บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ

3.1.1 วัตถุดิบ ส่วนผสมแห้ง และเชื้อจุลินทรีย์

(1) ถั่วเหลืองจากตลาดวโรรส อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่

(2) โลคัสต์บีนกัม (Locust bean gum: Sigma Chemicals Inc., USA)

(3) คาร์ราจีแนน (Carrageenan compound: UCB, Italy)

(4) เกลือ (ปรุงทิพย์®, บ.อุตสาหกรรมเกลือบริสุทธิ์จำกัด, ประเทศไทย)

(5) เชื้อ *Lactobacillus fermentum* (TISR 914)

(6) เชื้อ *Strptococcus thermophilus* (TISR 894)

3.1.2 สารเคมี

(1) ฟีนอล์ฟธาลีน (Phenolphthalein) (Merck, Germany)

(2)โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) (Merck, Germany)

(3) กรดไนตริค (Nitric acid) (Merk, Germany)

(4) เงินไนเตรต (Silver nitrate) (Merk, Germany)

(5) ไนโตรเบนซิน (Nitrobenzene) (Anala R, England)

(6) แอมโมเนียมเฟอริคซัลเฟต (Ammonium ferric sulphate) (Merk, Germany)

(7) โปแตสเซียมไธโอไซยาเนต (Potassium thiosulphate) (Merk, Germany)

(8) กรดบอริค (Boric acid) (Merk, Germany)

(9) เมธิลเรด (Methyl red) (Fluka, Switzerland)

(10) คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulphate) (Carlo erba, Italy)

(11) กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) (Merck, Germany)

(12) กรดกำมะถันเข้มข้น (Sulfuric acid) (Merck, Germany)

(13) เซเลเนี่ยมไดออกไซด์ (Selenium dioxide) (Merk, Germany)

(14) โซเดียมซัลเฟตปราศจากน้ำ (Sodium sulphate anhydrous) (Merk, Germany)

(15) แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Ammonium hydroxide) (J.T. Baker Inc., USA)

(16) เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) (Anala R, England)

(17) ไดเอทิลอีเทอร์ (Diethyl ether) (Carlo Erba, Italy)

(18) ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) (Carlo Erba, Italy)

(19) MRS Agar (Merck, Germany)

(20) M 17 broth (Merck, Germany)

(21) ผงวุ้น (โอ.วี.เคมิคอล, ประเทศไทย)

(22) Bromcresol purple (Fluka, Switzerland)

(23) Potato dextrose agar (Difco Laboratory, USA)

(24) Total plate count agar (Difco Laboratory, USA)

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

3.2.1.1 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

(1) เครื่องวัดสี ("*Color Quest II*" Hunter Associates Laboratories Inc., USA)

(2) เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัสอาหาร ("*Instron*" model 5565, Universal Testing Machine, Instron Corp.)

3.2.1.2 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

(1) เตาเผา (Murffle furnace)

(2) Kjeldahl digestion apparatus (Tecator, USA)

(3) Kjeldahl distillation apparatus (Tecator, USA)

(4) ตู้อบลมร้อนสำหรับหาความชื้น (Hot air oven)

(5) ชุดเครื่องวิเคราะห์ไขมัน ("*Soxtec*" avanti 2050)

(6) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter "*Hanna*" Model HI 9321, Portugal)

(7) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ("*Sartorius*" Model A120S, Germany)

3.2.1.3 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์สมบัติทางจุลินทรีย์

(1) เครื่องนับจำนวนโคโลนี

(2) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator: "*Gallenkamp*", England)

(3) เครื่องตีบดอาหาร ("*Stomacher*" Model BWS 99)

(4) ถุงตีบด ("*Stomacher Bag*" Seward Medical Ltd, UK)

(5) หม้อนึ่งความดัน (Autoclave: "*Gallenkamp*", England)

(6) เครื่องเขย่า ("*Vortex-Genie2*" Scientific Industries Inc., USA)

(7) เตาอบฆ่าเชื้อ ("*Heraeus*" Model KT 500, Heraeus Instrument)

3.2.1.4 อุปกรณ์สำหรับการทดสอบด้านประสาทสัมผัส

(1) ชุดอุปกรณ์ทดสอบ

(2) แบบสอบถาม (รายละเอียดในภาคผนวก ค)

3.2.2 โปรแกรมทางสถิติ

(1) โปรแกรมสำเร็จรูป Statistix version 4.0 (1992) (Analytical Software, USA)

(2) โปรแกรมสำเร็จรูป Mathcad version 7.0 (1997) (MathSoft, Inc.)

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมนมถั่วเหลือง (ประยุกต์จากวิธีของ Angeles and Marth, 1971)

นำถั่วเหลืองมาล้างน้ำให้สะอาด แล้วแช่น้ำอุณหภูมิ 5 °ซ ในอัตราส่วนน้ำ 3 ส่วนต่อถั่วเหลือง 1 ส่วนนาน 6-8 ชั่วโมง จากนั้นนำถั่วเหลืองมาล้างน้ำสะอาดอีกครั้ง ปั่นถั่วเหลืองกับน้ำโดยใช้เครื่องบดผสมอาหารในอัตราส่วนน้ำ 5 ส่วนต่อถั่วเหลือง 1 ส่วน (น้ำหนักเปียก) เป็นเวลา 3 นาที ส่วนของแข็งที่ไม่ละลายถูกแยกออกโดยการกรองผ่านผ้าขาวบาง

3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อ (Starter preparation)

การเตรียมหัวเชื้อ *L. fermentum* และ *S. thermophilus* ซึ่งถูกเก็บรักษามาในสภาพแห้งจากวิธีการทำแห้งแบบระเหิด (Lyophilized) ได้ประยุกต์วิธีของ Angeles and Marth (1971) ดังนี้

3.3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อขั้นแรก (Stock cultures) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth และ M17 broth ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 15×160 มิลลิเมตร จำนวน 10 มิลลิลิตรแล้วเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปประมาณ 0.5 กรัม นำไปอบในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงที่ 37 °ซ เพาะเชื้อ *L. fermentum* ใน MRS broth ส่วน M17 broth เพาะเชื้อ *S. thermophilus* แล้วนำไปบ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำเข้าเก็บรักษาในตู้เย็นที่ 5°ซ และควรถ่ายเชื้อในอาหารที่เตรียมขึ้นใหม่ในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตรทุกๆ 2 สัปดาห์

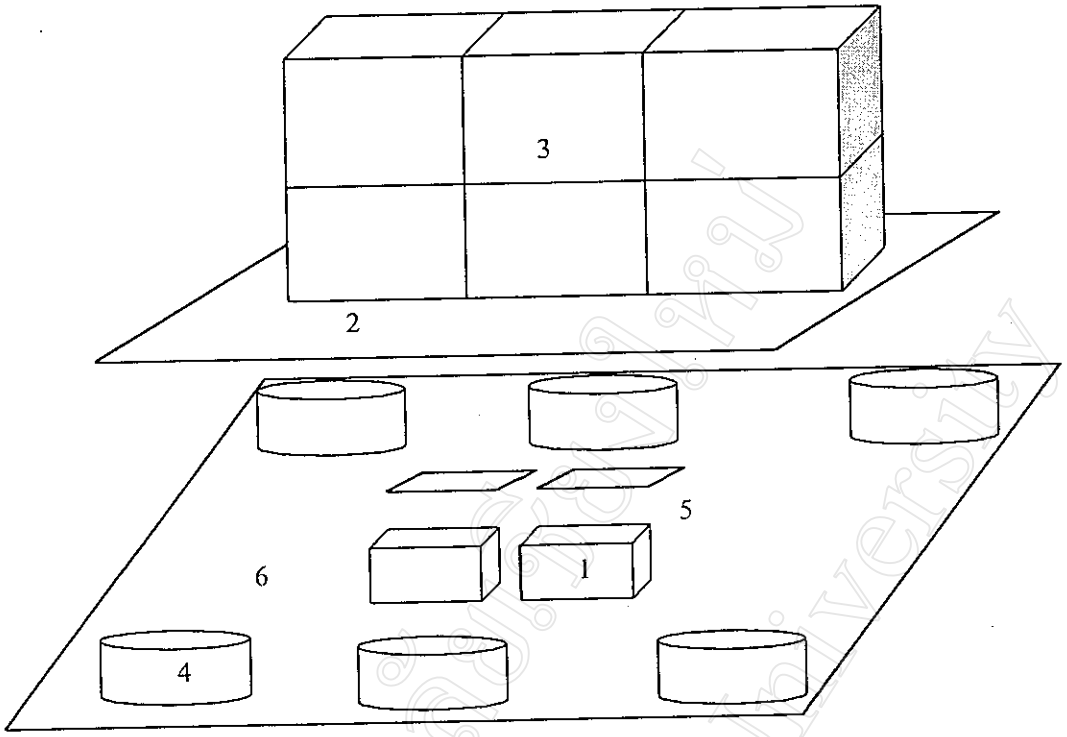
3.3.2.2 การเตรียมหัวเชื้อหลักที่ใช้ (Mother cultures) เตรียมนมถั่วเหลืองใส่ในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตรจำนวน 150 มิลลิลิตร นำเข้าหม้อนึ่งความดันที่ 121 °ซ นาน 15 นาที ทำให้เย็นลงที่ 37 °ซ เพาะเชื้อจากหัวเชื้อขั้นแรกปริมาณ 1% โดยปริมาตร นำเข้าบ่มที่ 37 °ซ 24 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บในตู้เย็น

3.3.2.3 การเตรียมหัวเชื้อที่ใช้ในระหว่างการหมัก (Intermediate cultures) เตรียมนมถั่วเหลืองเหมือนกับ Mother cultures นำเข้าหม้อนึ่งความดันที่ 121 °ซ นาน 15 นาที ลดอุณหภูมิลงเหลือ 37 °ซ นำเชื้อจาก Mother cultures มาเพาะในปริมาณ 1% โดยปริมาตร บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อซ้ำอีกอย่างน้อย 2 ครั้งก่อนนำไปใช้ ควรเตรียมหัวเชื้อภายใต้สภาวะที่กำหนดข้างต้นเสมอก่อนทำการผลิต เพื่อให้เชื้อมีกิจกรรมที่ดี

การเตรียมหัวเชื้อ แสดงดังภาพ ก-3 ในภาคผนวก ก

3.3.3 ขั้นตอนการผลิตเนยแข็งจากนมถั่วเหลือง

เตรียมนมถั่วเหลืองจำนวน 4,000 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์สเตนเลสขนาด 2 ลิตร จำนวน 3 ใบ (ใบๆละ 1,333 กรัม) ต้มนมในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 90°ซ นาน 20 นาที นำลงแช่ในน้ำเย็นให้มีอุณหภูมิลดลงถึง 37 °ซ เพื่อให้เหมาะสมต่อการหมัก ถ่ายนมถั่วเหลืองใส่ถังพลาสติกขนาด 2.5 กิโลกรัมจำนวน 2 ถังๆละ 2,000 กรัม จากนั้นทำการถ่ายหัวเชื้อทั้งสองชนิดลงไปในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จำนวน 5% โดยปริมาตรต่อน้ำหนักนมที่ใช้ ปิดฝาให้สนิท แล้วนำไปหมักในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ปล่อยทิ้งไว้ให้โปรตีนตกตะกอน ซึ่งความเป็นกรด-ด่างของนมจะลดลงเรื่อยๆจนถึง 4.4-4.6 หรือจนกว่าจะเกิดลิ่มนมที่มีลักษณะแน่นขึ้น ตัดลิ่มนมที่ได้ให้เป็นก้อนสี่เหลี่ยมเล็กๆเพื่อไล่เวย์ที่มากเกินพอ ตั้งทิ้งไว้นาน 15 นาที ถ่ายลิ่มนมใส่หม้อเคลือบความจุ 6 ควอท์ แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 70 °ซ นาน 45-60 นาทีโดยคนตลอดเวลา (ทำในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ) ทำให้ลิ่มนมแห้งด้วยการระบายเวย์ออกไป แล้วแขวนลิ่มนมในถุงผ้าที่ 4 °ซ ทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้นนำลิ่มนมมาทำให้เป็นรูปร่างในแบบพิมพ์ลักษณะสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 10×13×4 เซนติเมตร (กว้าง×ยาว×สูง) ซึ่งเจาะรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3 เซนติเมตรบริเวณด้านข้างตามแนวยาวจำนวน 2 แถวๆละ 6 รูและด้านล่างจำนวน 5 แถวๆละ 6 รู รองด้านในด้วยผ้าขาวบางโดยเติมลิ่มนมให้สูงจากขอบด้านบนของแบบพิมพ์ 0.5 เซนติเมตร ปิดทับด้วยแผ่นไม้ขนาด 9.6×12.6×2 เซนติเมตร (กว้าง×ยาว×หนา) ทับด้วยก้อนซีเมนต์ 120 กิโลกรัม (923 กรัมต่อตารางเซนติเมตร) นานประมาณ 8 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แสดงดังภาพ 3.1 เพื่อบีบให้ลิ่มนมเกาะตัวกัน เก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้ไว้ในถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีน (PE) ปิดปากถุงให้สนิท แล้วเก็บในกล่องพลาสติก นำเข้าเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °ซ ก่อนนำมาวิเคราะห์สมบัติในด้านต่างๆ



หมายเหตุ: 1 คือ แบบพิมพ์ลักษณะสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาด 10×13×4 เซนติเมตร (กว้าง×ยาว×สูง) 2 อันวางไว้ข้างใต้แผ่นไม้ในบริเวณตรงกลาง

2 คือ แผ่นไม้ ขนาด 60×80×4 เซนติเมตร (กว้าง×ยาว×หนา)

3 คือ ก้อนซีเมนต์ 6 ก้อน หนักก้อนละ 20 กิโลกรัม

4 คือ ไม้ทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร และสูง 4 เซนติเมตร จำนวน 6 อัน วางตามมุมและตรงกลางขอบของแผ่นไม้

5 คือ แผ่นไม้ ขนาด 9.6×12.6×2 เซนติเมตร (กว้าง×ยาว×หนา) ใช้ปิดทับแบบพิมพ์

6 คือ โต๊ะไม้ขนาด 1×1.5×0.5 เมตร (กว้าง×ยาว×สูง)

ภาพ 3.1 การอัดลิ่มนมในแบบพิมพ์

3.3.4 การวางแผนการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอน ดังนี้

ตอนที่ 1 ศึกษาชนิดและปริมาณไฮโดรคอลลอยด์ในการผลิตเนยแข็งจากนมถั่วเหลือง

การทดลองนี้วางแผนแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 2 ซ้ำ จัดสิ่งทดลองแบบ 3×3 Factorial มีไฮโดรคอลลอยด์ 2 ชนิด คือโลคัสต์บีนกัม (Locust bean gum) และคาร์ราจีแนน (Carrageenan) เป็นปัจจัยศึกษาที่ต่างกัน 3 ระดับ (ระดับต่ำ ระดับกลางและระดับสูง) เติมลงในนมถั่วเหลืองที่ใช้ในการผลิตเนยแข็งตามสัดส่วนในหน่วยทดลองดังตาราง 3.1 โดยทำการเตรียมผลิตภัณฑ์ตามขั้นตอนการผลิตเนยแข็งจากนมถั่วเหลืองและมีการควบคุมขั้นตอนการผลิตดังนี้

1. อุ่นนมถั่วเหลืองในน้ำร้อนให้ถึง 65°ซ ค่อยๆผสมไฮโดรคอลลอยด์ลงไป พร้อมกับคนให้เข้ากัน แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 90 °ซ คงไว้ 20 นาที
2. หมักนมถั่วเหลืองด้วยหัวเชื้อ (*S. thermophilus* และ *L. fermentum*) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จำนวน 5% โดยปริมาตรต่อน้ำหนักนมที่ใช้ บ่มที่ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง
3. ให้ความร้อนเพื่อแยกเวย์จากลิ่มนมถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 70 °ซ นาน 50 นาที
4. ทิ้งลิ่มนมในถุงผ้าที่อุณหภูมิ 4 °ซ ค้างคืน แล้วอัดลิ่มนมให้แน่นด้วยน้ำหนัก 923 กรัมต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

การวิเคราะห์สมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ได้ มีดังนี้

ก. สมบัติทางกายภาพ (รายละเอียดในภาคผนวก ค) ได้แก่

(1) ค่าแรงเจาะทะลุ (Penetration force) โดยใช้ Instron Universal Testing Machine Model 5565 (Instron, 1993) มีหน่วยวัดเป็นนิวตัน

(2) ค่าสีในระบบฮันเตอร์ (L a b) โดยใช้เครื่องวัดสี ColorQuest II (HunterLab, 1997)

ข. ปริมาณผลผลิตที่ได้ (Yield of products, %) โดยชั่งน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นกรัมต่อน้ำหนักของนมถั่วเหลืองที่ใช้

ค. สมบัติทางเคมี (รายละเอียดในภาคผนวก ค) ได้แก่

(1) ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลกติค (Total titratable acidity) ตามวิธีของ AOAC (1995)

(2) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) โดยใช้ pH-meter

(3) ปริมาณความชื้น (Moisture content) ตามวิธีของ AOAC (1995)

ตาราง 3.1 แผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการจัดสิ่งทดลองแบบ 3×3 Factorial โดยมีไฮโดรคอลลอยด์ 2 ชนิดเป็นปัจจัยศึกษาที่ต่างกัน 3 ระดับ

สิ่งทดลองที่	ปัจจัยศึกษา	
	A= %โลคัสต์บีนกัม	B = % คาร์ราจีแนน
1	0 (-1)	0 (-1)
2	0 (-1)	0.1 (0)
3	0 (-1)	0.2 (+1)
4	0.075 (0)	0 (-1)
5	0.075 (0)	0.1 (0)
6	0.075 (0)	0.2 (+1)
7	0.15 (+1)	0 (-1)
8	0.15 (+1)	0.1(0)
9	0.15 (+1)	0.2 (+1)

หมายเหตุ: (+1) = ระดับสูงของปัจจัย ; (0) = ระดับกลางของปัจจัย; (-1) = ระดับต่ำของปัจจัย

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ได้แก่ Analysis of variance และ Linear regression analysis โดยใช้โปรแกรม SX 4.0 เพื่อหาข้อสรุปถึงผลของไฮโดรคอลลอยด์ทั้งสองชนิดต่อสมบัติของผลิตภัณฑ์ รวมทั้งวิเคราะห์ถึงอิทธิพลของปัจจัยศึกษาแต่ละชนิดและความเกี่ยวข้องกัน นอกจากนี้ยังสามารถคาดคะเนผลที่อาจจะเกิดขึ้น โดยวิธีการรีเกรชชันซึ่งทำการ Coding ปัจจัยต่างๆ ดังนี้ –1, 0 และ +1 ตามลำดับเพื่อหาสมการถดถอยที่มีค่า R^2 (Coefficient of determination) สูง ทั้งนี้ค่า R^2 เป็นค่าที่อธิบายสมการว่าค่าสังเกตมีอิทธิพลจากปัจจัยศึกษาต่างๆมากน้อยเพียงใด ถ้าค่า R^2 สูง (เข้าใกล้ 1) แสดงถึงความแม่นยำในการคาดคะเนผลโดยสมการสูงตามด้วย จากนั้น

นำสมการถดถอยแต่ละสมการที่เป็น Coded regression equation มาทำการถอดรหัส (Decoding) เพื่อให้ได้ผลที่เป็นค่าจริง

หลักการถอดรหัสของสมการที่เป็น Coded equation ดังกล่าวทำได้โดยการนำเอา Coded regression equation ที่มีตัวแปรที่ยังไม่ได้ถอดรหัส (Coded variable) มาแก้สมการตามสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ตัวแปรที่ยังไม่ได้ถอดรหัส} = \frac{\text{ตัวแปรเดิม}-(\text{ค่าที่ระดับสูงของปัจจัยนั้น}+\text{ค่าที่ระดับต่ำของปัจจัยนั้น})/2}{(\text{ค่าที่ระดับสูงของปัจจัยนั้น}-\text{ค่าที่ระดับต่ำของปัจจัยนั้น})/2}$$

จากนั้นนำเอาตัวแปรที่ยังไม่ได้ถอดรหัสไปแทนในสมการ Coded equation และแก้สมการให้เป็นสมการที่ถอดรหัสแล้ว (Decoded equation) แล้วจึงนำสมการที่ถอดรหัสแล้วไปคาดคะเนผลที่จะเกิดขึ้นได้ (ไพโรจน์, 2536)

ตัวอย่างการทำ Linear regression analysis และการถอดรหัสของสมการที่เป็น Coded equation แสดงรายละเอียดในภาคผนวก ฉ

ตอนที่ 2 ศึกษาขั้นตอนการผลิตเนยแข็งจากนมถั่วเหลือง

ตอนที่ 2.1 ศึกษาการให้ความร้อนในการแยกเวย์จากลิ่มนมถั่วเหลือง

หลังจากการตัดลิ่มนมเพื่อเพิ่มพื้นที่ในการปล่อยเวย์จากลิ่มนมถั่วเหลืองให้ออกมามากที่สุด จะให้ความร้อนอีกครั้งเพื่อให้ลิ่มนมปล่อยเวย์ออกมามากขึ้น ซึ่งความร้อนที่ใช้แตกต่างกันตามชนิดของเนยแข็งที่ทำการผลิต

การทดลองนี้วางแผนแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 2 ซ้ำ จัดสิ่งทดลองแบบ 3×2 Factorial มีอุณหภูมิและเวลาเป็นปัจจัยศึกษา โดยอุณหภูมิมีการแปรผัน 3 ระดับและเวลาในการให้ความร้อน 2 ระดับ สิ่งทดลองตามแผนการทดลองแสดงดังตาราง 3.2 โดยทำการเตรียมผลิตภัณฑ์ตามขั้นตอนการผลิตเนยแข็งจากนมถั่วเหลืองและมีการควบคุมขั้นตอนการผลิตดังนี้

1. เติมโลคัสต์บีนกัม 0.15 % และคาร์ราจีแนน 0.1% ลงในนมถั่วเหลือง (ข้อมูลจากการทดลองตอนที่ 1)
2. หมักนมถั่วเหลืองด้วยหัวเชื้อ (*S. thermophilus* และ *L. fermentum*) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จำนวน 5% โดยปริมาตรต่อน้ำหนักนมที่ใช้ บ่มที่ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง
3. ทิ้งลิ่มนมในถุงผ้าที่อุณหภูมิ 4 °ซ ค้างคืน แล้วอัดลิ่มนมให้แน่นด้วยน้ำหนัก 923 กรัมต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 8 ชั่วโมง

ตาราง 3.2 แผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการจัดสิ่งทดลองแบบ 3×2 Factorial โดยมีอุณหภูมิ 3 ระดับและเวลา 2 ระดับเป็นปัจจัยศึกษา

สิ่งทดลองที่	ปัจจัยศึกษา	
	A = อุณหภูมิที่ใช้ (°ซ)	B = เวลาที่ใช้ (นาที)
1	55 (-1)	45(-1)
2	55 (-1)	60(+1)
3	65 (0)	45(-1)
4	65 (0)	60(+1)
5	75 (+1)	45(-1)
6	75 (+1)	60(+1)

หมายเหตุ: (+1) = ระดับสูงของปัจจัย ; (0) = ระดับกลางของปัจจัย; (-1) = ระดับต่ำของปัจจัย

ผลิตภัณฑ์ที่ได้นำมาวิเคราะห์เหมือนตอนที่ 1

ตอนที่ 2.2 ศึกษาการเติมเกลือในการผลิตเนยแข็งจากนมถั่วเหลือง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 2 ซ้ำ จัดสิ่งทดลองแบบ 2×2 Factorial มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้และวิธีเติมเกลือเป็นปัจจัยศึกษา โดยปริมาณเกลือมีการผันแปร 2 ระดับ (ระดับต่ำและระดับสูง) และมีวิธีเติมเกลือในลักษณะของแข็ง (Dry form) 2 แบบ คือ วิธีโรยเกลือลงในลิ่มนมก่อนอัดให้เกิดรูปร่าง (Sprinkling) และวิธีทาเกลือบนผิวนอกภายหลังการอัดให้เกิดรูปร่างแล้ว (Rubbing) (Cheesemakers Association Wales, 2001) สิ่งทดลองตามแผนการทดลองแสดงดังตาราง 3.3

โดยทำการเตรียมผลิตภัณฑ์ตามขั้นตอนการผลิตเนยแข็งจากนมถั่วเหลืองและมีการควบคุมขั้นตอนการผลิตดังนี้

1. เติมโลคัสต์บีนกัม 0.15 % และคาร์ราจีแนน 0.1% ลงในนมถั่วเหลือง (ข้อมูลจากการทดลองตอนที่ 1)
2. หมักนมถั่วเหลืองด้วยหัวเชื้อ (*S. thermophilus* และ *L. fermentum*) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จำนวน 5% โดยปริมาตรต่อน้ำหนักนมที่ใช้ บ่มที่ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมง
3. ให้ความร้อนเพื่อแยกเวย์จากลิ่มนมถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 75 °ซ นาน 60 นาที (ข้อมูลจากการทดลองตอนที่ 2.1)
4. ทิ้งลิ่มนมในถุงผ้าที่อุณหภูมิ 4 °ซ ค้างคืน
5. ถ้าเป็นวิธีเติมเกลือแบบ Sprinkling ให้โรยเกลือลงในลิ่มนมให้ทั่ว คลุกเคล้าให้เข้ากันดีแล้วอัดลิ่มนมให้แน่นด้วยน้ำหนัก 923 กรัมต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ส่วนวิธีเติมเกลือแบบ Rubbing ให้อัดลิ่มนมให้เกิดรูปร่างก่อนด้วยน้ำหนัก 923 กรัมต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำมาทาเกลือบริเวณผิวนอก จากนั้นนำไปอัดซ้ำอีกครั้งเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

ตาราง 3.3 แผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการจัดสิ่งทดลองแบบ 2×2 Factorial โดยมีปริมาณเกลือ 2 ระดับและวิธีเติมเกลือ 2 วิธีเป็นปัจจัยศึกษา

สิ่งทดลองที่	ปัจจัยศึกษา	
	A = ปริมาณเกลือ (% ของน้ำหนักลิ่มนม)	B = วิธีเติมเกลือ
1	1	Sprinkling
2	1	Rubbing
3	2	Sprinkling
4	2	Rubbing

การวิเคราะห์สมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ได้ มีดังนี้

ก. สมบัติทางกายภาพ (รายละเอียดในภาคผนวก ค) ได้แก่ ค่าแรงเจาะทะลุ (Penetration force) โดยใช้ Instron Universal Testing Machine Model 5565 (Instron, 1993) มีหน่วยวัดเป็นนิวตัน

ข. สมบัติทางเคมี (รายละเอียดในภาคผนวก ค) ได้แก่

(1) ปริมาณเกลือ (%Salt) ตามวิธีของ Volhard (Pearson, 1976)

(2) ปริมาณความชื้น (Moisture content) ตามวิธีของ AOAC (1995)

ค. การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส (รายละเอียดในภาคผนวก ค): ทดสอบโดยใช้แบบทดสอบ Hedonic scale scoring test ให้ผู้ทดสอบชิม 11 ท่านที่ผ่านการฝึกการทดสอบทางประสาทสัมผัสแล้ว ทำการประเมินการยอมรับด้านรสเค็ม (Saltiness) และความแน่นเนื้อ (Firmness)

นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ผลสถิติ (Analysis of variance) โดยใช้โปรแกรม SX 4.0 เพื่อหาข้อสรุปถึงผลของปริมาณเกลือและวิธีเติมเกลือต่อสมบัติของผลิตภัณฑ์ รวมทั้งวิเคราะห์ถึงอิทธิพลของปัจจัยศึกษาแต่ละชนิดและความเกี่ยวข้องกันด้วย จากนั้นจึงคัดเลือกปริมาณเกลือและวิธีเติมเกลือที่เหมาะสมที่สุด

ตอนที่ 3 ศึกษาเปรียบเทียบเนยแข็งจากนมถั่วเหลืองที่เติมและไม่เติมไฮโดรคอลลอยด์

ตอนที่ 3.1 ศึกษาการเจริญของหัวเชื้อในการหมักนมถั่วเหลือง

รูปแบบของนมถั่วเหลืองที่ใช้ในการศึกษามี 2 แบบ คือ

(1) รูปแบบที่ 1 นมถั่วเหลืองที่เติมไฮโดรคอลลอยด์ คือ โลคัสต์บีนกัม 0.15% และคาร์ราจีแนน 0.1% (ข้อมูลจากการทดลองตอนที่ 1)

(2) รูปแบบที่ 2 นมถั่วเหลืองที่ไม่เติมไฮโดรคอลลอยด์

ขั้นตอนนี้ได้เพิ่มแหล่งคาร์โบไฮเดรตในรูปของน้ำตาลกลูโคสจำนวน 1 %โดยน้ำหนักลงในนมถั่วเหลืองด้วย แล้วต้มนมในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 90°ซ เป็นเวลา 20 นาที นำลงแช่ในน้ำเย็นให้มีอุณหภูมิลดลงถึง 37 °ซ เติมหัวเชื้อลงไปจำนวน 5% โดยปริมาตรของน้ำหนักนมที่ใช้ จากนั้นนำไปหมักในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เริ่มเก็บตัวอย่างนมถั่วเหลือง (ทั้งสองแบบ) เป็นเวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20, 22 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์สมบัติต่างๆ ดังนี้

(1) ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลกติค (Total titratable acidity) ตามวิธีของ AOAC (1995)

(2) ปริมาณแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติค โดยใช้วิธีเพลทเค้านท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (Vanderzant and Splittstoesser, 1992)

(3) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) โดยใช้ pH-meter

ตอนที่ 3.2 ศึกษาข้อมูลของเนยแข็งจากนมถั่วเหลือง

รูปแบบของเนยแข็งจากนมถั่วเหลืองที่ใช้ในการศึกษามี 2 แบบ คือ

(1) รูปแบบที่ 1 เนยแข็งจากนมถั่วเหลืองที่เติมไฮโดรคอลลอยด์ คือ โลคัสต์บีนกัม 0.15% และคาร์ราจีแนน 0.1% (ข้อมูลจากการทดลองตอนที่ 1)

(2) รูปแบบที่ 2 เนยแข็งจากนมถั่วเหลืองที่ไม่เติมไฮโดรคอลลอยด์

เนยแข็งจากนมถั่วเหลืองทั้งสองรูปแบบมีการควบคุมขั้นตอนการผลิตดังนี้

1. ต้มนมถั่วเหลืองในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 90 °ซ นาน 20 นาที โดยเพิ่มน้ำตาลกลูโคส 1 % โดยน้ำหนักลงไปด้วย
2. หมักนมถั่วเหลืองด้วยหัวเชื้อ (*S. thermophilus* และ *L. fermentum*) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จำนวน 5% โดยปริมาตรต่อน้ำหนักนมที่ใช้ บ่มที่ 37 °ซ นาน 16 ชั่วโมง (ข้อมูลจากการทดลองตอนที่ 3.1)
3. ให้ความร้อนเพื่อแยกเวย์จากลิ่มนมถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 75 °ซ นาน 60 นาที (ข้อมูลจากการทดลองตอนที่ 2.1)
4. ทิ้งลิ่มนมในถุงผ้าที่อุณหภูมิ 4 °ซ ค้างคืน

5. โรยเกลือลงในลิ่มนมจำนวน 2 % โดยน้ำหนักของลิ่มนม แล้วอัดลิ่มนมให้แน่นด้วยน้ำหนัก 923 กรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ข้อมูลจากการทดลองตอนที่ 2.2)

สิ่งทดลองที่ได้นำมาวิเคราะห์สมบัติด้านต่างๆ ดังนี้

ก. สมบัติทางกายภาพ (รายละเอียดในภาคผนวก ค) ได้แก่

(1) ค่าแรงเจาะทะลุ (Penetration force) โดยใช้ Instron Universal Testing Machine Model 5565 (Instron, 1993) มีหน่วยวัดเป็นนิวตัน
(2) ค่าสีในระบบฮันเตอร์ (L a b) โดยใช้เครื่องวัดสี ColorQuest II (HunterLab, 1997)

ข. ปริมาณผลผลิตที่ได้ (Yield of products, %) โดยชั่งน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นกรัมต่อน้ำหนักของนมถั่วเหลืองที่ใช้

ค. ส่วนประกอบทางเคมีโดยประมาณ (รายละเอียดในภาคผนวก ค) ได้แก่

(1) ปริมาณเกลือ (%Salt) ตามวิธีของ Volhard (Pearson, 1976)
(2) ปริมาณไขมัน (Fat content) ตามวิธีของ AOAC (1995)
(3) ปริมาณโปรตีน (Protein content) (Pearson, 1976)
(4) ปริมาณเถ้า (Total ash) ตามวิธีของ AOAC (1995)
(5) ปริมาณความชื้น (Moisture content) ตามวิธีของ AOAC (1995)

ง. สมบัติทางจุลชีววิทยา (รายละเอียดในภาคผนวก ค) ได้แก่

(1) ปริมาณแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติค โดยใช้วิธีเพลทเค้านท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (Vanderzant and Splittstoesser, 1992)
(2) ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยใช้ Plate count agar (เรณู, 2537)
(3) ปริมาณยีสต์และรา โดยใช้ Potato dextrose agar (เรณู, 2537)
(4) ปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรียและ *E. coli* โดยวิธี Most probable number (เรณู, 2537)

จ. การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส (รายละเอียดในภาคผนวก ค) โดยนำเนยแข็งจากนมถั่วเหลืองขนาดกว้าง×ยาว×สูง เป็น 20×20×20 มิลลิเมตร และเนยแข็งที่แปรรูปโดยการทอดในน้ำมันปาล์มที่อุณหภูมิ 180 °ซ นาน 15 วินาที ให้ผู้ทดสอบชิมประเมินลักษณะต่างๆของตัวอย่าง ได้แก่ ลักษณะปรากฏ ลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่นและรสชาติและการยอมรับโดยรวม โดยใช้แบบทดสอบ Structured scaling (ไพโรจน์, 2536)

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ (Two-sample t-test) เพื่อเปรียบเทียบสมบัติด้านต่างๆ ระหว่างเนยแข็งที่เติมและไม่เติมไฮโดรคอลลอยด์

ตอนที่ 4 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติด้านต่างๆของเนยแข็งจากนมถั่วเหลืองในระหว่างการเก็บรักษา

ขั้นตอนนี้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติด้านต่างๆของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ นาน 15 วัน โดยเปรียบเทียบระหว่างผลิตภัณฑ์ 2 รูปแบบ คือ

(1) รูปแบบที่ 1 เนยแข็งจากนมถั่วเหลืองที่เติมไฮโดรคอลลอยด์ คือ โลคัสต์บีนกัม 0.15% และคาร์ราจีแนน 0.1% (ข้อมูลจากการทดลองตอนที่ 1)
(2) รูปแบบที่ 2 เนยแข็งจากนมถั่วเหลืองที่ไม่เติมไฮโดรคอลลอยด์

เนยแข็งจากนมถั่วเหลืองทั้งสองรูปแบบมีการควบคุมขั้นตอนการผลิตเหมือนการทดลองตอนที่ 3.2 โดยสุ่มตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ในวันที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 นับจากวันที่ผลิต สำหรับสมบัติที่ทำการวิเคราะห์ ได้แก่

ก. สมบัติทางกายภาพ (รายละเอียดในภาคผนวก ค) ได้แก่

(1) ค่าแรงเจาะทะลุ (Penetration force) โดยใช้ Instron Universal Testing Machine Model 5565 (Instron, 1993) มีหน่วยวัดเป็นนิวตัน
(2) ค่าสีในระบบฮันเตอร์ (L a b) โดยใช้เครื่องวัดสี ColorQuest II (HunterLab, 1997)

ข. สมบัติทางเคมี (รายละเอียดในภาคผนวก ค) ได้แก่

(1) ปริมาณเกลือ (%Salt) ตามวิธีของ Volhard (Pearson, 1976)
(2) ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลกติค (Total titratable acidity) ตามวิธีของ AOAC (1995)
(3) ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) โดยใช้ pH-meter
(4) ปริมาณความชื้น (Moisture content) ตามวิธีของ AOAC (1995)

ค. สมบัติทางจุลชีววิทยา (รายละเอียดในภาคผนวก ค) ได้แก่

(1) ปริมาณแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติค โดยใช้วิธีเพลทเค้านท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (Vanderzant and Splittstoesser, 1992)
(2) ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยใช้ Plate count agar (เรณู, 2537)
(3) ปริมาณยีสต์และรา โดยใช้ Potato dextrose agar (เรณู, 2537)

ตอนที่ 5 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในระหว่างขั้นตอนการผลิตและเก็บรักษาเนยแข็งจากนมถั่วเหลือง

ใช้โพลีอะคริละไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซีสแบบเอสดีเอส (SDS-PAGE) ตามวิธีของ Laemmli, 1970 (รายละเอียดในภาคผนวก ข) ในสภาวะนอนรีดิวส์ซิ่ง (Non reducing) และรีดิวส์ซิ่ง (Reducing) โดยตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ได้ทำการสุ่มในระหว่างขั้นตอนการผลิตและเก็บรักษาของการทดลองตอนที่ 4 ประกอบด้วย

(1) นมถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านความร้อน
(2) ลิ่มนมจากการตกตะกอนของผลิตภัณฑ์ที่เติมและไม่เติมไฮโดรคอลลอยด์
(3) เวย์จากลิ่มนมถั่วเหลืองของผลิตภัณฑ์ที่เติมและไม่เติมไฮโดรคอลลอยด์
(4) เนยแข็งจากนมถั่วเหลืองที่เติมไฮโดรคอลลอยด์ในวันที่ 0 และวันที่ 15
(5) เนยแข็งจากนมถั่วเหลืองที่ไม่เติมไฮโดรคอลลอยด์ในวันที่ 0 และวันที่ 15