

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การประเมินอายุการเก็บแบบรวดเร็วของผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป
โดยใช้ NIR spectroscopy และ Chemometrics

Rapid shelf life evaluation of a processed food product using
NIR spectroscopy & Chemometrics

ทุนงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2557

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

รศ.ดร.อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ
รศ.ดร. สุวิธสา พงษ์อำไพ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ทุนงบประมาณแผ่นดิน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประจำปีงบประมาณ 2557 ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยวิจัยและนิสิตผู้ช่วยวิจัย เจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เจ้าหน้าที่ฝ่ายวิจัยและบริการวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้พัฒนาการประเมินคุณภาพและอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปพร้อมบริโภค ด้วยวิธีแบบรวดเร็วโดยใช้ NIR spectroscopy ร่วมกับ chemometrics ทำโดยเตรียมผลิตภัณฑ์ได้กรอกหมูปรรูจในถุงพลาสติกภายใต้ภาวะสุญญากาศและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมี (ค่า pH) ทางกายภาพ (ค่าแรงตึงขาด และ ค่าสี) ทางจุลินทรีย์ (จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และ แบคทีเรียแลคติก) และทางประสาทสัมผัส (odor, color, appearance และ overall acceptability) ของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา รวมทั้งวิเคราะห์โดยใช้ near infrared spectroscopy จากผลการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์มีค่า pH ค่าแรงตึงขาด ค่าสี (L^* (ความเข้ม-สว่าง), a^* (เขียว-แดง) และ b^* (น้ำเงิน-เหลือง)) ลดลง เมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น

จากการวัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ พบว่า จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้นาน 8 วัน จำนวนแบคทีเรียแลคติกจึงเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อเก็บรักษานาน 16 วัน พบว่าการเพิ่มของจำนวนจุลินทรีย์ส่งผลให้ ค่าแรงตึงขาด ค่าสี ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าค่า pH ที่ลดลงเป็นผลมาจากปริมาณ แบคทีเรียแลคติกที่เพิ่มขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการยอมรับด้านประสาทสัมผัสของผู้บริโภค

จากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ พบว่า เมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น ตัวอย่างมีการเปลี่ยนแปลงของกลิ่น (off-odor) ลักษณะปรากฏ (slimy appearance) และสี (off-color) เพิ่มมากขึ้น ส่วนค่าการยอมรับโดยรวม (overall acceptability) มีคะแนนลดลง โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการเจริญของจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา และพบว่าผลคะแนนทางประสาทสัมผัสสอดคล้องกับค่าการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และทางกายภาพของผลิตภัณฑ์

สำหรับการวัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาด้วย NIR spectroscopy โดยวัดค่า reflectance ในช่วงความยาวคลื่น 400-1000 nm ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี Savitzky-Golay 2nd derivatives ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสม จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลด้วย chemometrics โดยใช้ principal component analysis (PCA) ในการลดจำนวนข้อมูล และจำแนกตัวอย่างที่มีคุณภาพแตกต่างกัน พบว่าการใช้ NIR spectroscopy ร่วมกับ PCA สามารถจัดจำแนกตัวอย่างเป็นกลุ่ม (clusters) ที่มีคุณภาพแตกต่างกันตามระยะเวลาการเก็บรักษาได้

การทำนาย จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนผลิตภัณฑ์จากค่า reflectance ที่ได้จาก NIR spectroscopy ทำโดยใช้ partial least square regression (PLSR) พบว่าการใช้ PLSR ให้ค่า coefficient of determination (R^2) เป็น 0.85 และ 0.81 สำหรับการ calibration และ validation ตามลำดับ และค่า root mean square error of calibration (RMSEC) และ root mean square error of validation (RMSEV) เป็น 1.88 และ 1.22 Log (CFU/g) ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่า NIR spectroscopy ร่วมกับ PLSR สามารถใช้ในการทำนายการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนผลิตภัณฑ์ และมีความถูกต้องสูง

Abstract

This research developed a rapid method based on near infrared spectroscopy coupled with chemometrics for evaluation of processed food (pork sausages) qualities and shelf life. Changes in physical (color, cutting force), chemical (pH, thiobarbituric acid), microbiological (total plate counts, lactic bacteria) and sensory qualities (color, odor, appearance, overall acceptability) of pork sausages were monitored during the storage at 4 °C. Near infrared spectroscopy also used to measure the reflectance of the samples in the wavelength range of 400-1000 nm.

The results showed that pH, cutting force, color values (L^* , a^* , b^*) decreased with storage time. Total plate counts (TPC) increased with storage time and exceeded the standard limit of bacterial counts for sausage products after storage for 16 days. Lactic bacteria were not detected during 0-8 days of storage, but significantly increased after storage for 8 days. Growth of bacteria affected qualities including cutting force and color values of the products. It was found that a decrease in pH values of the product was caused by an increase in number of lactic bacteria. Results of sensory evaluation revealed that off-odor, slimy appearance, and off-color increased, while overall acceptance scores of the products decreased with increasing storage period. Changes in sensory qualities were caused by bacterial growth during the storage.

For the NIR spectroscopic analysis, reflectance spectra of the products during storage were first mathematically pretreated using Savitzky-Golay 2nd derivatives before submitted to chemometrics for data analysis. Principal component analysis (PCA) was used for data reduction and clustering. It was found that PCA could discriminate samples into different clusters according to their qualities due to different storage time. Partial least square regression model was used to predict the number of total bacteria in the products. The results showed that PLSR could predict total bacteria found in the samples and gave coefficient of determination (R^2) of 0.85 for calibration and 0.81 for validation. Root mean square error of calibration (RMSEC) and root mean square error of validation (RMSEV) of 1.88 and 1.22 Log (CFU/g), respectively, were calculated from the PLSR model. The results suggested that NIR spectroscopy coupled with chemometrics developed in this research could be used to indicate microbiological quality.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อไทย	iii
บทคัดย่ออังกฤษ	iv
สารบัญ	v
สารบัญรูป	vi
1. บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	1
2. วารสารปริทัศน์	2
3. วิธีดำเนินการวิจัย	9
4. ผลการทดลองและวิจารณ์	13
5. สรุปผลการทดลอง	27
6. ข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป	29
เอกสารอ้างอิง	29

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1. Electromagnetic spectrum	7
รูปที่ 2. UV-VIS-NIR spectrophotometer	12
รูปที่ 3. Color values (L^* , a^* , b^*) of food samples during storage	14
รูปที่ 4. Cutting force (gram force) of food samples during storage	15
รูปที่ 5. pH of food samples during storage	16
รูปที่ 6. Total counts (Log (CFU/g)) of food samples during storage 4°C	17
รูปที่ 7. Lactic acid bacteria (Log (CFU/g)) of food samples during storage 4°C	18
รูปที่ 8. Sensory scores (odor, appearance, discoloration, and overall acceptability)	22
รูปที่ 9. Reflectance signals of food samples during storage	21
รูปที่ 11. Reflectance signals of food samples during storage	22
รูปที่ 11. Variance explained by PCs of samples during storage using PCA	23
รูปที่ 12. PCA score plot of samples during storage	24
รูปที่ 13. PLSR of calibration for prediction of total aerobic counts (Log (CFU/g))	26
รูปที่ 14. PLSR of validation data for prediction of total aerobic counts (Log (CFU/g))	28

การประเมินอายุการเก็บแบบรวดเร็วของผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป

โดยใช้ NIR spectroscopy และ Chemometrics

1. บทนำ

อุตสาหกรรมอาหารจัดเป็นอุตสาหกรรมหลักที่เป็นรากฐานทางเศรษฐกิจของประเทศในการนำรายได้เข้าประเทศ ทั้งจากการส่งออกและทำให้เกิดการจ้างแรงงานในประเทศ (Department of Foreign Trade, 2011) และในอนาคตมีแนวโน้มที่จะส่งออกผลิตภัณฑ์อาหารเพิ่มมากขึ้น

การเพิ่มศักยภาพของอุตสาหกรรมอาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารควรมีคุณภาพดี มีความปลอดภัย เป็นที่ยอมรับทั้งภายในและต่างประเทศ การผลิตตลอดอายุการเก็บรักษาจนถึงมือผู้บริโภค และในกรณีของผลิตภัณฑ์อาหารส่งออกผลิตภัณฑ์ควรมีมาตรฐานตามที่ประเทศคู่ค้ากำหนด ดังนั้นการตรวจสอบคุณภาพและการประเมินอายุการเก็บของอาหารจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อให้ผู้ผลิตจะมั่นใจได้ว่าเมื่อถึงมือผู้บริโภคผลิตภัณฑ์อาหารยังคงมีคุณภาพเป็นที่ยอมรับ มีมาตรฐานตามที่ประเทศคู่ค้ากำหนด โดยทั่วไปการศึกษาอายุการเก็บของอาหารตามสภาวะจริง จำเป็นต้องเก็บรักษาอาหารและตรวจสอบคุณภาพเป็นระยะจนกระทั่งคุณภาพของอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงจนไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน ได้แก่ ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปพร้อมบริโภค เช่น ไส้กรอก แฮม และเบคอน เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความขึ้นสูง เสื่อมเสียได้ง่ายเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยทั่วไปการตรวจสอบคุณภาพทำโดยใช้วิธีการนับจำนวนโคโลนี (colony counting method) ของจุลินทรีย์ที่เจริญบนผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งวิธีดังกล่าวต้องใช้เวลาอันยาวนาน อีกทั้งยังสิ้นเปลืองแรงงาน และมีค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาคุณภาพและอายุการเก็บของอาหารด้วยวิธีรวดเร็ว โดยใช้เทคนิค near infrared spectroscopy อย่างไรก็ตามเนื่องจากข้อมูลที่ได้จาก near infrared spectroscopy เป็นข้อมูลที่มีความซับซ้อน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคการวิเคราะห์ข้อมูลที่เหมาะสม งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ chemometrics ความสำเร็จของโครงการสามารถใช้เป็นพื้นฐานสำหรับประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพและระบุอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ ในอุตสาหกรรมได้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์หลักของการวิจัย คือ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพและประเมินอายุการเก็บด้วยวิธีรวดเร็วของผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปพร้อมบริโภคโดยใช้เทคนิค near infrared spectroscopy ร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยเทคนิค chemometrics โดยมีวัตถุประสงค์ย่อยดังต่อไปนี้

1. เพื่อศึกษาติดตามคุณภาพของอาหารด้วยเทคนิค near infrared spectroscopy
2. เพื่อศึกษาการประเมินอายุการเก็บอาหารโดยวิธีมาตรฐานกับวิธีแบบรวดเร็วด้วยเทคนิค near infrared spectroscopy
3. เพื่อศึกษาการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ multivariate data ด้วยเทคนิค chemometrics

2. วารสารปริทัศน์

อุตสาหกรรมอาหารจัดเป็นอุตสาหกรรมหลักที่เป็นรากฐานทางเศรษฐกิจของประเทศในการนำรายได้เข้าประเทศ ทั้งจากการส่งออกและทำให้เกิดการจ้างแรงงานในประเทศ การเพิ่มศักยภาพของอุตสาหกรรมอาหารเพื่อการส่งออกจำเป็นต้องอาศัยความเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมผลิตอื่นๆ ตลอดจนวิธีการที่รวดเร็วและถูกต้องในการตรวจสอบคุณภาพและอายุการเก็บของอาหาร การพัฒนาอุตสาหกรรมต้องอาศัยเทคโนโลยีที่ทันสมัยเพื่อให้กระบวนการผลิตและการควบคุมคุณภาพมีประสิทธิภาพ มีความปลอดภัย และมีมาตรฐานตามที่ประเทศคู่ค้ากำหนด เพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการผลิตให้สินค้าไทยมีคุณภาพสามารถแข่งขันกับตลาดโลกได้ ซึ่งการพัฒนาของเทคโนโลยีสนับสนุนการผลิตที่สำคัญอย่างยิ่งสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร คือ การพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อใช้ในการตรวจสอบติดตาม คุณภาพอาหาร ตลอดจนสามารถกำหนดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ได้ (Siripatrawan et al., 2006)

ผลิตภัณฑ์อาหารจะเป็นที่ยอมรับของตลาดนั้นจำเป็นต้องมีการควบคุมคุณภาพตั้งแต่วัตถุดิบ ขั้นตอนระหว่างการผลิตและการบรรจุ นอกจากนี้ยังต้องมีมาตรการควบคุมการเก็บรักษาและการจัดส่ง เพื่อให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตมีคุณภาพสม่ำเสมอ อายุการเก็บของอาหาร ซึ่งเป็นระยะเวลาของการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารจนกระทั่งผลิตภัณฑ์ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เป็นข้อมูลที่สำคัญและจำเป็นต่อทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภคเพื่อให้มั่นใจได้ว่าผลิตภัณฑ์อาหารยังคงมีคุณภาพดี มีความปลอดภัยต่อการบริโภค การตรวจสอบคุณภาพและการเปลี่ยนแปลงคุณภาพอาหารเพื่อกำหนดอายุการเก็บด้วยวิธีปกติทั่วไป โดยการเก็บผลิตภัณฑ์และตรวจสอบจนกระทั่งผลิตภัณฑ์เกิดการเสื่อม

เสียหรือไม่เป็นที่ยอมรับ เป็นวิธีที่ใช้เวลานาน สิ้นเปลืองแรงงาน และมีค่าใช้จ่ายสูง (Siripatrawan & Jantawat, 2008)

ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกและการเสื่อมเสีย

ไส้กรอก (sausage) มีหลากหลายชนิดแบ่งเป็นประเภทใหญ่ๆ เช่นไส้กรอกสด ไส้กรอกรมควัน ไส้กรอกสุก ไส้กรอกแห้งและไส้กรอกกึ่งแห้ง เป็นต้น ไส้กรอก bratwurst จัดอยู่ในพวก ไส้กรอก สุก พร้อมที่จะรับประทานได้ทันที เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อประเภทบดละเอียด ซึ่งผลิตภัณฑ์ไส้กรอกจัดอยู่ในกลุ่มอาหารที่มีความชื้นสูง ($a_w > 0.90$) และ มีความเป็นกรดต่ำ (low acid food, $pH > 4.5$) ดังนั้นจึงเกิดการเสื่อมเสียได้ง่าย ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ไม่พึงประสงค์ ในด้านกลิ่น, รสชาติ และลักษณะปรากฏ นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากการหืน (rancidity) จากการออกซิเดชันของไขมันเนื่องจากมีปริมาณไขมันสูง การเสื่อมเสียของไส้กรอกขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์และส่วนผสม, กระบวนการใช้ความร้อนในการแปรรูป, การปนเปื้อนระหว่างการแปรรูป, ภาชนะบรรจุ วิธีการบรรจุ และอุณหภูมิในการเก็บรักษา (Samelis, Kakouri และ Rementzis, 2000) การเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกสุกสามารถแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะได้แก่ การเปลี่ยนแปลงรสชาติและกลิ่น และการเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏ (อัมเอบ พันสด, 2549)

การเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก

จุลินทรีย์เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ซึ่งอาจเป็นพวกที่ปนเปื้อนมาในเนื้อสัตว์ในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ หรือการใช้ความร้อนไม่เพียงพอในการอบและการรมควันเพื่อทำลายแบคทีเรีย ทำให้เหลือรอดและสามารถเจริญต่อไปได้ และสร้างสารพวก peroxide ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเม็ดสีไนตริกออกไซด์ ฮีโมโครโมเจน (nitric oxide hemochromogen) หรือไนตริกออกไซด์ไมโอโกลบิน (nitric oxide myoglobin) ได้สารออกซิไดซ์เพอไฟริน (oxidized porphyrin) ซึ่งมีสีเขียว เช่น การเปลี่ยน สีของ Norwegian salami sausage พบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อ *Lactobacillus* spp. (Jjaberg, Haugum และ Murmi, 1970)

การเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นมี 4 ลักษณะ คือ การเกิดสีเขียวบริเวณแกน (core greening), การเกิดสีเขียวบริเวณผิวหน้า (surface greening), การเกิดวงแหวนสีเขียว (green ring) และ การเกิดสีซีดจาง (color degradation) เป็นต้น ซึ่งการซีดจางของสีในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกนั้นมักเกิดจากแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* และ *Leuconostoc* เนื่องจากการเก็บผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ไว้ที่อุณหภูมิสูง และมีสุขลักษณะในการผลิตไม่ดีพอจึงทำให้มีแบคทีเรียเจริญได้อย่างรวดเร็ว และผลิตสารไฮโดรเจนเปอร์

ออกไซด์ (hydrogen.peroxide) ซึ่งจะไปทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีซีดลง (Forrest และคณะ, 1975)
นอกจากนี้ยังพบว่า จุลินทรีย์ *Florescent Pseudomonas* ส่งผลต่อการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ได้กรอก
โดย *Pseudomonas* สามารถสร้างสารประกอบสีเขียวที่ละลายน้ำได้ที่ เรียกว่า pyoverdines (PVDs)
ส่วน *Pseudomonas* ที่มักพบมากในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น *Pseudomonas fragi* ย่อยสารประกอบ
คาร์บอน glucose, free amino acids, และ lactate ในระหว่างการเจริญและทำให้อาหารเน่าเสีย
(Chenoll et al., 2006)

นอกจากการเปลี่ยนแปลงทางด้านจุลินทรีย์ที่กล่าวข้างต้นแล้ว การเปลี่ยนแปลง ทางด้านเคมี
เช่นปฏิกิริยา oxidation ก็ส่งผลต่อการเปลี่ยนสีในผลิตภัณฑ์ได้เช่นกัน

การเสื่อมเสียจากการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรส

การเสื่อมเสียจากการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรส จัดเป็นลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ ในผลิตภัณฑ์
เนื้อสัตว์ ซึ่งเกิดจาก กลิ่นเหม็นหืน การเกิดก๊าซและรสเปรี้ยว และ กลิ่นเหม็นเน่า

กลิ่นเหม็นหืน ในเนื้อและผลิตภัณฑ์เกิดจาก 2 สาเหตุหลักๆ คือ เกิดปฏิกิริยากับออกซิเจน
(autoxidation) ของไขมัน และจากจุลินทรีย์ โดยสาเหตุที่เกิดจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ เกิดจากแบคทีเรีย
ในกลุ่มที่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยไขมันได้ เช่น เอนไซม์ ไลเปส (Lipase) จะไฮโดรไลซ์โมเลกุลของ
ไขมัน และฟอสโฟลิพิด (phospholipid) ทำให้เกิด เป็นสารประกอบต่างๆ เช่น กรดไขมันอิสระ (free
fatty acid), กลีเซอรอล (glycerol), คีโตน (ketone), อัลดีไฮด์ (aldehyde), แอลกอฮอล์ (alcohol) และ
เปอร์ออกไซด์ (peroxide) หรือเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) ซึ่งทำปฏิกิริยา oxidation กับกรดไขมันใน
เนื้อได้เป็นสารประกอบ ที่ทำให้อาหารมีกลิ่นรสผิดปกติแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ที่ย่อยไขมันได้ ได้แก่
Pseudomonas spp. และ *Achromobacter* spp. นอกจากนี้การเกิดปฏิกิริยา ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ได้กรอก
ซึ่งมีไขมันจากสัตว์ อาจเกิดกลิ่นหืนได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ผ่านการทำให้สุก
แล้ว จะเกิดปฏิกิริยาการเหม็นหืนได้ง่ายและรวดเร็ว จึงเรียกปฏิกิริยาดังกล่าวว่าการเกิดกลิ่นหืนใน
สภาพที่มีก๊าซออกซิเจน (oxidative rancidity) หรือเรียกว่าปฏิกิริยาออกซิเดชัน (autoxidation)
ดังนั้นการเกิดกลิ่นเหม็นหืนของไขมันสัตว์โดยทั่วไปนั้น ส่วนใหญ่จึงเป็นผลเนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยา
autoxidation

การเกิดก๊าซและรสเปรี้ยว

การเกิดกลิ่นและรสเปรี้ยวในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เกิดจาก formic acid, butyric acid,
propionic acid และ lactic acid เป็นต้น มักเกิดจากแบคทีเรียชนิด *Streptococcus* spp. นอกจากนี้
อาจเกิดจากแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต เช่น แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก ได้แก่

Streptococcus faecium และ *Streptococcus faecalis* ซึ่งย่อยสลายองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรตในเนื้อสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ได้เป็นสารประกอบพวกกรดอินทรีย์ เช่น lactic acid, ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และ alcohol ซึ่งมักพบในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกที่มีขนาดใหญ่ เช่น bologna หรือในผลิตภัณฑ์ที่บรรจุแบบสุญญากาศ (สุมนททา วัฒนสินธุ์, 2545)

กลิ่นเหม็นเน่า

กลิ่นเหม็นเน่าเกิดจากแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนได้ เช่น *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas* sp. และ *Proteus* sp. โดยจะย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเนื้อสัตว์ทำให้เกิดเป็นสารระเหย ได้แก่ แอมโมเนีย (ammonia), อินโดล (indole), ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulphide), เอมีน (amines), เมอร์แคปแทน (mercaptans) และอื่น ๆ องค์ประกอบเหล่านี้ทำให้เกิดเป็นกลิ่นเหม็นเน่าขึ้นซึ่งเกิดจากการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิไม่เหมาะสม หรือเนื้อที่ผ่านการเตรียมโดยใช้ความร้อนในการปรุงอาหารไม่เหมาะสมก็จะเกิดการเสื่อมเสียโดยอาหารมีกลิ่นเหม็นและอาจเกิดอาหารเป็นพิษจากจุลินทรีย์ได้ (สุมนททา วัฒนสินธุ์, 2545)

การเสื่อมเสียเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏ

การเสื่อมเสียเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏสามารถเกิดขึ้นได้หลายลักษณะเช่น การเกิดเมือก และการเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีในผลิตภัณฑ์ ดังนี้

การเกิดเมือกที่ผิวหน้า

เมือกจัดเป็นสารพวกโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ซึ่งจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรียพวก *Pseudomonas alcaligenes* และ *Leuconostoc* สร้างขึ้นและสะสมอยู่ในเซลล์ มักเกิดในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยเมื่อจุลินทรีย์มีจำนวนมากขึ้น จนสามารถมองเห็นโคโลนีของจุลินทรีย์ได้ด้วยตาเปล่าซึ่งจะเห็นเป็นเมือกเกิดขึ้นและจะมีกลิ่นเหม็น เมือกที่เกิดขึ้นอาจมีสีขาวหรือสีเหลืองบนผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกที่มีความชื้นสูง

Electromagnetic radiation

รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า เป็นพลังงานที่ประกอบด้วยสนามแม่เหล็กและสนามไฟฟ้า ซึ่งเคลื่อนที่ไปในทิศทางเดียวกันแต่อยู่ในระนาบตั้งฉากซึ่งกันและกัน ซึ่งจะเป็นปฏิปักษ์ระหว่างสนามไฟฟ้าและสนามแม่เหล็ก ช่วงของสเปกตรัมของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic spectrum) ที่นำมาใช้

ประโยชน์ทางเคมี มีช่วงคลื่นตั้งแต่ คลื่นวิทยุ (radio wave) ไปจนถึง รังสีแกมมา (gamma ray) ดังแสดงในรูปที่ 1

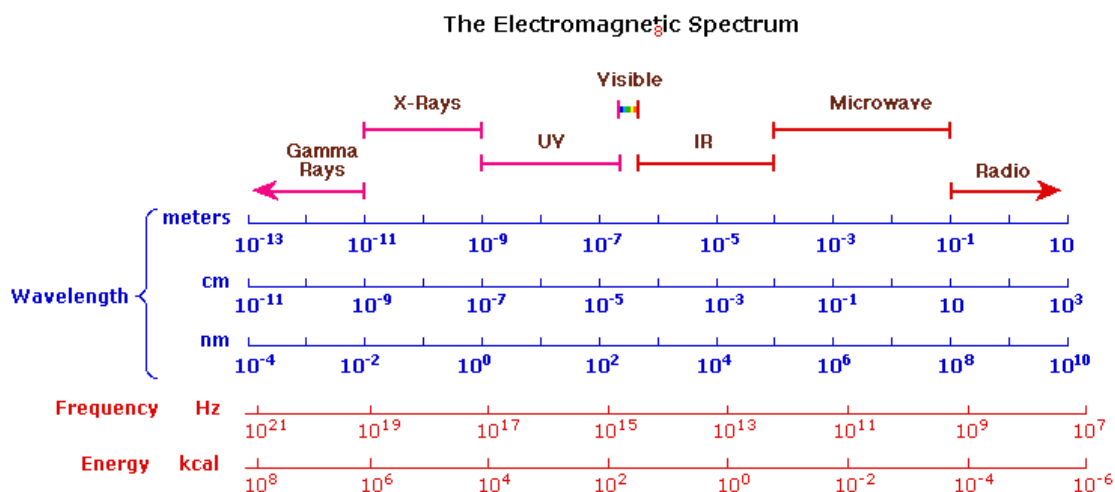
การดูดกลืนรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าของโมเลกุลของสาร ประกอบด้วยหลายระดับพลังงาน โดยพลังงานมีลักษณะเป็น “quantize” โมเลกุลแต่ละชนิดจะมีระดับพลังงานที่แตกต่างกัน การเกิดทรานดิชันระหว่างระดับพลังงานสองระดับพลังงาน เกิดได้เมื่อระบบมีการดูดพลังงาน (absorption) หรือคายพลังงาน (emission) การดูดหรือคายพลังงานจะอยู่ในรูปของคลื่น แม่เหล็กไฟฟ้า เมื่อผ่านรังสีแม่เหล็กไฟฟ้าเข้าไปใน โมเลกุลหรือไอออนของสารที่อยู่ในระดับพลังงานต่ำหรือในสถานะพื้น (ground state) จะเปลี่ยนสถานะไปอยู่ในระดับพลังงานที่สูงกว่าหรือสถานะกระตุ้น (excited state) การเปลี่ยนแปลงนี้ อาจจะเป็นผลมาจากการเปลี่ยนระดับพลังงานของอิเล็กตรอน (electronic transition) การเปลี่ยนระดับพลังงานการหมุน (rotational transition) หรือการเปลี่ยนระดับพลังงานการสั่น (vibration transition) ของโมเลกุล ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันดังนี้

Electronic transition เมื่อโมเลกุลดูดกลืนคลื่นแสงในช่วง ultraviolet และ visible จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของอิเล็กตรอนในโมเลกุลนั้นๆ โดยเกิดการกระตุ้น และทำให้อิเล็กตรอนตัวหนึ่งไปอยู่ ระดับพลังงานที่สูงขึ้นกว่าเดิม การ transition จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับพลังงานของการสั่นและการหมุนด้วย

Rotational transition เกิดเนื่องจากโมเลกุลหมุนรอบแกนต่างๆ ด้วยพลังงาน ของการหมุนที่ระดับพลังงานแน่นอนหลายระดับ ดังนั้นเมื่อโมเลกุลดูดกลืนแสงในช่วงไมโครเวฟ โมเลกุลจะมีระดับพลังงานของการหมุนสูงขึ้น

Vibrational transition เนื่องจาก แต่ละอะตอมที่ประกอบเป็นโมเลกุลจะสั่นตลอดเวลาและเกิดที่ระดับพลังงานที่แน่นอน เมื่อโมเลกุลดูดกลืนคลื่นแสงในช่วงอินฟราเรด จะมีการเปลี่ยนระดับพลังงานมาเป็นระดับพลังงานของการสั่นที่สูงขึ้น

ช่วงคลื่นที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจวิเคราะห์พันธะในองค์ประกอบของอาหาร ได้แก่ ช่วงคลื่น ในช่วงความถี่ 3×10^{12} ถึง 3×10^{14} Hz หรือมีความยาวคลื่นประมาณ 2500-16000 nm การเปลี่ยนแปลงของพลังงานที่เกี่ยวข้องเกิดจากการสั่นของโมเลกุล (vibration) ความแตกต่างของระดับพลังงานของการสั่น นอกจากนี้ ช่วงคลื่น visible and ultraviolet อยู่ในช่วงความถี่ 3×10^{14} ถึง 3×10^{16} Hz หรือมีความยาวคลื่นประมาณ 400 - 800 nm (Chalmers and Griffiths, 2002)



รูปที่ 1 Electromagnetic spectrum
ที่มา Reusch (2013)

Near Infrared (NIR) spectroscopy

Spectroscopy เป็นการศึกษา interaction ระหว่างองค์ประกอบของสาร กับ รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (electromagnetic radiation) ที่เกิดจากการเปลี่ยนระดับพลังงานของอิเล็กตรอน การเปลี่ยนระดับพลังงานการหมุน (rotation) และการสั่นสะเทือน (vibration) ของ โมเลกุล จึงใช้ในการตรวจสอบพลังงานที่เปลี่ยนไปของนิวเคลียส อะตอม ไอออน หรือโมเลกุล พลังงานที่เปลี่ยนไปนี้เกิดจากการปลดปล่อย (emission) การดูดกลืน (absorption) หรือการกระเจิง (scattering) ของรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า จากสเปกตรัมของโมเลกุลจะทำให้ทราบข้อมูลทางเคมีหรือการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี หรือโครงสร้างของโมเลกุลของอาหารและสมบัติทางเคมี เช่น ความยาวพันธะ (bond length) มุมพันธะ (bond angle) สมมาตรของโมเลกุล (symmetry) ความแข็งแรงของพันธะ (bond strength) การเปลี่ยนแปลงภายในและระหว่างโมเลกุล (Chalmers and Grifiths, 2002)

near Infrared (NIR) spectroscopy เป็นเทคนิคทาง spectroscopic method ที่วัดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากการเกิด molecular overtone และการเกิด vibrations เป็นการตรวจสอบที่ใช้คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่อยู่ระหว่าง visible และ mid-infrared คลื่นแสงช่วงใกล้อินฟราเรดที่อยู่ในช่วงความยาวคลื่น 800 -2500 นาโนเมตร โดยเมื่อแสงช่วงใกล้อินฟราเรดส่องผ่านเข้าไปยังโมเลกุลในตัวอย่าง ถ้าความยาวคลื่นที่โมเลกุลได้รับตรงกับพันธะในโมเลกุลก็จะเกิดการสั่นที่ความถี่สูงและดูดกลืนแสงไว้ (Bellon-Maurel, 2006) การดูดกลืนแสง NIR สามารถใช้ในการวิเคราะห์ทั้งเชิงปริมาณ คุณภาพของสารประกอบอินทรีย์ การสั่น (vibration) ของโมเลกุลในหมู่ฟังก์ชันของสาร แบ่งออกได้เป็น

สองลักษณะหลักๆ คือ การยืดหด (stretching) ของพันธะ ซึ่งเป็นการสั่นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความยาวระหว่างอะตอมที่สร้างพันธะกัน ทั้งในรูปแบบสมมาตร และแบบอสมมาตร ส่วนการสั่นในลักษณะที่สอง คือ การงอ (bending) เป็นการสั่นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงมุมพันธะ ในรูปแบบต่างๆ เช่น scissoring, rocking, wagging twisting ซึ่งการสั่นอาจเกิดการเคลื่อนที่ในระนาบเดียวกัน (in-plane) หรือต่างระนาบกัน (out-of-plane)

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค NIR spectroscopy มาใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรม ทางการแพทย์ ในการตรวจสอบ ผลิตผลทางการเกษตร และการควบคุมและตรวจสอบคุณภาพทางอาหาร เช่น มาใช้เพื่อการคัดแยกผลไม้ต่างๆ แบบไม่ทำลาย (Sankaran et al., 2010) การตรวจสอบการปนเปื้อนของ *Escherichia coli* (Siripatrawan et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิค NIR spectroscopy มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลาย

เนื่องจากการวิเคราะห์ ด้วย near infrared region จะให้ข้อมูลที่ไม่จำเพาะเจาะจง ทำให้ได้พีคของค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมีลักษณะกว้างและไม่ปรากฏเป็นพีคที่ชัดเจน ดังนั้นสเปกตรัมที่ได้จึงมีความซับซ้อน และต้องใช้เทคนิคการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีประสิทธิภาพมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล วิธีที่ใช้อยู่ คือ multivariate data analysis สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีหลายตัวแปร (multiple wavelengths) โดยสามารถวิเคราะห์ข้อมูลได้ทั้งเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ ซึ่งใช้ calibration techniques นอกจากนี้จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ ด้วยวิธีนี้ยังส่งผลต่อความถูกต้องของผลการวิเคราะห์ได้อีกด้วย

เทคนิค NIR มีข้อดี คือ ง่ายต่อการเตรียมตัวอย่าง มีความรวดเร็วในการวัดค่า ให้ผลการตรวจสอบที่แม่นยำ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสมการที่สร้างขึ้นเพื่อใช้ในการทำนายค่าคุณภาพ การตรวจสอบเป็นวิธีการแบบไม่ทำลาย ทำให้ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบสามารถนำไปใช้ได้ และไม่ก่อให้เกิดมลภาวะเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางด้านเคมี (Chun et al., 2009; Singh et al., 2010)

3. วิธีทดลอง

3.1 เตรียมวัตถุดิบ และศึกษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารเริ่มต้น

เตรียมผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปพร้อมบริโภค ในการทดลองนี้ใช้ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมู เตรียมผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีส่วนผสมโดยประมาณ ได้แก่ เนื้อหมู 80% น้ำ 15% เครื่องปรุงรส 5% บรรจุในไส้คอลลาเจน ทำให้สุกแล้วบรรจุในบรรจุภัณฑ์ให้เหมือนผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปทางการค้า และเก็บรักษาในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ศึกษาคุณภาพเริ่มต้นของผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ คุณภาพทางเคมี ทางกายภาพ และทางชีวภาพ ทำการวิเคราะห์คุณภาพ ทุกๆ 2 วัน ระหว่างการเก็บรักษาจนกระทั่งผลิตภัณฑ์มีคุณภาพไม่เป็นที่ยอมรับ เลือก parameters ที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการกำหนดอายุการเก็บ

3.2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพของอาหารในระหว่างการเก็บรักษา

3.2.1 การวัดค่าสี

วัดค่าทางสีด้วยเครื่อง Colorimeter (Minolta Chroma Meter CR-400) ระบบ CIELAB และบันทึกค่า L* value (lightness), a* value (redness) และ b* value (yellowness) โดยวัดตัวอย่าง 6 จุดต่อ 1 ชิ้น เป็นจำนวน 3 ชิ้น

3.2.2 การวัดค่าทางเนื้อสัมผัส

วัดค่าแรงตัดขาด (Cutting force) โดยใช้เครื่อง Texture Analyzer (TA-XT2i) นำตัวอย่างที่ตัดให้มีความยาว 4 เซนติเมตร วางตามแนวนอน ทำการตั้งโปรแกรมการวัดดังต่อไปนี้ วัดค่าแรงตัดขาด (รายงานผลเป็นค่า gram force)

3.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีของอาหารในระหว่างการเก็บรักษา

3.3.1 การวิเคราะห์ ค่า pH

วัดค่า pH ตามวิธีของ Summo, Caponio และ Pasqualone (2006) ซึ่งน้ำหนักตัวอย่าง 10 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) บั้่นรวมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (อัตราส่วน sample/water เท่ากับ 1/10) ด้วยเครื่อง Stomacher (Seward Stomacher 400, England) วัด ค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter

3.3.2 การวิเคราะห์ ค่า Thiobarbituric acid (TBA)

การวิเคราะห์ ค่า TBAดัดแปลงจากวิธีของ Pikul, Leszezynski and Kummerow (1989) ซึ่งน้ำหนักตัวอย่าง 10 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) บั้่นรวมกับน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เทตัวอย่างพร้อมน้ำในข้อที่ 1 ใส่ในขวดกลั่น เติมน้ำกลั่น 47.5 มิลลิลิตร และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 4 M 2.5 มิลลิลิตร กลั่นตัวอย่างด้วยเครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (Rotary evaporator) (BÜCHI

Rotavapor R-200) จนได้สารละลาย 50 มิลลิลิตร บีเปตสารละลายที่กลั่นได้ 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดมีฝาปิด เติม TBA reagent 5 มิลลิลิตร (เตรียมจาก 2-Thiobarbituric acid จำนวน 0.2883 กรัม ในสารละลายกรดแอสติก ความเข้มข้นร้อยละ 90 โดยปริมาตร 100 มิลลิลิตร) และเตรียม blank ในลักษณะเดียวกันแต่ใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายที่กลั่นได้ ปิดจุก เขย่าผสมให้เข้ากัน และต้มในน้ำเดือดนาน 35 นาที ทำให้เย็น โดยแช่ในน้ำนาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 538 nm (Spectronic GENESYS 20) คำนวณ ค่า TBA โดยใช้สูตร

$$\text{TBA value} = \frac{7.8 \times D \times 10}{\text{sample weight}} \quad (1)$$

D = ค่า Absorbance ของตัวอย่าง และค่า TBA value แสดงหน่วยเป็น mg malonaldehyde/Kg sample

3.4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์ ทำโดยวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียแลคติก โดยดัดแปลงจาก วิธีของ Bingol และ Bostan (2007) สำหรับแบคทีเรียทั้งหมด ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Bombay, India) และแบคทีเรียแลคติกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus MRS Agar (MRS) (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Bombay, India) ซึ่งตัวอย่าง 10 g ลงในสารละลาย peptone 0.1 % ปริมาตร 90 ml นำถุงตัวอย่างเข้าเครื่องตีตัวอย่าง stomacher (Seward stomacher รุ่น 400, England) จากนั้นบีเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจาง ปริมาตร 0.1 ml ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar โดยใช้วิธี spread plate และปริมาตร 1 ml สำหรับ MRS โดยใช้วิธี pour plate จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ plate count agar และแบคทีเรียแลคติก บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจนใน anaerobic jar ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ยีสต์ ราและแบคทีเรียแลคติก ทุกๆ 4 วันตลอดอายุการ เก็บรักษา โดยนับจำนวนโคโลนีระหว่าง 20-200 โคโลนี รายงานผลเป็นโคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง (CFU/g)

3.5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน จำนวน 7 คน แบ่งเป็น เพศชาย 2 คน และเพศหญิง 5 คน อายุเฉลี่ย 30 – 45 ปี ซึ่งเป็นบุคลากรในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อประเมินความเข้มของลักษณะทางประสาทสัมผัสของตัวอย่าง (Intensity) โดยพิจารณาจากกลิ่น, ลักษณะปรากฏ, สี และการยอมรับโดยรวม เสรีฟตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง และใช้รหัสกำกับตัวอย่างเป็น ตัวเลขสุ่ม 3 หลัก

การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างได้กรอกใช้วิธีทดสอบเชิงพรรณนา ผู้ทดสอบจะได้รับคำแนะนำก่อนการประเมินตัวอย่างโดยให้เริ่มจากการดมกลิ่นตัวอย่างก่อน แล้วประเมินระดับความเข้มของลักษณะทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างให้ตรงกับจุดที่รู้สึกสูงสุด ด้วยสเกลเส้นตรงระดับความเข้ม 0 – 9 (Descriptive analysis with scaling) ซึ่งให้ผู้ทดสอบเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างได้กรอกในด้านต่างๆ ตามระดับ คะแนน ดังนี้

กลิ่น	(ระดับคะแนน 0 หมายถึง ไม่มีกลิ่นผิดปกติเลย) (ระดับคะแนน 9 หมายถึง มีกลิ่นผิดปกติชัดเจนมาก)
ลักษณะปรากฏ (การเกิดเมือก/ยางสีขาว)	(ระดับคะแนน 0 หมายถึง ไม่เป็นเมือก) (ระดับคะแนน 9 หมายถึง เป็นเมือกเห็นได้ชัดเจน)
สี	(ระดับคะแนน 0 หมายถึง ไม่มีสีผิดปกติ สม่่าเสมอตลอดชิ้น) (ระดับคะแนน 9 หมายถึง มีสีผิดปกติ)
การยอมรับโดยรวม	(ระดับคะแนน 0 หมายถึง ไม่ยอมรับ) (ระดับคะแนน 9 หมายถึง ยอมรับ)

ข้อมูลที่ได้จากผู้ทดสอบแต่ละคนจะนำมาหาค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of variance) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DNMRT ต่อไป

3.6 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของอาหารโดยใช้เทคนิค NIR spectroscopy

เครื่องที่ใช้วัดค่าการดูดกลืนในงานวิจัยนี้คือ UV-VIS-NIR spectrophotometer (UV-3600, Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japan) ส่วนประกอบของเครื่องที่สำคัญได้แก่ light source ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดแสง monochromator เป็นอุปกรณ์ที่ใช้แยกคลื่นแสงออกเป็นความยาวคลื่นโดยใช้ grating ที่มีช่องผ่านแสงที่สามารถควบคุมให้อยู่ในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการ และ detectors ประกอบด้วย 3 detectors ได้แก่ PMT (photomultiplier tube) สำหรับแสงในช่วง ultraviolet and visible regions (250-700 nm) InGaAs detector (700 to 1,000 nm) และ PbS detector สำหรับแสงในช่วง near-infrared region (1,600 to 1,800 nm) สำหรับการวัดในช่วง ultraviolet region จนถึง the near-infrared region ซึ่งสามารถวัดได้ทั้งค่า transmittance และ reflectance สำหรับงานวิจัยนี้เก็บข้อมูลในรูปแบบของค่า reflectance

ศึกษาภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค NIR spectroscopy ในการเก็บข้อมูล (data acquisition) วัดค่าการดูดกลืนแสงของข้าวด้วยเทคนิค NIR spectroscopy วัดด้วยหลักการการสะท้อนแสง (reflectance) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บันทึกค่าการดูดกลืนแสงในวันที่ 0, 4, 8, 12, 16 และ 20 ของการเก็บรักษา (การวัดคุณภาพด้านต่างของผลิตภัณฑ์จะเก็บข้อมูลทุกๆ 2 วัน แต่เนื่องจากข้อจำกัด

เรื่องการใช้เครื่องมือ NIR spectroscopy จึงวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงคุณภาพด้วย NIR spectroscopy ทุกๆ 4 วัน)

เตรียมข้อมูลที่ได้จาก NIR spectroscopy ก่อนการวิเคราะห์ โดยเริ่มจากศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมสำหรับ mathematical pretreatment ของค่าการ reflectance ที่วัดได้ โดยคัดเลือกจากวิธีต่างๆ ได้แก่ Savitzky-Golay filter for smoothing, normalization, Savitzky-Golay 1st derivatives และ Savitzky-Golay 2nd derivatives เพื่อปรับแต่งสเปกตรัม และเพื่อลดข้อผิดพลาด หรือความแตกต่างที่อาจเกิดขึ้นจากการกระจายตัวของแสงที่ไม่สม่ำเสมอ



รูปที่ 2. UV-VIS-NIR spectrophotometer

3.7 วิเคราะห์ข้อมูลด้วย chemometrics

3.7.1 การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ principal components analysis (PCA)

เตรียมข้อมูลที่ได้จาก NIR spectroscopy ทำ mathematical pretreatment ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ โดยคัดเลือกจากวิธี smoothing, first derivative หรือ second derivative เพื่อลดค่า noise หรือความแตกต่างที่อาจเกิดขึ้นจากการกระจายตัวของแสง วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ principal component analysis เพื่อลดจำนวนตัวแปร และจัดจำแนกตัวอย่างที่มีคุณภาพแตกต่างกันเนื่องจากระยะเวลาการเก็บรักษา

การวิเคราะห์ข้อมูลทางคณิตศาสตร์ และการสร้างสมการทำนาย ทำโดยใช้โปรแกรม Unscrambler (Digital Data Management Corporation, Tokyo, Japan) และ MATLAB (MathWorks, Tokyo, Japan)

3.7.2 สร้างสมการทำนายและการตรวจสอบความแม่นยำของสมการทำนาย

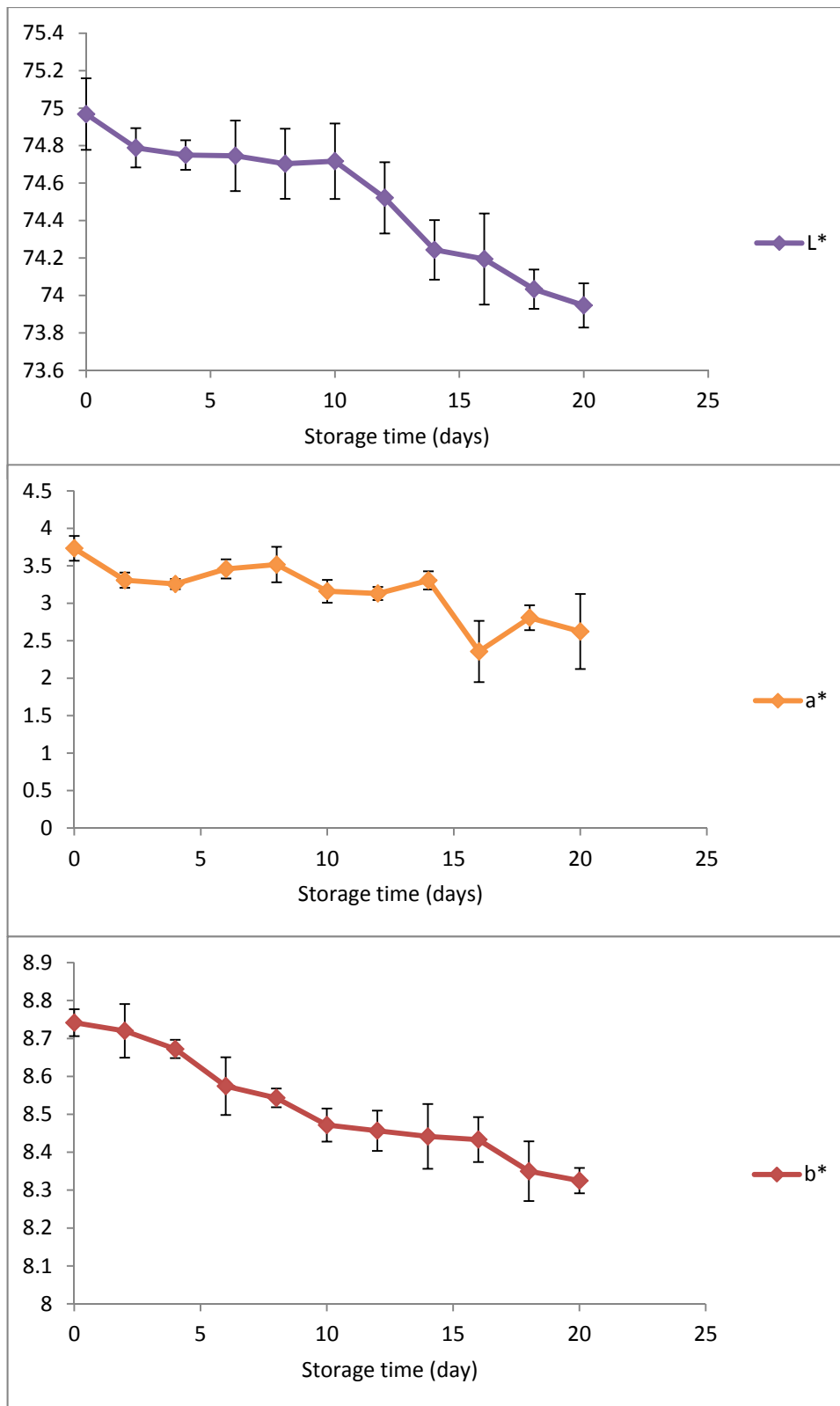
สร้างสมการที่เหมาะสมในการบ่งชี้การเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก เพื่อนำไปสร้างสมการทำนายการเจริญของจุลินทรีย์ และตรวจสอบความแม่นยำในการทำนายของสมการที่สร้างขึ้น โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทำนายด้วยสมการที่สร้างขึ้นจากสเปกตรัมของ NIR กับค่าที่วิเคราะห์ได้จริง ใช้ตัวอย่างที่เตรียมขึ้นใหม่เพื่อตรวจสอบความแม่นยำของสมการ (validation) พิจารณาความเหมาะสมของสมการทำนายที่สร้างขึ้นจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (coefficient of determination, R^2) และค่าความคลาดเคลื่อน (root mean square errors, RMSE) ของสมการในการทำนายค่าคุณภาพที่ทำการศึกษา

4. ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การเปลี่ยนแปลงค่าสีของอาหารในระหว่างการเก็บรักษา

สุ่มตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกในบรรจุภัณฑ์ ที่เก็บรักษาที่ 4 °C ทุกๆ 2 วัน ติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าสี ใช้ CIE (L^* , a^* , b^*) system ผลการวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าสี (L^* , a^* , b^*) ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกในระหว่างการเก็บรักษาแสดงในรูปที่ 3 จากผลการทดลองพบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า L^* (ความเข้ม-สว่าง), ค่า a^* (เขียว-แดง) และค่า b^* (น้ำเงิน-เหลือง) ของผลิตภัณฑ์ ตลอดระยะเวลาการเก็บ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

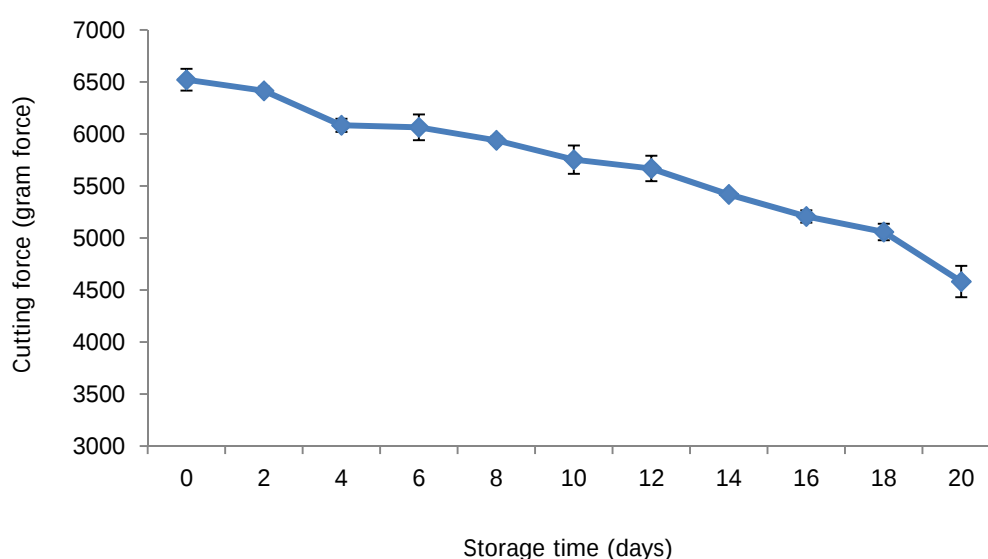
โดยพบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้นค่า L^* a^* และ b^* ของตัวอย่างมีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์มีความสว่าง ความเป็นสีแดง และความเป็นสีเหลืองลดลง จะเห็นได้ว่าเมื่ออายุการเก็บเพิ่มขึ้น ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกมีสีคล้ำ มีสีแดงลดลงและเปลี่ยนเป็นสีเขียวมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากโดยธรรมชาติอาหารต่างๆ ไปเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นปริมาณจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย และในกรณีของไส้กรอกก็เช่นเดียวกัน ซึ่งจุลินทรีย์เป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกและการเปลี่ยนเป็นสีเขียวในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกที่เกิดขึ้นนั้น เนื่องจากจุลินทรีย์จะผลิตสารจำพวก peroxide ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเม็ดสี nitric oxide hemochromogen หรือ nitric oxide myoglobin ได้สาร oxidized porphyrin ซึ่งมีสีเขียว (Jaberg และคณะ, 1970) ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Siripatrawan and Noipha (2012) ที่พบว่าเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมูไว้นานขึ้น จะมีการเปลี่ยนสีซึ่งเป็นผลมาจากการเจริญของจุลินทรีย์



รูปที่ 3. Color values (L^* , a^* , b^*) of food samples during storage

4.2 การเปลี่ยนแปลงค่าแรงตัดขาดของอาหารในระหว่างการเก็บรักษา

การเปลี่ยนแปลงค่าแรงตัดขาดของเนื้อสัมผัสในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกได้ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4 จากผลการทดลองพบว่า ในระหว่างการเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์ที่มีค่าแรงตัดขาดลดลง ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าเป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ เพราะ เมื่อปริมาณจุลินทรีย์สูงขึ้นจนเกินมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมไส้กรอกฮอตดอก (มอก.ไส้กรอกฮอตดอก, 2549) จะส่งผลให้ค่า pH ลดต่ำลงเนื่องจากปริมาณกรดแลกติก ที่จุลินทรีย์ผลิตจะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การแยกตัวของน้ำและไขมันที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เนื้อสัมผัสเริ่มยุ่ย ค่าแรงตัดขาดที่ได้จึงลดลงเช่นเดียวกัน

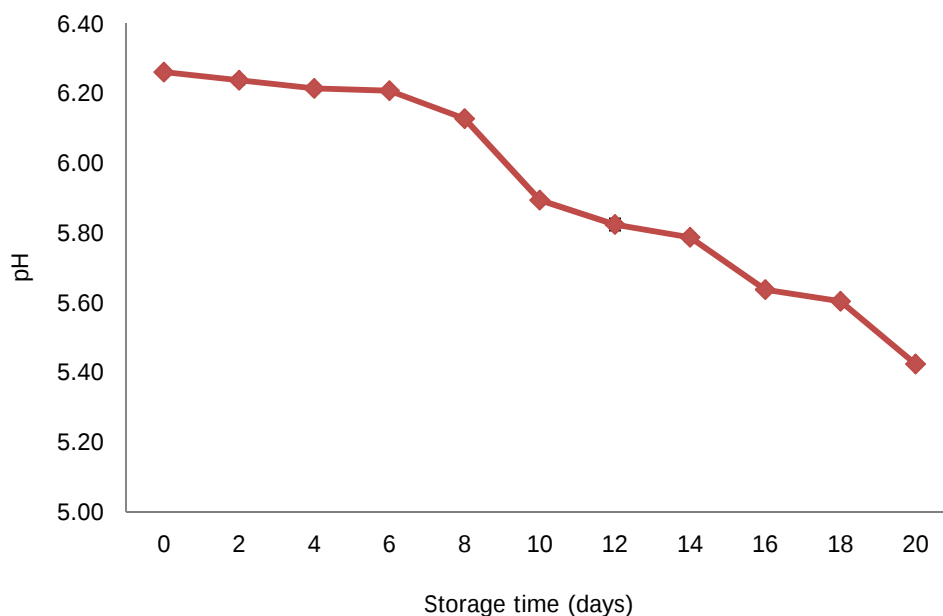


รูปที่ 4. Cutting force (gram force) of food samples during storage

4.3 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารในระหว่างการเก็บรักษา

เมื่อพิจารณาค่า pH ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกพบว่า ระยะเวลาการเก็บ มีผลต่อค่า pH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 5 โดยพบว่าตัวอย่างมีค่า pH ลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ทั้งนี้อาจเกิดจากการเจริญของจุลินทรีย์ที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจุลินทรีย์บางชนิดสร้างกรด ในระหว่างการเจริญได้ เช่น แบคทีเรียแลกติก หากมีจำนวนสูงขึ้นก็จะส่งผลให้ค่า pH ของผลิตภัณฑ์ลดต่ำลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dykes, Cloete และ Holy (1991) ซึ่งได้อธิบายไว้ว่าการลดลงของ pH ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์นั้นมีอิทธิพลมาจากแบคทีเรียแลกติก เช่นเดียวกันกับงานวิจัยของ Korkeala et al. (1990) ซึ่งวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ

แบคทีเรียแลคติกและค่า pH ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก และพบว่าปริมาณ แบคทีเรียแลคติกที่เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับค่า pH ที่ลดลง เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างกรด ระหว่างการเจริญได้



รูปที่ 5. pH of food samples during storage

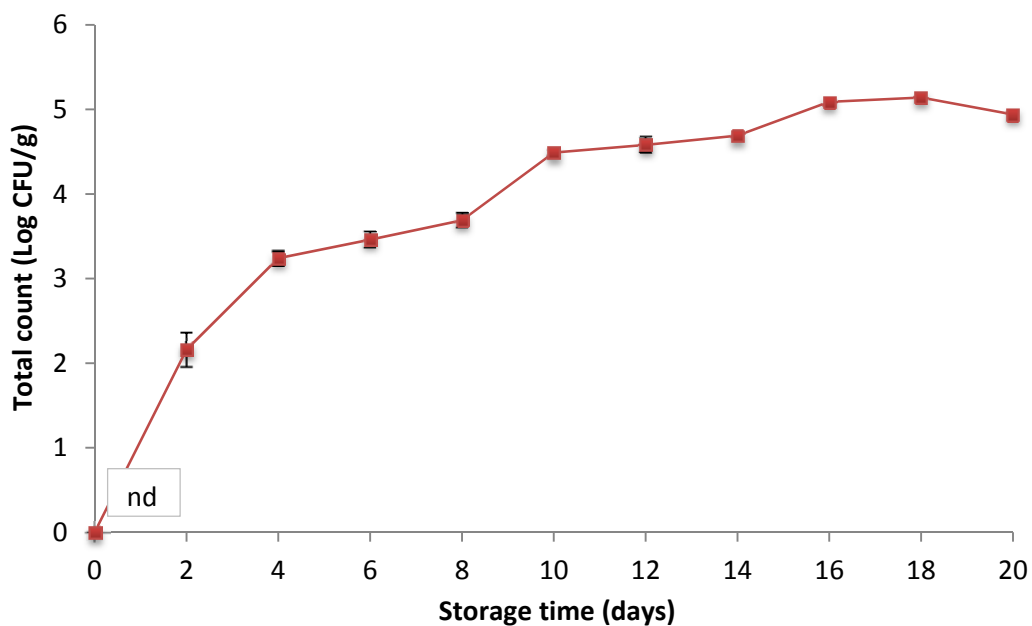
4.5 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ ได้เก็บปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (total plate counts), และแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด ได้ผลการวิเคราะห์แสดงในรูปที่ 6 และ 7 ตามลำดับ

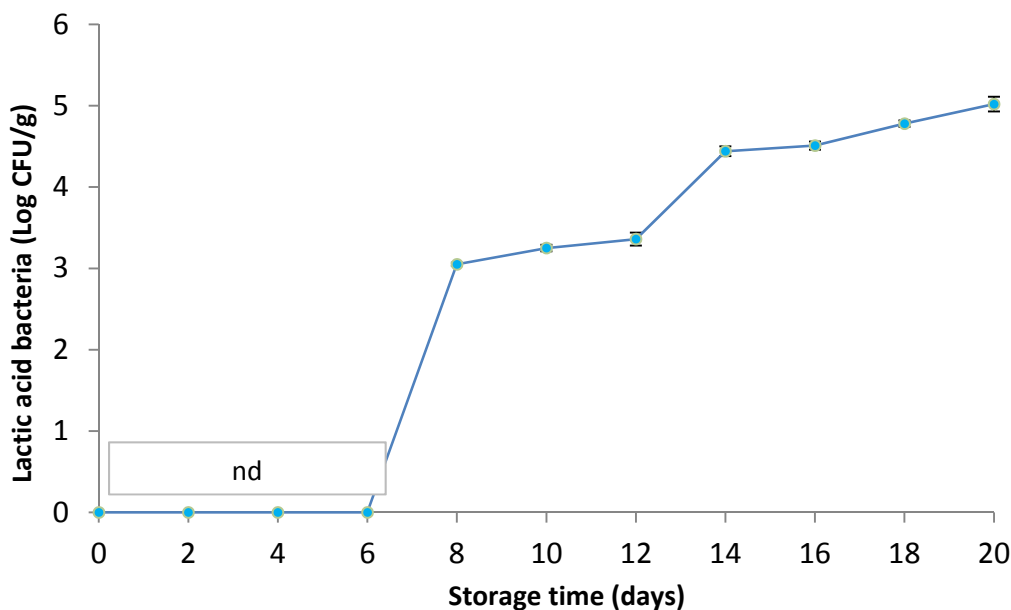
พบว่าในวันเริ่มต้นปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (รูปที่ 7) มีจำนวนน้อยกว่า 2 Log (CFU/g) (รายงานเป็น not detected, nd) จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น และเมื่อเก็บรักษานาน 16 วัน ตัวอย่างมีแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นเป็น 5 Log (CFU/g) ซึ่งเกินกว่าที่มาตรฐานกำหนดไว้ ซึ่งตามข้อกำหนดปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารไส้กรอกสดตอกลง มาตรฐานกำหนดไว้ คือ 10^5 CFU/g (มอก.ไส้กรอกสดตอกลง, 2549) (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2536)

เมื่อพิจารณาแบคทีเรียแลคติก (รูปที่ 7) จะพบว่าไส้กรอกที่เก็บรักษาไว้ระหว่างวันที่ 0-8 มีแบคทีเรียแลคติกมีจำนวนน้อยกว่า 20 โคโลนี (รายงานเป็น not detected, nd) และเมื่อเก็บรักษาไว้

นาน 8 วัน จำนวนแบคทีเรียแลคติกเพิ่มสูงขึ้นจากเดิมอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งอาจส่งผลต่อคุณภาพการยอมรับด้านประสาทสัมผัสของผู้บริโภคได้ แม้ว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นจะยังไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้ ในผลิตภัณฑ์อาหารได้กรอกฮอตดอก คือ 10^5 CFU/g ในช่วงระยะเวลาการเก็บระหว่าง 8-20 วัน จำนวนแบคทีเรียแลคติกในตัวอย่างมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องอยู่ในช่วง 3-5 Log (CFU/g) โดยปกติมักพบแบคทีเรียแลคติกได้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ต่างๆ เช่น แฮม, เบคอน และไส้กรอกซาลามิ (Steel และ Stiles, 1981) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณ แบคทีเรียแลคติกที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับค่า pH ที่ลดลง เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างกรด ระหว่างการเจริญได้ ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Korkeala et al. (1990) ซึ่งใช้ ปริมาณ แบคทีเรียแลคติกและค่า pH เป็นตัวบ่งชี้อายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ไส้กรอก



รูปที่ 6 . Total counts (Log (CFU/g)) of food samples during storage 4°C (nd = not detected)



รูปที่ 7 . Lactic acid bacteria (Log (CFU/g)) of food samples during storage 4°C (nd = not detected)

4.6 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางประสาทสัมผัสของอาหารในระหว่างการเก็บรักษา

จากการศึกษาผลของการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางประสาทสัมผัสของอาหารในระหว่างการเก็บรักษา (รูปที่ 8) พบว่า เมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น ตัวอย่างมีการเปลี่ยนแปลงของกลิ่น ลักษณะปรากฏ และสีมากขึ้น ทำให้คะแนนการเปลี่ยนแปลงคุณภาพมีค่าเพิ่มขึ้น ส่วนค่าการยอมรับโดยรวมมีคะแนนลดลง เมื่อระยะเวลาการเก็บมากขึ้น โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นเล็กน้อยในช่วงแรกๆของระยะเวลาการเก็บ แต่เมื่อเก็บรักษาไว้มากกว่า 8-10 วันมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง

ผลคะแนนทางประสาทสัมผัสสอดคล้องกับค่าการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของตัวอย่าง เช่น เมื่อเก็บไว้นานขึ้นรสนกวัตถุที่อยู่ในไส้กรอกเกิดการเปลี่ยนแปลง บริเวณผิวของไส้กรอกมีสีคล้ำลง ค่าความเป็นสีแดง ลดลงจึงทำให้ผู้ทดสอบ สามารถแยกความแตกต่างเหล่านี้ได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสีของผลิตภัณฑ์มีความสำคัญต่อคุณภาพและลักษณะปรากฏซึ่งส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค

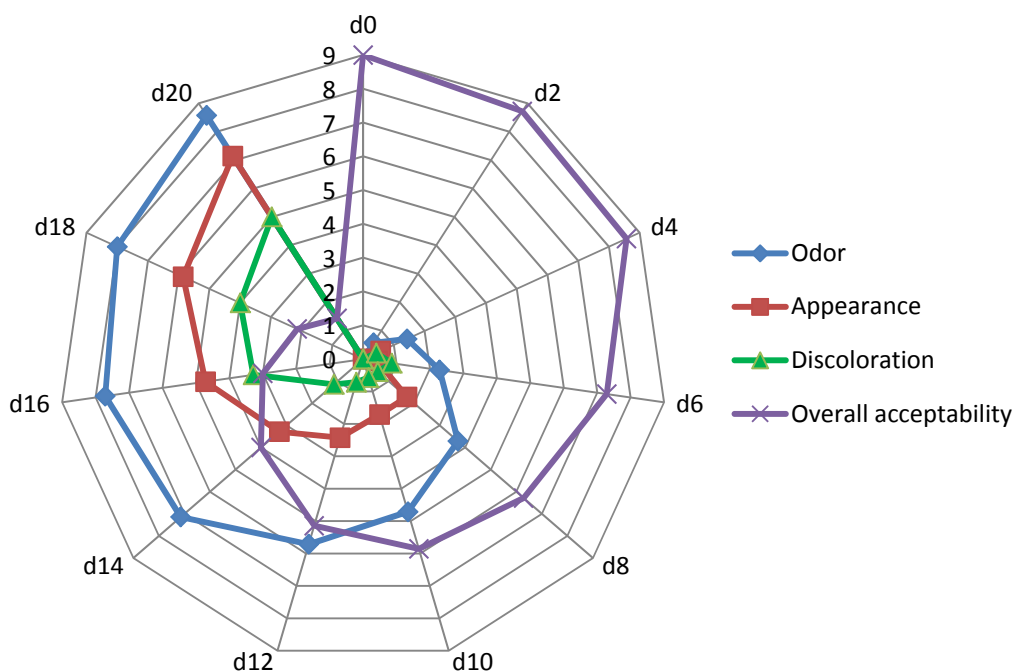
เมื่อพิจารณาคะแนนทางประสาทสัมผัสของค่าสี ร่วมกับผลการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์จะเห็นได้ว่าการเจริญของจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ส่งผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โดยตรง เนื่องจากระหว่างการเจริญ จุลินทรีย์จะมีการดำเนินกิจกรรมทางชีวเคมี

และสร้างสารประกอบต่างที่ส่งผลต่อกลิ่นรสและลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์ได้ (Salinas et al., 2014) เช่น จุลินทรีย์เป็นสาเหตุหนึ่งที่สำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเม็ดสีในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกและการเปลี่ยนเป็นสีเขียวในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกที่เกิดขึ้นนั้น เกิดได้เนื่องจากจุลินทรีย์จะผลิตสารจำพวก peroxide ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเม็ดสี nitric oxide hemochromogen หรือ nitric oxide myoglobin ได้สาร oxidized porphyrin ซึ่งมีสีเขียว (Jjaberg และคณะ, 1970)

การทดสอบทางประสาทสัมผัสในด้านกลิ่นผิดปกติและการเกิดเมือกของไส้กรอก พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น ผลิตภัณฑ์มีแนวโน้มการเกิดกลิ่นผิดปกติและการเกิดเมือกเพิ่มขึ้น โดยระยะเวลาการเก็บรักษาตั้งแต่เริ่มต้น (วันที่ 0) จนถึงวันที่ 4 ตัวอย่างไส้กรอกทุกตัวอย่างยังไม่มีกลิ่นผิดปกติ ตัวอย่างไส้กรอกยังมีคุณภาพดีเหมือนตัวอย่างเริ่มต้น ตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย และพบว่าการเก็บรักษาในช่วง 8 วันแรก ตัวอย่างมีคะแนนด้านกลิ่นผิดปกติเพียงเล็กน้อย ผู้ทดสอบไม่พบการเกิดเมือกที่ผิวของผลิตภัณฑ์ไส้กรอก ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ (รูปที่ 5) ที่พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดไม่เกินมาตรฐาน คือ 10^5 CFU/g (นอก.ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกฮอตดอก) เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้นานมากกว่า วันที่ 8-ผลิตภัณฑ์มีเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้นสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเวลาการเก็บรักษาเพิ่มมากขึ้น พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด และมีปริมาณแบคทีเรียแลคติกสูงขึ้น อาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี กายภาพ นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์อาจมีการดำเนินกิจกรรมทางชีวเคมี ซึ่งส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสเปลี่ยนแปลงไป จึงส่งผลให้มีคะแนนด้านกลิ่น และการยอมรับโดยรวมลดลง

ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสที่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ทางเคมีและกายภาพ เช่น การเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัมผัส และการลดลงของค่า pH ยังอาจเนื่องมาจากการเจริญของ แบคทีเรียแลคติก ซึ่งสามารถสร้างกรดได้จึงส่งผลต่อค่า pH ของผลิตภัณฑ์ และเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้นานขึ้น ผู้ทดสอบสามารถสังเกตการเกิดเมือกได้ ทั้งนี้เนื่องจากผลิตภัณฑ์ มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่สูง และมีปริมาณแบคทีเรียเพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาด้านการยอมรับโดยรวม พบว่าตัวอย่างมีคะแนนด้านการยอมรับโดยรวมแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และพบว่าคะแนนด้านการยอมรับโดยรวมของตัวอย่างมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ การเกิดกลิ่นเหม็นเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน การเปลี่ยนแปลงด้านสีรวมทั้งการเกิดเมือกและกลิ่นผิดปกติ ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการยอมรับผลิตภัณฑ์ของผู้ทดสอบ



รูปที่ 8 Sensory scores (odor, appearance, discoloration, and overall acceptability of food samples during storage (d0, d2, ..., d20 = samples storage for 0, 2, ..., 20 days, respectively); odor (0 = no off-odor, 9 = highly off-odor); appearance (0 = no slime, 9 = highly slimy); color (0 = no off-color, 9 = highly off-color); overall acceptability (0 = highly acceptable, 9 = highly unacceptable)

4.7 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของอาหารโดยใช้เทคนิค NIR spectroscopy

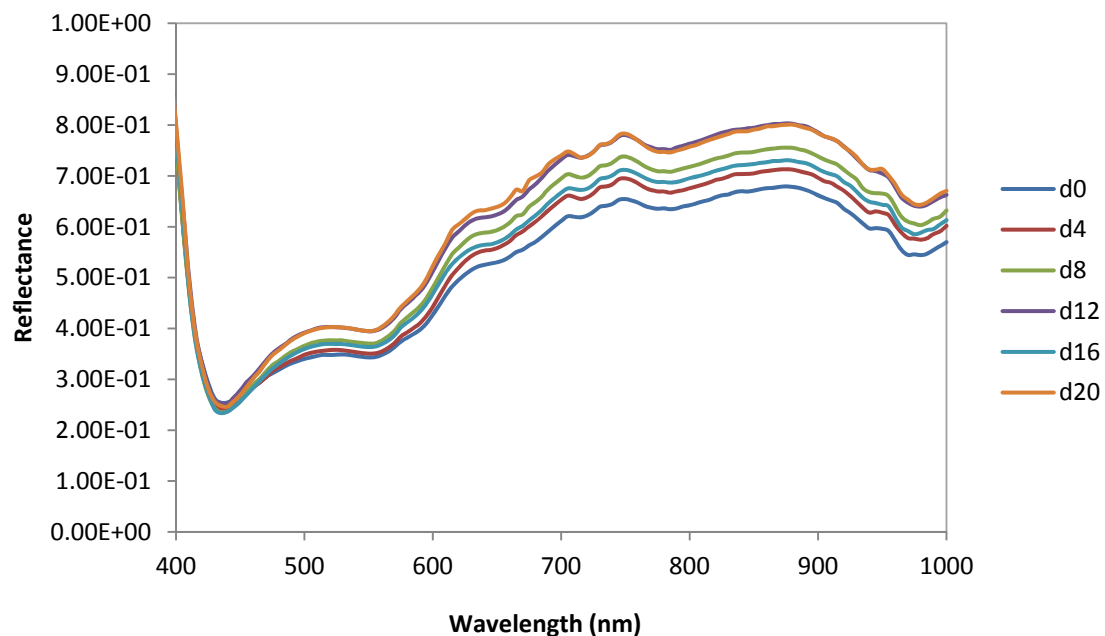
เนื่องจากผลิตภัณฑ์ไส้กรอกมีความชื้นสูง มีอายุการเก็บรักษาสั้นโดยจะเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์เป็นหลัก ก่อนการเกิดกลิ่นเหม็น โดยจุลินทรีย์ที่เจริญบนผลิตภัณฑ์ ส่งผลให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ ทั้งทางด้านเคมี กายภาพ และคุณภาพทางประสาทสัมผัสเปลี่ยนแปลงไปจนไม่เหมาะแก่การบริโภค ในงานวิจัยนี้จึงใช้การเจริญของจุลินทรีย์เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพและอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์

สำหรับการวัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาด้วย NIR spectroscopy เลือกใช้ความยาวคลื่นในช่วง visible-short wave NIR แทน โดยแสดงสเปกตรัมของตัวอย่างที่เก็บที่ระยะเวลาต่างกัน โดยวัดที่ความยาวคลื่นในช่วง 400-1000 nm ดังแสดงในรูปที่ 10 (การวัดคุณภาพด้านต่างของผลิตภัณฑ์จะเก็บข้อมูลทุกๆ 2 วัน แต่เนื่องจากข้อจำกัดเรื่องการใช้

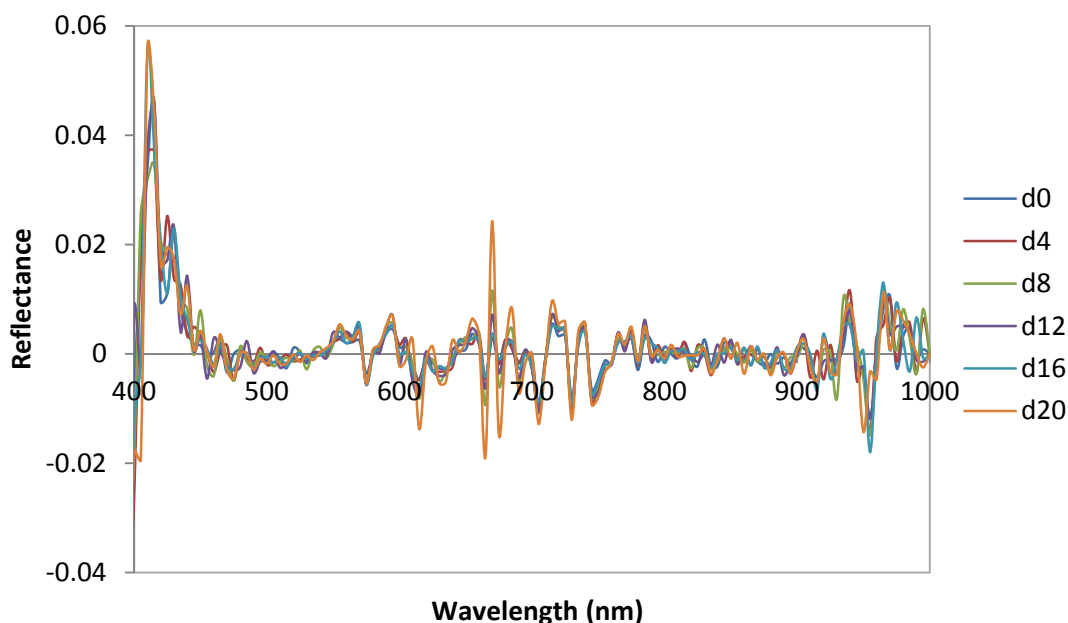
เครื่องมือ NIR spectroscopy จึงวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงคุณภาพด้วย NIR spectroscopy ทุกๆ 4 วัน)

จากผลการทดลองในรูปที่ 9 แสดงให้เห็นว่าลักษณะสเปกตรัมค่อนข้างกว้าง จึงจำเป็นต้องมีการปรับแต่งสเปกตรัมโดยใช้ mathematical pretreatments ก่อนการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย chemometrics ในการทดลองเบื้องต้นใช้การปรับแต่งสเปกตรัมโดยใช้วิธีต่างๆ ได้แก่ Savitzky-Golay filter for smoothing, normalization, Savitzky-Golay 1st derivatives และ Savitzky-Golay 2nd derivatives พบว่าวิธีที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการปรับแต่งสเปกตรัม และเพื่อลดค่าความแตกต่างที่อาจเกิดขึ้นจากการกระจายตัวของแสง คือ Savitzky-Golay 2nd derivatives ผลการวิเคราะห์แสดงในรูปที่

10



รูปที่ 9. Reflectance signals of food samples during storage (d0, d4,..., d20 = samples storage for 0, 4,..., 20 days, respectively)



รูปที่ 10. Reflectance signals (2^{nd} derivatives) of food samples during storage (d0, d4,..., d20 = samples storage for 0, 4,..., 20 days, respectively)

4.8 chemometrics สำหรับทำนายคุณภาพและอายุการเก็บของอาหาร

4.8.1 principal components analysis (PCA)

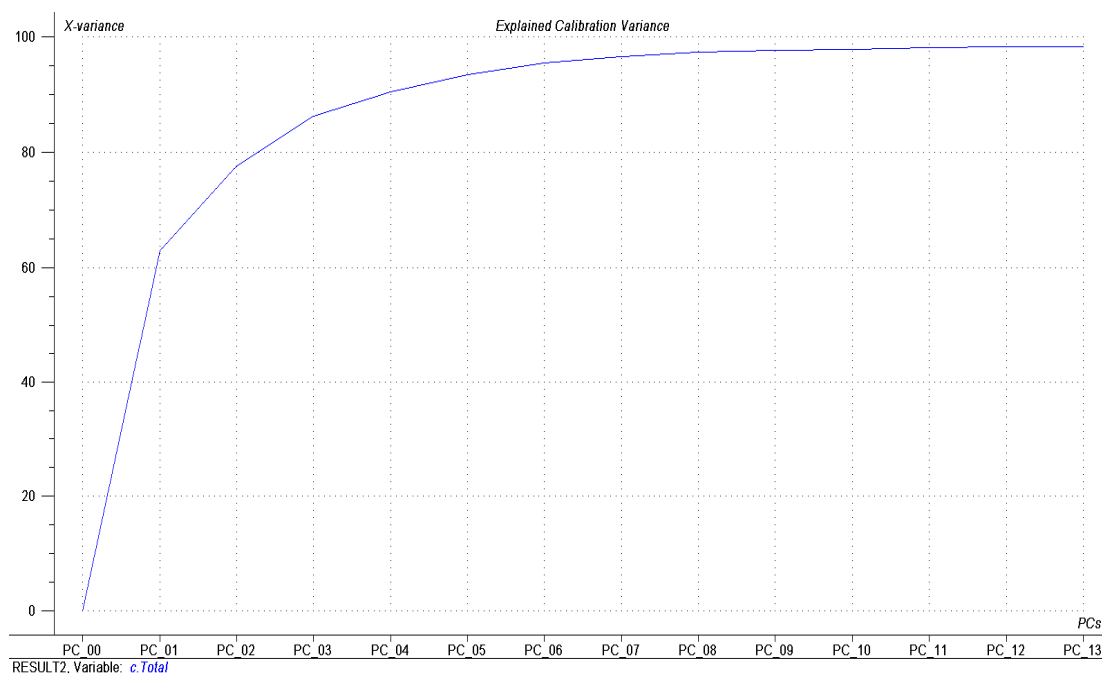
การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จาก NIR spectroscopy โดยใช้ chemometrics ในการทดลองนี้เริ่มจากใช้ principal components analysis (PCA) เพื่อลดจำนวนข้อมูล เนื่องจากข้อมูลเชิงคลื่นที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย near infrared spectroscopy สามารถเก็บข้อมูลได้ทีละหลายค่าความยาวคลื่น ข้อมูลจึงมีขนาดใหญ่และซับซ้อน การวิเคราะห์ข้อมูลจึงจำเป็นต้องใช้ chemometrics

ในการจำแนกคุณภาพของผลิตภัณฑ์โดยใช้ near infrared spectroscopy วัดค่า reflectance โดยใช้ wavelength 400-1000 nm ทำให้มีจำนวนตัวแปรมากถึง 126 ตัวแปร การเปรียบเทียบข้อมูลของแต่ละตัวแปรทำได้ยากและเสียเวลานาน การวิเคราะห์ข้อมูลที่มีหลายตัวแปร (multivariate data) ในงานวิจัยนี้ใช้ principal components analysis ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการลดจำนวนตัวแปรอิสระ (independent variables) โดยการศึกษาถึงโครงสร้างความสัมพันธ์ของตัวแปร และสร้างตัวแปรใหม่เรียกว่า principal component (PC) ที่สามารถอธิบายความแปรปรวนของกลุ่มตัวอย่างได้มากที่สุด โดย PC ที่ได้เป็นการนำตัวแปรที่มีความสัมพันธ์ร่วมกันมารวมกันเป็น PC เดียวกัน ส่วนตัวแปรที่อยู่คน

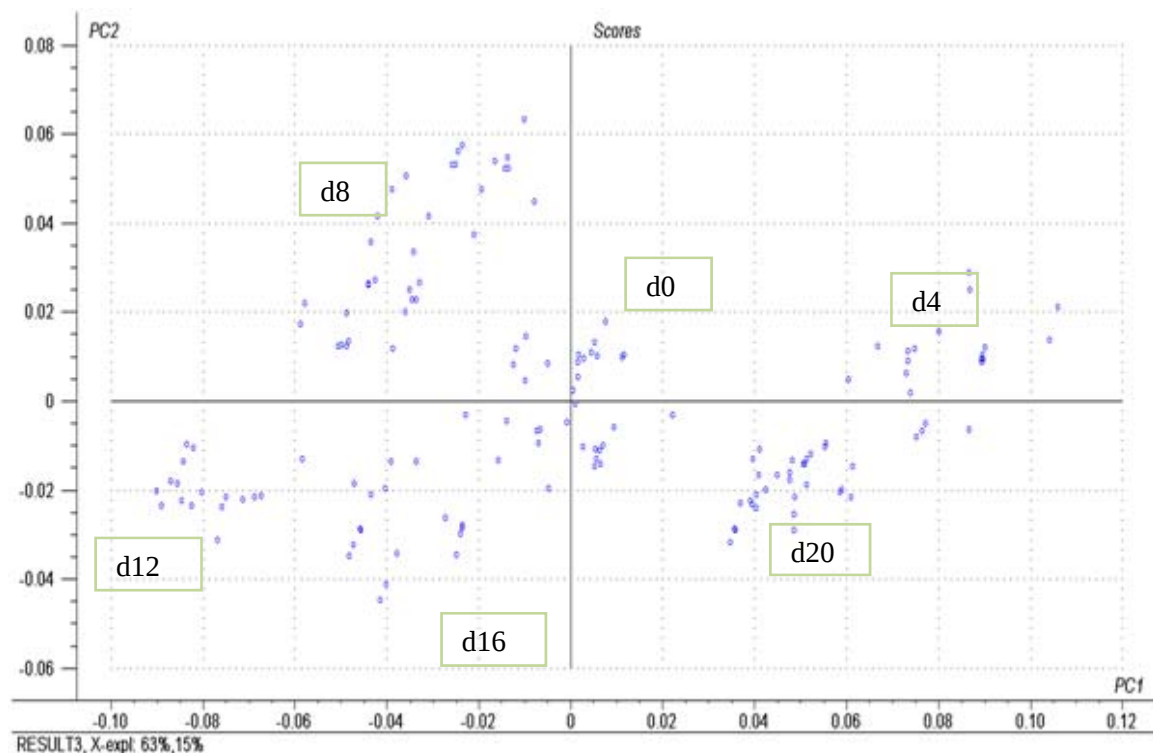
ละ PC มีความความสัมพันธ์ร่วมกันน้อยหรือไม่มีเลย ทำให้เห็นโครงสร้างความสัมพันธ์ของตัวแปรที่ศึกษาได้ชัดเจนขึ้น

จากผลการวิเคราะห์ พบว่า PCA ลดจำนวนตัวแปรจาก 126 ตัวแปร ได้เป็น 10 PCs โดยที่ PC1 สามารถอธิบายความแปรปรวนของกลุ่มตัวอย่างได้มากที่สุด คิดเป็น 63 % PC2 สามารถอธิบายความแปรปรวนของกลุ่มตัวอย่างได้รองลงมาเป็น 15% จากนั้นจะมีค่าลดลงตามลำดับ และเมื่อรวมทั้ง 10 PC สามารถอธิบายความแปรปรวนได้สูงถึง 99% (รูปที่ 11)

ส่วน PC scores (รูปที่ 12) คำนวณได้จาก reflectance responses ของตัวอย่างเมื่ออยู่บนตัวแปร (PC) ใหม่ เนื่องจาก 2 PCs แรกสามารถอธิบายความแปรปรวนได้โดยรวม 78% ซึ่งถือว่าพอเพียงในการอธิบายความสัมพันธ์ของข้อมูล จึงแสดงค่า scores บน 2 PCs แรกเท่านั้น จะเห็นได้ว่าหลังการลดจำนวนตัวแปรโดยใช้ PCA สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างที่มีคุณภาพแตกต่างกันออกจากกันได้เป็นหลายกลุ่มตัวอย่าง (cluster) ตามระยะเวลาการเก็บรักษา คือ ตัวอย่างที่มีอายุการเก็บนาน 0, 4, 8, 12, 16 และ 20 วัน อย่างไรก็ตามมีบางกลุ่มตัวอย่างที่ทับซ้อนอยู่ในบริเวณเดียวกัน อาจเนื่องจากตัวอย่างมีลักษณะใกล้เคียงกันเพราะมีระยะเวลาการเก็บรักษาที่ใกล้เคียงกัน จึงมีปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญใกล้เคียงกัน



รูปที่ 11. Variance explained by PCs of samples during storage using PCA



รูปที่ 12. PCA score plot of samples during storage (d1, d2, ..., d10 = on the first day, and after 2, ..., 10 days storage20, respectively)

4.8.2 ทำนายอายุการเก็บโดยใช้ partial least squares regression

เนื่องจากผลิตภัณฑ์ได้กรอกมีอายุการเก็บรักษาสั้นโดยจะเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์เป็นหลัก ในงานวิจัยนี้ใช้วิธี NIR ในการในการทำนายการเจริญของจุลินทรีย์เป็นหลัก

การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงปริมาณทำโดยใช้วิธี multivariate regression โดยสร้างสมการที่เหมาะสมในการบ่งชี้คุณภาพของอาหารเนื่องมาจากการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตในระหว่างการเก็บรักษา เพื่อนำไปสร้างสมการทำนาย เช่น multiple linear regression หรือ partial least squares regression และตรวจสอบความแม่นยำในการทำนายของสมการที่สร้างขึ้น โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทำนายด้วยสมการที่สร้างขึ้นจากสเปกตรัม NIR กับค่าที่วิเคราะห์ได้จริง ตรวจสอบความแม่นยำของสมการด้วยวิธี cross validation พิจารณาความเหมาะสมของสมการทำนายที่สร้างขึ้นจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ และค่าความคลาดเคลื่อนของสมการในการทำนาย

ในงานวิจัยนี้ใช้ partial least square regression ในการทำนาย การวิเคราะห์ผลทำโดยนำข้อมูลค่า reflectance ที่ได้ มาใช้เพื่อทำนายจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญบนผลิตภัณฑ์ ในการทำนายโดยใช้ PLSR ทำโดยจัดกลุ่มตัวแปรเดิมที่มีความสัมพันธ์กันเป็นตัวแปรใหม่ เรียกว่า PLS

components ซึ่งเกิดจากการรวมค่า reflectance ที่ทุกความยาวคลื่นที่มีน้ำหนักแตกต่างกัน โดย PLS components ที่สร้างขึ้นใหม่จะไม่มีความสัมพันธ์กัน จึงสามารถอธิบายความแปรปรวนของข้อมูลได้ดี

การสร้างสมการที่เหมาะสมในการทำนายจำนวนโคโลนีของจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนผลิตภัณฑ์อาหาร จากสเปกตรัมที่วัดได้จาก NIR spectroscopy ด้วย PLSR มีการคำนวณโดยใช้สมการดังแสดงใน Eq 2 จากนั้นตรวจสอบความแม่นยำในการทำนายของสมการที่สร้างขึ้น โดยเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทำนายด้วยสมการกับที่ได้จากวิเคราะห์ได้จริง ใช้ตัวอย่างที่เตรียมขึ้นใหม่เพื่อตรวจสอบความแม่นยำของสมการ (validation) พิจารณาความเหมาะสมของสมการทำนายที่สร้างขึ้นจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ และค่าความคลาดเคลื่อนของสมการในการทำนายค่าคุณภาพที่ทำการศึกษา

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_px_p \quad (2)$$

b_0 คือค่า regression coefficient for the intercept และ b_i คือ ค่า regression coefficients สำหรับตัวแปรที่ 1 ถึงตัวแปรที่ p และค่า Y คือค่าที่ต้องการทำนาย (จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมด)

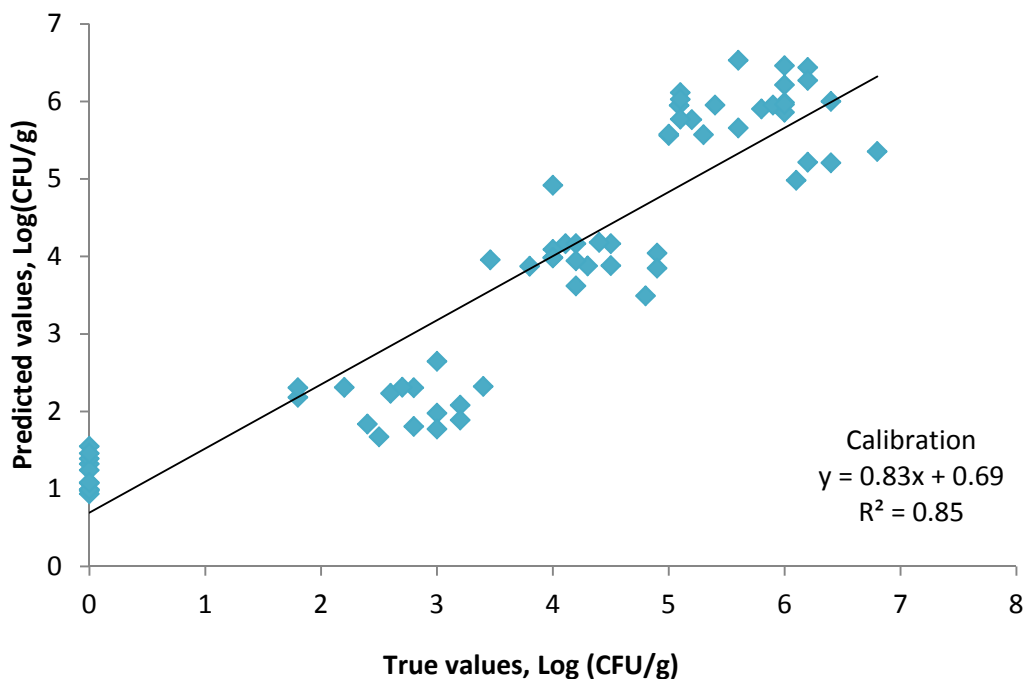
การหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนผลิตภัณฑ์อาหาร และค่า reflectance ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย NIR spectroscopy ทำโดยใช้วิธี PLS regression การศึกษาการใช้ PLSR ในการทำนายจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนผลิตภัณฑ์ใช้กรอกจากข้อมูลที่ได้จาก NIR spectroscopy ประกอบด้วยขั้นตอนการสร้างสมการ (calibration) และการตรวจสอบความแม่นยำของสมการ (validation) การประเมินความถูกต้องของการทำนายโดยใช้ PLSR model ทำโดยวัดค่า coefficient of determination (R^2) และ root mean square error (RMSE) คำนวณโดยใช้ Eq 3

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (3)$$

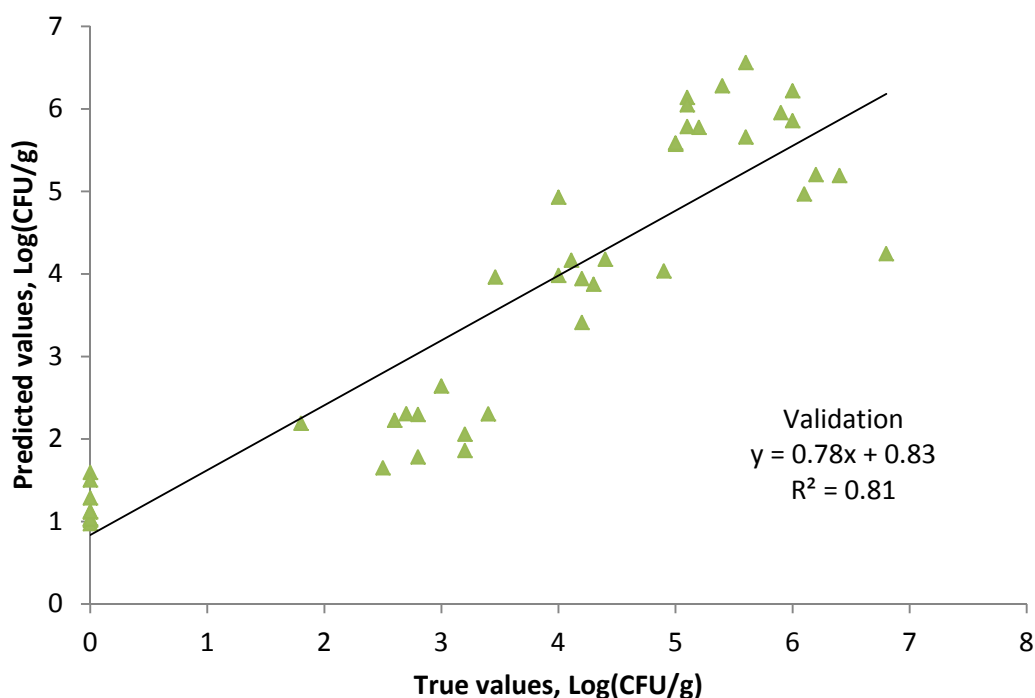
เนื่องจากมีบางตัวแปร (predictor variables/ wavelengths) เท่านั้น ที่มีความสำคัญต่อการทำนายจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ (response variable) ดังนั้นจึงหา PLS components (PCs) ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการคำนวณด้วย PLS model การหา optimum number ของ PLS components ทำได้โดยเลือกจำนวน PLS components ที่ให้ค่า root mean square error of cross-validation (RMSECV) ที่ต่ำที่สุด ผลการวิเคราะห์ พบว่า PLS components ที่เหมาะสมคือ 3 PCs จึงใช้ค่านี้ใน

PLS model เพื่อการทำนายจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนผลิตภัณฑ์อาหาร ได้ผลการทำนายดังแสดงใน รูปที่ 13 การตรวจสอบความแม่นยำของการทำนายโดยใช้ข้อมูลชุดใหม่ที่ไม่เคยใช้ในขั้นตอนการทำนาย (unseen validation set) ได้ผลการทำนายดังแสดงใน รูปที่ 14 ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากการทดลองกับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ได้จากการทำนาย

ผลการศึกษาพบว่าการใช้ PLSR ให้ค่า coefficient of determination, root mean square error of calibration (RMSEC) และ root mean square error of validation (RMSEV) พบว่า PLS regression ที่ใช้ให้ค่า R^2 เป็น 0.85 สำหรับการ calibration และ 0.81 สำหรับการ validation และค่า RMSEC และ RMSEV เป็น 1.88 และ 1.22 Log (CFU/g) ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่า NIR สามารถใช้ในการทำนายการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งบ่งบอกถึงคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ได้



รูปที่ 13. PLSR of calibration for prediction of total aerobic counts (Log (CFU/g)) on samples during storage



รูปที่ 14. PLSR of validation data for prediction of total aerobic counts (Log (CFU/g)) on samples during storage

5. สรุปผลการทดลอง

ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้กรอกในระหว่างการเก็บรักษา โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี ทางกายภาพ ทางจุลินทรีย์ และทางประสาทสัมผัส พบว่า ผลิตภัณฑ์มีการเปลี่ยนแปลงของ ค่า L^* (ความเข้ม-สว่าง), ค่า a^* (เขียว-แดง) และค่า b^* (น้ำเงิน-เหลือง) โดยเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้นค่า L^* a^* และ b^* ของตัวอย่างมีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์มีความสว่าง ความเป็นสีแดง และเป็นสีเหลืองลดลง ทั้งนี้เนื่องจาก เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ปริมาณจุลินทรีย์ย่อมจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ส่วนค่าแรงตัดขาดของผลิตภัณฑ์มีค่าลดลงในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ เพราะเมื่อปริมาณจุลินทรีย์สูงขึ้น จะส่งผลให้ค่า pH ลดต่ำลงเนื่องจากปริมาณกรดแลกติกที่จุลินทรีย์ผลิตจะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การแยกตัวของน้ำและไขมันที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เนื้อสัมผัสเริ่มยุ่ย ค่าแรงตัดขาดที่ได้จึงลดลง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด พบว่า จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น และเมื่อเก็บรักษานาน 16 วัน ตัวอย่างควบคุมมีแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นเป็น 5 Log

(CFU/g) ซึ่งเกินกว่าที่มาตรฐานกำหนดไว้ คือ 10^5 นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้นาน 8 วัน จำนวนแบคทีเรียแลคติกจึงเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพการยอมรับด้านประสาทสัมผัสของผู้บริโภค ปริมาณแบคทีเรียแลคติกที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับค่า pH ที่ลดลง เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างกรด ระหว่างการเจริญได้

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางประสาทสัมผัสของอาหารในระหว่างการเก็บรักษาพบว่า เมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น ตัวอย่างมีการเปลี่ยนแปลงของกลิ่น ลักษณะปรากฏ และสีมากขึ้น ส่วนคะแนนการยอมรับโดยรวมมีค่าลดลง โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บมากขึ้น ผลคะแนนทางประสาทสัมผัสสอดคล้องกับค่าการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของตัวอย่าง

สำหรับการวัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพผลิตภัณฑ์ระหว่างการรักษาด้วย NIR spectroscopy ใช้ความยาวคลื่นในช่วง 400-1000 nm และการปรับแต่งสเปคตรัม (mathematical pretreatments) ที่เหมาะสมทำโดยใช้ Savitzky-Golay 2nd derivatives จากนั้นวิเคราะห์ข้อมูลด้วย chemometrics โดยใช้ PCA ในการลดจำนวนข้อมูลรวมทั้งจัดจำแนกตัวอย่างที่มีคุณภาพที่แตกต่างกัน พบว่าการใช้ NIR spectroscopy ร่วมกับ PCA สามารถจัดจำแนกตัวอย่างที่มีคุณภาพแตกต่างกันตามระยะเวลาการเก็บรักษาได้

การทำนาย จำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนผลิตภัณฑ์อาหาร โดยข้อมูลค่า reflectance ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย NIR spectroscopy ทำโดยใช้ PLS regression ประกอบด้วยการขั้นตอนการสร้างสมการ (calibration) และการตรวจสอบความแม่นยำของสมการ (validation) พบว่าการใช้ PLSR ให้ค่า coefficient of determination เป็น 0.85 สำหรับการ calibration และ 0.81 สำหรับการ validation และค่า root mean square error of calibration และ root mean square error of validation เป็น 1.88 และ 1.22 Log (CFU/g) ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่า NIR spectroscopy ร่วมกับ PLSR สามารถใช้ในการทำนายการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญบนผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งบ่งบอกถึงคุณภาพและอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ได้

การนำวิธี near infrared spectroscopy ควบคู่กับ chemometrics มาใช้ในการบ่งชี้การเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งใช้เป็นเกณฑ์ในการระบุอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์เป็นวิธีที่เชื่อถือได้ มีความถูกต้อง การใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้นอกจากจะทำให้การกำหนดคุณภาพและอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ทำได้อย่างรวดเร็วแล้ว วิธีนี้ยังเป็นวิธีที่ไม่ทำลายตัวอย่าง และไม่ใช้สารเคมีในการวิเคราะห์

6. ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย

การวิเคราะห์ด้วย NIR spectroscopy สำหรับในงานวิจัยนี้ ใช้ความยาวคลื่นที่อยู่ในช่วง 400-1000 ซึ่งเป็นช่วงความยาวคลื่นของ visible-short wave NIR region เหมาะกับการใช้ทำนายปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญบนผลิตภัณฑ์อาหาร การเลือกใช้ความยาวคลื่นให้เหมาะสมกับการวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ของอาหารเป็นสิ่งสำคัญเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำมาบ่งชี้คุณภาพอาหารได้ สำหรับการศึกษการทำนายคุณภาพด้านอื่นๆ หรือผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่น อาจต้องมีการเลือกความยาวคลื่นในช่วงอื่นที่มีความเหมาะสมกับการวิเคราะห์นั้นๆ

การวิเคราะห์ด้วย NIR spectroscopy ให้มีประสิทธิภาพ นอกจากจำเป็นต้องเลือกปัจจัยต่างๆ เช่น ช่วงความยาวคลื่น (wavelength range) สำหรับเก็บข้อมูลค่าการดูดกลืนแล้ว การเลือกใช้ mathematical pretreatment ที่เหมาะสมสำหรับการปรับแต่งข้อมูล และการใช้ chemometrics ที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อให้ได้ผลในการทำนายที่ถูกต้องแม่นยำ

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2536. เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาสำหรับอาหารทั่วไปที่ไม่มีเชื้ออาหาร
ควบคุมเฉพาะ. แหล่งที่มา: <http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/BOSF/File/variety/law.htm>.
- นิธิยา รัตนานนท์. 2545. เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์,
487 หน้า.
- อิมเอิบ พันสด. 2549. บทที่ 12 การปนเปื้อนและการเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์.
แหล่งที่มา: http://www.nsruc.ac.th/e-learning/meattech/lesson/less12_5.html
- อุตสาหกรรม, กระทรวง. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2549. มาตรฐาน
ผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมไส้กรอกสอดดอก (มอก.2298-2549). กรุงเทพมหานคร: กระทรวง
อุตสาหกรรม, 11 หน้า.
- Bellon-Maurel V. 2006. NIR imaging spectroscopy instrumentation: looking forward to 2020?,
NIR News. 17, 14-23.
- Chalmers, J.M., Griffiths, P.R. (Eds.), 2002. Handbook of Vibrational Spectroscopy, J. Wiley
and Sons, Chichester (2002) 3334
- Chenoll, E., Macian, M., Elizaquivel, P., and Aznar, R. 2006. Lactic Acid Bacteria Associated
with Vacuum-packed Cooked Meat Product Spoilage: Population Analysis by rDNA-
based Methods. Journal of Applied Microbiology. 2006. 102: 498-508.
- Chun H. S., Choi, E. H., Chang, H.J., Choi, S.W., and Eremin, S. A. 2009. A fluorescence
polarization immunoassay for the detection of zearalenone in corn, Analytica Chimica
Acta, 639, 83-89.
- Department of Foreign Trade, Ministry of Commerce of Thailand. 2011. Situation of mango
products. [online]. Available from: <http://www.dft.go.th> [2011, April 13].
- Dykes, G.A., Cloete, T.E., and Holy, A.V. 1991. Quantification of microbial populations
associated with the manufacture of vacuum-packaged, smoked Vienna sausages.
International Journal of Food Microbiology 13: 239 - 248.
- Jjaberg, T.B., Haugum, M., and Murmi. 1970. Studies on discoloration of Norwegian salami.
Food Science and Technology 2: 871.
- Korkeala, H., Alanko, T., Mäkelä, P., Lindroth, S. 1990. Lactic acid and pH as indicators
of spoilage for vacuum-packed cooked ring sausages. International Journal of Food
Microbiology, 10: 245-253.

- Pikul, J., Leszczynski, D.E., and Kummerow, F.A. 1989. Evaluation of the three modified TBA method for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 40: 2182-2185.
- Salinas, Y., Ros-Lis, J. V., Vivancos, J-L., Martínez-Máñez, R., Marcos, M. D., Aucejo, S., Herranz, N., Lorente, I., Garcia, E. 2014. A novel colorimetric sensor array for monitoring fresh pork sausages spoilage *Food Control*, 35: 166-176.
- Samelis, J., Kakouri, A., and Rementzis, J. 2000. The spoilage microflora of cured, cooked turkey breasts prepared commercially with or without smoking. *International Journal of Food Microbiology* 56: 133 - 143.
- Sankaran S., Ehsani R., Etxeberria E. 2010. Mid-infrared spectroscopy for detection of Huanglongbing (greening) in citrus leaves. *Talanta*. 83, 574-581.
- Singh C. B., Jayas D. S., Paliwal J., White N. D.G. 2010. Identification of insect-damaged wheat kernels using short-wave near-infrared hyperspectral and digital colour imaging, *Comput. Electron. Agri.* 73, 118-125.
- Siripatrawan U., Makino Y., Kawagoe Y., Oshita S. 2010. Near infrared spectroscopy integrated with chemometrics for rapid detection of *E. coli* ATCC 25922 and *E. coli* K12. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 148, 366–370.
- Siripatrawan, U., and Jantawat, P. 2008. A novel method for shelf life prediction of a packaged moisture sensitive snack using multilayer perceptron neural network. *Expert Systems with Applications*. 73, 118-125.
- Siripatrawan, U., Noipha, S. Active film from chitosan incorporating green tea extract for shelf life extension of pork sausages, *Food Hydrocolloids*, 27 (2012) 102-108.
- Siripatrawan, U., Sanguandeeikul, R., Luangsa-ard, N. and Suppakul, P. 2006. Food packaging improvement: An effective means to promote international trade. The 15th IAPRI World Conference on Packaging, Tokyo, Japan.
- Steele, J.E., and Stiles, M.E. 1981. Food poisoning potential of artificially contaminated vacuum packaged sliced ham in sandwiches. *Journal of Food Protection* 44: 430 - 434.
- Summo, C., Caponio, F., and Pasqualone, A. 2006. Effect of vacuum-packaging storage on the quality level of ripened sausages. *Meat Science*. 74: 249-254. 36: 685 - 692.