.860	0.58	0.997	0.001	1.55
Second derivative	7	0.76	0.792	0.58	1.010	0.010	1.53
SNV	5	0.51	1.110	0.40	1.190	0.010	1.29
SNV+ first derivative	9	0.76	0.798	0.61	0.963	0.008	1.61
MSC+ first derivative	8	0.79	0.744	0.65	0.913	0.007	1.61
MSC	8	0.66	0.951	0.55	1.030	0.007	1.49
Straight line subtraction	9	0.72	0.873	0.55	1.030	0.005	1.49

หมายเหตุ: R^2 : coefficients of determination, RMSEC: root mean square error of calibration, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction, SNV: standard normal variate

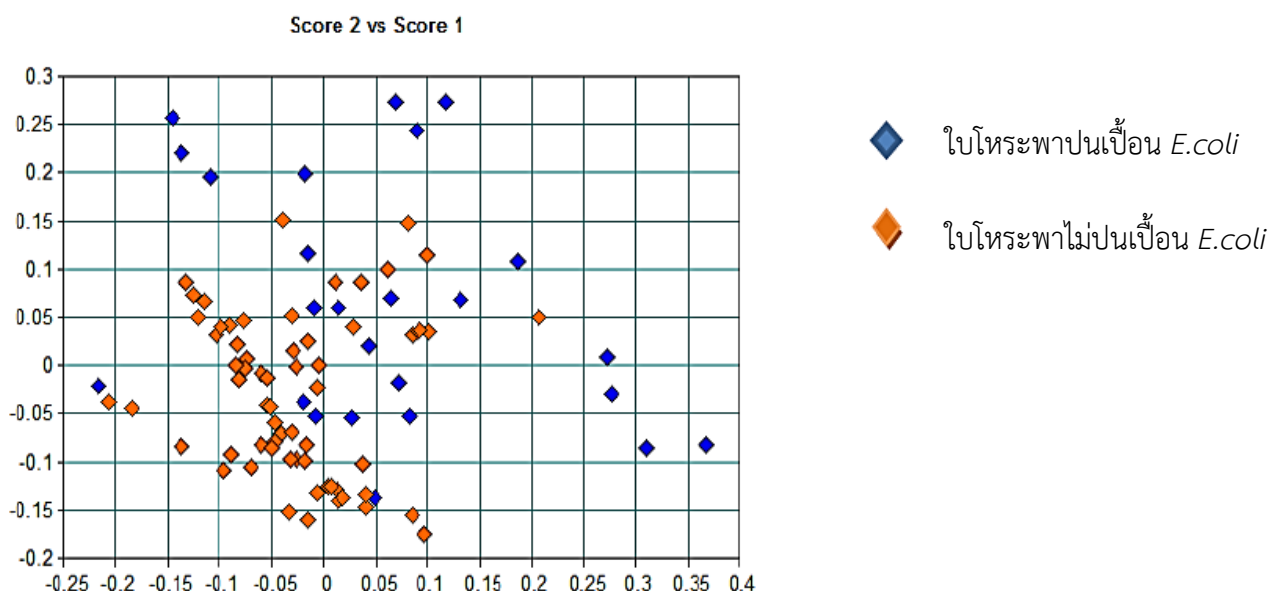
สำหรับแผนภาพการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นในใบโพธิ์ แสดงในภาพที่ 14 จะพบว่าข้อมูลมีแนวโน้มไปทางเดียวกับเส้น target line และกระจายเข้าใกล้เส้น target line



ภาพที่ 14 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณความชื้นจากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC ร่วมกับวิธี first derivative

4.1.4 การแบ่งกลุ่มใบโหระพาที่ปนเปื้อนเชื้อ *E.coli* ด้วยเทคนิค NIR

การใช้เทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้มาสร้างสมการสำหรับการทำนายการจำแนกกลุ่มใบโหระพาที่ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *E.coli* ออกจากกลุ่มใบโหระพาที่มีการปนเปื้อนของเชื้อ *E.coli* ด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis; PCA) ผลการทดลองพบว่าไม่สามารถแยกใบโหระพาที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *E.coli* ออกจากใบโหระพาที่ไม่มีการปนเปื้อนได้แสดงดังภาพที่ 15



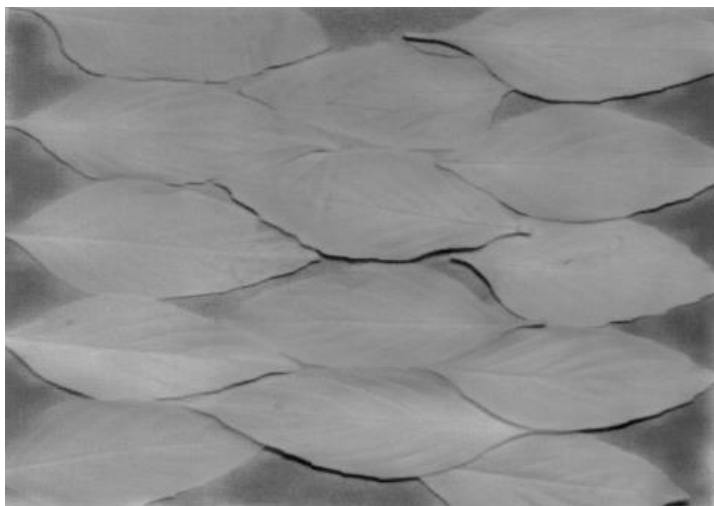
ภาพที่ 15 การแบ่งกลุ่มใบโหระพาที่มีการปนเปื้อน *E.coli* และ ไม่ปนเปื้อน *E.coli* ด้วยเทคนิค PCA

4.2 ตอนที่ 2 การตรวจสอบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในใบโหระพาอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิคภาพถ่ายเชิงสเปกตรัม

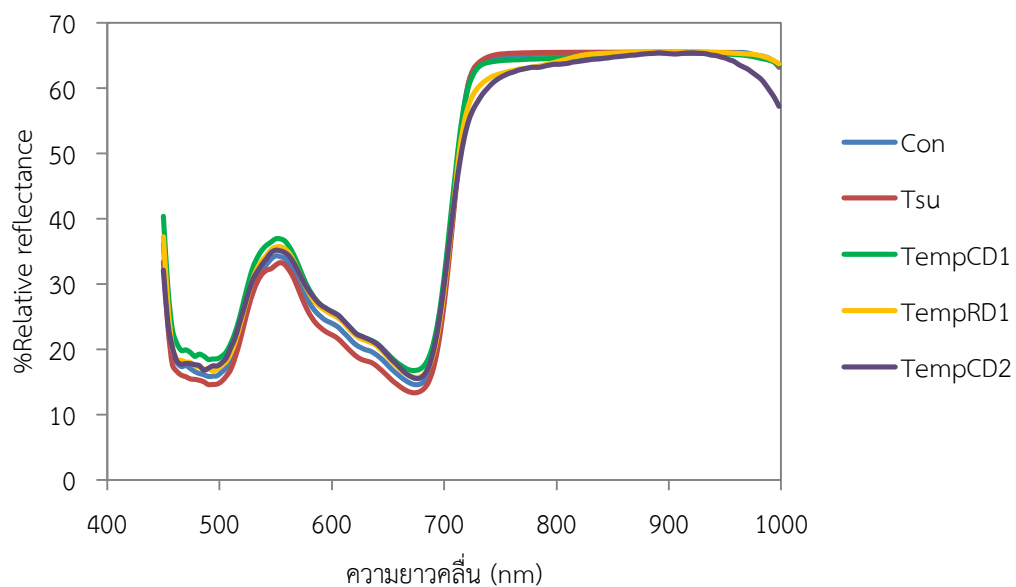
4.2.1 ลักษณะเส้นสเปกตรัม

สเปกตรัมที่ได้จากการถ่ายภาพด้วยเทคนิคถ่ายภาพสเปกตรัม (HSI) (ภาพที่ 16) ในช่วงความยาวคลื่นระหว่าง 450 ถึง 1000 นาโนเมตร ข้อมูลสเปกตรัมที่ได้แสดงดังภาพที่ 17 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวคลื่นกับเปอร์เซ็นต์การสะท้อนกลับสัมพัทธ์ (% relative reflectance) สเปกตรัมของใบโหระพาในการทดลองนี้มีลักษณะใกล้เคียงกับสเปกตรัมของผักโขม (Diezma และคณะ, 2013) นอกจากนี้พบว่ามีพีคการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 680 นาโนเมตร (nm) ซึ่งเป็นช่วงการดูดกลืนแสงของคลอโรฟิลล์ที่สามารถพบในผักและผลไม้ (ElMasry และคณะ, 2007)

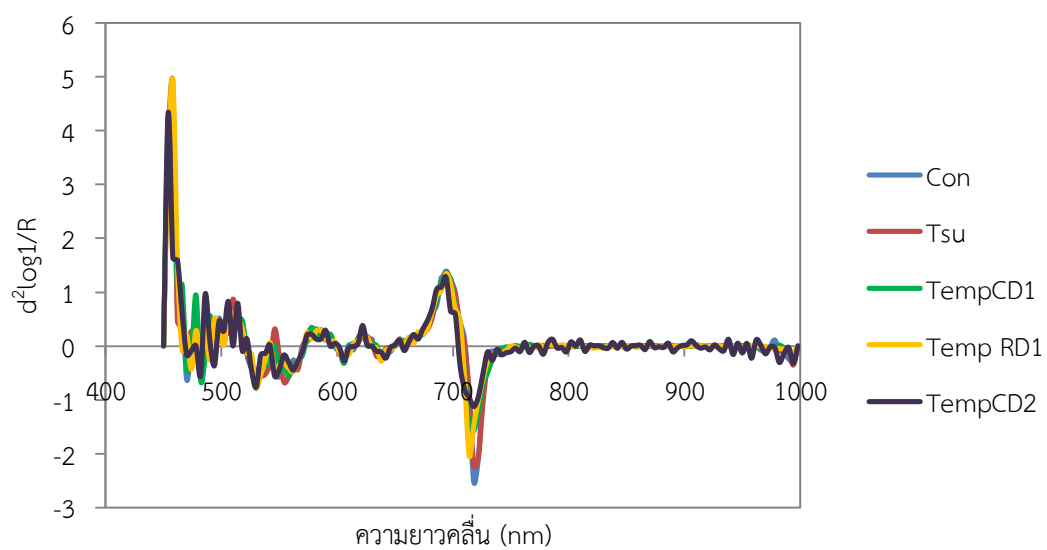
อย่างไรก็ตามการซ้อนทับกันของพีคขนาดใหญ่มีผลต่อการบดบังพีคสำคัญที่ต้องการศึกษา จึงได้มีการปรับแต่งเส้นสเปกตรัมก่อนการนำไปวิเคราะห์คุณภาพ ภาพที่ 18 แสดงเส้นสเปกตรัมที่ได้จากเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีการคำนวณค่าอนุพันธ์อันดับสอง ซึ่งทำให้สามารถแยกพีคที่ซ้อนทับกันออกมาได้ชัดเจนขึ้น พบพีคที่สำคัญ เช่น บริเวณ 670-710 nm แสดงถึงรงควัตถุของคลอโรฟิลล์ (Rajkumar และคณะ, 2012)



ภาพที่ 16 ภาพถ่ายสเปกตรัมจากเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัมของใบโหระพา



ภาพที่ 17 เส้นสเปกตรัมเฉลี่ยที่ได้จากเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัมของใบโหระพา



ภาพที่ 18 เส้นสเปกตรัมที่ได้จากเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสองของ ใบโหระพา

4.2.2 การสร้างสมการทำนายด้วยเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัม (HSI)

ค่าทางสถิติของปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา และปริมาณเชื้อ *E.coli* ที่ใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัมในใบโพธิ์ระพา แสดงดังตารางที่ 7 โดยปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดมีค่าเฉลี่ยคือ 1.1×10^7 cfu/g sample ปริมาณยีสต์และรามีค่าเฉลี่ย 2.2×10^5 cfu/g sample และปริมาณ เชื้อ *E.coli* มีค่าเฉลี่ย 2.6×10^9 cfu/g sample

ตารางที่ 7 ค่าทางสถิติของปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา และปริมาณเชื้อ *E.coli* ที่ใช้ในการสร้างสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบด้วยเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัมในใบโพธิ์ระพา

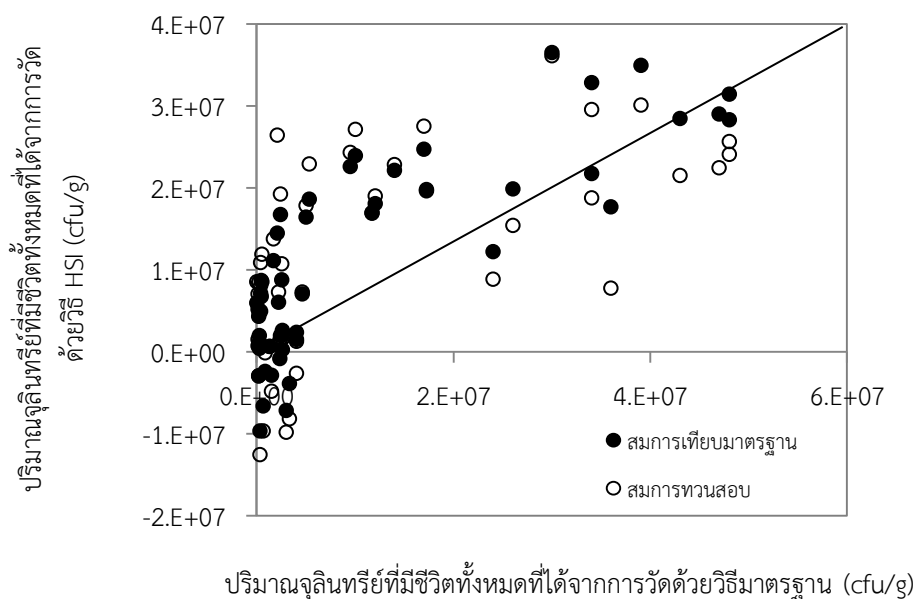
เชื้อจุลินทรีย์	จำนวนตัวอย่าง	ต่ำสุด – สูงสุด	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
จุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด	50	$1.4 \times 10^2 - 4.8 \times 10^7$	$1.1 \times 10^7 \pm 1.5 \times 10^7$
ยีสต์และรา	80	$8.0 - 2.7 \times 10^6$	$2.2 \times 10^5 \pm 4.2 \times 10^5$
<i>E.coli</i>	40	$0 - 3.9 \times 10^9$	$2.6 \times 10^9 \pm 7.2 \times 10^8$

ตารางที่ 8 แสดงผลของสมการทำนายปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดของใบโพธิ์ระพาดด้วยเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัมในช่วงความยาวคลื่น 450-1000 nm ด้วยระบบการวัดแบบสะท้อนกลับ วิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี PLS และทวนสอบด้วยวิธี full cross validation โดยสมการที่ดีที่สุดได้จากการปรับแต่งด้วยวิธี standard normal variate (SNV) ร่วมกับวิธีอนุพันธ์ลำดับหนึ่ง (first derivative) ซึ่งให้ค่า R^2 , RMSECV, Bias และ RPD ของสมการทวนสอบเท่ากับ 0.373, 1.2×10^7 cfu/g, -1.4×10^5 cfu/g และ 1.24 Williams (2007) กล่าวว่า สมการทำนายที่มี R^2 ในช่วง 0.26-0.49 แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ทำนายกับค่าทางเคมีที่ต่ำ นอกจากนี้ Nicolai และคณะ (2007) กล่าวว่าค่า RPD ที่มีค่าต่ำกว่า 1.5 แสดงว่าสมการทำนายมีประสิทธิภาพต่ำและไม่สามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งสอดคล้องกับกราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (ภาพที่ 19) โดยแกน x แสดงปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดที่วัดได้จากวิธีมาตรฐาน และแกน y แสดงปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดที่ทำนายได้จากเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัม (HSI) จากภาพจะเห็นว่าจุดของข้อมูลกระจายออกจากเส้น target line และมีการรวมตัวอยู่บริเวณที่มีค่าน้อย ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของการทำนายที่ต่ำ

ตารางที่ 8 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดด้วยเทคนิค การถ่ายภาพสเปกตรัม (HSI)

วิธีการปรับแต่งสเปกตรัม	จำนวน ตัวแปร	สมการเทียบมาตรฐาน		สมการทวนสอบ			RPD
		R ²	RMSEC (cfu/g)	R ²	RMSECV (cfu/g)	Bias (cfu/g)	
Raw	6	0.596	9.5 ×10 ⁶	0.354	1.2 ×10 ⁷	-3.5 ×10 ⁵	1.22
Smoothing	6	0.573	9.8 ×10 ⁶	0.369	1.2 ×10 ⁷	-2.0 ×10 ⁵	1.23
Normalize	5	0.584	9.6 ×10 ⁶	0.359	1.2 ×10 ⁷	-1.5 ×10 ⁵	1.22
MSC	5	0.556	9.9 ×10 ⁶	0.355	1.2 ×10 ⁷	-2.5 ×10 ⁵	1.22
First derivative	6	0.724	7.8 ×10 ⁶	0.364	1.2 ×10 ⁷	-2.0 ×10 ⁵	1.23
Second derivative	5	0.672	8.5 ×10 ⁶	0.174	1.4 ×10 ⁷	-1.9 ×10 ⁵	1.08
SNV	5	0.557	9.9 ×10 ⁶	0.342	1.2 ×10 ⁷	-3.0 ×10 ⁵	1.21
SNV+ smoothing	4	0.529	1.0 ×10 ⁷	0.349	1.2 ×10 ⁷	-4.0 ×10 ⁵	1.22
SNV+ first derivative	5	0.649	8.9 ×10 ⁶	0.373	1.2 ×10 ⁷	-1.4 ×10 ⁵	1.24
SNV+ second derivative	5	0.626	9.1 ×10 ⁶	0.081	1.5 ×10 ⁷	-4.0 ×10 ⁵	1.02
MSC+ smoothing	4	0.529	1.0 ×10 ⁶	0.363	1.2 ×10 ⁷	-3.5 ×10 ⁵	1.23
MSC+ first derivative	5	0.649	8.9 ×10 ⁶	0.370	1.2 ×10 ⁷	-2.0 ×10 ⁵	1.23
MSC+ second derivative	5	0.624	9.2 ×10 ⁶	0.076	1.5 ×10 ⁷	-4.1 ×10 ⁵	1.02

หมายเหตุ: R²: coefficients of determination, RMSEC: root mean square error of calibration, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction, SNV: standard normal variate



ภาพที่ 19 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV ร่วมกับวิธี first derivative

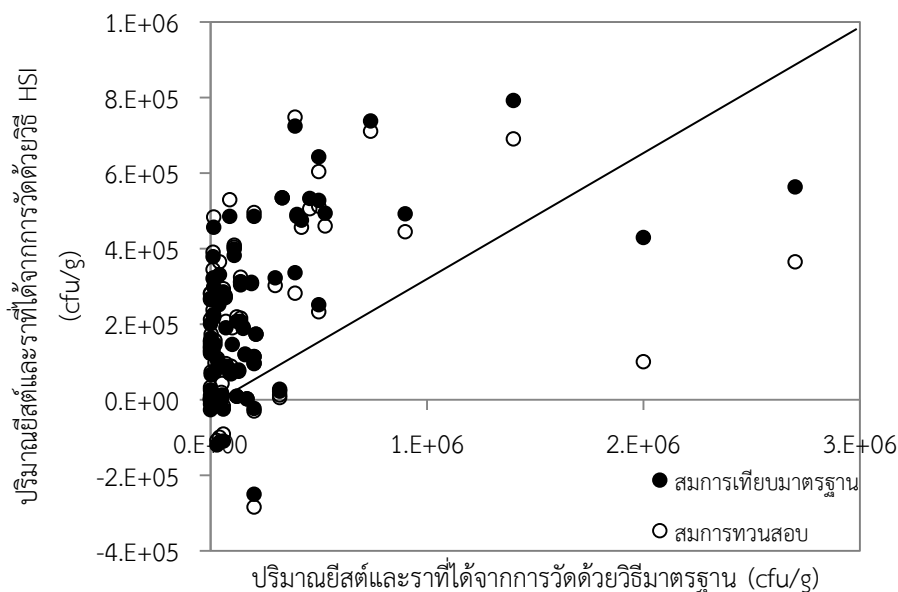
สำหรับผลของสมการทำนายปริมาณยีสต์และราของใบโหระพาแสดงในตารางที่ 9 ซึ่งจะเห็นว่าสมการที่ดีที่สุดมาจากการปรับแต่งด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง (second derivative) ซึ่งให้ค่า R^2 , RMSECV, Bias และ RPD ของสมการทวนสอบเท่ากับ 0.110, 3.9×10^5 , -2.6×10^3 และ 1.05 Williams (2007) กล่าวว่า สมการทำนายที่มี R^2 ต่ำกว่า 0.2 แสดงถึงสมการไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ทำนายได้และค่าทางเคมี เช่นเดียวกับผลของสมการทำนายปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด ค่า RPD มีค่าต่ำกว่า 1.5 แสดงว่าสมการทำนายมีประสิทธิภาพต่ำและไม่สามารถนำไปใช้ได้ (Nicolai และคณะ, 2007)

ภาพที่ 20 แสดงกราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณยีสต์และราซึ่งได้จากการปรับแต่งด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง จากภาพจะเห็นว่าข้อมูลมีการกระจายตัวน้อย รวมตัวกันอยู่ตรงบริเวณค่าต่ำและกระจายตัวออกจากเส้น target line แสดงถึงประสิทธิภาพในการทำนายที่ต่ำมาก

ตารางที่ 9 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณยีสต์และราด้วยเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัม (HSI)

วิธีการปรับแต่ง สเปกตรัม	จำนวน ตัวแปร	สมการเทียบมาตรฐาน		สมการทวนสอบ			RPD
		R^2	RMSEC (cfu/g)	R^2	RMSECV (cfu/g)	Bias	
Raw	1	0.051	4.0×10^5	0.040	4.1×10^5	-1.3×10^2	1.01
Smoothing	1	0.050	4.0×10^5	0.039	4.1×10^5	-1.0×10^2	1.01
Normalize	1	0.049	4.0×10^5	0.037	4.1×10^5	-9.4×10^1	1.01
MSC	2	0.125	3.9×10^5	0.067	4.0×10^5	-3.0×10^3	1.02
First derivative	1	0.121	3.8×10^5	0.088	4.0×10^5	-1.3×10^3	1.03
Second derivative	1	0.270	3.5×10^5	0.110	3.9×10^5	-2.6×10^3	1.05
SNV	2	0.126	3.9×10^5	0.067	4.0×10^5	-2.8×10^3	1.02
SNV+ smoothing	2	0.110	3.9×10^5	0.068	4.0×10^5	-2.6×10^3	1.02
SNV+ first derivative	1	0.106	3.9×10^5	0.081	4.0×10^5	-7.5×10^3	1.03
SNV+ second derivative	1	0.245	3.6×10^5	0.106	3.9×10^5	-3.2×10^3	1.04
MSC+ smoothing	2	0.108	3.9×10^5	0.068	4.0×10^5	-2.8×10^3	1.02
MSC+ first derivative	1	0.105	3.9×10^5	0.081	4.0×10^5	-5.9×10^2	1.03
MSC+ second derivative	1	0.244	3.6×10^5	0.106	3.9×10^5	-3.3×10^3	1.04

หมายเหตุ: R^2 : coefficients of determination, RMSEC: root mean square error of calibration, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction, SNV: standard normal variate



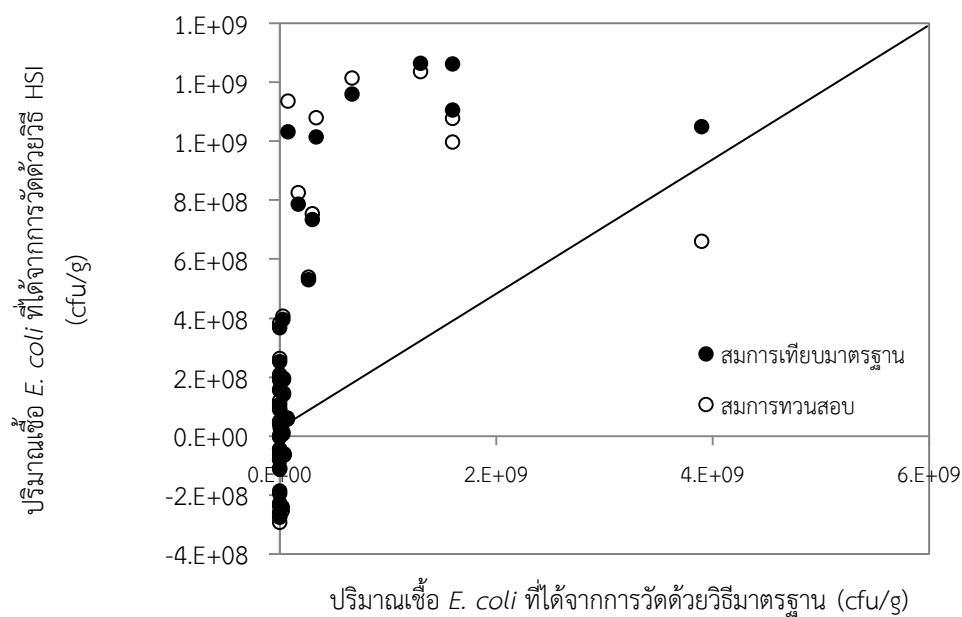
ภาพที่ 20 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณยีสต์และรา จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์อันดับสอง

ตารางที่ 10 แสดงผลของสมการทำนายปริมาณเชื้อ *E.coli* ของใบโหระพาด้วยเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัม โดยสมการที่ดีที่สุดมาจากการปรับแต่งด้วยวิธี multiplicative scatter correction (MSC) ร่วมกับวิธีอนุพันธ์อันดับ 1 ซึ่งให้ค่า R^2 , RMSECV, Bias และ RPD ของสมการทวนสอบเท่ากับ 0.301, 6.1×10^8 , 9.8×10^6 และ 1.17 ซึ่งสมการทำนายที่มี R^2 ในช่วง 0.26-0.49 แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ทำนายกับค่าทางเคมีที่ต่ำ (Williams, 2007) และเช่นเดียวกันกับผลของสมการทำนายปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดและปริมาณยีสต์และรา ค่า RPD ของสมการทำนายปริมาณ เชื้อ *E.coli* มีค่าต่ำกว่า 1.5 แสดงว่าสมการทำนายมีประสิทธิภาพต่ำ (Nicolai และคณะ, 2007) ซึ่งสอดคล้องกับกราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อ *E.coli* แสดงดังภาพที่ 21 จะเห็นว่าจุดของข้อมูลกระจายออกจากเส้น target line

ตารางที่ 10 ผลของสมการเทียบมาตรฐานและสมการทวนสอบของปริมาณเชื้อ *E.coli* ด้วยเทคนิคการถ่ายภาพสเปกตรัม

วิธีการปรับแต่ง สเปกตรัม	จำนวน ตัวแปร	สมการเทียบมาตรฐาน		สมการทวนสอบ			RPD
		R^2	RMSEC (cfu/g)	R^2	RMSECV (cfu/g)	Bias	
Raw	2	0.438	5.3×10^8	0.230	6.4×10^8	-4.2×10^6	1.11
Smoothing	2	0.407	5.4×10^8	0.231	6.4×10^8	-4.6×10^6	1.11
Normalize	2	0.431	5.3×10^8	0.227	6.4×10^8	-3.4×10^6	1.11
MSC	1	0.370	5.6×10^8	0.280	6.6×10^8	-8.3×10^6	1.15
First derivative	1	0.428	5.3×10^8	0.289	6.1×10^8	-1.0×10^6	1.16
Second derivative	2	0.419	5.4×10^8	0.040	7.1×10^8	-1.6×10^6	1.00
SNV	1	0.370	6.2×10^8	0.280	6.2×10^8	-8.3×10^6	1.15
SNV+ smoothing	1	0.345	5.7×10^8	0.267	6.2×10^8	-7.8×10^6	1.14
SNV+ first derivative	1	0.421	5.4×10^8	0.299	6.1×10^8	-9.4×10^6	1.17
SNV+ second derivative	1	0.276	6.0×10^8	0.043	7.1×10^8	-4.7×10^6	1.00
MSC+ smoothing	1	0.345	5.7×10^8	0.267	6.2×10^8	-7.8×10^6	1.14
MSC+ first derivative	1	0.423	5.4×10^8	0.301	6.1×10^8	-9.8×10^6	1.17
MSC+ second derivative	1	0.278	6.0×10^8	0.045	7.1×10^8	-4.8×10^6	1.00

หมายเหตุ: R^2 : coefficients of determination, RMSEC: root mean square error of calibration, RMSEP: root mean square error of prediction, RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP, MSC: multiplicative scatter correction, SNV: standard normal variate



ภาพที่ 21 กราฟการกระจายของสมการทำนายปริมาณเชื้อ *E.coli* จากการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี multiplicative scatter correction (MSC) ร่วมกับวิธีอนุพันธ์อันดับ 1

อย่างไรก็ตามหากพิจารณาจากผลของสมการเทียบมาตรฐาน R^2 ของสมการทำนายปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (ตารางที่ 8) มีค่าอยู่ในช่วง 0.6-0.7 แสดงว่าสมการยังมีแนวโน้มที่จะเป็นไปได้ ซึ่งอาจทำการปรับปรุงสมการได้โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างและช่วงของค่าทางเคมีของตัวอย่างให้เพิ่มขึ้นจากเดิม

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษา พบว่าเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้สามารถใช้ในการตรวจสอบปริมาณยีสต์และราได้แต่ไม่สามารถใช้ตรวจสอบปริมาณเชื้อ *E.coli* และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ แต่อย่างไรก็ตามยังพอมองแนวโน้มที่จะสามารถใช้ในการตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดได้หากทำการเพิ่มจำนวนตัวอย่างและช่วงของค่าทางเคมีของตัวอย่างให้มากขึ้น

จากผลการศึกษาด้วยเทคนิค HSI พบว่าเทคนิค HSI ยังไม่สามารถใช้ในการตรวจสอบปริมาณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด *Escherichia coli* (*E.coli*) ยีสต์และรา ในใบโหระพาได้อย่างไรก็ตามหากพิจารณาสมการทำนายปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดสมการยังมีแนวโน้มที่จะเป็นไปได้ ซึ่งอาจทำการปรับปรุงสมการได้โดยการเพิ่มจำนวนตัวอย่างและช่วงของค่าทางเคมีของตัวอย่างให้เพิ่มขึ้นจากเดิม

เอกสารอ้างอิง

- จารุวรรณ บางแว และจารุรัตน์ พุ่มประเสริฐ. (ไม่ระบุปีที่ตีพิมพ์). การวิเคราะห์หาเชื้อ *E. coli* ในพืชผักด้วยเครื่อง Near Infrared Spectroscopy. สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร.
- สำนักงานส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ ณ กรุงลอนดอน. 2556. ปัญหาการนำเข้าสินค้าผักสดจากไทยมายังสหราชอาณาจักรและสหภาพยุโรป. วันที่ค้นข้อมูล 8 มีนาคม 2560. เว็บไซต์: www.ditp.go.th/contents_attach/74293/74293.pdf.
- ศุมาพร เกษมสำราญ. 2552. หลักการพื้นฐานของสเปกโตรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้. หน้า 2(1)-2(23). ใน วิชัย หฤทัยธนาสันต์ (บรรณาธิการ). เทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- Cámara-Martos, F., Lopes, J. A., Moreno-Rojas, R. and Pérez-Rodríguez, F. 2015. Detection and quantification of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in cow milk by near-Infrared spectroscopy. International Journal of Dairy Technology. 68: 357-365
- Diezma, B., Lleó, L., Roger, J. M., Herrero-Langreo, A., Lunadei, L. and Ruiz-Altisent, M. (2013). Examination of the quality of spinach leaves using hyperspectral imaging. Postharvest Biology and Technology. 85: 8-17.
- Ellekjaer, M.R., Isaksson, T. and Solheim, R. (1994). Assessment of sensory quality of meat sausages using near infrared spectroscopy. Journal of Food Science. 59(3): 456-464.
- ElMasry, G., Wang, N., ElSayed, A. and Ngadi, M. (2007). Hyperspectral imaging for nondestructive determination of some quality attributes for strawberry. Journal of Food Engineering. 81: 98-107.
- Fernando, C-M., Joao, A. L., Rafafael, M-R., and Fernando, F-R., I., (2015). Detection and quantification of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in cow milk by near-infrared spectroscopy. International Journal of Dairy Technology. 68: 357-365.
- Huang, H., Yu, H., Xu, H. and Ying, Y. (2008). Near infrared spectroscopy for on/in-line monitoring of quality in foods and beverages: A review. Journal of Food Engineering 87: 303-313.
- Tripathi, S. and Mishra, H. (2009). A rapid FT-NIR method for estimation of aflatoxin B1 in red chili powder, Food Control, 20(9): 840-846.
- Kawano, S. 2002. Application to agricultural products and foodstuffs Near-infrared spectroscopy. Chapter 12. In Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S., Heise, H.M. (eds.). Near Infrared Spectroscopy. Wiley-VCH Verlag. Germany. pp. 269-287.

- Iqbal, A., Sun, D.W. and Allen, P. (2014). An overview on principle, techniques and application of hyperspectral imaging with special reference to ham quality evaluation and control. *Food Control*. 46: 242-254.
- Nicolaï, B. M., Beullens, K., Bobelyn, E., Peirs, A., Saeys, W., Theron, K. I. and Lammertyn J. (2007). Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology*. 46, 99-118.
- Osborne, B.G., Fearn, T. and Hindle, P.H. (1993). *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis*. Longman Scientific & Technical. Singapore. 29.
- Osborne, B.G. (2007). Near-infrared spectroscopy in food analysis. [On line]. Accessed on 3 February 2009. Available from <http://bse.ist.utl.pt/2007/News/NIR%20Food%20Review.pdf>.
- Rajkumar, P., Wang, N., Elmasry, G., Raghavan, G.S.V. and Gariepy, Y. (2012). Studies on banana fruit quality and maturity stages using hyperspectral imaging. *Journal of Food Engineering*. 108: 194-200.
- Suthiluk, P., Saranwong, S., Kawano, S. and Satake, T. (2008). Possibility of using near infrared spectroscopy for evaluation of bacterial contamination in shredded cabbage. *International Journal of Food Science and Technology*. 43(1): 160-165
- Schwanninger, M. (2009). Basics and applications of infrared spectroscopy in biomass properties. [online]. Accessed on 30 August 2009. Available from <http://www.boku.ac.at/chemie/bc2/>
- Talens, P., Mora, L., Morsy, N., Barbin, D.F., Elmasry, G., and Sun, D. (2013). Prediction of water and protein contents and quality classification of Spanish cooked ham using NIR hyperspectral imaging. *Journal of Food Engineering*. 108: 194-200.436.
- Tito, N.B., Rodemann, T. and Powell, S.M. (2012). Use of near infrared spectroscopy to predict microbial numbers on Atlantic salmon. *Food Microbiology*. 32:431-
- Williams, P. (2007). "Grains and seeds." In *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*, 165-217. Edited by Ozaki, Y., McClure, W. F. and Christy, A. A. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc,
- Wu, D. and Sun, D. W. (2013). Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: Part Fundamentals. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 19: 1-14.

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

ก.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2552)

ก.1.1 เครื่องมือ

ก.1.1.1 ตู้อบ (oven)

ก.1.1.2 เครื่องชั่ง ที่ชั่งได้ละเอียดถึง 0.01 กรัม

ก.1.1.3 เดสิคเคเตอร์ (desiccator)

ก.1.1.4 กล่องอลูมิเนียมมีฝาปิด

หมายเหตุ กรณีที่มีการวิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยใช้วิธีอื่น เช่น การใช้เครื่องวัดความชื้น ต้องมีการทวนสอบความถูกต้องของเครื่องมือเปรียบเทียบกับวิธีการอบในตู้อบลมร้อน ความถี่ในการทวนสอบขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความถี่ในการวัด ปริมาณตัวอย่างที่วัด ความคลาดเคลื่อนของเครื่องมือวัด

ก.1.2 วิธีวิเคราะห์

ก.1.2.1 เปิดฝากล่องอลูมิเนียมตามข้อ ก.1.1.4 โดยเอาฝาซ้อนไว้ใต้กล่องหรือวางข้างๆ แล้วนำไปอบในตู้อบตามข้อ ก.1.1.1 ที่อุณหภูมิ 105°C (องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดสิคเคเตอร์แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งตาม ก.1.1.2

ก.1.2.2 ตักตัวอย่างเมล็ดกาแฟประมาณ 10 g ใส่ในกล่องอลูมิเนียมที่ได้จากข้อ ก.1.2.1 แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งตาม ก.1.1.2 อบกล่องเมล็ดกาแฟตัวอย่างในตู้อบที่อุณหภูมิ 105°C โดยเปิดฝาและเอาฝาซ้อนไว้ใต้กล่องหรือวางข้างๆ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง $\pm$ 0.5 ชั่วโมง แล้วปิดฝาทิ้งไว้ให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งตาม ก.1.1.2

ก.1.2.3 ทำตามข้อ ก.1.2.1 และข้อ ก.1.2.2 อย่างน้อย 2 ซ้ำ

ก.1.2.4 คำนวณหาปริมาณความชื้นของการวิเคราะห์แต่ละครั้ง จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของความชื้น} = \frac{(B - C)}{(B - A)} \times 100$$

เมื่อ $A =$ น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝา

$B =$ น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝาและเมล็ดกาแฟก่อนอบ

$C =$ น้ำหนักกล่องอลูมิเนียมพร้อมฝาและเมล็ดกาแฟหลังอบ

และนำผลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยปริมาณความชื้น

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อแซ่ชื่อสกุลการวิจัย นางสาวบุศรากรณ์ มหาโยธี (Busarakorn Mahayothee)
ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม
โทรศัพท์ 034-219361 โทรสาร 034-272194
e-mail: busarakornm@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา เทคโนโลยีอาหาร สถาบันจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่จบ พ.ศ. 2532
- ปริญญาโท M.Sc. สาขา เทคโนโลยีอาหาร สถาบันจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่จบ พ.ศ. 2537
- ปริญญาเอก Dr.rer.nat. สาขา Natural Science (Food Technology) สถาบัน The
University of Hohenheim, Germany
ปีที่จบ พ.ศ. 2548

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ

- Marcus Nagle; Habasimbi K; **Mahayothee B**; Haewsungcharern M; Janjai S; Müller J (2011). Fruit processing residues as an alternative fuel for drying in Northern Thailand. *Fuel*, 90 (2), 813-823.
- Precoppe M F; Nagle M; Janjai S; **Mahayothee B**; Müller J (2011). Analysis of dryer performance for the improvement of small-scale litchi processing. *International Journal of Food Science & Technology*, 46 (3), 561-569.
- Marcus Nagle, **Busarakorn Mahayothee**, Parika Rungpichayapichet, Serm Janjai and Joachim Müller. 2010. Effect of irrigation on near-infrared (NIR) based prediction of mango maturity. *Scientia Horticulturae*, 125 (4) 771-774.
- Janjai, S., Lamlert, N., Tohsing, K., **Mahayothee, B.**, Bala, B. K., Mueller, J. 2010. Measurement and modeling of moisture sorption isotherm of litchi (*Litchi Chinensis* Sonn.). *International Journal of Food Properties*, 13(2) 251-260.
- Marcus Nagle, Juan Carlos Gonzalez Azcarraga, **Busarakorn Mahayothee**, Methinee Haewsungcharern, Serm Janjai, Joachim Muller. 2010. Improved quality and energy performance of a fixed-bed longan dryer by thermodynamic modifications, *Journal of Food Engineering*, 99(3) 392-399.
- S. Janjai, **B. Mahayothee**, N. Lamlert, B.K. Bala, M. Precoppe, M. Nagle, J. Muller, 2010. Diffusivity, shrinkage and simulated drying of litchi fruit (*Litchi Chinensis* Sonn.), *Journal of Food Engineering*, 96(2) , 214-221.
- Janjai S; Precoppe M F; Lamlert N; **Mahayothee B**; Bala B K; Nagle M; Müller J (2010). Thin-layer drying of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Food and Bioproducts Processing*, online available.

- Busarakorn Mahayothee**, Patchimaporn Udomkun, Marcus Nagle, Methinee Haewsungcharoen, Serm Janjai, Joachim Mueller. 2009. Effects of pretreatments on colour alterations of litchi during drying and storage. *European Food Research and Technology*, 229 (2) 329-337.
- S. Janjai, P. Intawee, K. Tohsing, **B. Mahayothee**, B.K. Bala, M.A. Ashraf, J. Muller. (2009) Neural network modeling of sorption isotherms of longan (*Dimocarpus longan* Lour.), *Computers and Electronics in Agriculture*, 66, (2), May 2009, 209-214.
- Franz Roman, Marcus Nagle, Hermann Leis, Serm Janjai, **Busarakorn Mahayothee**, Methinee Haewsungcharoen, Joachim Muller. Potential of roof-integrated solar collectors for preheating air at drying facilities in Northern Thailand. 2009. *Renewable Energy* 34(7): 1661-1667.
- S. Janjai, N. Lamlert, P. Intawee, **B. Mahayothee**, B.K. Bala, M. Nagle, J. Muller. (2009) Experimental and simulated performance of a PV-ventilated solar greenhouse dryer for drying of peeled longan and banana. *Solar Energy*, 83 (9), 1550-1565.
- Janjai, S., Lamlert, N. Intawee, P., **Mahayothee, B.**, Boonrod, Y., Haewsungcharern, M., Bala, B. K., Nagle, M., Mueller, J. 2009. Solar Drying of Peeled Longan Using a Side Loading Type Solar Tunnel Dryer: Experimental and Simulated Performance. *Drying Technology* 27(4) 595-605.
- M. Nagle, J. C. González-Azcárraga, S. Phupaichitkun, **B. Mahayothee**, M. Haewsungcharern, S. Janjai, He. Leis & J. Müller (2008). Effects of operating practices on performance of a fixed-bed convection dryer and quality of dried longan. 43(11): 1979 - 1987.
- Janjai, S., Lamlert, N., Intawee, P., **Mahayothee, B.**, Haewsungcharern, M., Bala, B. K., Nagle, M., Leis, H. & Müller, J. 2008. Finite Element Simulation of Drying of Longan Fruit. *Drying Technology*, 26 (6), 666-674.
- S. Janjai, N. Lamlert, P. Intawee, **B. Mahayothee**, M. Haewsungcharern, B.K. Bala, J. Müller. 2008. Finite element simulation of drying of mango. *Biosystems Engineering*, 99(4): 523-531.
- Sarawut Phupaichitkun, **Busarakorn Mahayothee**, Thomas Waldenmaier, Joachim Müller. Generalized single-layer model for drying kinetics of unpeeled-longan. *Int J Agric & Biol Eng*. 2008; 1(2): 64-71.
- Busarakorn Mahayothee**, Sybille Neidhart, Reinhold Carle and Werner Mühlbauer. 2007. Effects of variety, ripening condition and ripening stage on the quality of sulphite-free dried mango slices. *European Food Research and Technology*, 225(5-6): 723-732.

- S. Janjai, B.K. Bala, N. Lamlert, **B. Mahayothee**, M. Haewsungcharern, W. Muehlbauer, J. Muller. 2007. Moisture Diffusivity Determination of Different Parts of Longan Fruit. *International Journal of Food Properties*, 10(3): 471-478.
- Busarakorn Mahayothee**, S. Neidhart, W. Mühlbauer, R. Carle. 2007. Effects of Calcium Carbide and 2-Chloroethylphosphonic Acid on Fruit Quality of Thai Mangoes under Various Postharvest Ripening Regimes. *European Journal of Horticultural Science*, 72(4):171-178.
- Janjai S, Bala BK, Tohsing K, **Mahayothee B**, Haewsungcharern M, Müller J. 2007. Moisture sorption isotherms and heat of sorption of mango (*Mangifera Indica* L. cv. Nam Dok Mai). *International Agricultural Engineering Journal*;16(3-4):159-168.
- Janjai, S., Bala, B.K., Tohsing, K., **Mahayothee, B.**, Haewsungcharern, M., Muehlbauer, W., Mueller, J. 2006. Equilibrium moisture content and heat of sorption of longan (*Dimocarpus longan* Lour.). *Drying technology* 24 (12),1691-1696.
- Mahayothee, B.**, Neidhart, S., Leitenberger, M., Mühlbauer, W., Carle, R. Non-destructive determination of maturity of Thai mangoes by near-infrared spectroscopy. *Acta Horticulturae (ISHS)* 2004; 645: 581-588.
- Mahayothee, B.**, Neidhart, S., Mühlbauer, W., Carle, R. Influence of postharvest ripening processes on appropriate maturity for drying mangoes 'Nam Dokmai' and 'Kaew'. *Acta Horticulturae (ISHS)* 2004; 645: 241-248.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

ชื่อ นายปราโมทย์ คูวิจิตรจารุ (Pramote Khuwijitjaru)

ตำแหน่งทางวิชาการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์

สถานที่ทำงานปัจจุบัน ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม

โทรศัพท์ 034-219361 โทรสาร 034-272194 e-mail: kpramote@su.ac.th

ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีที่จบ 2539
- ปริญญาโท Master of Agricultural Science, Kyoto University ประเทศญี่ปุ่น
ปีที่จบ 2544
- ปริญญาเอก Doctor of Agricultural Science, Kyoto University ประเทศญี่ปุ่น
ปีที่จบ 2547

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิชาการ

Klinchongkon, K., Khuwijitjaru, P., Adachi, S. Degradation kinetics of passion fruit pectin in subcritical water. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry
doi: 10.1080/09168451.2016.1277941

Klinchongkon, K.; Chanthong, N.; Ruchain, K.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Effect of ethanol addition on subcritical water extraction of pectic polysaccharides from passion fruit peel. Journal of Food Processing and Preservation doi: 10.1111/jfpp.13138.

Khuwijitjaru, P.; Koomyart, I.; Kobayashi, T.; Adachi, S., Hydrolysis of konjac flour under subcritical water conditions. Chiang Mai Journal of Science (in press).

Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Adachi, S., Degradation kinetics of trisaccharides comprising glucose residues in subcritical water. Journal of Carbohydrate Chemistry 2016, 35(5):286-299.

Kobayashi, T., Khuwijitjaru, P., Adachi, S. Decomposition kinetics of glucose and fructose in subcritical water containing sodium chloride. Journal of Applied Glycoscience 2016, 63 (4): 99-104.

Wiboonsirikul, J.; Watanabe, Y.; Omori, A.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Antioxidative properties of stearyl ascorbate in a food matrix system. Journal of Oleo Science 2016, 65, 487-492.

Watanabe, Y.; Khuwijitjaru, P.; Hamai, Y.; Wiboonsirikul, J.; Adachi, S., Antioxidative property of acyl ascorbate in cookies containing iron. Japan Journal of Food Engineering 2016, 17, 77 - 81.

Tamiya, S.; Koomyart, I.; Kobayashi, T.; Shiga, H.; Yoshii, H.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Preparation of liquid and solid seasonings with shrimp-like flavor from Isada krill under subcritical water conditions by steam injection. Food Science and Technology Research 2016, 22, 317-323.

- Soisangwan, N.; Gao, D.-M.; Kobayashi, T.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Kinetic analysis for the isomerization of cellobiose to cellobiulose in subcritical aqueous ethanol. *Carbohydrate Research* 2016, 433, 67-72.
- Soisangwan, N.; Gao, D.-M.; Kobayashi, T.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Production of lactulose from lactose in subcritical aqueous ethanol. *Journal of Food Process Engineering* 2016, DOI: 10.1111/jfpe.12413.
- Rungpichayapichet, P.; Mahayothee, B.; Nagle, M.; Khuwijitjaru, P.; Müller, J., Robust NIRS models for non-destructive prediction of fruit ripeness and quality in mango. *Postharvest Biology and Technology* 2016, 111, 31-40.
- Mahayothee, B.; Koomyart, I.; Khuwijitjaru, P.; Siriwongwilaichat, P.; Nagle, M.; Müller, J., Phenolic compounds, antioxidant activity, and medium chain fatty acids profiles of coconut water and meat at different maturity stages. *International Journal of Food Properties* 2016, 19, 2041-2051.
- Koomyart, I.; Nagamizu, H.; Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Shiga, H.; Yoshii, H.; Adachi, S., Using severity factor as a parameter to optimize krill treatment under subcritical water conditions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2016, 80(11): 2192-2197.
- Koomyart, I.; Nagamizu, H.; Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Shiga, H.; Yoshii, H.; Adachi, S., Direct treatment of Isada krill under subcritical water conditions to produce seasoning with shrimp-like flavor. *Food Technology and Biotechnology* 2016, 54 (3) 335–341.
- Khuwijitjaru, P., Utilization of plant-based agricultural waste by subcritical water treatment *Japan Journal of Food Engineering* 2016, 17, 33-39.
- Wiboonsirikul, J.; Nakata, Y.; Kobayashi, T.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Degradation of disaccharides containing two glucose units in subcritical water. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* 2015, 10, 681-686.
- Rungpichayapichet, P.; Mahayothee, B.; Khuwijitjaru, P.; Nagle, M.; Müller, J., Non-destructive determination of β - carotene content in mango by NIR spectroscopy compared with colorimetric measurements. *Journal of Food Composition and Analysis* 2015, 38, 32-41.
- Koomyart, I.; Nagamizu, H.; Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Shiga, H.; Yoshii, H.; Adachi, S., Compositions, flavour and antiradical properties of products from subcritical water treatment of raw Isada krill. *International Journal of Food Science and Technology* 2015, 50, 1632-1639.
- Klinchongkon, K.; Khuwijitjaru, P.; Wiboonsirikul, J.; Adachi, S., Extraction of oligosaccharides from passion fruit peel by subcritical water treatment. *Journal of Food Process Engineering* 2017, 40(1): e12269.

- Koomyart, I.; Nagamizu, H.; Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Shiga, H.; Yoshii, H.; Adachi, S., Subcritical water treatment for producing seasoning from semidried Isada krill. *Journal of Food Process Engineering* 2014, 37, 567–574.
- Khuwijitjaru, P.; Suaylam, B.; Adachi, S., Degradation of caffeic acid in subcritical water and on-line HPLC-DPPH assay of degradation products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014, 62, 1945-1949.
- Khuwijitjaru, P.; Pokpong, A.; Klinchongkon, K.; Adachi, S., Production of oligosaccharides from coconut meal by subcritical water treatment. *International Journal of Food Science and Technology* 2014, 49, 1946-1952.
- Khuwijitjaru, P.; Plernjit, J.; Suaylam, B.; Samuhaseneetoo, S.; Pongsawatmanit, R.; Adachi, S., Stability of some phenolic compounds in subcritical water and radical scavenging activity of their degradation products. *Can. J. Chem. Eng.* 2014, 92, 810-815.
- Wiboonsirikul, J.; Mori, M.; Khuwijitjaru, P.; Adachi, S., Properties of extract from okara by its subcritical water treatment. *International Journal of Food Properties* 2013, 16, 974-982.
- Wanpen, C.; Ngampanya, B.; Pruksasri, S.; Jaturapiree, P.; Khuwijitjaru, P., The effect of ultrasonic pretreatment on inulin extraction from Jerusalem artichoke tuber. *KMUTT Research and Development Journal* 2013, 36, 261-270.
- Murayama, Y.; Wiboonsirikul, J.; Khuwijitjaru, P.; Kobayashi, T.; Adachi, S., Antioxidant characteristics of extracts from cereal residues by their subcritical water treatment. *Journal of Oleo Science* 2012, 61, 465-468.
- Khuwijitjaru, P.; Watsanit, K.; Adachi, S., Carbohydrate content and composition of product from subcritical water treatment of coconut meal. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2012, 18, 225-229.
- Khuwijitjaru, P.; Sayputikasikorn, N.; Samuhasaneetoo, S.; Penroj, P.; Siriwongwilaichat, P.; Adachi, S., Subcritical water extraction of flavoring and phenolic compounds from cinnamon bark (*Cinnamomum zeylanicum*). *Journal of Oleo Science* 2012, 61, 349-355.
- Leelayuwapan, H.; Hiangratch, K.; Liangpaiboon, T.; Khuwijitjaru, P.; Boonyarattanakalin, S. In Identification of Products Obtained from Subcritical Water Hydrolysis of Coconut Meal, PACCON2011, Thailand, 2011; Thailand, 2011; pp 124-127.
- Khuwijitjaru, P.; Yuenyong, T.; Pongsawatmanit, R.; Adachi, S., Effects of ferric chloride on thermal degradation of γ -oryzanol and oxidation of rice bran oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2011, 113, 652-657.
- Khuwijitjaru, P.; Anantanasuwong, P.; Adachi, S., Emulsifying and foaming properties of defatted soy meal extracts obtained by subcritical water treatment. *International Journal of Food Properties* 2011, 14, 9-16.

- Khuwijitjaru, P.; Suthasirisup, T., Properties of breader prepared from rice flour. *KKU Research Journal* 2010, 15, 965-972.
- Khuwijitjaru, P.; Yuenyong, T.; Pongsawatmanit, R.; Adachi, S., Degradation kinetics of gamma-oryzanol in antioxidant-stripped rice bran oil during thermal oxidation. *Journal of Oleo Science* 2009, 58, 491-497.
- Khuwijitjaru, P.; Wanpen, C.; Mala, T.; Ariyakriangkrai, M.; Adachi, S., Effect of subcritical water pretreatment on enzymatic digestibility of rice straw, corn stover and sugar cane bagasse. *KKU Research Journal* 2009, 14, 1084-1090 (in Thai).
- Khuwijitjaru, P.; Chaloodong, K.; Adachi, S., Phenolic content and radical scavenging capacity of kaffir lime fruit peel extract obtained by pressurized hot water extraction. *Food Science and Technology Research* 2008, 14, 1-4.
- Wiboonsirikul, J.; Khuwijitjaru, P.; Kimura, Y.; Morita, H.; Tsuno, T.; Adachi, S., Production optimization of the extract with high phenolic content and radical scavenging activity from defatted rice bran by subcritical water treatment. *Japan Journal of Food Engineering* 2007, 8, 311-315.
- Khuwijitjaru, P.; Nualchan, P.; Adachi, S., Foaming and emulsifying properties of rice bran extracts obtained by subcritical water treatment. *Silpakorn University Science and Technology Journal* 2007, 1, 7-12.
- Fujii, T.; Khuwijitjaru, P.; Kimura, Y.; Adachi, S., Decomposition kinetics of monoacyl glycerol and fatty acid in subcritical water under temperature-programmed heating conditions. *Food Chemistry* 2006, 94, 341-347.
- Khuwijitjaru, P.; Taengtieng, N.; Changprasit, S., Degradation of gamma-oryzanol in rice bran oil during heating: An analysis using derivative UV-spectrophotometry. *Silpakorn University International Journal* 2004, 4, 154-165.
- Khuwijitjaru, P.; Kimura, Y.; Matsuno, R.; Adachi, S., Solubility of oleic and linoleic acids in subcritical water. *Food Science and Technology Research* 2004, 10, 261-263.
- Khuwijitjaru, P.; Kimura, Y.; Matsuno, R.; Adachi, S., Preparation of finely dispersed O/W emulsion from fatty acid solubilized in subcritical water. *Journal of Colloid and Interface Science* 2004, 278, 192-197.
- Khuwijitjaru, P.; Fujii, T.; Adachi, S.; Kimura, Y.; Matsuno, R., Kinetics on the hydrolysis of fatty acid esters in subcritical water. *Chemical Engineering Journal* 2004, 99, 1-4.
- Khuwijitjaru, P. Solubility of fatty acids and hydrolysis of their esters in subcritical water. Dissertation, Kyoto University, Kyoto, 2004.
- Khuwijitjaru, P.; Adachi, S.; Matsuno, R., Solubility of saturated fatty acids in water at elevated temperatures. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2002, 66, 1723-1726.