

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

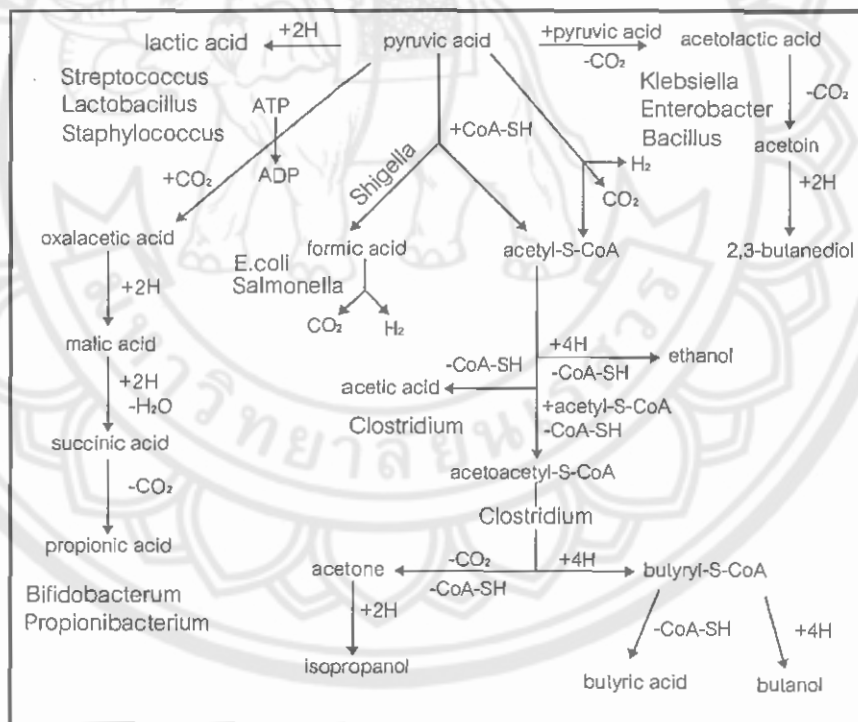
ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับแฮม

แฮมเป็นอาหารหมักประเภทเนื้อที่เป็นที่รู้จักกันดีของคนไทยในทุกภาค โดยเฉพาะภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ การทำแฮมเป็นการถนอมอาหารที่แสดงถึงภูมิปัญญาของคนไทยที่สามารถเก็บอาหารประเภทเนื้อได้ในระยะเวลาหนึ่ง สำหรับประวัติความเป็นมาของการแปรรูปแฮมนั้นไม่ปรากฏหลักฐานที่แน่ชัด แต่เป็นลักษณะของการพัฒนาหรือค้นคว้าวิธีแปรรูปเนื้อหมู ให้มีรสชาติ เนื้อสัมผัส รวมทั้งกลิ่นและสีให้น่ารับประทาน การผลิตแฮมสามารถทำได้โดยใช้วิธีการที่ไม่ซับซ้อนและไม่ต้องผ่านความร้อน โดยมีสัดส่วนและองค์ประกอบของวัตถุดิบที่แตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น กระบวนการผลิตทำโดยปล่อยให้เกิดการหมักด้วยธรรมชาติที่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเพื่อการเจริญเติบโต (ประเวทย์ ดุษฎีเมวงศ์, 2536) การบรรจุจึงต้องเน้นความสะอาด และต้องใส่อากาศออกให้หมด เพื่อให้จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดกรดแลคติกซึ่งมีรสเปรี้ยวสามารถเจริญเติบโตได้เพียงชนิดเดียว ส่วนจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ต้องการออกซิเจนจะไม่เจริญเติบโต และจุลินทรีย์ที่ไม่ชอบความเป็นกรดจะตาย สำหรับรูปแบบบรรจุภัณฑ์ที่ใช้แต่เดิมเป็นใบตองมัดแน่นเป็นแท่งขนาดพอเหมาะโดยให้อากาศเข้าได้น้อยที่สุด แต่ในปัจจุบันนิยมใช้ถุงพลาสติกเป็นภาชนะบรรจุแทน เนื่องจากทำได้ง่ายและสะดวกกว่าทั้งสามารถป้องกันอากาศผ่านเข้าได้เป็นอย่างดี (อารี วิบูลย์พงศ์ และคณะ, 2545)

สำหรับกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในการหมักแฮมมีดังนี้ แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ตามธรรมชาติ หรือจากการเติมเชื้อบริสุทธิ์เข้าไป เช่น *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus cerevisiae* ซึ่งจะใช้ข้าวเหนียวหรือข้าวเจ้าที่ต้มลงไปเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานเพื่อการเจริญเติบโต โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อยมาก และจะสร้างกรดแลคติกออกมาทำให้นเนื้อมีความเป็นกรด หรือมีค่า pH ลดลง นอกจากกรดจะทำให้เกิดรสเปรี้ยวแล้ว ยังทำให้จุลินทรีย์หลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และตายไปในที่สุด อาทิเช่น *Trichinella spiralis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* และ *Escherichia coli* O157:H7 เป็นต้น ดังนั้นในการผลิตแฮมนั้นควรให้แฮมผ่านกระบวนการหมักจนมีค่า pH ที่ต่ำกว่า 4.6 จึงจะทำให้มีโอกาสพบเชื้อก่อโรคปนเปื้อนมาน้อยลง หรือกล่าวได้ว่าผลิตภัณฑ์แฮม

มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากขึ้น อีกทั้งยังจะมีรสชาติเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคอีกด้วย (อารี วิบูลย์พงศ์ และคณะ, 2543)

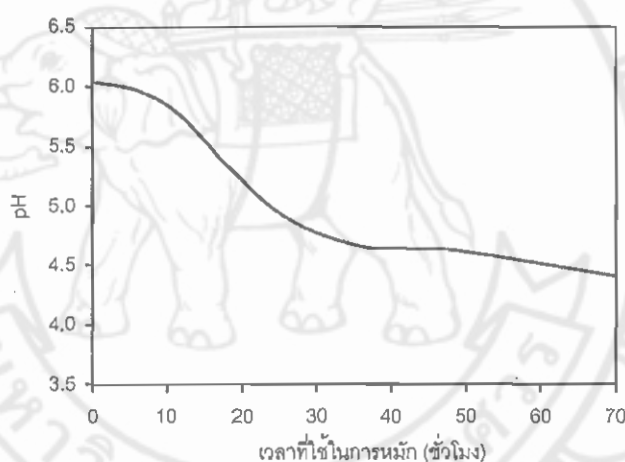
โดยแลคติกแบคทีเรียที่มีความสามารถทนกรดในปริมาณสูงๆ ได้ สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิค่อนข้างกว้างคือตั้งแต่ 5 - 45°C และไม่ต้องการออกซิเจน ซึ่งในกระบวนการหมักของแลคติกแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative) เป็นการหมักที่ได้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียวเป็นผลิตภัณฑ์สำคัญ ได้แก่ genus *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* และ *Pediococcus* และการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) เป็นการหมักที่ได้กรดแลคติก แอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น genus *Leuconostoc* และ *Oenococcus* โดยที่การหมักทั้งสองแบบนี้ต่างก็เกิดผ่านกระบวนการ Embden Meyerhof pathway เช่นเดียวกัน (Soni, R. and Soni, K.S., 2007) ดังภาพ 1



ภาพ 1 การหมักของแลคติกแบคทีเรียผ่านกระบวนการ Embden Meyerhof pathway

ที่มา: Soni, R. and Soni, K.S., 2007

เมื่อเกิดกระบวนการหมักดังกล่าวขึ้น จะทำให้เกิดกรดแลคติก กรดอะซิติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล (Tittsler, R. P. et. al., 1952) และเมื่อเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมักนานขึ้น ผลผลิตที่เกิดจากการหมักก็เพิ่มขึ้นด้วย กรดแลคติก และกรดอะซิติกที่เพิ่มขึ้นก็จะยิ่งทำให้แหมมนั้นมีค่า pH ลดลง ดังภาพ 2 (ณรงค์ นิยมวิทย์ และทัศนีย์ โรจนไพบูลย์, 2527) จากการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ทำให้ผลิตภัณฑ์แหมมนั้นมีความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรค และเพื่อเป็นการเพิ่มความมั่นใจต่อการบริโภคแหมมที่ปลอดภัยของผู้บริโภค ดังนั้นการผลิตและพัฒนาตัวชี้วัดเพื่อบ่งบอกระดับการหมักของแหมม ที่มีความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนสีของตัวชี้วัดกับระดับการหมักของแหมมนั้น จะทำให้ผู้บริโภคสามารถเลือกที่จะรับประทานแหมมที่มีความปลอดภัย รวมทั้งเป็นการยกระดับความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารหมักของไทย และเพิ่มศักยภาพทางการตลาดอีกด้วย



ภาพ 2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH ที่ลดลงกับระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก

ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับสารอินดิเคเตอร์จากธรรมชาติ

อินดิเคเตอร์ คือ สารประกอบชนิดหนึ่งซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งเป็นสีที่มีความสามารถละลายได้ในตัวทำละลายต่างๆ และมีการเปลี่ยนแปลงสีในช่วง pH ช่วงหนึ่ง ลักษณะเฉพาะของอินดิเคเตอร์เป็นกรดอ่อน ซึ่งจะแสดงสีที่แตกต่างจากเบส เช่น ในกรณีของกระดาษลิตมัสจะมีการเปลี่ยนแปลงจากสีแดงเป็นสีน้ำเงิน เมื่อมีการเปลี่ยนสภาวะจากกรดเป็นเบส อินดิเคเตอร์ที่ดีจะสามารถทำงานได้แม้มีความเข้มข้นต่ำ ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวจะไม่ส่งผลต่อค่า pH ของสารละลาย

สำหรับอินดิเคเตอร์จากธรรมชาติเริ่มมีการนำมาใช้นานมาแล้วมากกว่า 100 ปี โดยเริ่มตั้งแต่ในศตวรรษที่ 17 Robert Boyle (1663) ได้รายงานว่ เมื่อนำน้ำเชื่อมสีม่วงที่สกัดได้จากกลีบดอกไม้หยดลงบนกระดาษสีขาว จากนั้นหยดน้ำส้มหรือกรดชนิดอื่นๆ ตามลงไป จะพบว่าน้ำเชื่อมดังกล่าว จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีแดง และในทางตรงกันข้ามถ้าหยดสารละลายต่างลงไป ก็เปลี่ยนเป็นสีเขียว ซึ่งจากการทดลองดังกล่าวนี้เองจึงทำให้นักเคมีในยุคนั้นเริ่มที่จะนำน้ำเชื่อมจากกลีบดอกไม้เป็นเครื่องบ่งชี้ความเป็นกรด - ต่างของสาร โดยปกติสารอินดิเคเตอร์จากธรรมชาติจะเป็นกรดอ่อน และจะให้สีที่แตกต่างกัน เมื่ออยู่ในรูปของกรดและคอนจูเกตต่าง (conjugate base) ซึ่งอินดิเคเตอร์จากธรรมชาติหลายชนิดสามารถสกัดได้จากพืชหรือวัสดุที่หาได้ง่าย (Fred, S., 2008) ดังตัวอย่างเช่น

1. Alizarin (1) เป็นสารสีส้มที่พบในรากของพืชตระกูลเข็ม และถูกใช้เป็นสีย้อมเส้นด้ายในสมัยอียิปต์โบราณ เปอร์เซีย และอินเดีย ซึ่งสารละลาย 5% ในแอลกอฮอล์ alizarin จะมีสีเหลืองที่ pH 5.5 และจะมีสีแดงที่ pH 6.8 โดยสาร alizarin นี้ยังถูกพัฒนาและปรับปรุงเพื่อนำไปใช้เป็น acid - base indicator

2. Cochineal (2) เป็น acid-base indicator ที่ได้จากแมลงที่ชื่อว่า cochineal แมลงชนิดนี้จะให้ carmine ซึ่งเป็นรงควัตถุ แมลงชนิดนี้จะอาศัยอยู่แถบประเทศเม็กซิโก และอเมริกา กลาง ในการผลิต carmine จะได้มาจากไข่และแมลงตัวเมีย จะเริ่มจากนำแมลง cochineal มาแช่ในน้ำร้อน แล้วล้างด้วยลมร้อนให้แห้งประมาณ 30% จากนั้นก็นำมาบด โดยที่ต้องใช้แมลงประมาณ 70,000 ตัว ต่อ carmine 1 ปอนด์ ซึ่งผงของ carmine 10% ใน carminic acid จะให้สีเหลืองในสารละลายกรด และสีม่วงในสารละลายต่าง

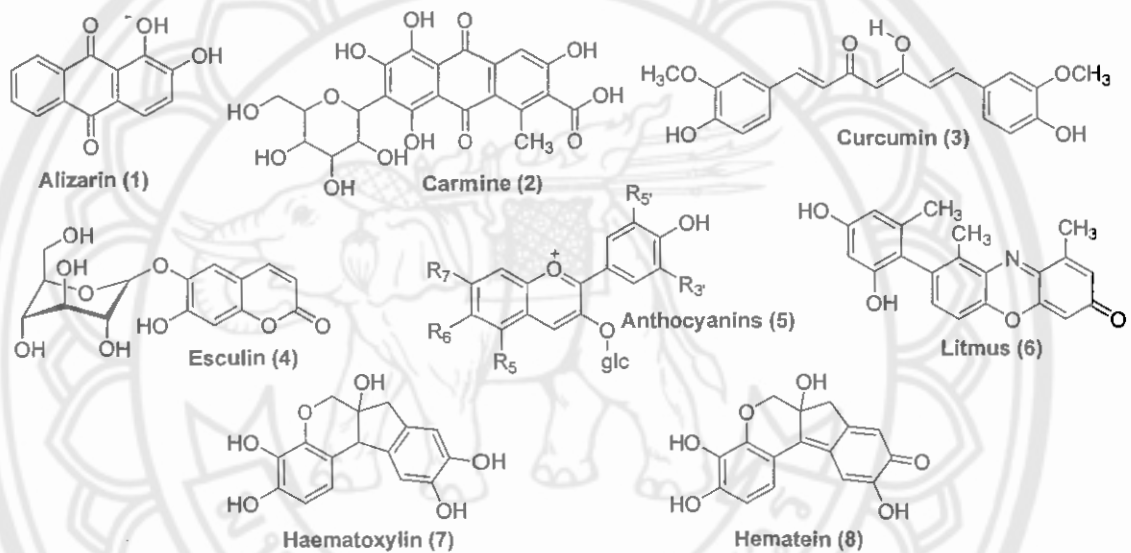
3. Curcumin (3) หรือ turmeric yellow เป็นรงควัตถุธรรมชาติที่พบในผงกะหรี่ ซึ่งจะเปลี่ยนจากสีเหลืองที่ pH 7.4 เป็นสีแดงที่ pH 8.6

4. Esculin (4) เป็นสารสีเรืองแสงที่สามารถสกัดได้จากใบ และเปลือกของต้น horse chestnut esculin โดยที่ esculin จะเปลี่ยนจากสารที่ไม่มีสีที่ pH 1.5 ไปเป็นสีน้ำเงินเรืองแสงที่ pH 12

5. Anthocyanin (5) เป็น acid - base indicator ที่สามารถหาได้ง่ายที่สุด และเป็นสารสีที่อยู่ในพืชซึ่งทำให้มีสีแดงในกะหล่ำปลีม่วง สีน้าเงินในดอกข้าวโพด และสีแดงในดอก บ๊อบบี้ โดยที่ Anthocyanins จะมีสีแดงในสารละลายกรด จะเปลี่ยนเป็นสีม่วงถึงเขียวในสารละลายต่าง เจือจาง และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองในสารละลายต่างเข้มข้น

6. Litmus (6) เป็นสารสีน้ำเงินสามารถสกัดได้จากไลเคนส์หลายสายพันธุ์ แม้ว่า ไลเคนส์ จะสามารถเจริญเติบโตได้ในหลายๆ ส่วนของโลก แต่ลิตมัสส่วนใหญ่จะถูกสกัดและบรรจุที่ประเทศ ฮอลแลนด์ ลิตมัสมีสีแดงที่ pH 4.5 และสีน้ำเงินที่ pH ประมาณ 8.3 ซึ่งลิตมัสพวกนี้จะถูกนำไปทำ เป็นกระดาษลิตมัสนั่นเอง

7. Logwood เป็นสารสีที่ได้จากแก่นไม้ของต้นไม้ในแถบอเมริกากลาง และเอเชีย อากาศเนย์ โดยสารสกัดจาก logwood จะประกอบด้วย hematoxylin (7) และ hematein (8) ซึ่งสาร สีจาก logwood นี้จะเปลี่ยนเป็นสีแดงสดในสารละลายต่าง



ภาพ 3 โครงสร้างทางเคมีของสารอินดิเคเตอร์จากธรรมชาติ

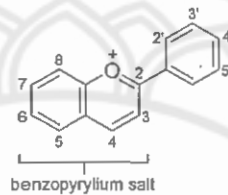
ที่มา: Fred, S., 2008

แอนโทไซยานินส์ (Anthocyanins)

แอนโทไซยานินส์ เป็นสารสีธรรมชาติที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในผัก ผลไม้ และดอกไม้บาง ชนิด เช่น แครนเบอร์รี่ องุ่น พลัม บลูเบอร์รี่ หัว อัญชัน และอื่นๆ ที่มีสีม่วงแดงไปจนถึงสีน้ำเงิน แอนโทไซยานินส์จะละลายอยู่ใน เซลล์แซป [sap cell; ของเหลวที่อยู่ในแวคิวโอล ประกอบด้วย สารต่างๆ ที่ละลายน้ำได้ดี เช่น น้ำตาล กลีโคอินทรีย์ (ไนเตรต ซัลเฟต ฟอสเฟต และคลอไรด์ของ ธาตุ K, Ca, Mg, Fe) กรดอินทรีย์ต่างๆ กรดไขมัน กรดอะมิโน แอนโทไซยานินส์ เป็นต้น] ของพืช

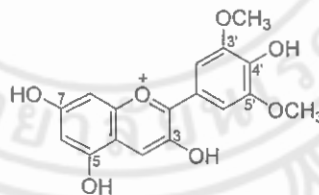
แอนโทไซยานินส์สามารถละลายน้ำได้แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว ไม่มีหมู่ hydroxide เช่น อีเทอร์ อะซีโตน คลอโรฟอร์ม และเบนซีน เป็นต้น

แอนโทไซยานินส์ เป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ชนิดหนึ่งมีสูตรโครงสร้างหลักเป็น $C_6-C_3-C_6$ ของเกลือฟลาเวียเลียม (flavylium salt) หรือ 2-phenylbenzopyrylium (กนกวรรณ รัตนสโนบล, 2536) มีสมบัติเป็นเกลือ ดังภาพ 4



ภาพ 4 โครงสร้างของเกลือฟลาเวียเลียม (flavylium salt) หรือ 2-phenylbenzopyrylium

ซึ่งถ้ามีหมู่ hydroxy (-OH) หรือหมู่ methoxy (-OCH₃) มาเกาะที่ตำแหน่งในตำแหน่งหนึ่งของตำแหน่ง 3, 5, 7, 3', 4' และ 5' เรียกโครงสร้างนี้ว่า แอนโทไซยานิดิน (anthocyanidin หรือ aglycone) แสดงโครงสร้างของ malvidin ซึ่งเป็นตัวอย่างของแอนโทไซยานิดินในภาพ 5



ภาพ 5 โครงสร้างของ malvidin ซึ่งเป็นแอนโทไซยานิดินชนิดหนึ่ง

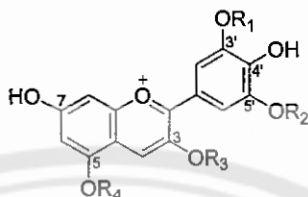
ในธรรมชาติจะพบแอนโทไซยานิดินมากกว่า 15 ชนิด เรียกชื่อแตกต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่งของ hydroxy และหมู่ methoxy ดังตาราง 1

ตาราง 1 สารแอนโทไซยานิดินที่พบในธรรมชาติ

Name	Substitution							Color
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigeninidin (Ap)	H	OH	H	OH	H	H	H	orange
Aurantininidin (Au)	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	orange
Capensinidin (Cp)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	bluish - red
Cyanidin (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	orange - red
Delphinidin (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	bluish - red
Europinidin (Eu)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	bluish - red
Hirsutidin (Hs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	bluish - red
6-Hydroxycyanidin (6-OHCy)	OH	OH	OH	OH	OH	H	H	red
Luteolinidin (Lt)	H	OH	H	OH	OH	OH	H	orange
Malvidin (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	bluish - red
5-Methylcyanidin (5-MCy)	OH	OMe	H	OH	OH	H	H	orange - red
Pelargonidin (Pg)	OH	OH	H	OH	H	OH	H	orange
Peonidin (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	orange - red
Petunidin (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	bluish - red
Pulchellidin (Pl)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	bluish - red
Rosinidin (Rs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	red
Tricetinidin (Tr)	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	red

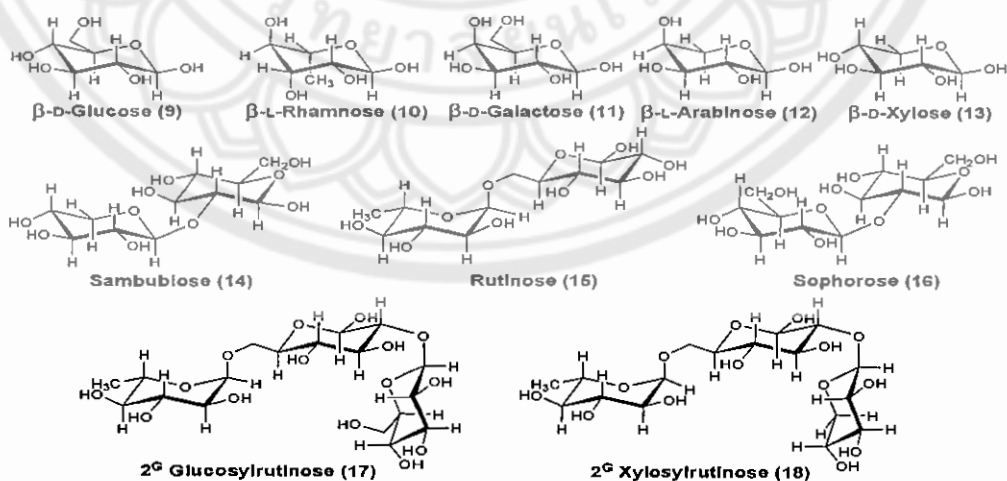
ที่มา: Mazza, G. and Miniati, E., 1993

เมื่อมีน้ำตาลมาสร้างพันธะกับหมู่ hydroxyl ของแอนโทไซยานิดินที่ตำแหน่ง 3 และ 5 เรียกโครงสร้างนี้ว่า แอนโทไซยานินส์ (จงรักษ์ แก้วประสิทธิ์ และคณะ, 2544) ดังภาพ 6



ภาพ 6 โครงสร้างของแอนโทไซยานินส์ เมื่อ R₃ และ R₄ คือกลุ่มของน้ำตาล

แอนโทไซยานินส์นั้นมีสูตรโครงสร้างต่างๆ กันหลายชนิด ขึ้นอยู่กับชนิดของแอนโทไซยานิดิน และน้ำตาลที่มีสร้างพันธะกัน แต่ส่วนมากจะพบโครงสร้างของแอนโทไซยานิดิน 6 ชนิด คือ cyanidin (Cy), delphinidin (Dp), malvidin (Mv), pelargonidin (Pg), peonidin (Pn) และ petunidin (Pt) ซึ่งจะสร้างพันธะกับน้ำตาลประเภท monosaccharide หรือ oligo-saccharide ซึ่งพบมากที่สุดที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 (R₃) อาจเป็นน้ำตาล pentose ได้แก่ xylose และ arabinose หรือน้ำตาล hexose และที่พบบ่อยได้แก่ glucose และ galactose บางครั้งอาจพบที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 หรือ 7 โดยที่น้ำตาลเหล่านี้จะช่วยให้ aglycone หรือแอนโทไซยานิดินมีเสถียรภาพดีขึ้น



ภาพ 7 โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลส่วนใหญ่ที่พบในแอนโทไซยานินส์

ในการประยุกต์ใช้แอนโทไซยานินส์ในอาหาร พบว่า แอนโทไซยานินส์มีการเปลี่ยนแปลงระดับสีได้ง่าย เนื่องจากผลของการขาดอิเล็กตรอนของโมเลกุลแอนโทไซยานินส์ จึงทำให้โครงสร้างหลักซึ่งเป็นเกลือฟลาวิลีเยียมมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยามาก การเปลี่ยนแปลงสีของแอนโทไซยานินส์ไม่ได้ขึ้นอยู่กับ การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเพียงปัจจัยเดียวเท่านั้น ยังมีอีกหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสี เช่น pH เอนไซม์ ออกซิเจน อุณหภูมิ แสง น้ำตาล กรดแอสคอร์บิก copigmentation และการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโลหะบางชนิด เป็นต้น (Sim, C.A. and Morris, J.R., 1984)

ผลของ pH กับการเปลี่ยนสีของแอนโทไซยานินส์

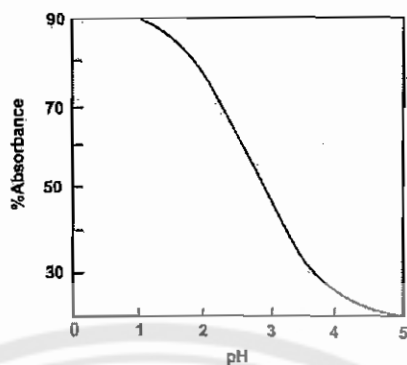
แอนโทไซยานินส์มีสมบัติของการบอกค่า pH (pH indicator) อย่างคร่าวๆ ได้ โดยแอนโทไซยานินส์จะเปลี่ยนสีไปตามค่า pH ต่างๆ ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 ความสัมพันธ์ระหว่าง pH กับสีของแอนโทไซยานินส์

pH	สี
1.0	แดง
4.0	น้ำเงินแดง
6.0	ม่วง
8.0	น้ำเงิน
12.0	เขียว
13.0	เหลือง

ที่มา: จงรักษ์ แก้วประสิทธิ์ และคณะ, 2544

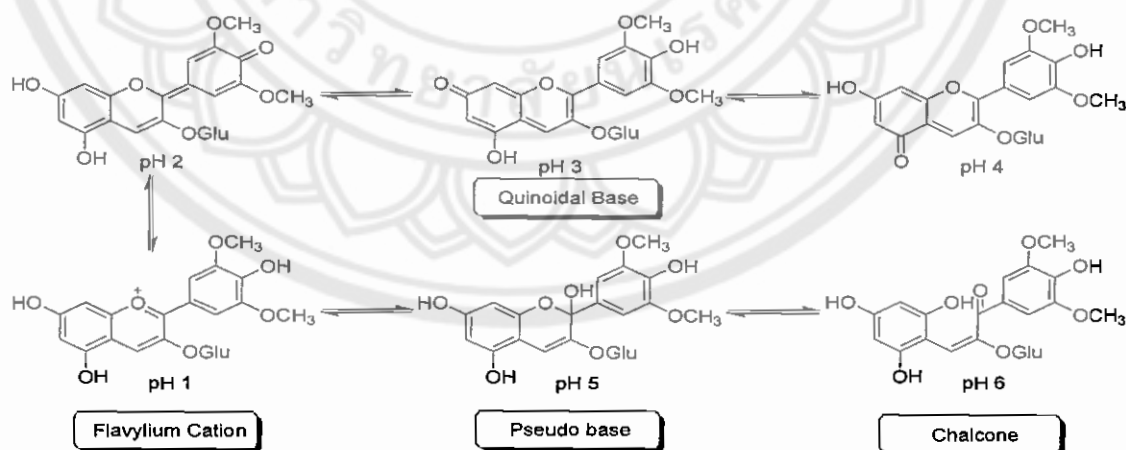
นอกจากการเปลี่ยนระดับสีตามค่า pH แล้ว ค่าความเข้มของสี (color intensity) ยังแปรผันตามค่า pH ด้วย กล่าวคือ ที่ pH เท่ากับ 1.0 แอนโทไซยานินส์มีความเข้มสีมากที่สุด และลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH กับค่าการดูดกลืนแสง (Henry, B.S., 1992) ดังภาพ 8



ภาพ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า pH กับค่าการดูดกลืนแสงของแอนโทไซยานินส์

ที่มา: Henry, B.S., 1992

ในสารละลายที่มีสมบัติเป็นกรด เป็นกลาง และเป็นเบส โครงสร้างของแอนโทไซยานินส์ จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้ โดยที่ pH 1 จะพบอยู่ในรูปแบบของ flavylium cation ที่มีสีม่วงแดง เมื่อ pH มีค่าอยู่ระหว่าง 2 – 4 จะพบอยู่ในรูปแบบของ quinoidal base ที่มีสีน้ำเงิน แต่เมื่อ pH มีค่า 5 และ 6 จะพบอยู่ในรูปแบบของ pseudo base และ chalcone ซึ่งโครงสร้างทั้งสองรูปแบบนี้จะไม่มีสีหรือมีสีจาง เนื่องจากแอนโทไซยานินส์มีการสูญเสีย conjugated double bond ไป (Castañeda-Ovando, 2009)

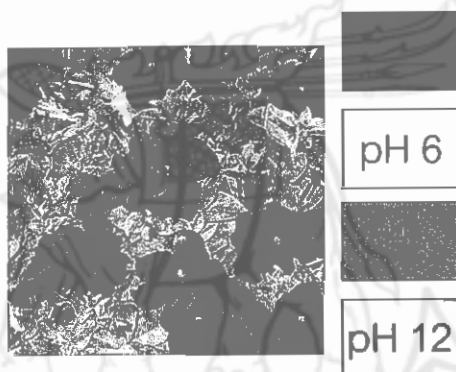


ภาพ 9 โครงสร้างทางเคมีของ anthocyanins ที่ pH ต่าง ๆ

ที่มา: Castañeda-Ovando, 2009

จากนั้นมียกกลุ่มของนักวิจัยสนใจและศึกษาการเปลี่ยนสีของสารแอนโรไชยานินส์ที่สามารถสกัดได้จากพืชชนิดต่างๆ ดังนี้

Hayashi, et. al. (1998) ได้ทำการศึกษาสารสกัดจากกลีบดอกพิทูเนียสีม่วงซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นอินดิเคเตอร์แทน phenolphthalein ได้โดยมีลักษณะการเปลี่ยนสีดังนี้ ในช่วง pH 2 ให้สีม่วงแดง ช่วง pH 6 ไม่มีสี ช่วง pH 8 ให้สีน้ำเงินอ่อน และในช่วง pH 12 ให้สีเขียวถึงเหลือง (ภาพ 10) แต่อย่างไรก็ตามปัญหาของการนำสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ หรืออินดิเคเตอร์ ก็คือ การรักษาความคงตัว และการเปลี่ยนโทนสีที่ชัดเจนของสารสกัดจากธรรมชาติที่ pH ต่างๆ



ภาพ 10 ดอกพิทูเนีย และการเปลี่ยนสีของสารสกัดในช่วง pH ต่างๆ

Scaman (2001) พบว่า การเปลี่ยนสีของแอนโรไชยานินส์ในน้ำคั้นผลแครนเบอร์รี่ที่ pH ต่ำ (pH = 1) มีสีแดงเข้ม และสีจะจางหายไปเมื่อ pH เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะที่ pH 4 - 5 แต่สีของแอนโรไชยานินส์ที่หายไปในั้นจะค่อยๆ เข้มขึ้นอีกครั้งเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเป็นเบสสูง และการเปลี่ยนสีของแอนโรไชยานินส์ในน้ำคั้น ผลบลูเบอร์รี่ที่ pH ต่ำ มีสีแดงสด และสีจะจางลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้น และเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเป็นเบสสูง สีของแอนโรไชยานินส์จะเปลี่ยนเป็นสีส้ม (ภาพ 11)



ภาพ 11 สารสกัดแอนโทไซยานินส์จากผลบลูเบอร์รี่ และผลแครนเบอร์รี่
ที่สารละลาย pH 1 - 13

ที่มา: Scaman, C., 2001

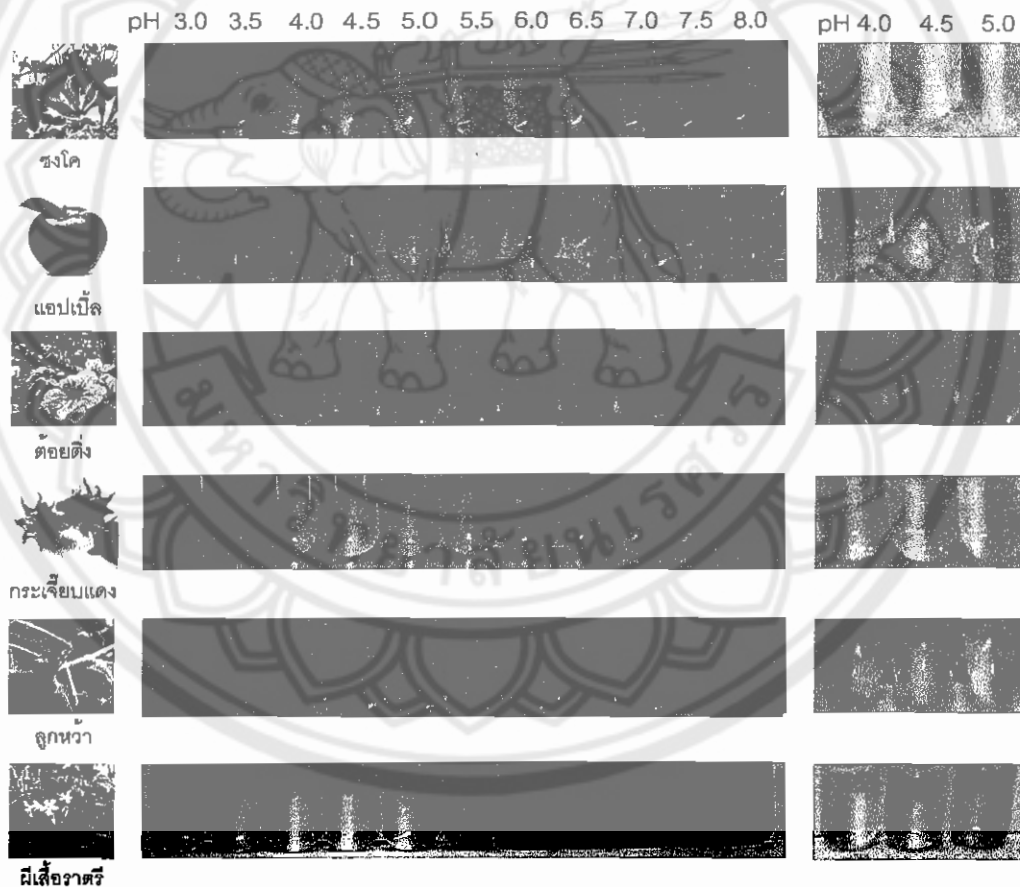
Bloomberg, et. al. (2007) ได้ทำการประดิษฐ์อินดิเคเตอร์ชนิดใหม่ เพื่อตรวจวัดค่า pH ของน้ำ ที่ใช้สำหรับสัตว์เลี้ยงและผลผลิตทางการเกษตร ซึ่งทำการสกัดสีจากพืช 3 ชนิด คือ องุ่น กระจับปี่ม่วง และไลเคน จากนั้นนำสารสีที่สกัดได้นั้นมาผสมกับส่วนผสมอื่นๆ ตามอัตราส่วน ดังตาราง 3 และผลจากการทดสอบ พบว่า สารอินดิเคเตอร์ชนิดใหม่นี้ มีสีแดงเมื่อน้ำมีค่า pH ที่ต่ำกว่า 5 และเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเมื่อน้ำมีค่า pH มากกว่า 5

ตาราง 3 อัตราส่วนของอินดิเคเตอร์ชนิดใหม่ที่ประดิษฐ์ขึ้น

ส่วนผสม	อินดิเคเตอร์ 1	อินดิเคเตอร์ 2	อินดิเคเตอร์ 3
Nonyl phenoxy polyoxyethylene glycol	10.4	10.4	10.4
Monoortho-phosphoric ester	43.6	43.6	43.6
Diorthophosphoric ester	2.9	2.9	2.9
Isopropyl alcohol	15.6	15.6	15.6
Water	17.5	-	-
Grape skin extract	10.0	-	-
Cabbage extract	-	27.5	-
Lichen extract	-	-	27.5

ที่มา: Bloomberg, et. al., 2007

จุฬารัตน์ อ้นชนะ และมารุต เหล่าแก้วก่อง (2548) พบว่า เมื่อทำการสกัดสารแอนโรไฮยานินส์จากพืชนานาชนิดที่สามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่น จำนวน 50 ชนิด ตัวอย่างเช่น ชงโค, แอปเปิ้ลแดง, กระจับแดง, ลูกหว้า, ต้อยติ่ง และผีเสื้อราตรี เป็นต้น เมื่อนำสารที่สกัดได้ไปทดสอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ในช่วง pH 3.0 - 8.0 ผลปรากฏว่าสารสกัดแต่ละชนิดเปลี่ยนสีได้แตกต่างกันในแต่ละช่วง pH (ภาพ 12) และเมื่อทดสอบการเปลี่ยนสีกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 4.0 - 5.0 ในอัตราส่วนระหว่างสารสกัดแอนโรไฮยานินส์ที่ได้กับสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:10 (v/v) พบว่า สารแอนโรไฮยานินส์จากใบผีเสื้อราตรีนั้น จะให้การเปลี่ยนสีที่ชัดเจนที่ pH 4.0, 4.5 และ 5.0 และมีค่า λ_{\max} เท่ากับ 528, 535 และ 537 นาโนเมตร ตามลำดับ



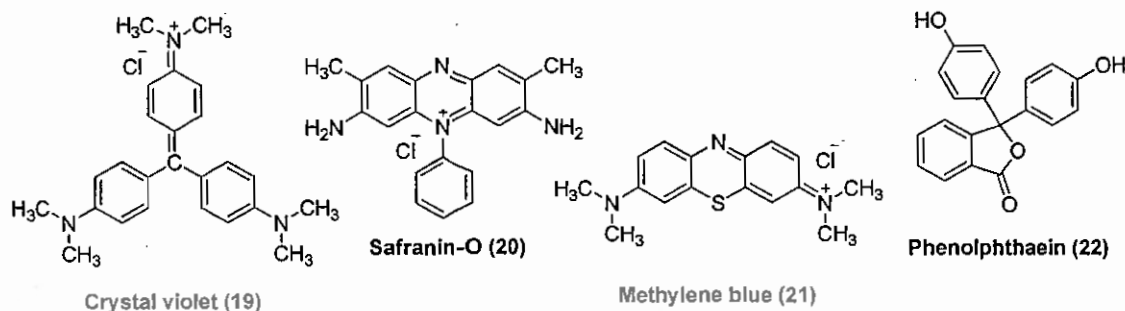
ภาพ 12 การเปลี่ยนสีของแอนโรไฮยานินส์ที่สามารถสกัดได้จากพืชชนิดต่างๆ เมื่อทดสอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

ที่มา: จุฬารัตน์ อ้นชนะ และมารุต เหล่าแก้วก่อง, 2548

การประยุกต์ใช้ตัวชี้วัดความปลอดภัยกับผลิตภัณฑ์อาหาร

การเกิดวิกฤตด้านความปลอดภัยของอาหารที่เกิดขึ้น เช่น โรควัวบ้าที่พบว่าสามารถถ่ายทอดจากเนื้อสัตว์สู่คน การระบาดของไข้หวัดนกในสัตว์ปีก การเกิดภาวะเจ็บป่วยเนื่องจากเชื้อก่อโรคที่พบในอาหาร การค้นพบสารเคมีตกค้างที่จะเป็นอันตรายต่อสุขภาพในอาหารคน และอาหารสัตว์ ส่งผลให้ผู้บริโภคเกิดภาวะวิตกกังวล และห่วงใยสุขภาพ จึงต้องการอาหารที่มีคุณภาพปลอดภัย และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง กระแสผู้บริโภคเลือกซื้ออาหารที่ปลอดภัย จึงเป็นปัจจัยกดดันให้ผู้ทำธุรกิจด้านอาหารต้องตื่นตัวขึ้น ตั้งแต่เกษตรกร ผู้ค้า ผู้ผลิต และแปรรูป ผู้ขนส่ง เกิดสำนึกและให้ความสำคัญในการจัดการสินค้าเพื่อให้เกิดความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค ด้วยเหตุนี้เองนักวิจัยจึงพยายามศึกษาและค้นคว้าถึงตัวชี้วัดต่างๆ ที่สามารถให้ข้อมูลด้านคุณภาพของอาหาร เพิ่มความสะดวกสบายต่อการเลือกซื้อแก่ผู้บริโภค และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่ผลิตภัณฑ์อีกด้วย

Baron and Elie (2003) ได้ทำการพัฒนาภาชนะบรรจุภัณฑ์ที่มีการพิมพ์สารอินดิเคเตอร์ที่เปลี่ยนสีตามอุณหภูมิ ทับบนข้อความที่ต้องการระบุให้ผู้บริโภคทราบ ซึ่งอินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย 4 ชนิด ได้แก่ คริสตอล ไวโอเลต (19), ซาฟานินโอ (20), เมทิลลีนบลู (21) และฟีนอล์ฟทาลีน (22) (ภาพ 13) โดยนำอินดิเคเตอร์ดังกล่าวติดบนเยื่อแผ่น Nafion[®] โดยช่วงอุณหภูมิที่ทำการศึกษา คือ 4 ถึง 70 °C พบว่า เมื่ออยู่ในสถานะที่มีความชื้น แผ่นฟิล์ม คริสตอล ไวโอเลต และซาฟานินโอ มีการตอบสนองกับความชื้น กล่าวคือ มีการเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีน้ำเงิน และเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีม่วง แต่แผ่นฟิล์มเมทิลลีน บลู ไม่มีการตอบสนองต่อความชื้นและเมื่ออยู่ในสถานะที่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ แผ่นฟิล์ม คริสตอล ไวโอเลต ไม่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ แผ่นฟิล์มเมทิลลีน บลู มีการเปลี่ยนสีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนแผ่นฟิล์มซาฟานินโอ สามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วง 4 ถึง 18 °C เท่านั้น และแผ่นฟิล์ม ฟีนอล์ฟทาลีน ตอบสนองการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างชัดเจนที่อุณหภูมิ 70 °C มีสีชมพูเข้ม และจะเปลี่ยนไปเป็นไม่มีสีที่อุณหภูมิ 2 °C (ตาราง 4)



ภาพ 13 โครงสร้างทางเคมีของคริสตอล ไวโอเลต (19), ซาฟานิน-โอ (20), เมทิลีน บลู (21) และฟีนอล์ฟทาลีน (22)

ตาราง 4 การเปลี่ยนสีของแผ่นฟิล์มอินดิเคเตอร์ที่ความชื้นและอุณหภูมิต่างๆ

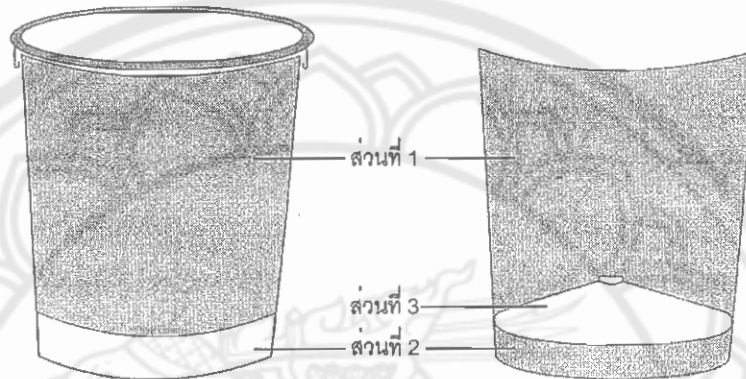
Dye	Ambient	100% RH*	70°C	2°C
Crystal violet	Yellow	Blue	Yellow	Yellow
Safranin-O	Blue	Violet	Green	Violet
Phenolphthalein	Pale pink	Colorless	Dark pink	Colorless
Methylene blue	Blue	Blue	Green	Green

* RH = Relative Humidity

ที่มา: Baron, M.G. and Elie, M., 2003

Chen, et. al. (2004) ได้ประดิษฐ์บรรจุภัณฑ์ที่สามารถตรวจสอบความสดของนมและติดตามการเน่าเสียของนม ซึ่งบรรจุภัณฑ์ที่ประดิษฐ์ขึ้นนั้นมีส่วนประกอบด้วยกันทั้งหมด 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 เป็นส่วนที่ใช้ในการบรรจุนม จะมีลักษณะทึบแสง เพื่อป้องกันแสงจากภายนอก ส่วนที่ 2 เป็นส่วนที่ใช้บรรจุตัวอย่างนม โดยมีอินดิเคเตอร์สองตัวคือ ฟีนอล เรด (มีสีเหลืองในสภาวะกรด และมีสีแดงในสภาวะเบส) กับ เมทาซีน บลู (ออกซิไดซ์ เมทาซีน บลู มีสีน้ำเงินและรีดิวซ์ เมทาซีน บลู ไม่มีสี) ซึ่งในส่วนที่ 2 นี้ จะเป็นภาชนะโปร่งแสงเพื่อสามารถติดตามความเน่าเสียของนมโดยสังเกตจากอินดิเคเตอร์ดังกล่าว และในส่วนที่ 3 จะเป็นภาชนะที่ใช้ปิดกั้นระหว่างส่วนทั้งสองข้างต้น ผลจากการทดสอบบรรจุภัณฑ์พบว่า เมื่อใส่นมลงไปในส่วนที่ 2 ที่มีอินดิเคเตอร์

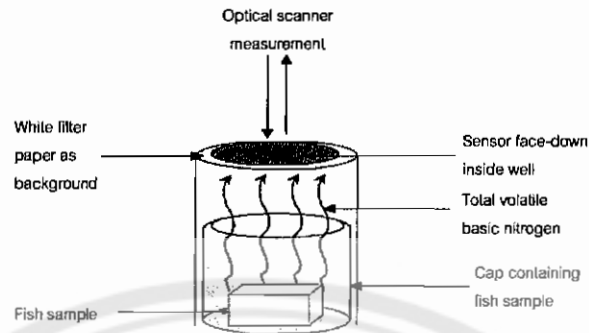
ร่วมอยู่ด้วยนั้น อินดิเคเตอร์จะเป็นสีเทา - น้ำเงิน และเมื่อน้ำนมเกิดการเน่าเสียอินดิเคเตอร์นั้น จะเปลี่ยนสีตามสภาวะต่างๆ ดังนี้ เมื่อน้ำนมมีความเป็นกรดอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนเป็นสีเขียว เหลือง และในสภาวะเบส อินดิเคเตอร์ก็จะเปลี่ยนเป็นสีม่วง ซึ่งผู้บริโภคสามารถเลือกซื้อนมที่มี คุณภาพดีและสดใหม่ โดยการสังเกตและติดตามการเน่าเสียจากส่วนที่ 2 นั้นเอง (ภาพ 14)



ภาพ 14 ลักษณะของบรรจุภัณฑ์ที่ Chen และคณะประดิษฐ์ขึ้น

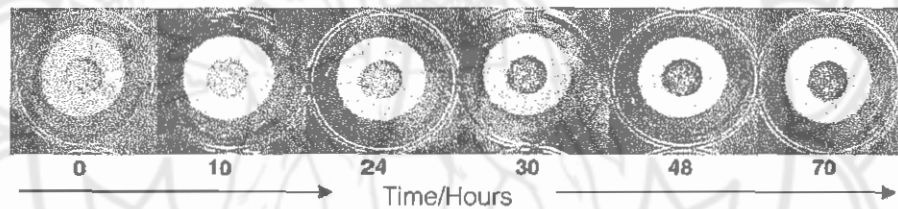
ที่มา: Chen, et. al., 2004

Alexis, et. al. (2007) ได้พัฒนาบรรจุภัณฑ์ที่สามารถตรวจวัดความสดของปลาและอาหารทะเล และยังสามารถควบคุมการแบ่งตัวของจุลินทรีย์ด้วย ในการออกแบบบรรจุภัณฑ์นี้มี ต้นแบบมาจากการงานวิจัยของ Byrne (2002) (ภาพ 15) โดยเมื่อมีการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์ขึ้น จะเกิดการปลดปล่อยสาร volatile amine ซึ่งตรวจวัดได้ด้วย pH sensor ที่เตรียมได้จากโบรโมครี ซอล กรีน จับยึดกับ polyethylene terephthalate (PET) ด้วยเทคนิค spincoating หรือใช้การหยด สารละลายสีลงบนกระดาษ พบว่า เมื่อมีการปลดปล่อยสาร volatile amine จากตัวอย่างปลาที่ เน่าเสีย จะมีการเปลี่ยนแปลงสีของโบรโมครีซอล กรีน โดยจะเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีฟ้า (ภาพ 16) ซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า และสีที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นมีความสัมพันธ์กับ จำนวนจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น



ภาพ 15 การออกแบบบรรจุภัณฑ์เพื่อติดตามการเน่าเสียของปลา

ที่มา: Byrne, L., Lau, K.T. and Diamond, D., 2002

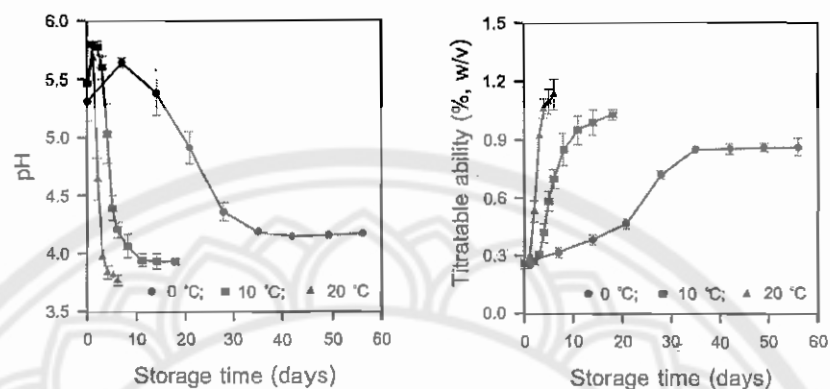


ภาพ 16 ตัวอย่างของ pH sensor ที่ใช้ติดตามการเน่าเสียของปลา whiting

ที่มา: Alexis, P., 2007

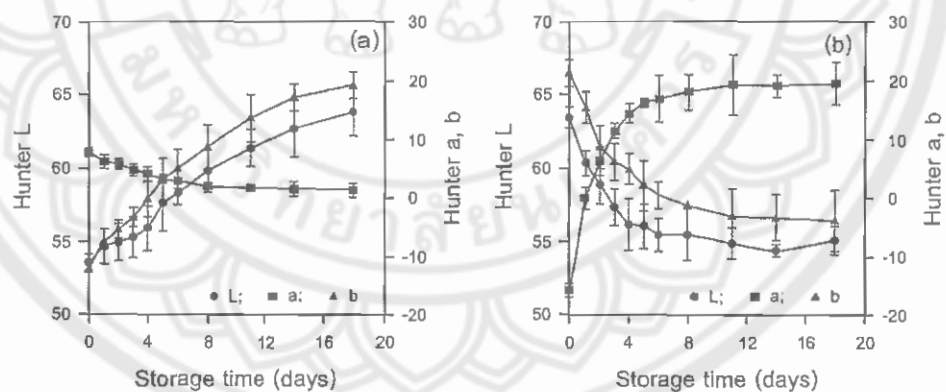
Hong, S.I. and Park, W.S. (1999) ได้พัฒนาอินดิเคเตอร์สีสำหรับภาชนะบรรจุกิมจิ เพื่อบ่งบอกระดับการหมักของผลิตภัณฑ์ระหว่างการขนส่งและการเก็บรักษา เมื่อกระบวนการหมักของกิมจิเกิดขึ้นจะทำให้กิมจินั้นมีค่าความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้น หรือ pH ลดลง ซึ่งการเก็บรักษาในสภาวะที่อุณหภูมิ 20 °C จะทำให้เกิดกระบวนการหมักได้เร็วกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 °C และ 0 °C (ภาพ 17) โดยกิมจิจะถูกบรรจุอยู่ในภาชนะโพลีโพรพิลีน ซึ่งปิดด้วยฝาไนลอนลามิเนตกับโพลีโพรพิลีน โดยมีฟิล์มอินดิเคเตอร์สีชนิด ไบรโมครีซอล เพอร์เฟิล หรือเมทิล เรด ติดอยู่ จากการทดลองระหว่างกระบวนการหมักของกิมจิ สีของอินดิเคเตอร์จะเปลี่ยนแปลงไป โดยไบรโมครีซอล เพอร์เฟิล จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเมื่อ pH เปลี่ยนจาก 6.8 เป็น 5.2 ส่วนเมทิล

เรด จะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดงเมื่อ pH เปลี่ยนจาก 6.2 เป็น 4.2 (ภาพ 18) แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์มีความสัมพันธ์กับค่า pH และเปอร์เซ็นต์กรดของกิมจิ



ภาพ 17 การเปลี่ยนแปลงของ pH และค่าความเป็นกรดของกิมจิ ระหว่างการเก็บรักษา ณ อุณหภูมิต่างๆ

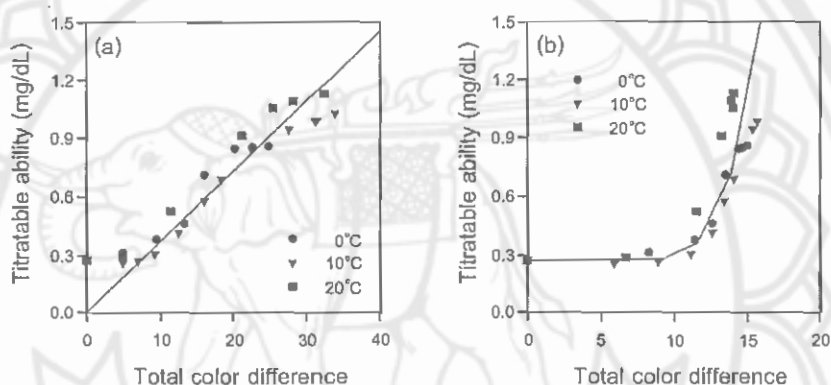
ที่มา: Hong, S.I. and Park, W.S., 1999



ภาพ 18 การเปลี่ยนสีของโบรโมคริสซอล เพอร์เฟิล (a) และเมทิล เรด (b) ที่ติดในภาชนะ การหมักกิมจิระหว่างการเก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 10 °C

ที่มา: Hong, S.I. and Park, W.S., 1999

Hong, S.I. and Park, W.S. (2000) ใช้อินดิเคเตอร์สีประเมินระดับการหมักของกิมจิ โดยทำการบรรจุกิมจิและใช้อินดิเคเตอร์สีเช่นเดียวกับ Hong, S.I. and Park, W.S. (1999) แต่ตำแหน่งของการติดฟิล์มอินดิเคเตอร์อยู่ด้านในของฝาบรรจุภัณฑ์ ซึ่งจากการทดลองพบว่า ฟิล์มชนิดโบรโมครีซอล เพอร์เฟิล มีการเปลี่ยนแปลงสีมากกว่าชนิดเมทิล เรด โดยการเปลี่ยนสีของ ฟิล์มทั้งสองมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์กรดของกิมจิที่เพิ่มขึ้น และฟิล์มชนิดโบรโมครีซอล เพอร์เฟิล บ่งบอกระดับการหมักของกิมจิได้ ตลอดอายุการเก็บรักษา ส่วนฟิล์มเมทิล เรด สามารถ บ่งบอกความสุกของกิมจิได้ (ภาพ 19) จึงถือว่า การใช้อินดิเคเตอร์สีนั้น สามารถบ่งบอกระดับ การหมักของกิมจิได้โดยไม่ทำให้กิมจิสูญเสียรสชาติ



ภาพ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความแตกต่างโดยรวมของสีของโบรโมครีซอล เพอร์เฟิล (a) และเมทิล เรด (b) กับค่าความเป็นกรดในการหมักกิมจิ

ที่มา: Hong, S.I. and Park, W.S., 2000

จะเห็นได้ว่าตัวชี้วัดความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้ทำการพัฒนาขึ้นนี้ ล้วนแต่เป็นสารเคมีที่ต้องสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งสารเคมีดังกล่าวอาจเป็นอันตรายและส่งผลเสียต่อ สุขภาพของบริโภค เนื่องจากตัวชี้วัดความปลอดภัยดังกล่าวนี้ จะต้องอยู่ในหีบห่อและสัมผัสอยู่กับผลิตภัณฑ์ตลอดเวลาตั้งแต่กระบวนการผลิตจนถึงการบริโภค อีกทั้งอาจทำให้ต้นทุนในการผลิตมีมูลค่าที่สูงขึ้น ด้วยเหตุนี้ผลิตภัณฑ์ทางธรรมชาติ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาไปเป็นตัวชี้วัดความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อาหาร ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ อินดิเคเตอร์สังเคราะห์