เอกสารอ้างอิง

1. ศูนย์สถิติการเกษตร, "สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปีเพาะปลูก 2527/28," สำนักเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพมหานคร, 2528.

2. นฤดม บุญ-หลง และคณะ, วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, หน้า 173, ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2521.

3. "คาดอีก 5 ปี น้ำนมดิบท่วมตลาดวันละ 103 ตัน," รวมประชาชาติธุรกิจ, (9 มิถุนายน 2527) : 16.

4. สำนักงานเลขาธิการนายกรัฐมนตรี, "นโยบายส่งเสริมการใช้น้ำนมดิบที่ผลิตได้ภายในประเทศ," ข่าวการประชุมคณะ รมต. (8 กุมภาพันธ์ 2526): 9-10.

5. อรวินท์ โทรกี และ ประชา บุญญสิริกูล, อาหาร, หน้า 36, สมาคมคหเศรษฐศาสตร์แห่งประเทศไทย, กรุงเทพมหานคร, 2526.

6. Alm, L., "Effect of Fermentation on Lactose. Glucose and Galactose Content in Milk and Suitability of Milk Products for Lactose Intolerance Individual," J. Dairy Sci., 65, 346-352, 1982.

7. Campbell, J.R. and R. T. Marshall, The Science of Providing Milk for Man, pp. 608, Mc Graw Hill Book Co., New York, 1975.

8. เจือ สุทธิวนิช, "แพะและแกะสำหรับงานอุตสาหกรรมเกษตร," วารสารสงขลานครินทร์, 3 (3), 225-231, 2524.

9. บุญจันทร์ สายยิ้ม, "การใช้นมถั่วเหลืองผสมนมโคในการผลิตนมเปรี้ยว," วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาสัตวบาล บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2530.

10. Tamime, A.Y. and R.K, Robinson, Yoghurt: Science and Technology, pp. 431, Pergamon Press, Oxford, 1985.

11. Eckles, C.H., Milk and Milk Products, pp. 138, McGraw-Hill Book Co., INC., New York, 1973.

12. Anonymous, Dairy Handbook, pp. 171, Alfa-Laval AB, Lund, 1980.

13. Kon, S.K., Milk and Milk Products in Human Nutrition, pp. 43, 47-48, Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome, 1972.

14. Lampert, L.M., Milk and Dairy Products, pp. 127, Chemical Publishing Co., INC., Brocklyn, 1947.

15. Webb, B.H., Fundamentals of Dairy Chemistry, pp. 63-65, The AVI Publishing Co., INC., Westport, 1974.

16. อรอนงค์ นัยวิกุล และคณะ, น้ำนมและผลิตภัณฑ์, หน้า 2, เอกสารเผยแพร่วิชาการ ลำดับที่ 2, ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรม-เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

17. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตร "เทคโนโลยีอาหารนม" ขั้นตอนในการผลิตน้ำนม, ศูนย์พัฒนาฝึกอบรมและวิจัยด้านโคนมแห่งชาติ กรมปศุสัตว์, 2526.

18. ลาวัณย์ ไกรเดช, จุลินทรีย์ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม, หน้า 191, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2529.

19. Hammer, B.W., Dairy Bacteriology, pp. 376, John Willey & Sons, INC., New York, 1948.

20. Hull, R.R., "Recent Developments in the Genetics of Lactic Acid Bacteria," CSIRO Food Res. Q., 45, 40-46, 1985.

21. Ling, E.R., A Textbook of Dairy Chemistry, pp. 39, Chapman & Hall Ltd., London, 1956.

22. Sellars, R.L., and F.J. Babel, Cultures for the Manufacture of Dairy Products, pp. 8, CHR. Hansen's Laboratory, INC., Wisconsin, 1970.

23. Cogan, T.M., "Constitutive Nature of the Enzymes of Citrate Metabolism in Streptococcus lactis subsp. diacetylactis," J. Dairy Res., 48, 485-495, 1981.

24. สุวรรณา กิจภากรณ์, ผลิตภัณฑ์จากน้ำนม, หน้า 76, ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2525.

25. Lampert, L.M., Modern Dairy Products, pp. 221, Chemical Publishing Co., INC., New York, 1975.

26. Kosikowski, F., Cheese and Fermented Milk Foods, pp. 31-36, Edwards Brothers, INC., Michigan, 1966.

27. ประกาย จิตรกร, นมและผลิตภัณฑ์นม, หน้า 140, สมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทย, กรุงเทพมหานคร, 2526.

28. เสถียร วิชัยลักษณะ และ สืบวงศ์ วิชัยลักษณ์, "พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ. 2522," นิติเวชช์, 2523.

29. Foulson, R.R., "Ymer, A Danish Protein-Enriched Fermented Milk Product," International Dairy Congress, 409, 1970.

30. Delaney, A., "Factory-Scale Experiments on the Production of Ymer by Ultrafiltration." Milchwissenschaff, 32 (11), 651-653, 1977.

31. Ulrick, P., "Manufacture of Ymer by Means of Ultrafiltration (UF)," Maelkeritidende, 93 (3), 67-73, 1980.

32. สมเกียรติ สายธนู, "ปริมาณและคุณภาพของนมแพะและแกะ," วารสารสงขลานครินทร์, 7 (1), 83-87, 2528.

33. Smith, A.K., and J. Circle, Soybean: Chemistry and Technology, pp. 110, The AVI Publishing Co., Connecticut, 1978.

34. Mital, B.K., and K.H. Steinkraus, "Growth of Lactic Acid Bacteria in Soy Milk," J. of Food Sci., 39, 1018-1022, 1974.

35. Wilken, W.F., "Effect of Processing Method on Oxidative Off Flavor of Soybean Milk," Food Technology, 21, 960-966, 1967.

36. Obaidy, H.M., and A. M. Siddhigui, "Properties of Broad Bead Lipoxygenase," J. of Food Sci., 46, 622-627, 1981.

37. Holman, R.T., "Substrate Specificity of Soybean Lipoxidase," J. of Biol. Chem., 244, 1149-1152, 1969.

38. Johnson, T.M., and M.E. Zabik, "Gelation Properties of Albumen Proteins, Singly and in Combination," Poultry Sci., 60, 2071-2083, 1981.

39. A.O.A.C., Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists, Washington, D.C., 14th ed., 1984.

40. Hart, F.L. and H.J. Fisher, Modern Food Analysis, pp. 237-238, Springer-Verlag New York, INC., New York, 1971.

41. Indian Standard Institution, "Indian Standard: Method of Test for Dairy Industry," Indian Standard Institution, New Delhi, 1961.

42. Cochran, W.G., and G.M. Cox, Experimental Designs, John Wiley and Sons, New York, 1957.

43. Prabharak, C., "Formulations of Soymilks with Approximate Composition of Human and Cow's Milk," M.S. Thesis, Cornell University, 1976.

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์และตรวจสอบ

1. วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1.1 การหาปริมาณกรด (Titratable Acidity)

สารเคมี

- สารละลายฟีนอฟธาลีน (Phenolphthalein Indicator) เตรียมโดยการละลายฟีนอฟธาลีน 1 กรัม ในเอธิลอัลกอฮอล์ 95% 100 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล ทีละหยดจนหยดแรกให้สีชมพูแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 200 มิลลิลิตร

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล เตรียมโดยการละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์กับน้ำปริมาณเท่า ๆ กัน ในขวดพลาสติก ทิ้งไว้เป็นเวลา 3-4 วัน เพื่อให้โซเดียมไฮดรอกไซด์ส่วนที่ไม่ละลายตกตะกอน จากนั้นใช้สารละลายส่วนใสมาเตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล โดยใช้ Stock Solution ประมาณ 8 มิลลิลิตร ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ติเตรทกับสารมาตรฐานโปตัสเซียมไฮโดรเยน พธาเลต (Potassium Hydrogen Phthalate) เพื่อหาความเข้มข้นที่แน่นอน

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่จะหาปริมาณกรด 2 กรัม เจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 30 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด

3. ติเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล จนกระทั่งถึงจุดยุติ ซึ่งมีสีชมพูอ่อน

คำนวณปริมาณกรดในรูปของกรดแลคติก ตามสูตร

$$\text{ปริมาณกรด} = \frac{N \times V \times 90.08 \times 100}{1,000 \times 2}$$

กำหนดให้ N = ความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

V = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

1.2 การหาปริมาณอะซิติลเมธิลคาร์บินอล (Acetylmethyl carbinol)

สารเคมี

- สารละลายแอลฟาแนพทอล (Alpha naphthol solution) เตรียมโดยละลายแอลฟาแนพทอล 5 กรัม ในเอธิลอัลกอฮอล์ 95% 100 มิลลิลิตร

- สารละลายด่างครีเอทีน (Alkaline creatine solution) เตรียมโดยละลายครีเอทีน 0.3 กรัม ในสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 40%

- สารละลายไดอะซิติล (Diacetyl หรือ 2,3-butanedione stock solution) เตรียมโดยการละลายไดอะซิติล 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้เป็น 1 ลิตร จะได้สารละลายเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

การเตรียมกราฟมาตรฐาน (Standard Curve)

เตรียมสารละลายไดอะซิติลเข้มข้นตั้งแต่ 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ถึง 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยการเจือจางจาก Stock Solution ที่เตรียมไว้แล้ว จากนั้นก็ develop สี ตามวิธีการข้างล่าง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 มิลลิไมครอน

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 50 กรัม ใส่ใน distilling flask

2. นำไปกลั่น โดยให้ได้ distillate 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป develop สี

3. การ develop สี ทำโดย ปิเปต distillate 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ เติมสารละลายแอลฟาแนนทอล 5% 5 มิลลิลิตร และสารละลายครีเอทีน 2 มิลลิลิตร

4. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex Mixer 15 วินาที ทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นก็ผสมอีกครั้งเป็นเวลา 15 วินาที

5. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 545 มิลลิไมครอน โดยใช้น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แทน distillate ในการเตรียม blank

6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้ แล้วอ่านค่าจากกราฟออกมาในรูปของปริมาณไดอะซิติล

7. คำนวณหาปริมาณอะซิติลเมธิลคาร์บินอล โดยนำค่าปริมาณไดอะซิติลที่ได้คูณกับ 1.02

2. วิธีวิเคราะห์ทางกายภาพ

2.1 การตรวจสอบสี

วิธีการ

1. ใส่ตัวอย่างที่ต้องการวัดลงในจานของเครื่อง

2. นำแผ่นสีมาตรฐานมาสวมเข้ากับเครื่อง เปิดไฟและเปิดสวิทช์ให้แผ่นสีทั้ง 5 แผ่น ซึ่งประกอบด้วยแผ่นสีรหัส 10 YR8/6, 5 Y8/12, 5G8/6, N9.25/ และ N8/ หมุน

3. ทำการปรับให้สีในแผ่นสีมาตรฐานมีสีเหมือนกับตัวอย่างที่ตรวจสอบโดยใช้สายตาของผู้วัด เมื่อได้สีที่เหมือนกันแล้ว นำเอาแผ่นสีมาอ่านสัดส่วนขององค์ประกอบของสีโดยทาบกับแผ่นวงกลมที่ปรับเปอร์เซนต์ไว้แล้ว

2.2 การวัดความข้นหนืด

วิธีการ

1. ปรับเครื่องมือให้ได้สมดุลโดยสังเกตจากลูกน้ำ

2. หมุนสกรูเพื่อให้เข็มที่ใช้วัดจุ่มลงในตัวอย่างจนถึงระดับที่กำหนดไว้บนเข็ม

3. เปิดเครื่องให้หมุนตามอัตราเร็วที่ตั้งเอาไว้

4. เมื่อหมุนไปครบ 2 รอบ ก็อ่านค่าที่ได้จากหน้าปัด

5. นำค่าที่อ่านได้ไปคูณกับแฟคเตอร์ที่กำหนด ซึ่งขึ้นอยู่กับอัตราเร็วของการหมุนและเลขของเข็มที่ใช้วัด จะได้ค่าความข้นหนืดตามต้องการ มีหน่วยเป็นเซนติพอยซ์ (cps)

2.3 การตรวจสอบ syneresis ของยแมร์

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักยแมร์ทั้งถ้วย และชั่งน้ำหนักขวดรูปชมพู่ แล้วจดบันทึกไว้

2. ใช้มีดปาดรอบถ้วย แล้วเทลงในกรวยที่ใส่กระดาษกรอง (Whatman No.1) ไว้แล้ว ใช้ขวดรูปชมพู่รองรับน้ำที่แยกออกมา

3. จับเวลา 1 ชั่วโมง ยกกรวยออก ชั่งน้ำหนักที่อยู่ในขวดรูปชมพู่

4. ชั่งน้ำหนักถ้วยยแมร์เปล่าที่เทยแมร์ออกไปแล้ว นำน้ำหนักนี้ไปลบออกจากน้ำหนักยแมร์ทั้งถ้วย จะได้น้ำหนักยแมร์

คำนวณ % Syneresis โดย

$$\% \text{ Syneresis} = \frac{\text{น้ำหนักที่แยกจากเนื้อยแมร์}}{\text{น้ำหนักยแมร์}} \times 100$$

2.4 ตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของลิ่มนม

วิธีการ

1. ใส่ตัวอย่างลิ่มนมลงในหลอดทดสอบ นำไปแช่แข็งโดยการแกว่งในอัลกอฮอล์ผสมกับน้ำแข็งแห้ง (dry ice)

2. ระเหิดน้ำแข็งออกโดยใช้เครื่อง Vacuum Dryer

3. ติดตัวอย่างบนแท่งยึดตัวอย่าง โดยป้ายกาว Silver paint บนแผ่นหน้าของ stub ที่ล้างให้สะอาดด้วย acetone วางตัวอย่างลิ่มนมบนกาวทันที ทิ้งตัวอย่างให้แห้ง 15 นาที

4. ฉาบผิวตัวอย่างด้วยโมเลกุลของทอง (Au) โดยใช้ ion sputter ซึ่งมีหลักการทำงานคือ สามารถกระจายโมเลกุลของธาตุภายใต้สูญญากาศ และกระแสไฟฟ้าที่พอเหมาะ

5. ใส่ตัวอย่างลิ่มนมที่เตรียมแล้วลงในช่องใส่ตัวอย่างในเครื่อง Scanning Electron Microscope

6. จัดภาพที่ต้องการให้เหมาะสม ปรับภาพให้คมชัดโดยใช้โฟกัสละเอียด แล้วถ่ายภาพที่ต้องการ โดยใช้กำลังขยาย 500 และ 2,000 เท่า

3. วิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

3.1 การนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (Total Bacterial Count)

สารเคมี

- สารละลายเปปโตน 0.1%
- Plate Count Agar

วิธีการ

1. เตรียม dilution 10^{-1} โดยชั่งตัวอย่างยแมร์ 10 กรัม ใส่ในขวดที่มีเปปโตน 0.1% 90 มิลลิลิตร เขย่าขวดตัวอย่างอย่างแรงอย่างน้อย 25 ครั้ง แล้วทำ dilution 10^{-6}, 10^{-7} และ 10^{-8}

2. ใช้ปิเปตดูด dilution ที่เตรียมไว้ dilution ละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำ 3 ซ้ำ

3. หลอม plate count agar ที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงถึง 45-50 °ซ เทลงในจานเพาะเชื้อที่ใส่ตัวอย่างไว้แล้วจานละ 10-15 มิลลิลิตร จากนั้นหมุนจานเพาะเชื้อไปทางซ้ายและขวา เพื่อให้ตัวอย่างกระจายไปทั่วจาน ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ, เวลา 2-3 วัน

4. นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดมานับจำนวนโคโลนี โดยเลือกนับเฉพาะที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี

5. การคำนวณ :

Total Viable Count = จำนวนโคโลนีที่นับได้ × dilution

3.2 <u>การนับจำนวนบักเตรีสร้างกรดแลคติก</u> (Lactic Acid Bacteria Count)

<u>สารเคมี</u>

- สารละลายเปปโตน 0.1%
- MRS Agar
- Bromcresol purple
- $CaCO_3$

<u>วิธีการ</u>

1. เตรียม dilution 10^{-1} โดยชั่งตัวอย่างยแมร์ 10 กรัม ใส่ในขวดที่มีเปปโตน 0.1% 90 มิลลิลิตร เขย่าขวดตัวอย่างอย่างแรงอย่างน้อย 25 ครั้ง แล้วทำ dilution 10^{-6}, 10^{-7} และ 10^{-8}

2. ใช้ปิเปตดูด dilution ที่เตรียมไว้ dilution ละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำ 3 ซ้ำ

3. หลอม MRS Agar ที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงถึง 50-55 °ซ เติม Bromcresol purple 0.004% และ $CaCO_3$ 2% ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นเทลงจานเพาะเชื้อที่ใส่ตัวอย่างไว้แล้วจานละ 10-15 มิลลิลิตร หมุนจานเพาะเชื้อไปทางซ้ายและขวา เพื่อให้ตัวอย่างกระจายไปทั่วจาน ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เวลา 2-3 วัน

4. นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดมานับจำนวนโคโลนี โดยเลือกนับเฉพาะที่มีโคโลนี

อยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี และโคโลนีที่นับจะต้องมี clear zone อยู่รอบ ๆ และเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

5. การคำนวณ :

Lactic Acid Bacteria Count = จำนวนโคโลนีที่นับได้ × dilution

3.3 การนับจำนวนยีสต์และรา (Yeast and Mold Count)

สารเคมี

- สารละลายเปปโตน 0.1%
- PDA Agar
- Tartaric Acid 10%

วิธีการ

1. หลอม PDA Agar ที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงถึง 50-55 °ซ เติม Tartaric Acid 10% ลงไปในอัตรา 1 มิลลิลิตร ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 คืน เพื่อให้ผิวหน้าวุ้นแห้ง

2. เตรียม dilution 10^{-1} โดยชั่งตัวอย่างยแมร์ 10 กรัม ใส่ในขวดที่มีเปปโตน 0.1% 90 มิลลิลิตร เขย่าขวดตัวอย่างอย่างแรง อย่างน้อย 25 ครั้ง แล้วทำ dilution 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4}

3. ใช้ปิเปตดูด dilution ที่เตรียมไว้ dilution ละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้แล้ว ทำ 3 ซ้ำ

4. ใช้ Spreader จุ่มอัลกอฮอล์ แล้วลนไฟ ทิ้งให้เย็น จากนั้นเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายไปทั่วผิวหน้าวุ้น ทิ้งไว้สักครู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เวลา 3-5 วัน

5. นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดมานับจำนวนโคโลนี

6. การคำนวณ :

Yeast and Mold Count = จำนวนโคโลนีที่นับได้ × dilution × 10

3.4 การตรวจสอบ Escherichia coli

สารเคมี

- Brilliant green lactose bile broth
- Eosin methylene blue agar
- Lactose broth
- Nutrient agar slant
- Tryptone broth
- Methyl red indicator
- Voges-proskauer test reagent
- Kovac's reagent
- Glucose peptone water
- Peptone 0.1%

วิธีการ

ก. Presumptive test (MPN Method)

1. ใส่ตัวอย่างที่เตรียมใน dilution ที่เหมาะสมลงใน Brilliant green lactose bile broth โดยใช้ dilution ละ 5 หลอด

2. บ่มเชื้อที่ 35 °ซ 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยนับจำนวนหลอดที่เกิดกรดและแก๊สใน durham tube หลอดที่มีกรดและแก๊สให้ถือว่าผล presumptive เป็นบวก

ข. Confirm test

1. ใช้ loop ที่ลนไฟฆ่าเชื้อแล้ว จุ่มในหลอดทดลองที่ให้ผล presumptive test เป็นบวก นำมา streak ให้เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ บน EMB agar โดยบ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ, 18-24 ชั่วโมง

2. ตรวจผลโดยสังเกตดูโคโลนีโคลิฟอร์ม ถ้าเป็น E. coli จะมีสีเข้มหรือดำ และที่ผิวมีสีเขียวเป็นเงาโลหะมัน ส่วน A. aerogenes โคโลนีจะมีสีชมพูอ่อนชั้นแฉะกว่า E. coli

ค. Complete test

1. ใช้ loop แตะโคโลนีของบักเตรี E. coli แล้ว inocubate ลงใน lactose broth และ NA slant

2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °ซ 48 ชั่วโมง ถ้าเกิดแก๊สในหลอดอาหาร lactose broth ให้รายงานผลเป็นบวก เพราะบักเตรีโคลิฟอร์มสามารถหมักแลคโตสได้ภายใน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อในหลอด NA slant มาย้อมสีดูรูปร่าง การติดแกรม และทดสอบ IMViC ลักษณะของบักเตรีโคลิฟอร์มจะมีรูปร่างเป็นท่อน แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ สามารถหมักแลคโตสให้กรดและแก๊สที่อุณหภูมิ 35 °ซ ภายใน 48 ชั่วโมง

สำหรับปฏิกิริยาสำหรับ IMViC test เป็นดังนี้

I = Indole production

M = Methyl red test

Vi = Voges Proskauer reaction

C = Citrate Utilization

	I	M	Vi	C
Escherichia coli	+	+	-	-
Aerobacter aerogenes	-	-	+	+

4. วิธีตรวจสอบทางประสาทสัมผัส

การศึกษาคุณภาพในด้านต่าง ๆ ของยแมร์โดยใช้ผู้ทดสอบนั้น ใช้วิธีการให้คะแนนแบบ Hedonic Scale โดยแบ่งคะแนนออกเป็น 5 ช่วง ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 13-15 คน สำหรับตัวอย่างแบบทดสอบที่ใช้เป็นดังนี้

แบบทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสสำหรับผลิตภัณฑ์ยแมร์

ชื่อผู้ทดสอบ.....เพศ.....วันที่.....เวลา.....น.

จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ให้มา กรุณาประเมินคุณภาพทางด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัส พร้อมทั้งให้คะแนนตามความเห็นของท่าน โดยเทียบจากสเกลที่ให้ไว้นี้ ทั้งนี้ไม่จำเป็นต้องเป็นตัวเลขลงตัว เช่น ถ้าท่านเห็นว่าคะแนนสีอยู่ในช่วงระหว่างดีและดีมาก อาจจะให้คะแนน 4.5 เป็นต้น (ควรเป็นเลขทศนิยม 1 ตำแหน่ง)

1 2 3 4 5

ไม่ดีมาก ไม่ดี พอใช้ ดี ดีมาก

หมายเหตุ "กรุณาบ้วนปากทุกครั้งที่จะชิมตัวอย่างผลิตภัณฑ์ถัดไป"

หมายเลขตัวอย่างผลิตภัณฑ์	ลักษณะคุณภาพ					การยอมรับรวม
	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะ .....

.....

.....

.....

ภาคผนวก ข

ตัวอย่างการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการศึกษาวิจัยนี้ได้ใช้แผนการทดลอง 2 แบบ คือ

1. แผนการทดลองแบบ Factorial Design ประเภท Asymmetric Three Factor Experiment สำหรับศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อสร้างกรด และแผนการทดลองแบบ Asymmetric Two Factor Experiment สำหรับศึกษาหาชนิดของเชื้อสร้างกลิ่นที่เหมาะสมและหาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์

2. แผนการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design สำหรับศึกษาผลของการทดแทนน้ำนมวัวด้วยน้ำนมชนิดอื่น และผลของการใช้น้ำนมคืนรูปเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตยแมร์

เนื่องจากการวิเคราะห์ข้อมูลที่ใช้แผนการทดลองแบบ Factorial Design ประเภท Asymmetric Two Factor Experiment และ Randomized Completely Block Design มีการคำนวณไม่ยุ่งยากมากนัก ดังนั้นในที่นี้จึงขอยกตัวอย่างการคำนวณเฉพาะแผนการทดลองแบบ Factorial Design ประเภท Aymmetric Three Factor Experiment

แผนการทดลองแบบ Factorial Design ประเภท Asymmetric Three Factor Experiment

เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของชนิดเชื้อสร้างกรด อุณหภูมิที่บ่ม และระยะเวลาบ่ม ที่มีต่อค่า pH และความเป็นกรด

วิเคราะห์ค่วความแปรปรวน (Analysis of variance)

Treatment combination	Factor A	Factor B	Factor C
$a_1b_1c_1$	a_1	b_1	c_1
$a_2b_2c_2$	a_2	b_2	c_2
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	.	.
.	.	.	.
$a_nb_nc_n$	a_n	b_n	c_n

ในแต่ละการทดลองมีการทดลองซ้ำ จะได้ดังนี้

Treatment combination	การทดลองซ้ำ 1 2 3 r	ผลรวม
$a_1b_1c_1$		
$a_2b_2c_2$		
.		
.		
.		
.		
.		
$a_nb_nc_n$		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำนวณค่าต่าง ๆ โดยใช้สูตรต่อไปนี้

แหล่งความแปรปรวน (source of variation)	ผลบวกกำลังสอง (Sum of Square - SS)	ชั้นแห่งความเป็นอิสระ (Degree of freedom)
Treatment A	$SS_A = \sum_{i=1}^{a} Y_{i...}^2 / bcr - CT$	(a-1)
Treatment B	$SS_B = \sum_{j=1}^{b} Y_{.j..}^2 / acr - CT$	(b-1)
Treatment C	$SS_C = \sum_{k=1}^{c} Y_{..k.}^2 / abr - CT$	(c-1)
AB	$SS_{AB} = \left[\sum_{i=1}^{a} \sum_{j=1}^{b} Y_{ij..}^2 / cr - CT\right] - SS_A - SS_B$	(a-1)(b-1)
BC	$SS_{BC} = \left[\sum_{i=1}^{b} \sum_{k=1}^{c} Y_{.jk.}^2 / ar - CT\right] - SS_B - SS_C$	(b-1)(c-1)
AC	$SS_{AC} = \left[\sum_{i=1}^{a} \sum_{k=1}^{c} Y_{i.k.}^2 / br - CT\right] - SS_A - SS_C$	(a-1)(c-1)
ABC	$SS_{ABC} = \left[\sum_{i=1}^{a} \sum_{j=1}^{b} \sum_{k=1}^{c} Y_{ijk.}^2 / r - CT\right] - SS_A - SS_B - SS_C$	(a-1)(b-1)(c-1)
Error	$SS_E = SS_Y$ - all other SS	abc (r-1)
Total	$SS_Y = \sum_{i=1}^{a} \sum_{j=1}^{b} \sum_{k=1}^{c} \sum_{i=1}^{r} Y_{ijkl}^2 = CT$	(abcr-1)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$CT = \text{Correction Term} = \frac{\left(\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{c}\sum_{l=1}^{r} Y_{ijkl}\right)^2}{n}$$

n = abcr

a = จำนวนทรีตเมนต์ A

b = จำนวนทรีตเมนต์ B

c = จำนวนทรีตเมนต์ C

r = จำนวนซ้ำ

MS = Mean Square = SS/df

Testing hypothesis :

$H : \alpha_i = 0$ ใช้ F-test โดยค่า $f = MS_{A/MS_E}$

เทียบกับ Critical value $f\alpha$, (a-1), abc(r-1)

$H : \beta_j = 0$ ใช้ F-test โดยค่า $f = MS_{B/MS_E}$

เทียบกับ Critical value $f\alpha$, (b-1), abc(r-1)

$H : \gamma_k = 0$ ใช้ F-test โดยค่า $f = MS_{C/MS_E}$

เทียบกับ Critical value $f\alpha$, (c-1), abc(r-1)

$H : (\alpha\beta)_{ij} = 0$ ใช้ F-test โดยค่า $f = MS_{AB/MS_E}$

Critical value $f\alpha$, (a-1)(b-1), abc(r-1)

ตัวอย่างการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพื่อศึกษาผลของชนิดเชื้อสร้างกรด อุณหภูมิที่บ่ม และระยะเวลาบ่มที่มีต่อค่า pH ข้อมูลเป็นดังนี้

	A_1			A_2			A_3			A_4			A_5		
	B_1	B_2	B_3	B_1	B_2	B_3	B_1	B_2	B_3	B_1	B_2	B_3	B_1	B_2	B_3
C_1	6.40	6.41	6.38	6.33	6.37	6.43	6.42	6.39	6.36	6.35	6.43	6.41	6.37	6.39	6.43
	6.35	6.30	6.31	6.41	6.42	6.38	6.34	6.43	6.44	6.42	6.40	6.39	6.41	6.44	6.36
C_2	5.60	5.50	5.96	5.86	5.58	5.92	5.81	5.44	5.32	6.24	5.90	6.01	5.42	5.20	5.40
	5.78	5.31	6.25	5.61	5.30	5.70	5.62	5.21	5.60	6.05	6.12	6.22	5.70	5.45	5.59
C_3	5.34	4.96	5.90	5.28	4.91	5.02	4.98	4.89	4.96	6.15	5.86	5.99	5.01	4.77	5.12
	5.10	4.74	6.12	5.01	4.60	5.38	4.76	4.62	4.76	5.90	5.58	5.70	5.27	4.98	5.37
C_4	4.82	4.70	5.94	4.97	4.43	4.86	4.62	4.68	4.79	5.92	5.60	5.84	4.80	4.78	4.97
	4.61	4.50	5.80	4.73	4.65	4.60	4.75	4.51	4.64	5.71	5.39	5.61	4.98	4.60	4.68
C_5	4.58	4.47	5.84	4.72	4.40	4.61	4.60	4.50	4.65	5.79	5.25	5.69	4.70	4.59	4.74
	4.50	4.40	5.78	4.60	4.31	4.65	4.55	4.46	4.61	5.65	5.34	4.60	4.80	4.50	4.63
C_6	4.55	4.45	5.83	4.68	4.36	4.59	4.58	4.51	4.64	5.76	5.27	5.62	4.71	4.52	4.71
	4.51	4.41	5.80	4.61	4.32	4.63	4.54	4.45	4.60	5.64	5.32	5.65	4.76	4.56	4.62

โดยที่ A = ชนิดเชื้อสร้างกรด มี 5 ชนิดคือ a_1, a_2, a_3, a_4 และ a_5

B = อุณหภูมิ มี 3 ระดับคือ b_1, b_2 และ b_3

C = เวลา มี 6 ระดับคือ c_1, c_2, c_3, c_4, c_5 และ c_6

r = จำนวนซ้ำ มี 2 ซ้ำคือ r_1 และ r_2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการคำนวณ

1) วิเคราะห์ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด คำนวณค่า Sum of Squares ต่าง ๆ ได้ดังนี้

$$C = \frac{Y_{..}^2}{tr} = \frac{(959.56)^2}{90x2} = 5115.31$$

$$SS_{total} = \sum_{ij}\sum Y_{ij}^2 - \frac{Y_{..}^2}{tr}$$

$$= 5200.62 - 5115.31$$

$$= 85.31$$

$$SS_{treatment} = \frac{\sum_i Y_{i.}^2}{r} - \frac{Y_{..}^2}{tr}$$

$$= 5198.7 - 5115.31$$

$$= 83.39$$

$$SS_{error} = 85.31 - 83.39 = 1.92$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2) วิเคราะห์ตามแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียล โดยแบ่ง $SS_{treatment}$ ออกเป็นความผันแปรจากอิทธิพลหลักและอิทธิพลร่วม โดยการสร้างตารางย่อย cxb, cxa และ bxa

ตาราง cxb

C	B			(C_K)
	1	2	3	
1	$63.8=c_1b_1$	$63.9=c_1b_2$	$63.9=c_1b_3$	191.6
2	$57.7=c_2b_1$	$55.0=c_2b_2$	$57.9=c_2b_3$	170.6
3	$52.8=c_3b_1$	$49.9=c_3b_2$	$54.3=c_3b_3$	157.0
4	$49.9=c_4b_1$	$47.8=c_4b_2$	$51.7=c_4b_3$	149.4
5	$48.5=c_5b_1$	$46.2=c_5b_2$	$50.8=c_5b_3$	145.5
6	$48.3=c_6b_1$	$46.1=c_6b_2$	$50.7=c_6b_3$	145.2
(b_j)	321.0	309.1	329.4	959.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง cxa

C	A					(C_K)
	1	2	3	4	5	
1	$38.1=c_1a_1$	$38.3=c_1a_2$	$38.4=c_1a_3$	$38.4=c_1a_4$	$38.4=c_1a_5$	191.6
2	$34.4=c_2a_1$	$33.9=c_2a_2$	$33=c_2a_3$	$36.5=c_2a_4$	$32.7=c_2a_5$	170.6
3	$32.2=c_3a_1$	$30.2=c_3a_2$	$28.9=c_3a_3$	$35.2=c_3a_4$	$30.5=c_3a_5$	157.0
4	$30.4=c_4a_1$	$28.2=c_4a_2$	$27.9=c_4a_3$	$34.1=c_4a_4$	$28.8=c_4a_5$	149.4
5	$29.6=c_5a_1$	$27.3=c_5a_2$	$27.4=c_5a_3$	$33.3=c_5a_4$	$27.9=c_5c_5$	145.5
6	$29.5=c_6a_1$	$27.2=c_6a_2$	$27.3=c_6a_3$	$33.3=c_6a_4$	$27.8=c_6c_5$	145.2
(a_i)	194.2	185.2	183.0	210.8	186.3	959.5

ตาราง bxa

B	A					(b_j)
	1	2	3	4	5	
1	$62.1=b_1a_1$	$62.8=b_1a_2$	$61.6=b_1a_3$	$71.6=b_1a_4$	$62.9=b_1a_5$	321.0
2	$60.2=b_2a_1$	$59.7=b_2a_2$	$60.1=b_2a_3$	$68.5=b_2a_4$	$60.8=b_2a_5$	309.1
3	$71.9=b_3a_1$	$62.8=b_3a_3$	$61.4=b_3a_3$	$70.7=b_3a_4$	$62.6=b_3a_5$	329.4
(a_i)	194.2	185.2	183.0	210.8	186.3	959.5

คำนวณค่า sum of squares ต่าง ๆ ได้ดังนี้

$$SS(A) = \sum_i \frac{(a_i)^2}{rbc} - C$$

$$= \frac{(194.2)^2 + (185.2)^2 + \ldots + (186.3)^2}{(2)(3)(6)} - C$$

$$= 14.32$$

$$SS(B) = \sum_j \frac{(b_j)^2}{rac} - C$$

$$= \frac{(321)^2 + (309.1)^2 + (329.4)^2}{(2)(5)(6)} - C$$

$$= 3.46$$

$$SS(C) = \sum_k \frac{(C_k)^2}{rab} - C$$

$$= \frac{(191.6)^2 + (170.6)^2 + \ldots + (145.2)^2}{(2)(5)(6)} - C$$

$$= 55.51$$

$$SS(AB) = \sum_{i,j} \frac{(a_1 b_j)^2}{rc} - C - SS(A) - SS(B)$$

$$= \frac{(62.1)^2 + (60.2)^2 + \ldots + (62.6)^2}{(2)(6)} - 5115.31 - 14.32 - 3.46$$

$$= 4.46$$

$$SS(AC) = \sum_{j,k} \frac{(a_i c_k)^2}{rb} - C - SS(A) - SS(C)$$

$$= \frac{(38.1)^2 + (34.4)^2 + \ldots + (27.8)^2}{(2)(6)} - 5115.31 - 14.32 - 55.51$$

$$= 3.78$$

$$SS(BC) = \sum_{j,k} \frac{(b_j c_k)^2}{ra} - C - SS(B) - SS(C)$$

$$= \frac{(63.8)^2 + (57.7)^2 + \ldots + (50.7)^2}{(2)(5)} - 5115.31 - 3.46 - 55.51$$

$$= 0.88$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$SS(ABC) = \sum_{i,j,k} \frac{(a_i b_j c_k)^2}{r} - C\text{-}SS(A)\text{-}SS(B)\text{-}SS(C)\text{-}SS(AB)\text{-}SS(AC)\text{-}SS(BC)$$

$$= \frac{(12.75)^2+(11.38)^2+\ldots+(9.33)^2}{2}\text{-}5115.31\text{-}14.32\text{-}3.46\text{-}55.51\text{-}4.46\text{-}3.78\text{-}0.88$$

$$= 0.98$$

สรุปผลของการวิเคราะห์ความแปรปรวนได้ดังตารางข้างล่าง

Sources	df	SS	MS	F
Treatments	abc-1	14.32	3.58	179*
A	(a-1)=4	3.46	1.73	86.5*
B	(b-1)=2	55.51	11.10	555*
C	(c-1)=5	4.46	0.56	28*
AB	(a-1)(b-1)=8	3.78	0.19	9.0*
AC	(a-1)(c-1)=20	0.88	0.09	4.5*
BC	(b-1)(c-1)=10	0.98	0.02	1.0ns
ABC	(a-1)(b-1)(c-1)=40	1.92	0.02	
Error	abc(r-1)=90			
Total	rabc-1 = 179	85.31		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การเตรียมเชื้อเริ่มต้นและการเก็บรักษา

การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

ก่อนที่จะนำเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมาใช้ในการทดลองจะต้องทำการเพาะเลี้ยงในลิตมัสมิลค์ (litmus milk) ติดต่อกัน 3-4 ครั้ง เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียปรับตัวเข้ากับอาหาร เพราะจะทำให้มีความแข็งแรงดี และมี activity สูงสุด จากนั้นจึงนำมาเพาะเลี้ยงในหางนมผงคืนรูป 11% TS เพื่อที่จะเป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การเก็บรักษา

เชื้อแบคทีเรียทุกชนิดที่ใช้ในการทดลองจะเก็บรักษาในสภาพเชื้อเหลวโดยการเพาะเลี้ยงในลิตมัสมิลค์ และจะถ่ายเชื้อทุก ๆ 2 สัปดาห์ ตลอดระยะเวลาของการทดลอง เพื่อรักษาสภาพและคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียให้คงที่

นอกจากนี้ระหว่างการเก็บรักษาจะทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อทุก ๆ 4 สัปดาห์ โดยการนำมา streak บน MRS Agar ซึ่งเติมสารที่เป็นอินดิเคเตอร์ คือ bromcresol purple 0.004% และ $CaCO_3$ 2% เพื่อที่จะสังเกตเห็นได้ชัดถ้าหากมีการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่น กล่าวคือ แบคทีเรียแลคติกจะให้ลักษณะโซนใสรอบโคโลนี และจะเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสีเหลือง จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบอีกครั้งโดยการย้อมสีแกรมเพื่อดูการติดสีและการเรียงตัวของเซล

ประวัติผู้เขียน

นายบวรศักดิ์ ลีนานนท์ เกิดเมื่อวันที่ 7 ธันวาคม พ.ศ. 2503 ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร) จากคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ในปี พ.ศ. 2526 เคยทำงานในโครงการวิจัย IDRC ทางสาขาจุลชีววิทยา ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นระยะเวลา 1 ปี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย