บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ และวิธีวิเคราะห์

3.1.1 วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง มีดังนี้

- น้ำนมดิบ ใช้น้ำนมวัวจากโรงนมมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และน้ำนมแพะซึ่งซื้อจากชาวบ้านที่เลี้ยงแพะในเขตยานนาวา กรุงเทพฯ นำมาผ่านกระบวนการให้ความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์ LTLT

- น้ำนมถั่วเหลือง เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการตามกระบวนการซึ่งแสดงไว้ในรูปที่ 29 หน้า 50 เมล็ดถั่วเหลืองที่ใช้ซื้อจากตลาดบางเขน

- นมผงธรรมดา (ไขมันเต็มอัตรา) ตราโคสต์ ผลิตโดยฮอลแลนด์ แคน มิลค์ จำกัด ประเทศฮอลแลนด์ ซื้อจากห้างสรรพสินค้าเซ็นทรัล ลาดพร้าว

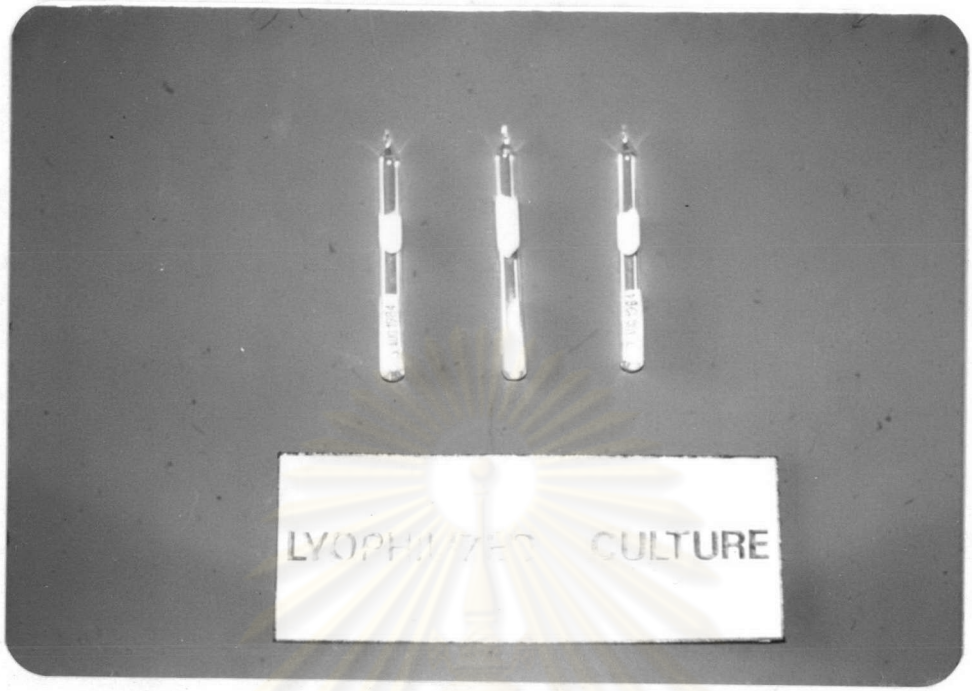
- นมผงขาดมันเนย ตราสลิม ผลิตโดยบริษัทโปรมาร์ท อินเตอร์เนชัลแนล จำกัด ซื้อจากห้างสรรพสินค้าเซ็นทรัล ลาดพร้าว

- เชื้อจุลินทรีย์ ได้จาก 2 แหล่ง คือ เชื้อผง (lyophilized culture) (รูปที่ 6) เก็บใน ampoule จากศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ประจำภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (MIRCEN) และเชื้อเหลว (liquid culture) เก็บในลิตมัสมิลค์ (รูปที่ 7) จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

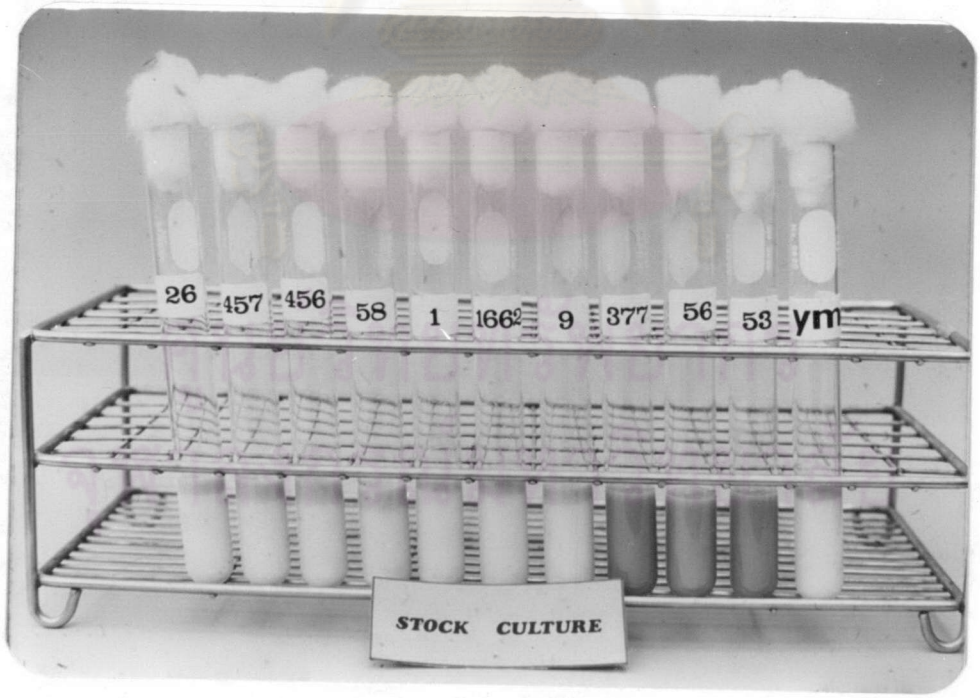
3.1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ประกอบด้วย

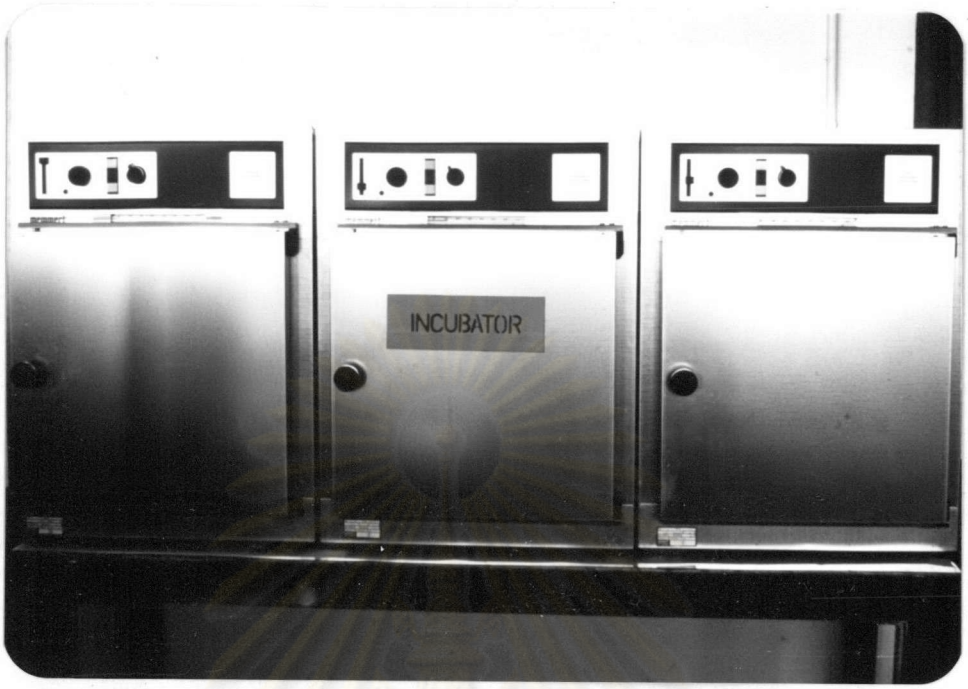
- หม้ออังไอน้ำ (Water Bath) ซึ่งมี thermostat ควบคุมอุณหภูมิ
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (รูปที่ 8)
- ตู้ถ่ายเชื้อแบบ Laminar Flow (รูปที่ 9)



รูปที่ 6 ลักษณะของเชื้อผงซึ่งเก็บใน ampoule



รูปที่ 7 ลักษณะของเชื้อเหลวซึ่งเก็บในลิตมัสมิลค์



รูปที่ 8 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

รูปที่ 9 ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar Flow

- กล้องจุลทรรศน์ (Phase Contrast Microscope) Olympus PM-6, Versatile Camera System ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (รูปที่ 10)

- เครื่องตรวจนับจำนวนโคโลนี (Colony Counter) (รูปที่ 11)

- เครื่องวัดพีเอช (pH meter) Ingold Type 646

- โฮโมจีไนเซอร์ (Homogenizer) Model MT-21, แบบสองขั้นตอนของภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (รูปที่ 12)

- ถังหมักนม (Vat) (รูปที่ 13)

- ถ้วยพลาสติก Polystyrene พร้อมฝาปิด จากบริษัทคัสตอมแพค จำกัด

3.1.3 <u>วิธีวิเคราะห์</u> แบ่งออกเป็น 3 วิธี คือ

3.1.3.1 <u>วิธีวิเคราะห์ทางกายภาพ</u>

- วัดสีโดยใช้ Macbeth Munsell Disc Colorimeter (รูปที่ 14)

- วัดความเข้มข้นโดยใช้ Brookfield Viscometer Model : RVT, ใช้เข็มเบอร์ 7 (รูปที่ 15)

- วัดเปอร์เซนต์ของเวย์ที่แยกจากลิ่มนมตามวิธีการของ Johnson & Zabik (38)

- ตรวจสอบโครงสร้างภายในของลิ่มนมโดยใช้ Microscope Model : JEM-T20 (รูปที่ 17) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.3.2 <u>วิธีวิเคราะห์ทางเคมี</u>

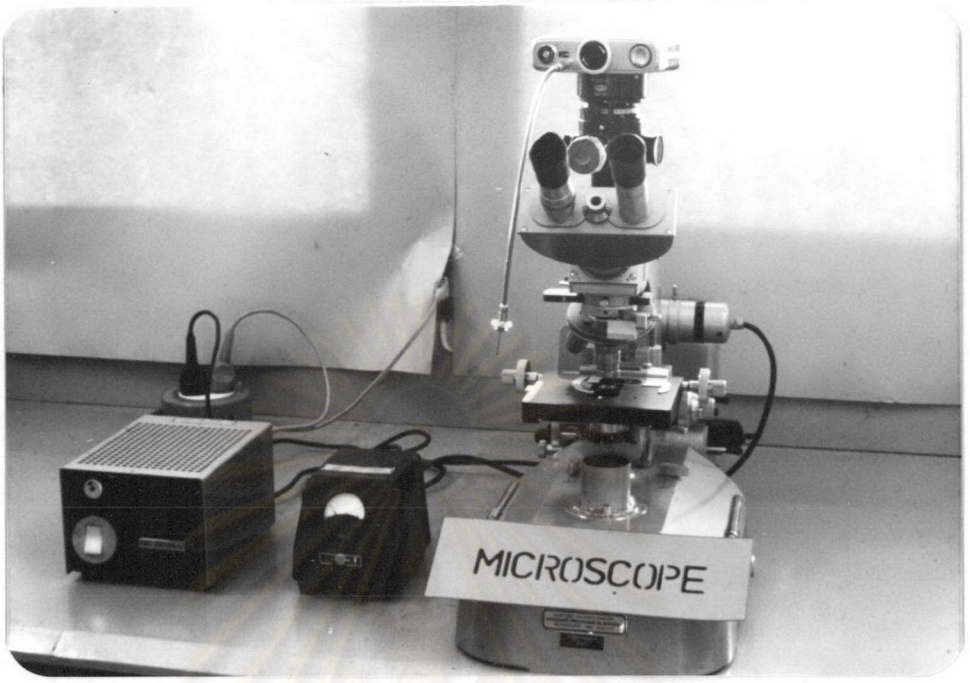
- หาองค์ประกอบทางเคมีในน้ำนมและผลิตภัณฑ์ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน แลคโตส โดยใช้ Milko Scan 104 TYPE 19900 ที่กองควบคุมโรคระบาด กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (รูปที่ 16)

- วัดพีเอชโดยใช้ pH Meter

- หาปริมาณกรดในรูปของกรดแลคติก (39)

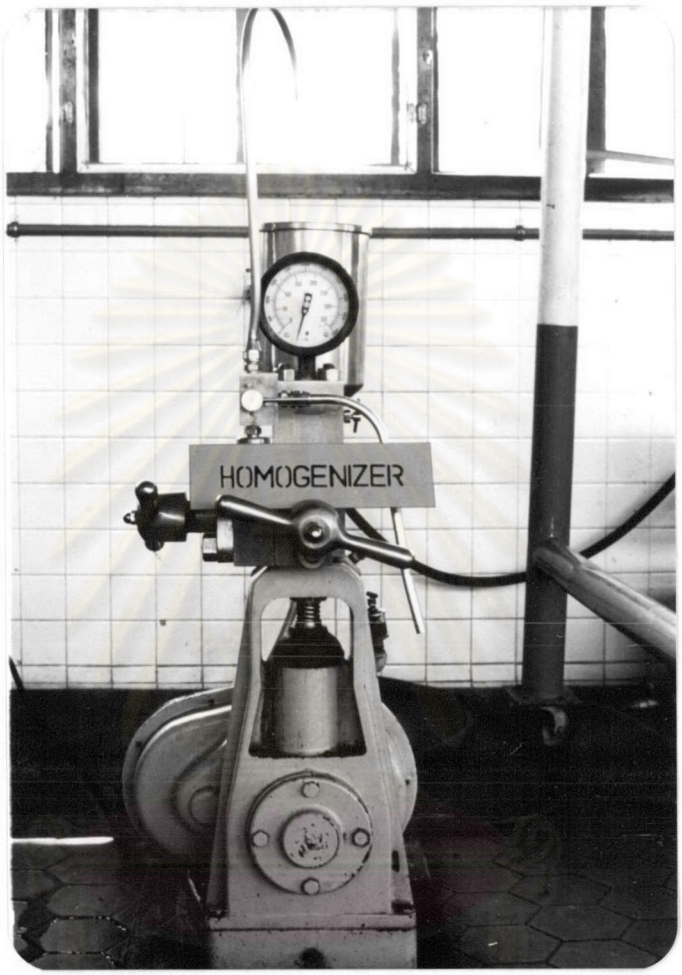
- หาปริมาณ Acetylmethyl carbinol โดยวิธีวัดการดูดกลืนแสง (40) ด้วยเครื่อง spectrophotometer (รูปที่ 18)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 กล้องจุลทรรศน์ (Phase Contrast Microscope) Olympus PM-6, Versatile Camera System

รูปที่ 11 เครื่องตรวจนับจำนวนโคโลนี (Colony Counter)



รูปที่ 12 โฮโมจีไนเซอร์ (Homogenizer) Model MT-21

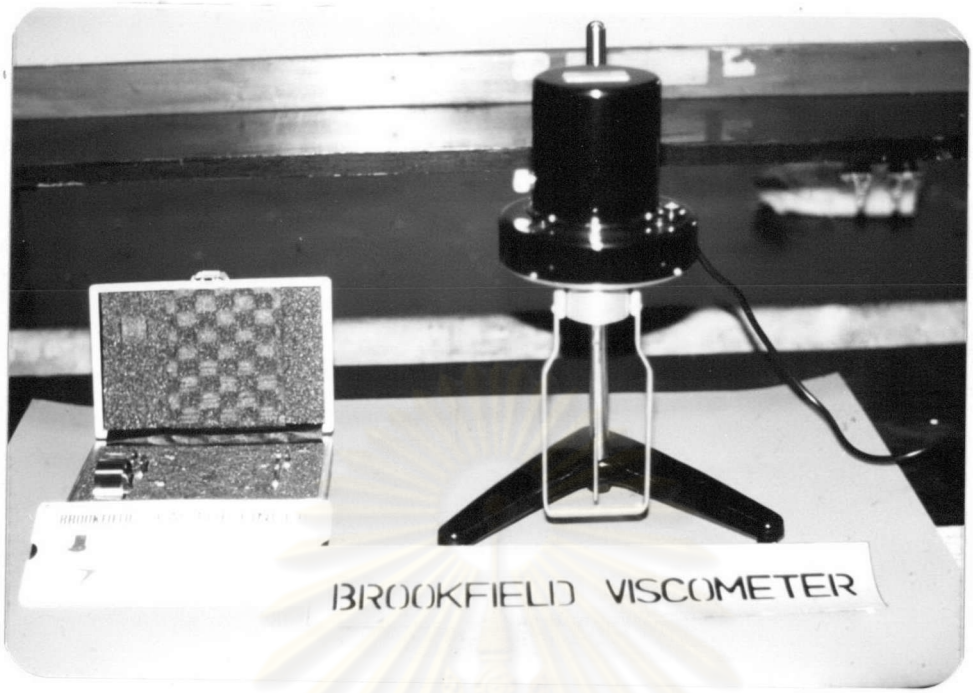
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 13 ถังหมักนม (Vat)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 14 Macbeth Munsell Disc Colorimeter Model No. BBX 320DC

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 Brookfield Viscometer Model : RVT

รูปที่ 16 Milko Scan 104 Type 19900

รูปที่ 17 Scanning Electron Microscope

Model : JEM-T20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 18 Spectrophotometer ของ Shimadzu รุ่น UV 240

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.3.3 วิธีวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (41)

- หาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด
- หาจำนวนแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก
- หาจำนวนยีสต์และรา
- ตรวจสอบหา Escherichia coli

3.1.3.4 วิธีประเมินผลทางประสาทสัมผัส

ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 13-15 คน ซึ่งเป็นนิสิตทั้งปริญญาตรีและโท ของภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยฝึกให้รู้จักกับผลิตภัณฑ์ตัวอย่างที่สั่งซื้อเข้ามา และกำหนดเกณฑ์มาตรฐานให้ตามแบบสอบถามในภาคผนวก โดยใช้วิธีให้คะแนน (Scoring Method) ตั้งแต่ 1-5 ตามลักษณะต่อไปนี้

- ลักษณะปรากฏ
- สี
- กลิ่น
- รสชาติ
- เนื้อสัมผัส
- การยอมรับรวม

3.2 ขั้นตอนการวิจัย

การวิจัยนี้ได้แบ่งขั้นตอนการวิจัยออกเป็น 5 ขั้นตอน คือ

3.2.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมที่ใช้เป็นวัตถุดิบและของผลิตภัณฑ์ที่ได้

อุ่นน้ำนมที่จะตรวจสอบที่อุณหภูมิ 40 °ซ เพื่อให้ไขมันละลายแล้ววิเคราะห์องค์ประกอบด้วยเครื่อง Milko Scan 104 อ่านค่าองค์ประกอบแต่ละชนิด ในกรณีที่เป็นผลิตภัณฑ์ใช้ตัวอย่าง 10 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วเจือจางให้เป็น 100 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Milko Scan 104 เช่นเดียวกับน้ำนมสด

3.2.2 หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตยแมร์จากน้ำนมวัว

3.2.2.1 ศึกษาสภาวะการสร้างกรดที่เหมาะสมของเชื้อสร้างกรด

ในการทดลองนี้แปรปัจจัยต่าง ๆ 4 ปัจจัย คือ ชนิดของเชื้อสร้างกรด (A) ปริมาณเชื้อที่ใช้ (B, %) อุณหภูมิที่ใช้บ่ม (C, °ซ) และระยะเวลาบ่ม (D, ช.ม.) โดยแต่ละปัจจัยมีชนิดและระดับดังนี้

A	B	C	D
a_1 = Streptococcus lactis 26	b_1 = 0.5	c_1 = 30	d_1 = 0
a_2 = Streptococcus lactis 457	b_2 = 1.0	c_2 = 37	d_2 = 4
a_3 = Streptococcus cremoris 1	b_3 = 2.0	c_3 = 43	d_3 = 8
a_4 = Streptococcus cremoris 58	b_4 = 3.0		d_4 = 12
a_5 = Streptococcus cremoris 456	b_5 = 4.0		d_5 = 16
			d_6 = 20

วิธีการ

1. นำน้ำนมดิบที่ผ่านการโฮโมจีไนซ์แล้ว มาพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิ 90 °ซ 30 นาที
2. ทำให้เย็นลงมาถึงระดับอุณหภูมิที่ใช้บ่ม
3. เติมเชื้อสร้างกรดลงไปตามปริมาณที่ต้องการ
4. คนส่วนผสมให้เข้ากัน
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่กำหนด
6. ติดตามผลโดยการวัดพีเอชและความเป็นกรด แล้วเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างกรดได้เร็ว และให้ลิ่มนมที่มีลักษณะดี
7. วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ โดยใช้ Factorial Design แบบ Asymmetric Four Factor Experiment ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตัวอย่างโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range (42)

3.2.2.2 ศึกษาหาชนิดของเชื้อสร้างกลิ่นที่เหมาะสม

ในการทดลองนี้แปรปัจจัยต่าง ๆ 3 ปัจจัย คือ ชนิดของเชื้อสร้างกลิ่น (A) ปริมาณเชื้อผสมที่ใช้ (B, %) และระยะเวลาบ่ม (C, ช.ม.) โดยแต่ละปัจจัยมีชนิดและระดับดังนี้

A	B	C
a_1 = Leuconostoc dextranicum 56	b_1 = 2	d_1 = 0
a_2 = Leuconostoc dextranicum 377	b_2 = 3	d_2 = 5
a_3 = Leuconostoc mesenteroides 53	b_3 = 4	d_3 = 10
a_4 = Streptococcus diacetylactis 9	b_4 = 5	d_4 = 15
a_5 = Streptococcus diacetylactis 1662		d_5 = 20

สำหรับปัจจัยอื่น ๆ คือ ชนิดและปริมาณของเชื้อสร้างกรด อุณหภูมิที่ใช้บ่ม จะใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.2.1 ส่วนเชื้อสร้างกลิ่นจะใช้ในอัตรา 2% โดยปริมาตรและผสมกับเชื้อสร้างกรดในอัตราส่วน 1:1

วิธีการ

1. นำน้ำนมดิบที่ผ่านการโฮโมจีไนซ์แล้ว มาพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิ 90 °ซ, 30 นาที

2. ทำให้เย็นลงมาที่ระดับอุณหภูมิที่ใช้บ่ม

3. เติมเชื้อสร้างกรดและเชื้อสร้างกลิ่นลงในน้ำนมในอัตราส่วน 1:1 โดยปรับให้มีปริมาณเชื้อผสมเป็น 2, 3, 4 และ 5% โดยปริมาตร

4. คนส่วนผสมให้เข้ากัน

5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.2.1

6. ติดตามผลโดยการวัดพีเอช ความเป็นกรด และปริมาณ Acetylmethyl carbinol แล้วเลือกเชื้อผสมที่ให้ค่า Acetylmethyl carbinol สูงสุด พร้อมทั้งให้ลิ่มนมที่มีลักษณะดี โดยจะพิจารณาร่วมกับค่าพีเอชและความเป็นกรดด้วย

7. วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ โดยใช้ Factorial Design แบบ Asymmetric Three Factor Experiment ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตัวอย่าง โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range (42)

3.2.3 ศึกษาการใช้น้ำนมชนิดอื่นทดแทนน้ำนมวัว

ในการทดลองได้นำน้ำนมแพะผสมกับน้ำนมวัวและน้ำนมถั่วเหลืองผสมกับน้ำนมวัว โดยผสมในอัตรา 0, 20, 40, 60, 80 และ 100% โดยปริมาตร

วิธีการ

1. นำน้ำนมที่ได้จากการผสมในอัตราส่วนที่กำหนดมาพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิ 90 °ซ, 30 นาที
2. ทำให้น้ำนมเย็นลงมาที่ระดับอุณหภูมิที่ใช้บ่ม
3. เติมเชื้อผสมลงในน้ำนม โดยใช้ชนิดและปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.2
4. คนส่วนผสมให้เข้ากัน
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.2
6. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาประเมินผลทางประสาทสัมผัส
7. วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตัวอย่างโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range (42)

3.2.4 ศึกษาการใช้น้ำนมคืนรูปในการผลิตยแมร์

ในการทดลองได้นำนมผงธรรมดาและนมผงขาดมันเนยมาคืนรูปโดยปรับให้ได้ปริมาณของแข็งไม่รวมไขมัน (SNF) 9 และ 12% สำหรับนมผงแต่ละชนิด

วิธีการ

1. นำน้ำนมคืนรูปซึ่งละลายเข้ากันดีแล้ว มาพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิ 90 °ซ 30 นาที
2. ทำให้น้ำนมเย็นลงมาที่ระดับอุณหภูมิที่ใช้บ่ม
3. เติมเชื้อผสมลงในน้ำนม โดยใช้ชนิดและปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.2
4. คนส่วนผสมให้เข้ากัน
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.2

6. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาประเมินผลทางประสาทสัมผัส

7. วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยใช้แผนการทดลองแบบ Randomized Completely Block Design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตัวอย่างโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range (42)

3.2.5 ศึกษาหาอายุการเก็บของยแมร์จากน้ำนมวัว

ในการทดลองได้นำผลิตภัณฑ์ยแมร์ที่ได้จากการใช้น้ำนมวัวเป็นวัตถุดิบ บรรจุลงในถ้วย Polystyrene แล้วปิดฝา จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิต่างกัน แล้วสุ่มตัวอย่างมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ

วิธีการ

1. นำน้ำนมวัวมาพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิ 90 °ซ, 30 นาที

2. ทำให้น้ำนมเย็นลงมาที่ระดับอุณหภูมิที่ใช้บ่ม

3. เติมเชื้อผสมลงในน้ำนม โดยใช้ชนิดและปริมาณที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.2

4. คนส่วนผสมให้เข้ากัน

5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.2

6. นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาบรรจุลงในถ้วย Polystyrene แล้วปิดฝา จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 5 และ 10 °ซ

7. สุ่มตัวอย่างทุก ๆ 3 วัน โดยนำมาประเมินผล ดังต่อไปนี้

7.1 การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

- สี
- ความข้นหนืด
- ปริมาณเวย์ที่แยกออกจากลิ่มนม

7.2 การเปลี่ยนแปลงทางเคมี

- ค่าพีเอช
- ค่าความเป็นกรด
- ปริมาณ Acetylmethyl carbinol

7.3 การเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยา

- จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

- จำนวนแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก
- จำนวนยีสต์และรา

7.4 การเปลี่ยนแปลงทางประสาทสัมผัส

- ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับรวม

8. วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยใช้ Factorial Design แบบ Asymmetric Two Factor Experiment ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จากนั้นเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างตัวอย่าง โดยใช้วิธี Duncan's New Mutiple Range (42)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย