

การพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมโคดิบ
ด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร
ธันวาคม 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมโคดิบ
ด้วยเทคนิคเอนริชอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี"

ของ นางสาวจุฑาทพร หงส์ผาทอง
ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การเกษตร

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....
..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พันธ์ศิริ สุทธิลักษณ์)

.....
..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร.สนธยา นุ่มท้วม)

.....
..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี ทาตระกูล)

.....
..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ดร.เสาวลักษณ์ รุ่งแจ้ง)

.....
..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ดร.รังสรรค์ เจริญสุข)

อนุมัติ

.....

(ดร.ภาณุ พุทธวงศ์)

รองคณบดีฝ่ายบริหารและวางแผน ปฏิบัติราชการแทน

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

14 ส.ค. 2559

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ดร.สนธยา นุ่มท้วม ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พันธ์สิริ สุทธิลักษณ์ ผู้เป็นประธานและดร.รังสรรค์ เจริญสุข เป็นกรรมการ รวมทั้ง รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี ทาตระกูล และดร.เสาวลักษณ์ รุ่งแจ้ง กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปี 2559 และกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2557 สัญญาเลขที่ R2557C012 ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทศพร อินเจริญ อาจารย์ประจำสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารสัตว์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร ที่คอยให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษาจนทำให้วิทยานิพนธ์นี้บรรลุตามวัตถุประสงค์ และเจ้าหน้าที่คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติ และสิ่งแวดล้อม ที่ให้ความช่วยเหลือและบริการเครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง และอำนวยความสะดวกสถานที่ทำงานวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร รวมทั้งนายพงศธร ปานศรี เจ้าของฟาร์มโคนม อำเภอโกสุมพิสัย จังหวัดสุโขทัย ที่ให้ความช่วยเหลือสำหรับตัวอย่างน้ำนมโคดิบที่ใช้ในการทดลอง จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วง ตลอดจนขอขอบคุณนายณัฐปกรณ์ สุขโฮสถ และนายพัชรพล ทองคำ ที่ให้การสนับสนุนและการช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการศึกษาระดับมหาบัณฑิต เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของผู้วิจัยที่ให้อำนาจใจและให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณด้วยความรักและความเคารพเป็นอย่างสูง

คุณค่าและประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศให้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาระบบการตรวจสอบคุณภาพของน้ำนมโคดิบแบบครบวงจรให้มีความรวดเร็วมากยิ่งขึ้นและผู้ที่สนใจไม่มากนัก

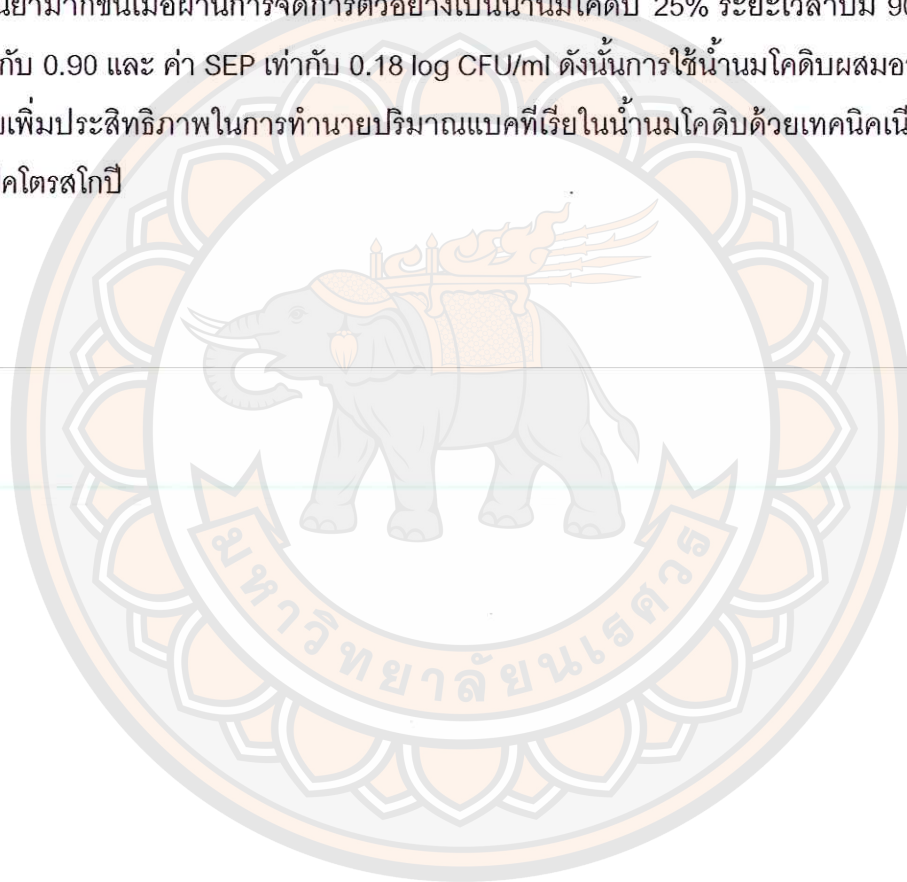
จุฑาพร หงส์ผาทอง

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในนํ้านมโคดิบด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี
ผู้วิจัย	จุฑาพร หงส์ผาทอง
ประธานที่ปรึกษา	ดร.สนธยา นุ่มท้วม
กรรมการที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.วันดี ทาตระกูล ดร.เสาวลักษณ์ รุ่งแจ้ง
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2559
คำสำคัญ	นํ้านมโคดิบ เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด เนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี

บทคัดย่อ

การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในนํ้านม เป็นสาเหตุหลักของการเสื่อมเสียของนํ้านม ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์นมต่างๆ และราคาการซื้อขายนํ้านมดิบ สำหรับวิธีการตรวจนับแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบในปัจจุบันนั้นใช้วิธีการตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมด (Standard plate count; SPC) วิธีดังกล่าวต้องใช้เวลา 48 ชั่วโมง ในการทราบผลการวิเคราะห์ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในนํ้านมโคดิบด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Near infrared spectroscopy; NIRS) แบ่งออกเป็น 2 การศึกษา โดยการศึกษาที่ 1 ศึกษาอิทธิพลของระยะที่แสงผ่าน (Pathlength) ต่อประสิทธิภาพการทำนายการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบด้วยเทคนิค NIRS ทำการศึกษาโดยการวัดสเปกตรัมนํ้านมโคดิบในโหมดสะท้อนกลับโดยใช้ Aluminum reflector ที่มีระยะ Optical pathlength 0.1 และ 1.0 มิลลิเมตร เพื่อช่วยในการสะท้อนแสงกลับมายังตัวตรวจวัดสัญญาณ จากนั้นทำการวิเคราะห์แบบจำลองทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Partial least square regression (PLSR) พบว่าผลการทำนายจากแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมของตัวอย่างนํ้านมโคดิบที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ให้ค่าการทำนายที่แม่นยำกว่า Pathlength 1.0 มิลลิเมตร โดยผลการทำนายที่ดีที่สุด มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; R) เท่ากับ 0.88 และค่าผิดพลาดมาตรฐานในการทดสอบ (Standard error of cross validation; SECv) เท่ากับ 0.34 log CFU/ml การศึกษาที่ 2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการทำนายการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบด้วยเทคนิค NIRS โดยการนำตัวอย่างนํ้านมโคดิบผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ที่ระดับความเข้มข้น 10%, 25% และ 50% แล้วทำการศึกษา

อิทธิพลของระดับความเข้มข้นน้ำมันและระยะเวลาในการบ่มตัวอย่างน้ำมันต่อประสิทธิภาพการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม พบว่าการผสมน้ำมันโคดิบผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในอัตราส่วน 10% และ 25% ให้ค่าการทำนายที่มีความแม่นยำมากกว่าการทำนายผ่านตัวอย่างน้ำมันโคดิบ 50% และ 100% มีค่าความคลาดเคลื่อนจากการทำนายที่ใกล้เคียงกันคือ มีค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ (Standard error of prediction; SEP) เท่ากับ 0.34 และ 0.37 log CFU/ml ตามลำดับ หลังจากนั้นนำตัวอย่างน้ำมันโคดิบ 10%, 25% และ 50% ทำการบ่มอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที พบว่าผลการทำนายมีความแม่นยำมากขึ้นเมื่อผ่านการจัดการตัวอย่างเป็นน้ำมันโคดิบ 25% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที มีค่า R เท่ากับ 0.90 และ ค่า SEP เท่ากับ 0.18 log CFU/ml ดังนั้นการใช้น้ำมันโคดิบผสมอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำนายปริมาณแบคทีเรียในน้ำมันโคดิบด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี



Title METHOD DEVELOPMENT OF TOTAL BACTERIAL
QUANTIFICATION IN RAW MILK USING NEAR INFRARED
SPECTROSCOPY

Author Jutaporn Hongpathong

Advisor Sonthaya Numthuam, Ph.D.

Co-Advisor Associate Professor Wandee Tartrakoon, Ph.D.
Saowaluk Rungchang, Ph.D.

Academic Paper Thesis M.S. in Agricultural Science,
Naresuan University, 2016

Keywords Raw milk, Total Bacteria, Near infrared spectroscopy

ABSTRACT

Bacterial contamination in raw milk causes deterioration of raw milk which leads to poor quality of dairy products and also affect the price of raw milk. Presently, conventional microbiological method faces a time consuming problem which need 48 hours or more to obtain the results. This research was to study the method development for determining total bacterial count (TBC) in raw milk using near infrared (NIR) spectroscopy. The study was divided into 2 experiments; the first experiment was to study the effect of pathlength on the TBC prediction efficiency. The NIR spectra of raw milk samples were scanned by NIR spectroscopy in transreflectance mode with optical pathlength of 0.1 and 1.0 mm. The calibration models were preformed using partial least square (PLS) regression. The PLS results of 0.1 mm pathlength provided better calibration results, with correlation coefficient (R) of 0.88 and root square error of cross validation (SECV) of 0.34 log CFU/ml. The second experiment was to study effect of bacterial activity on the TBC prediction efficiency. In order to study effect of milk concentration and curing time of milk samples on the TBC prediction efficiency, raw milk samples were added into culture broth with ratio of 10%, 25% and 50% milk and then were incubated at 32 C° for 30, 60, 90 and 120 minutes. The PLS results obtained from 10% and 25% milk samples were superior than those obtained from the 100% and 50% milk samples, with standard

error of prediction (SEP) of 0.34 and 0.37 log CFU/ml, respectively. The best calibration result were obtained from the 25% milk samples incubated for 90 minutes with R of 0.90 and SEP of 0.18 log CFU/ml. The results indicated that spectral data of diluted milk in culture broth could improve the prediction efficiency of TBC in raw milk using NIR spectroscopy.



สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาของปัญหา.....	1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
สมมติฐานของงานวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
คำนิยาม.....	4
องค์ประกอบนํ้านมโคดิบ.....	4
อุตสาหกรรมโคนมไทย.....	5
การตรวจสอบคุณภาพนํ้านมโคดิบ.....	7
เชื้อแบคทีเรียและการเจริญเติบโต.....	11
เชื้อแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบ.....	14
สาเหตุการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบ.....	19
การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในนํ้านม.....	23
เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี.....	26
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	44
ตัวอย่างนํ้านมโคดิบ.....	44
การตรวจวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในนํ้านมโคดิบด้วยวิธีมาตรฐาน.....	44
การตรวจสอบด้วยเทคนิค NIRS.....	47
การศึกษาที่ 1	49
การศึกษาที่ 2	51
การสแกนตัวอย่างด้วยแสงเนียร์อินฟราเรดและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	51

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย.....	55
การศึกษาที่ 1	55
การศึกษาที่ 2	61
5 บทสรุป.....	71
สรุปผลการวิจัย.....	71
ข้อเสนอแนะ.....	71
บรรณานุกรม.....	72
ภาคผนวก.....	80
ประวัติผู้วิจัย.....	166

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนมโคดิบ.....	5
2 การเพิ่มหรือลดของราคาการรับซื้อน้ำนมดิบ.....	9
3 Generation times ของเชื้อแบคทีเรียทั่วไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (optimum condition) กับการเจริญเติบโต.....	14
4 เชื้อแบคทีเรียในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม.....	17
5 เกณฑ์การพิจารณาค่า R และ R ²	35
6 เกณฑ์การพิจารณาค่า RPD.....	35
7 รายงานวิจัยที่ใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจคุณภาพน้ำนมดิบและผลิตภัณฑ์นม	37
8 รายงานวิจัยที่ใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร.....	42
9 ข้อมูลทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในน้ำนมโคดิบจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (การศึกษาที่ 1).....	57
10 ข้อมูลทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในน้ำนมโคดิบจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (การศึกษาที่ 2).....	57
11 ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PLSR ของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนม (100%) ที่มีขนาดของ Pathlength ที่ต่างกัน.....	59
12 ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PLSR ของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	64
13 ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PLSR ของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่มต่างๆ.....	66
14 ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PLSR ของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่มต่างๆ.....	67
15 ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PLSR ของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่มต่างๆ.....	68

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
16	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ที่ไม่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัม.....	82
17	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative.....	83
18	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี second derivative.....	84
19	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC.....	85
20	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV.....	86
21	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ MSC.....	87
22	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ SNV.....	88
23	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ไม่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัม.....	89

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
24	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative.....	90
25	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี second derivative.....	91
26	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC.....	92
27	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV.....	93
28	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ MSC.....	94
29	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ SNV.....	95
30	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ในกลุ่ม Calibration.....	96
31	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ในกลุ่ม Validation.....	97
32	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ในกลุ่ม Calibration.....	98

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
33	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ในกลุ่ม Validation.....	99
34	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ในกลุ่ม Calibration.....	100
35	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ในกลุ่ม Validation.....	101
36	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ในกลุ่ม Calibration.....	102
37	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ในกลุ่ม Validation.....	103
38	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ในกลุ่ม Calibration.....	104
39	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ในกลุ่ม Validation.....	105
40	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ในกลุ่ม Calibration.....	106

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
41	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ในกลุ่ม Validation.....	107
42	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ในกลุ่ม Calibration.....	108
43	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ในกลุ่ม Validation.....	109
44	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ในกลุ่ม Calibration.....	110
45	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ในกลุ่ม Validation.....	111
46	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ในกลุ่ม Calibration.....	112
47	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ในกลุ่ม Validation.....	113
48	ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ในกลุ่ม Calibration.....	114

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
49 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ในกลุ่ม Validation.....	115
50 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ในกลุ่ม Calibration.....	116
51 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ในกลุ่ม Validation.....	117
52 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ในกลุ่ม Calibration.....	118
53 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ในกลุ่ม Validation.....	119
54 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ในกลุ่ม Calibration.....	120
55 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ในกลุ่ม Validation.....	121

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 กราฟการเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย.....	12
2 ช่วงสเปกตรัมของคลื่นแสงอินฟราเรด.....	26
3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง NIR ของข้าว ถั่วเหลือง และองค์ประกอบทางเคมี ต่างๆ.....	28
4 หลักการทำงานของเครื่อง NIRS.....	28
5 ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาของตัวอย่างกับแสง NIR.....	29
6 ตัวอย่างน้ำมันโคดิบ.....	46
7 NIR aluminum reflector ที่มีระยะ Optical pathlength ขนาด 0.1 และ 1.0 มิลลิเมตร.....	48
8 เครื่อง FT-Near Infrared Spectroscopy.....	48
9 เซลล์บรรจุตัวอย่าง ที่บรรจุ Pathlength ขนาด 0.1 และ 1.0 มิลลิเมตร.....	50
10 ตัวอย่างน้ำมันโคดิบวัดด้วยเครื่อง NIRS.....	50
11 การเตรียมตัวอย่างน้ำมันผสมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว.....	53
12 ตัวอย่างน้ำมันผสมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว.....	53
13 ตัวอย่างน้ำมันดิบผสมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่ อุณหภูมิ 32 ± 0.5 องศาเซลเซียส.....	54
14 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำมันโคดิบ เมื่อวัดด้วย Pathlength 0.1 และ 1.0 มิลลิเมตร ที่เลขคลื่น $12000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$	58
15 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำมันโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่าน การปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ SNV.....	60
16 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำมันโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative.....	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
17	สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำมันที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่เลขคลื่น $12000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$	62
18	ความสัมพันธ์ของปริมาณแบรินในน้ำมัน 25% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS.....	69
19	Regression coefficients ของตัวอย่างน้ำมัน 25% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที.....	70
20	ความสัมพันธ์ของปริมาณแบรินในน้ำมันโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัม.....	122
21	ความสัมพันธ์ของปริมาณแบรินในน้ำมันโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative.....	122
22	ความสัมพันธ์ของปริมาณแบรินในน้ำมันโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี second derivative.....	123
23	ความสัมพันธ์ของปริมาณแบรินในน้ำมันโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC.....	123
24	ความสัมพันธ์ของปริมาณแบรินในน้ำมันโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV.....	124
25	ความสัมพันธ์ของปริมาณแบรินในน้ำมันโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ MSC.....	124
26	ความสัมพันธ์ของปริมาณแบรินในน้ำมันโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัม.....	125

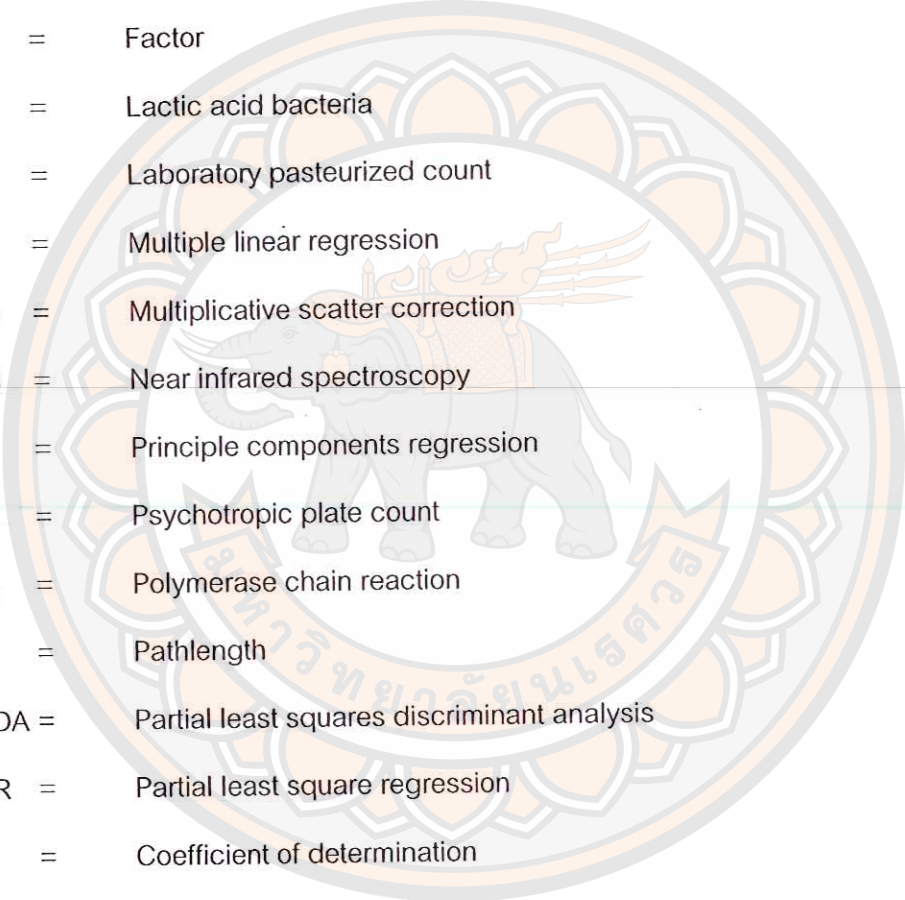
สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพ		หน้า
27	ความสัมพันธ์ของปริมาณเบคทีเรียในน้ำนมโคดิบที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี second derivative.....	125
28	ความสัมพันธ์ของปริมาณเบคทีเรียในน้ำนมโคดิบที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC.....	126
29	ความสัมพันธ์ของปริมาณเบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV.....	126
30	ความสัมพันธ์ของปริมาณเบคทีเรียในน้ำนมโค ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ SNV.....	127
31	ความสัมพันธ์ของปริมาณเบคทีเรียในน้ำนมโค ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ MSC.....	127
32	ความสัมพันธ์ของปริมาณเบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ ที่ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS.....	128
33	ความสัมพันธ์ของปริมาณเบคทีเรียในน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ที่ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS.....	129
34	ความสัมพันธ์ของปริมาณเบคทีเรียในน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ที่ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS.....	130
35	ความสัมพันธ์ของปริมาณเบคทีเรียในน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS.....	131
36	ความสัมพันธ์ของปริมาณเบคทีเรียในน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ที่ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS.....	132

สารบัญภาพ (ต่อ)

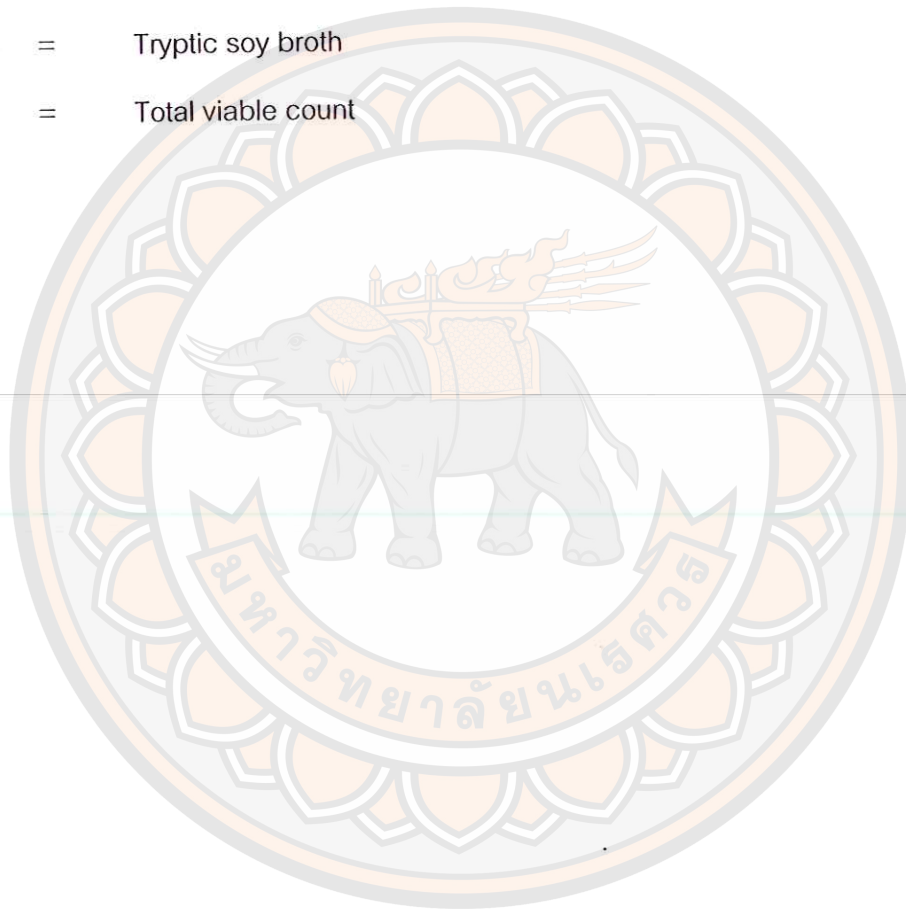
ภาพ	หน้า
37 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 25 ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ที่ได้ จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS.....	133
38 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ที่ได้ จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS.....	134
39 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ที่ได้ จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS.....	135
40 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ที่ได้ จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS.....	136
41 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ที่ได้ จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS.....	137
42 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ได้ จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS.....	138
43 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ที่ได้ จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS.....	139

อักษรย่อ



APC	=	Aerobic plate count
CFU	=	Colony forming unit
DEPT	=	Direct epifluorescent filter technique
DPLS	=	Discrimination partial least squares
F	=	Factor
LAB	=	Lactic acid bacteria
LPC	=	Laboratory pasteurized count
MLR	=	Multiple linear regression
MSC	=	Multiplicative scatter correction
NIRS	=	Near infrared spectroscopy
PCA	=	Principle components regression
PCC	=	Psychotropic plate count
PCR	=	Polymerase chain reaction
PL	=	Pathlength
PLSDA	=	Partial least squares discriminant analysis
PLSR	=	Partial least square regression
R^2	=	Coefficient of determination
R	=	Correlation coefficient
RMSECV	=	Root mean square error of cross validation
RMSEP	=	Root mean square error of prediction
RPD	=	Ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP
SCC	=	Somatic plate count
SEC	=	Standard error of calibration
SECV	=	Standard error of cross validation

SEP	=	Standard error of prediction
SIMCA	=	Soft independent modeling of class analogy
SLR	=	Simple linear regression
SNV	=	Standard normal variation
SPC	=	Standard plate count
TBC	=	Total plate count
TSB	=	Tryptic soy broth
TVC	=	Total viable count



บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

น้ำมันโคดิบและผลิตภัณฑ์นมเป็นแหล่งอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารที่ครบถ้วน ทำให้ประชาชนส่วนใหญ่หันมานิยมบริโภคน้ำมันและผลิตภัณฑ์นมกันอย่างแพร่หลาย ส่งผลให้อุตสาหกรรมนมมีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว โดยในปัจจุบันกำลังการผลิตน้ำมันโคดิบในประเทศไทยมีสูงถึง 28,000 ตันต่อวัน คุณภาพน้ำมันโคดิบมีความสำคัญมากต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์นม โดยเฉพาะคุณภาพทางสุขศาสตร์ ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการทำให้คุณภาพน้ำมันลดลง อาจส่งผลไปถึงผลิตภัณฑ์นมต่างๆ และรวมไปถึงสุขภาพของผู้บริโภค หากบริโภคนมและผลิตภัณฑ์นมที่มีการปนเปื้อนเชื้อที่เป็นอันตราย ด้วยเหตุนี้ จึงมีการสร้างระบบการตรวจสอบคุณภาพน้ำมันโคดิบขึ้นเพื่อป้องกันความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นจากน้ำมันโคดิบที่มีคุณภาพต่ำ และยังใช้เป็นตัวชี้วัดในการประเมินราคารับซื้อ สำหรับการรับซื้อน้ำมันโคดิบในประเทศไทยจะใช้ระบบการให้ราคาควบคู่กับคุณภาพของน้ำมันโคดิบ ซึ่งราคาน้ำมันโคดิบที่เกษตรกรแต่ละรายจะได้รับนั้น จะแปรไปตามคุณภาพของน้ำมันโคดิบที่ตนผลิตได้ เช่น หากในปัจจุบันราคาการรับซื้อน้ำมันโคดิบในราคามาตรฐานอยู่ที่ 18 บาทต่อกิโลกรัม เมื่อเกษตรกรสามารถผลิตน้ำมันโคดิบที่มีคุณภาพสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ก็จะได้รับค่าปรับเพิ่มของราคาการรับซื้อ เช่น ตามมาตรฐานปริมาณจำนวนจุลินทรีย์ในน้ำมันดิบน้อยกว่า 150,000 โคโลนีต่อลูกบาศก์เซนติเมตร เพิ่มขึ้น 0.20 บาทต่อกิโลกรัม เป็นต้น แต่ในทางกลับกันถ้าคุณภาพน้ำมันดิบต่ำกว่ามาตรฐาน เกษตรกรรายนั้นจะถูกปรับลดราคาการรับซื้อน้ำมันดิบลง ดังนั้นจึงมีการจัดการแบ่งชั้นคุณภาพน้ำมันโคดิบตามคุณลักษณะทางโภชนาการและคุณภาพทาง สุขศาสตร์ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำหนดเกณฑ์การซื้อขายน้ำมันดิบตามชั้นคุณภาพ

สำหรับการตรวจสอบคุณภาพทางสุขศาสตร์ของน้ำมันโคดิบ เป็นการประเมินหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างน้ำมันโคดิบ ตั้งแต่การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคด้านมอัสเสบของแม่โค รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอันเนื่องมาจากความไม่สะอาดในระหว่างกระบวนการผลิต เช่น การปนเปื้อนลงไปในถังนํ้านมรวมระหว่างการรีดเนื่องจากมีการจัดการการรีดนมที่ไม่ถูกอนามัย ความไม่สะอาดของอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการรีดนม และอาจเป็นผลมาจากกระบวนการฆ่าเชื้อโรคในกระบวนการผลิต เช่น การให้ความร้อนไม่เพียงพอสำหรับการ

ฆ่าเชื้อแบคทีเรียส่งผลให้แบคทีเรียในกลุ่มที่ทนความร้อนไม่ถูกทำลาย ปัจจุบันมีเกณฑ์ควบคุมคุณภาพของน้ำนมตามปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบ น้ำนมโคดิบที่มีคุณภาพยอดเยี่ยมจะมีเชื้อแบคทีเรียไม่เกิน 1,000 โคโลนีต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ซึ่งในประเทศไทยให้คุณภาพน้ำนมเกรดหนึ่งมีจำนวนเชื้อแบคทีเรีย 200,000 โคโลนีต่อลูกบาศก์เซนติเมตร สำหรับมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.) นั้นได้กำหนดให้น้ำนมโคดิบที่นำมาผลิตนมสดมีเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมไม่เกิน 500,000 โคโลนีต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ในปัจจุบันวิธีการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียในน้ำมนั้นใช้วิธีการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด (Standard plate count; SPC) ซึ่งจะสามารถตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เนื่องจากขั้นตอนการตรวจสอบที่ยังยากมีหลายขั้นตอน ประกอบกับต้องใช้เวลาในการประมวลผลการตรวจวิเคราะห์นาน ด้วยเหตุนี้ การพัฒนาการตรวจสอบคุณลักษณะของน้ำนมดิบให้มีความรวดเร็วจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมนมเพื่อให้ทันต่อความต้องการของตลาด

ปัจจุบันเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Near infrared spectroscopy; NIRS) เป็นวิธีที่กำลังได้รับความสนใจจากทุกวงการอุตสาหกรรม เนื่องจากเทคนิคนี้มีความรวดเร็วในการตรวจสอบ ประหยัด แม่นยำ มีการแสดงผลแบบเรียลไทม์ และไม่ใช้สารเคมี หลักการวัดค่าโดยการให้แสงในช่วงความยาวคลื่น NIR ลงไปบนตัวอย่าง (700-2500 นาโนเมตร) โดยพลังงานแสงถูกดูดกลืนทำให้เกิดการสั่นของพันธะต่างๆ เช่น O-H, C-H และ N-H ในโมเลกุล ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปีในการตรวจสอบสินค้าทางด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างแพร่หลาย สำหรับในอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์นม มีการนำเทคนิค NIRS มาวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ เช่น ปริมาณโปรตีน ไขมัน น้ำตาลแลคโตส และองค์ประกอบอื่นๆ ในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมชนิดต่างๆ (Tsenkova, et al., 1999; Laporte and Paquin, 1999) และการปลอมปนของเมลามีนในนมผง (Balabin and Smirnor, 2011) เป็นต้น ซึ่งสำหรับในด้านการตรวจสอบคุณภาพสุขศาสตร์ของน้ำนมโคดิบ มีการนำมาใช้ตรวจหาปริมาณจำนวนเม็ดเลือดขาวในน้ำนม (Tsenkova, et al., 2001; Meilina, et al., 2009) หากแต่ยังไม่มีมีการประเมินประสิทธิภาพในการตรวจสอบคุณภาพสุขศาสตร์ของน้ำนมโคดิบในด้านการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบ ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนาระบบการตรวจสอบคุณภาพสุขศาสตร์ของน้ำนมโคดิบด้วยเทคนิค NIRS แบบครบวงจร การวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำนมโคดิบด้วยเทคนิค NIRS จึงเป็นสิ่งที่ควรศึกษาเป็นอย่างมาก

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของระยะที่แสงผ่าน (Pathlength) และการเปลี่ยนแปลงโภชนาในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวต่อประสิทธิภาพการทำนายการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบด้วยเครื่อง NIRS
2. เพื่อสร้างแบบจำลองในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในนํ้านมโคดิบแบบรวดเร็วด้วยเครื่อง NIRS

ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษาที่ 1 ศึกษาอิทธิพลของระยะที่แสงผ่าน (Pathlength) ต่อประสิทธิภาพการทำนายการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบด้วยเทคนิค NIRS

การศึกษาที่ 2 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการทำนายการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบด้วยเทคนิค NIRS

สมมติฐานของงานวิจัย

เนื่องจากสเปกตรัมของนํ้านมโคดิบจะประกอบไปด้วยการดูดกลืนแสงขององค์ประกอบต่างๆ ในนํ้านม เช่น โปรตีน ไขมัน น้ำ และรวมไปถึงเซลล์แบคทีเรีย โดยการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบด้วยเทคนิค NIRS อาจได้มาจากการดูดกลืนแสงของเซลล์แบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางโภชนาต่างๆ ในนํ้านมที่เกิดขึ้นจากการกระบวนการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาระบบการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของนํ้านมโคดิบแบบรวดเร็ว จึงทำการศึกษาผลของระยะที่แสงผ่าน และการเปลี่ยนแปลงของโภชนาในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความเป็นไปได้ในการตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในนํ้านมโคดิบด้วยเครื่อง NIRS

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

คำนิยาม

น้ำนมโคดิบ (Raw cow milk) หมายถึง น้ำนมที่รีดจากแม่โคหลังจากคลอดลูกแล้วไม่น้อยกว่า 3 วัน และต้องปราศจากน้ำนมเหลือง (Colostrum) โดยมิได้แยกออกหรือเติมวัตถุอื่นใด และไม่ได้ผ่านกรรมวิธีใดๆ ยกเว้นการทำให้เย็น (สำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ , 2553)

องค์ประกอบน้ำนมโคดิบ

น้ำนม (Milk) เป็นอาหารเหลว ที่มีโครงสร้างเป็นอิมัลชัน (Emulsion) ประเภทน้ำมันในน้ำ (Oil in water emulsion) ไขมันนม (Butter fat) จะแขวนตัวเป็นหยดน้ำมันกระจายตัวอยู่ในน้ำ ซึ่งส่วนเนื้อนม (Milk solid not fat) คือ โปรตีน น้ำตาลแลคโตส (Lactose) แร่ธาตุและวิตามิน ส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญของน้ำนมดังแสดงในตาราง 1 มีรายละเอียด ดังนี้

1. น้ำ น้ำเป็นส่วนประกอบหลักของน้ำนม น้ำนมมีน้ำเป็นส่วนประกอบมากกว่า 85% น้ำเป็นตัวกลางให้โปรตีน ไขมันนม ที่กระจายตัวอยู่ เกิดลักษณะเป็นอิมัลชัน (emulsion) และน้ำเป็นตัวทำละลายน้ำตาลในน้ำนม และวิตามินที่ละลายในน้ำ และแร่ธาตุต่างๆ ในน้ำนม
2. ไขมัน ไขมันในน้ำนมอยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) อยู่ในน้ำนมในสภาพแขวนลอย กระจายตัวอยู่ในรูปของเม็ดไขมันเล็กๆ ในสภาพอิมัลชัน (Oil in water emulsion)
3. โปรตีน เคซีน (Casein) เป็นฟอสโฟโปรตีน (Phosphoprotein) ที่พบ 80% ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำนม เป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโน (Amino acid) ที่จำเป็นต่อร่างกายครบถ้วน
4. น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลแลคโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharide) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (Glucose) 1 โมเลกุล กับ น้ำตาลกาแลคโตส (Galactose) อีก 1 โมเลกุล รวมตัวกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (Glycosidic bond) ชนิดเบตา-1, 4 (Beta 1-4) น้ำตาลแลคโตส แยกได้จากเวย์ (Whey) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็ง (Cheese) หรือเคซีน (Casein)

5. วิตามิน นมเป็นแหล่งของวิตามินหลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย วิตามินที่มีอยู่ในนมได้แก่ วิตามินบีหนึ่ง วิตามินบีสอง ไนอะซิน วิตามินที่มีปริมาณน้อย ได้แก่ วิตามินดี และวิตามินซี

6. เกลือแร่ ในนมมีแร่ธาตุที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ได้แก่ โพแทสเซียม แคลเซียม คลอไรด์ ฟอสฟอรัส โซเดียม ซัลเฟอร์ และแมกนีเซียม เป็นจำนวนมาก และมีเหล็ก ทองแดง สังกะสี อะลูมิเนียมและโคบอลต์เป็นส่วนน้อย โดยในนมมีเกลือแร่อยู่ประมาณร้อยละ 0.7

7. สารประกอบอินทรีย์ นอกจากองค์ประกอบดังกล่าวแล้วนมยังมีเอนไซม์ที่สามารถทำให้เกิดกลิ่นหืน เช่น ฟอสฟาเทส (Phosphatase) ไลเปส (Lipase) รวมทั้งสารอินทรีย์ เช่น กรดซิทริก กรดอะมิโน ครีเอทีน (Creatinine) และแก๊สต่างๆ ที่ติดมาขณะรีดนมหรือเกิดจากปฏิกิริยาในเต้านม

ตาราง 1 องค์ประกอบทางเคมีของนมโคดิบ

องค์ประกอบทางเคมีของนมโคดิบ (%)	
น้ำ (Water)	87
โปรตีน (Protein)	3.4
ไขมัน (Fat)	3.2
น้ำตาลแลคโตส (Lactose)	4.5
วิตามินและเกลือแร่	0.7

ที่มา: สุมาพร เกษมสำราญ, 2551

อุตสาหกรรมโคนมไทย

นมโคเป็นเครื่องดื่มที่ถือว่ามีคุณค่าทางอาหารมากมาย อุดมด้วยธาตุอาหารครบทุกหมู่ คือ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน วิตามิน และ เกลือแร่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำตาลนม หรือแลคโตส (Lactose) และโปรตีนชนิดเคซีน (Casein) ซึ่งพบในนมเท่านั้น นมยังเป็นแหล่งของแคลเซียมที่สำคัญ ดังนั้นนมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการพัฒนาทางร่างกายและสติปัญญาของเด็ก รัฐบาลไทยจึงส่งเสริมให้มีการณรงค์บริโภคนมในหมู่ประชาชนทั่วไป โดยเฉพาะเด็กและเยาวชน และในปัจจุบันประเทศไทยมีกำลังการผลิตนมโคดิบสูงถึง 28,000 ตันต่อวัน การที่นมโคอุดมไปด้วยคุณค่าทางอาหารนั้น ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมาในระหว่างขั้นตอน

ต่างๆ เจริญเติบโตได้เป็นอย่างดีเช่นกันด้วย เหตุนี้จึงทำให้น้ำมันโคดิบเกิดเน่าเสียได้ง่าย ทำให้คุณภาพของน้ำมันไม่ได้มาตรฐาน และมีผลต่ออายุการเก็บรักษาน้ำมันและผลิตภัณฑ์จากนม

ในปี พ.ศ. 2540 ได้มีการจัดตั้งองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย(อสค.) ขึ้น เพื่อส่งเสริมการเลี้ยงโคนมและพัฒนาอุตสาหกรรมนม โดยให้ความสำคัญทางด้านการจัดการฟาร์ม และกระบวนการผลิต ทำให้การเลี้ยงโคนมเพื่อผลิตน้ำมันโคดิบได้แพร่หลายออกไปในจังหวัดต่างๆ การผลิตน้ำมันโคดิบในช่วงดังกล่าวเป็นการผลิตเพื่อตอบสนองความต้องการของตลาดในท้องถิ่นเท่านั้น เพื่อเป็นการสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกร ประมาณ 23,000 ครัวเรือน หรือประมาณ 130,000 คน การเลี้ยงโคนมได้รับการสนับสนุนจากทั้งภาครัฐและเอกชน อย่างไรก็ตามคนไทยบริโภคนมค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับต่างประเทศ จึงมีการรณรงค์ให้คนไทยดื่มนมมากขึ้น โดยรัฐบาลส่งเสริมให้มีนมโรงเรียน เพื่อสนับสนุนให้เด็กๆ ตามโรงเรียนทุกโรงเรียน ได้มีโอกาสดื่มนมที่มีคุณภาพเพื่อเป็นการบำรุงร่างกาย ส่งผลให้ปริมาณความต้องการน้ำมันโคในประเทไทยมีเพิ่มสูงขึ้นมาก โครงการนมโรงเรียนเริ่มจัดตั้งขึ้นปี พ.ศ. 2535 จนถึงปัจจุบันโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ

- 1) ปลูกฝังการดื่มนมในเด็กและเยาวชน เป็นอาหารเสริม ระหว่างพัฒนาร่างกายและสติปัญญา
- 2) สนับสนุนการใช้ไขมันโคดิบในโครงการส่งเสริมการเลี้ยงโคนมของรัฐบาล จนกระทั่งมีกระแสข่าวถึงปัญหาคุณภาพนมไม่ได้มาตรฐาน มีการเติมสิ่งเจือปนลงในน้ำมันโคดิบเพื่อลดต้นทุนการผลิต ลดปริมาณการใช้ไขมันโคดิบแท้ 100% (ส่วนข้อมูลข่าว ฝ่ายวิจัยและข้อมูลข่าว สำนักข่าวไทย, 2545) น้ำมันที่มีสิ่งเจือปนจะให้คุณค่าทางโภชนาการลดลงด้วย เป็นการเอาเปรียบผู้บริโภคอย่างมาก ซึ่งปัญหานี้จะส่งผลกระทบต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมอีกด้วย เนื่องจากทำให้เกิดสภาวะน้ำมันโคดิบล้นตลาด รัฐบาลจึงต้องมีการเพิ่มหลักเกณฑ์และวิธีการทำงาน ตลอดจนมาตรการในการควบคุมดูแล เพื่อสกัดการแสวงหาผลประโยชน์ สนับสนุนการใช้ไขมันโคดิบในประเทศและเน้นการจัดซื้อไขมันจากสหกรณ์โคนม ในปี พ.ศ. 2547 รัฐบาลจึงกำหนดให้เป็นปีแห่งความปลอดภัยด้านอาหารมีการประชาสัมพันธ์ ทำให้ผู้เกี่ยวข้องตระหนักเรื่องคุณภาพน้ำมันโคดิบมากขึ้น ตั้งแต่ระดับฟาร์ม ศูนย์รวบรวมไขมันโคดิบและโรงงานผู้ผลิตนมพร้อมดื่ม ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญทำให้จำนวนฟาร์มโคนมที่ผ่านการรับรองมาตรฐานเพิ่มขึ้น (กรมปศุสัตว์, 2547) และเนื่องจากประเทศไทยเป็นสมาชิกองค์การการค้าโลก (WTO) และถูกกำหนดเขตการค้าเสรี (FTA) ส่งผลให้ต้องมีการวางมาตรการในการควบคุมดูแลสินค้าอย่างเป็นรูปธรรม

การตรวจสอบคุณภาพนํ้านมโคดิบ (กรมตรวจบัญชีสหกรณ์, 2555)

คุณภาพของนํ้านมโคดิบมีความสำคัญต่อผลิตภัณฑ์นม และอายุการเก็บรักษา โดยเฉพาะคุณภาพทางสุขศาสตร์ เพราะเชื้อแบคทีเรียเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของนํ้านมโคดิบ จึงมีความจำเป็นต้องมีการตรวจสอบคุณภาพนํ้านมโคดิบก่อนการรับซื้อ ก่อนจำหน่ายให้แก่โรงงานแปรรูปนํ้านมโคดิบของสหกรณ์โคนมและบริษัทเอกชน และก่อนนำเข้าแปรรูปผลิตภัณฑ์นม นอกจากนี้ผลของคุณภาพนํ้านมโคดิบยังเป็นตัวกำหนดราคาการซื้อขายของนํ้านมโคดิบอีกด้วย ซึ่งในการตรวจสอบคุณภาพนั้น ประกอบด้วย 3 ส่วน คือการตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพ การตรวจสอบคุณภาพทางเคมี และการตรวจสอบคุณภาพทางสุขศาสตร์

1. การตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพ (Physical quality) นํ้านมต้องมีสีขาวหรือสีขาวนวล กลิ่น รส ตามธรรมชาติ และปราศจากสิ่งแปลกปลอม

2. การตรวจสอบคุณภาพทางเคมี (Chemical quality)

2.1 ความถ่วงจำเพาะ (Specific gravity) ตรวจโดย Laotodensimeter มีค่าระหว่าง 1.026 - 1.030 ที่ 20 องศาเซลเซียส หรือ ระหว่าง 1.028-1.034 ที่ 15 องศาเซลเซียส

2.2 ปริมาณไขมันในนํ้านม (Fat) ด้วยวิธี Gerber method นํ้านมโคดิบมีปริมาณไม่ต่ำกว่าร้อยละ 3.2

2.3 ปริมาณเนื้อมันทั้งหมด (Total solids: TS) และปริมาณเนื้อมันไม่รวมมันเนย (Solids not fat: SNF) โดยใช้ Milko scan มีปริมาณเนื้อมันทั้งหมดไม่น้อยกว่าร้อยละ 12 และมีปริมาณเนื้อมันไม่รวมมันเนยไม่น้อยกว่าร้อยละ 8.25

2.4 ความเป็นกรด – เบส (pH) อยู่ในช่วง 6.6 ถึง 6.8 และมีค่าความเป็นกรด (Titratable acid) ไม่เกินร้อยละ 0.16

2.5 จุดเยือกแข็ง (Freezing point) มีค่าจุดเยือกแข็งไม่สูงกว่า - 0.520 องศาเซลเซียส

2.6 สารปฏิชีวนะในนํ้านม (Antibiotic) ด้วยวิธี Delvo test หรือวิธีอื่นที่เทียบเท่า นํ้านมที่ไม่มีสารปฏิชีวนะปนเปื้อนโดยผลทดสอบเป็นลบ (Negative)

2.7 สารปนเปื้อนในนํ้านม เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คลอรีน หรืออื่นๆ ด้วยวิธี Peroxide test หรือวิธีอื่นที่เทียบเท่า นํ้านมที่ไม่มีสารปนเปื้อนโดยผลทดสอบเป็น 0

3. การตรวจสอบคุณภาพทางสุขศาสตร์ (Hygienic quality)

3.1 ทดสอบปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ (Alcohol test) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 75 นํ้านมไม่มีการตกตะกอนโดยผลทดสอบเป็นลบ (Negative)

3.2 ทดสอบการตกตะกอนด้วยการต้ม (Clot on boiling test) ถ้าทดสอบปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์ไม่ผ่านให้ตรวจยืนยันด้วยวิธีนี้ น้ำนมต้องไม่มีการจับตัวเป็นก้อนโดยผลทดสอบเป็นลบ (Negative)

3.3 ปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำนม ด้วยวิธี Methylene Blue Test หรือด้วยวิธี Resazurin test วิธี Methylene Blue เปลี่ยนสีมากกว่า 4 ชั่วโมง หรือมีการเปลี่ยนสีของ Resazurin ไม่น้อยกว่าเกรด 4.5

3.4 ปริมาณจุลินทรีย์ในน้ำนม ด้วยวิธี Standard Plate Count (SPC) น้ำนมต้องมีจุลินทรีย์ ไม่เกิน 500,000 โคโลนีต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

3.5 จำนวนเม็ดเลือดขาวในน้ำนม (Somatic Cell Count: SCC) ซึ่งบ่งชี้ถึงการอักเสบของเต้านมโค ด้วยวิธี Direct microscope count หรือ Fluoro – opto electronic method มีจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่เกิน 500,000 เซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ทั้งนี้ การตรวจสอบคุณภาพน้ำนมโคดิบเพื่อกำหนดราคาซื้อขาย โดยทั่วไปสหกรณ์ใช้การตรวจสอบคุณลักษณะทางกายภาพเพื่อพิจารณาในเบื้องต้นก่อนว่าจะรับซื้อน้ำนมโคดิบหรือไม่ จากนั้นจึงเรียกเก็บตัวอย่างน้ำนมโคดิบเพื่อไปตรวจสอบคุณภาพทางเคมีและคุณภาพทางจุลชีววิทยาในห้องปฏิบัติการโดยอาจไม่ตรวจสอบทุกขั้นตอน เนื่องจากใช้ระยะเวลาที่นานมากและมีค่าใช้จ่ายสูง สหกรณ์เลือกใช้วิธีการตรวจสอบเฉพาะที่ถือเป็นเกณฑ์ในการกำหนดราคาการรับซื้อน้ำนมโคดิบตามระเบียบสหกรณ์ ว่าด้วยการให้ราคาน้ำนมโคดิบกำหนดโดยสหกรณ์จะสุ่มตัวอย่างน้ำนมของสมาชิกและผู้มิใช่สมาชิกทุกรายเดือนละ 2 ครั้ง เพื่อตรวจสอบคุณภาพและให้ราคาน้ำนมโคดิบตามงวด ดังแสดงในตาราง 2 ตัวอย่างการรับซื้อน้ำนมโคดิบของสหกรณ์ในราคามาตรฐาน 18.00 บาทต่อกิโลกรัม ถือกำหนดปริมาณไขมันในน้ำนม ร้อยละ 3.6 เป็นเกณฑ์ และจะเพิ่มหรือลดราคาน้ำนมดิบจากราคามาตรฐาน (กรมตรวจบัญชีสหกรณ์, 2555; กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558)

ตาราง 2 การเพิ่มหรือลดของราคาการรับซื้อน้ำมันดิบ

คุณสมบัติ	มาตรฐาน	การจัดเกรด – ราคา
¹ ไขมัน	ร้อยละ < 3.20	ลดลง 40 สต./กก.
	ร้อยละ 3.20-3.39	ลดลง 20 สต./กก.
	ร้อยละ 3.40-3.59	ไม่ลด/ไม่เพิ่ม
	ร้อยละ 3.60-3.79	เพิ่มขึ้น 20 สต./กก.
	ร้อยละ 3.80-3.99	เพิ่มขึ้น 30 สต./กก.
	ร้อยละ ≥ 4.00	เพิ่มขึ้น 40 สต./กก.
¹ จุดเยือกแข็ง (Freezing Point)	สูงกว่าหรือเท่ากับ -0.520	-0.519 ถึง -0.515 °C ลดลง 10 สต./กก.
		-0.514 ถึง -0.510 °C ลดลง 20 สต./กก.
		อุณหภูมิสูงกว่า -0.510 °C ลดลง 1 บาท/กก.
¹ ความสะอาดคอก	คะแนน 5 (ดีมาก)	จะได้รับเงิน +15 สต./กก.
	คะแนน 4 (ดี)	จะได้รับเงิน +12 สต./กก.
	คะแนน 3 (ปานกลาง)	จะได้รับเงิน + 9 สต./กก.
	คะแนน 2 (พอใช้)	จะได้รับเงิน + 6 สต./กก.
	คะแนน 1 (ไม่ดี)	จะได้รับเงิน + 3 สต./กก.
	คะแนน 0 (แย่มาก)	จะได้รับเงิน 0 สต./กก.
¹ การทดสอบเมทิลีนบลู (Methylene Blue Test)		จำนวนชั่วโมงก่อนการเปลี่ยนสีของเมทิลีนบลู
		เกรด 1 (>6 ชั่วโมง) ได้รับเงินเพิ่มขึ้น 10 สต./กก.
		เกรด 2 (6 ชั่วโมง) ได้รับเงินเพิ่มขึ้น 10 สต./กก.
		เกรด 3 (5 ชั่วโมง) ได้รับเงิน 0 สต./กก.
		เกรด 5 (3 ชั่วโมง) ได้รับเงินลดลง 10 สต./กก.
		เกรด 6 (<3 ชั่วโมง) ได้รับเงินลดลง 20 สต./กก.
¹ ปริมาณเนื้อมันรวม ไขมัน (Solids not fat : SNF)		SNF น้อยกว่า 8.25 ลดลง 40 สต./กก.
		SNF 8.25 – 8.34 ลดลง 20 สต./กก.
		SNF 8.35 – 8.49 เพิ่มขึ้น 0 สต./กก.
		SNF 8.60 – 8.69 เพิ่มขึ้น 30 สต./กก.
		SNF มากกว่าหรือเท่ากับ 8.70 เพิ่มขึ้น 60 สต./กก.

ตาราง 2 (ต่อ)

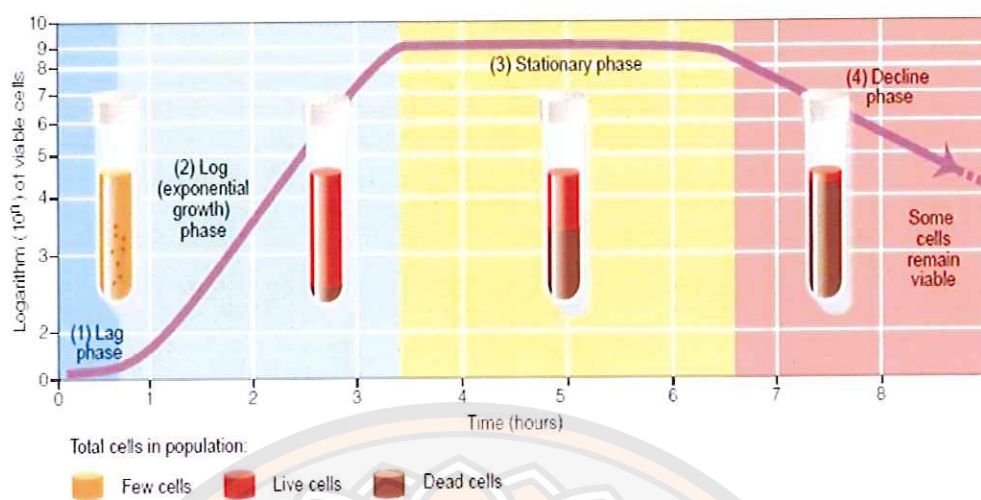
คุณสมบัติ	มาตรฐาน	การจัดเกรด – ราคา
² จุลินทรีย์ (Stand plate count)	$\leq 200,000$ colony/ml	เพิ่มขึ้น 50 สต./กก.
	200,001 – 300,000 colony/ml	เพิ่มขึ้น 30 สต./กก.
	300,001 – 400,000 colony/ml	เพิ่มขึ้น 20 สต./กก.
	400,001 – 500,000 colony/m	ลดลง 0 สต./กก.
	500,001 – 700,000 colony/m	ลดลง 20 สต./กก.
	700,001 – 1,000,000 colony/m	ลดลง 30 สต./กก.
	$> 1,000,000$ colony/m	ลดลง 50 สต./กก.
² จำนวนเม็ดเลือดขาว (Somatic cell count)	$< 200,000$ cell/ml	เพิ่มขึ้น 50 สต./กก.
	200,001 – 300,000 cell/ml	เพิ่มขึ้น 30 สต./กก.
	300,001 – 400,000 cell/ml	เพิ่มขึ้น 20 สต./กก.
	400,001 – 500,000 cell/ml	ไม่ลด/ไม่เพิ่ม
	500,001 – 700,000 cell/ml	ลดลง 20 สต./กก.
	700,001 – 1,000,000 cell/ml	ลดลง 30 สต./กก.
	$> 1,000,000$ cell/ml	ลดลง 50 สต./กก.

ที่มา: ดัดแปลงจาก ¹ กรมตรวจบัญชีสหกรณ์, 2555; ² กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558

เชื้อแบคทีเรียและการเจริญเติบโต

การเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียเกิดขึ้นโดยการแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสอง ส่วนยีสต์บางชนิดมีการแบ่งเซลล์คล้ายเชื้อแบคทีเรีย แต่บางชนิดมีการเจริญโดยการแตกหน่อ เชื้อแบคทีเรียมีการแบ่งเซลล์แบบทวิภาค (Binary fission) คือจาก 1 เซลล์ เป็น 2 เซลล์ เท่าๆ กัน ($1 \rightarrow 2 \rightarrow 4 \rightarrow 8 \rightarrow 16 \rightarrow 32 \rightarrow 64 \dots$ หรือ 2^n) การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียไม่ได้หมายความว่าขนาดของเซลล์ใหญ่ขึ้น แต่หมายถึงการเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและฟิสิกส์ภายในเซลล์ การเจริญเติบโตเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งในการดำรงชีวิต สามารถที่จะตรวจสอบได้โดยการวัดการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์หรือมวลชีวภาพ (Biomass) ของประชากรต่อหนึ่งหน่วยเวลา ซึ่งเรียกว่า "อัตราการเจริญเติบโต" (Growth rate) เวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนประชากรจากเดิมเป็น 2 เท่า เรียกว่า generation time (Doubling time) (พิมพ์เพ็ญพรเฉลิม และนิธิยา รัตนাপนนท์, 2554) จะแตกต่างกันไปในแต่ละ species ในสภาวะแวดล้อมต่างๆ เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดมี generation time แตกต่างกันไป (ตาราง 3) เช่น *Escherichia coli* ใช้เวลาในการแบ่งเซลล์ครั้งละประมาณ 15-20 นาที ส่วน *Staphylococcus aureus* ใช้เวลาประมาณ 27-30 นาที นอกจากนี้ยังพบว่า สภาวะแวดล้อมต่างๆ เช่น pH ชนิดของอาหาร อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ ฯลฯ ยังมีผลต่อ generation time อีกด้วย เช่น *Escherichia coli* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว (Broth) แล้วนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาในการแบ่งเซลล์แต่ละครั้งประมาณ 17 นาที ส่วน *Escherichia coli* ที่เลี้ยงในน้ำนมแล้วบ่ม เชื้อที่อุณหภูมิเดียวกัน จะใช้เวลาในการแบ่งเซลล์แต่ละครั้งประมาณ 12.5 นาที เท่านั้น เป็นต้น การเติบโตของเชื้อแบคทีเรียสามารถบอกได้โดยการวัดความขุ่น (Turbidity) ของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว การเพิ่มขนาดของโคโลนีบนอาหารแข็ง หรือการเพิ่มของจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทั้งนี้การวัดนั้นต้องเทียบกับหน่วยเวลา

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียจำนวนหนึ่ง ใส่ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลว แล้วจัดสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ออกซิเจน ให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียนั้น จะพบว่าแบคทีเรียมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น รูปแบบของการเจริญของเชื้อแบคทีเรียจะเป็นไปดังภาพ 1 ซึ่งแบ่งเป็นระยะต่างๆ ได้ 4 ระยะ ดังนี้



ภาพ 1 กราฟการเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย

ที่มา: http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=4638&typ=html

1. Lag phase (ระยะพัก) เป็นระยะแรกที่เชื้อแบคทีเรียเริ่มพบกับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ เชื้อแบคทีเรียจะปรับตัวให้เข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อมนั้น มีการสร้างเอนไซม์ที่เหมาะสม ที่จะใช้กับอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการสร้างโปรตีน และส่วนประกอบอื่นๆ ที่สำคัญของเซลล์ ตอนระยะท้ายๆ ของระยะนี้ เซลล์อาจจะมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าเดิมเล็กน้อย และพร้อมที่จะแบ่งตัว ระยะ lag นี้อาจจะยาวนานแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการแปรรูปอาหารจะพยายามยืดช่วงนี้ไปให้ยาวนานที่สุด เช่น การใช้อุณหภูมิต่ำ (Cold storage)

2. Exponential หรือ Log phase (ระยะแบ่งตัวทวีคูณ) เป็นระยะที่เชื้อแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุด มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณที่เป็นไปอย่างต่อเนื่องของส่วนประกอบทางเคมีของเซลล์ และกระบวนการต่างๆ ตลอดจนสมบัติทางสรีรวิทยาเป็นแบบเดียวกัน

3. Stationary phase (ระยะคงจำนวนเซลล์) เป็นระยะที่เชื้อแบคทีเรียมีจำนวนคงที่ ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียไม่มีการเพิ่มจำนวนอีกหรืออัตราเกิดเท่ากับอัตราตาย การที่เชื้อแบคทีเรียเจริญแล้วเข้าสู่ระยะ Stationary นี้เพราะอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้เริ่มมีจำกัด สารพิษหรือสารที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียเริ่มมีมากขึ้น รวมทั้งปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตเริ่มไม่เหมาะสม ทำให้อัตราการเจริญเติบโตลดต่ำลง

4. Death phase หรือ Decline phase (ระยะเซลล์ตาย) เป็นระยะสุดท้าย เชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่จะตายลงมากกว่าเชื้อแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะอาหารอาจหมดและมีสารพิษสะสมอยู่เป็นจำนวนมากจนสามารถทำลายโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียได้หรือทำให้เซลล์หยุดชะงักการเจริญได้ ซึ่งเป็นผลให้เชื้อแบคทีเรียลดจำนวนลงแบบทวีคูณจนในที่สุดแบคทีเรียทั้งหมดตายไป

ตาราง 3 Generation times ของเชื้อแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Optimum condition) กับการเจริญเติบโต

Bacterium	Medium	Generation Time (minutes)	Temperature (C°)
<i>Escherichia coli</i>	Glucose-salts	17	37
<i>Bacillus megaterium</i>	Sucrose-salts	25	37
<i>Streptococcus lactis</i>	Milk	26	37
<i>Streptococcus lactis</i>	Lactose broth	48	37
<i>Staphylococcus aureus</i>	Heart infusion broth	27-48	37
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Milk	66-87	37
<i>Rhizobium japonicum</i>	Mannitol-salts-yeast extract	344-461	20-30
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Synthetic	792-932	37
<i>Treponema pallidum</i>	Rabbit testes	1980	37

ที่มา: ดัดแปลงจาก พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิม และนิริยา รัตนปนนท์, 2554

เชื้อแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ

เชื้อแบคทีเรียในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นมดังแสดงในตาราง 4 ที่ทำให้เกิดลักษณะไม่พึงประสงค์ แบ่งได้ 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (Non - pathogenic bacteria) หรือกลุ่มที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในน้ำนม (Spoilage bacteria) และเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค (Pathogenic bacteria)

1. เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในน้ำนม เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในน้ำนมมีหลายชนิด ประกอบด้วย

1.1 เชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลแลคโตสในน้ำนม ได้แก่ สกุล *Lactococcus* และ *Lactobacillus* ซึ่ง *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus cremoris* เจริญได้อย่างรวดเร็วในน้ำนม โดยเฉพาะที่

อุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส ดังนั้นน้ำนมจึงจำเป็นต้องเก็บรักษาในตู้เย็น ในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์นมมีการใช้ประโยชน์จากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ในกระบวนการผลิตโยเกิร์ต เนยแข็ง (cheese) และเนยเหลว (butter) โดยควบคุมสภาวะการเจริญเติบโตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ (Walstra, et al., 1999, p. 162)

1.2 โคลิฟอร์ม (Coliform) ซึ่งอยู่วงศ์ Enterobacteriaceae มีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ และในร่างกายเช่น บริเวณลำไส้ เชื้อแบคทีเรียที่สำคัญในวงศ์นี้ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Aerobacter aerogenes* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส ย่อยสลายโปรตีน และน้ำตาลแล็กโทส ทำให้เกิดแก๊สและกลิ่นรสไม่พึงประสงค์ในน้ำนม

1.3 กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (Psychrotroph) ได้แก่ *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* และ *Alcaligenes* เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส สามารถแบ่งเซลล์ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส (Protease) และไลเปสย่อยสลายโปรตีนและไขมัน ทำให้เกิดการเน่าเหม็นและกลิ่นหืนของน้ำนม

1.4 กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่ทนต่อความร้อน (Heat resistant bacteria) ได้แก่ *Microbacterium lacticum*, *thermophilic streptococci* และรวมถึง *Micrococcus* บางชนิดที่ไม่สร้างสปอร์แต่มีเซลล์ไม่เกี่ยวกับเพศ (Vegetative cell) จะถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที

1.5 กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ ได้แก่ *Bacillus* และ *Clostridium* ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย ทั้งสองชนิดนี้สามารถสร้างสปอร์ได้ และทนต่อความร้อน โดยทั่วไปจะพบเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจากดิน ฝุ่นละออง มูลสัตว์ รวมถึงอาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ มีเชื้อแบคทีเรียชนิดที่สำคัญได้แก่

1.5.1 *Bacillus cereus* ทำให้นมพาสเจอร์ไรส์เกิดการเน่าเสีย (Sweet curdling) เกิดกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ เกิดการรวมกลุ่มของเม็ดไขมัน (Clump of fat globules) ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูงสามารถเจริญได้แม้ว่าอุณหภูมิจะลดลงถึง 7 องศาเซลเซียส

1.5.2 *Bacillus subtilis* และ *Bacillus stearothermophilus* ทนต่อความร้อน และทำให้น้ำนมที่ผ่านกระบวนการสเตอริไรซ์ที่ไม่เหมาะสมเน่าเสียได้

1.5.3 *Clostridium tyrobutyricum* จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรดบิวทิริก (Butyric acid bacteria) เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญในการเกิดข้อบกพร่องในการผลิตเนยแข็งชนิด Gouda หรือ Emmentaler ซึ่งทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า late blowing เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวจะสร้างแก๊สไฮโดรเจน ทำให้เกิดรูขนาดใหญ่ และก้อนเนยแข็งเกิดการแตก นอกจากนี้ยังทำให้เกิดกลิ่นเหม็น (Awful flavor)

2. เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สำคัญในการชี้วัดความปลอดภัยในกระบวนการผลิตนํ้านมและผลิตภัณฑ์นม เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่

2.1 *Mycobacterium tuberculosis* พบได้จากโคนมและผู้รีดนม ถูกทำลายได้ด้วยกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ สภาวะนี้จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ชี้วัดสภาวะการพาสเจอร์ไรซ์ที่เหมาะสมและยังทำให้มั่นใจได้ว่าทำลายเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้จริง

2.2 *Staphylococcus aureus* จะพบในเต้านมของโคนมที่เป็นโรคเต้านมอักเสบและสามารถพบได้ในร่างกายมนุษย์ บางสายพันธุ์สร้างสารพิษที่ทนร้อนและเป็นสาเหตุของการอักเสบของเต้านม

2.3 *Salmonella* และ *Shigella* spp. พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เป็นสาเหตุให้เกิดการทำงานที่ผิดปกติของลำไส้

2.4 *Campylobacter jejuni* อยู่ในวงศ์ Spirillaceae และพบได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ ทำให้เกิดอาการท้องร่วงและเกิดตะคริวในบริเวณช่องท้อง สามารถเจริญได้ในนํ้ามดิบที่อุณหภูมิต่ำ แต่เซลล์จะไม่ทนต่อความร้อน

2.5 *Listeria monocytogenes* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ ถูกทำลายได้ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.6 *Vibrio cholerae* พบได้ในน้ำที่ไม่สะอาด อาจเกิดการปนเปื้อนจากคนรีดนมที่ติดเชื้ออหิวาต์

2.7 *Coxiella burnetii* อยู่ในวงศ์ Rickettsiae เป็นสาเหตุของโรค Q fever พบได้ในโคนม แพะ และแกะ รวมถึงเห็บหรือหมัด ถูกทำลายได้ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.8 *Bacillus cereus* สปอร์ของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้พบได้ทั่วไป และถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียส

2.9 *Clostridium botulinum* พบได้ในน้ำและดิน สร้างสารพิษโบ툴ิน (Botulin) ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แบคทีเรียชนิดนี้จะเจริญบนเนยแข็งและมีรีดอกซ์โพเทนเชียลต่ำ (Low redox potential) หรือนมข้นหวานที่บรรจุในสภาวะสุญญากาศ

2.10 *Clostridium perfringens* พบสปอร์ได้ในดิน มูลสัตว์ และอาจพบได้ในนมดิบ สามารถสร้างสารพิษในขณะที่สร้างสปอร์ในระบบย่อยอาหาร จึงไม่สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ในนํ้านมดิบ (Walstra, et al., 1999, pp. 158-165)

ตาราง 4 เชื้อแบคทีเรียในน้ำนมและผลิตภัณฑ์นม

Name	Source	Pathogenicity	Spoilage
<i>Bacillus anthracis</i>	Diseased cow , soil	Anthrax	No
<i>Bacillus cereus</i>	Feed, dung, soil, dust	Food poisoning	Sweet curdling, "bitty cream" in pasteurized milk and cream
<i>Bacillus subtilis</i> and <i>B.stearothermophilus</i>	Feed, dung, soil, dust	Probably not	Spoil sterilized milk
<i>Brucella abortus</i>	Diseased cow	Contagious: abortion (cow), Malta fever? (humans)	No
<i>Campylobacter jejuni</i>	Dung, water	Intestinal disorder	No
<i>Clostridium botulinum</i>	Soil, contaminated water	Botulism	No
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Soil, dung, contaminated water	Intestinal disorder (infant formulas)	No
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Soil, silage, dung	Not	"Late blowing" in Cheese
Coliforms	Feces, milking utensils contaminated water	Mastitis, intestinal Disorder	Spoil milk and Cheese
<i>Corynebacterium bovis</i>	Teat canal	Not	No
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	Interior udder, flies	Mastitis	Hardly
<i>Coxiella burnetii</i>	Infected cattle, dung	Q fever (humans)	No
<i>Lactobacillus</i> spp.	Milking utensils, milk in churns, milking parlor	Not	Sour milk
<i>Lactococcus lactis</i>			
<i>Listeria monocytogenes</i>	Soil, feed, dung	Meningitis	No
<i>Leptospira (hardjo)</i>	Infected cattle, urine, contaminated water, surface water	Leptospirosis	No
<i>Microbacterium lacticum</i>	Milking utensils	Not	pasteurized Products
<i>Micrococcus</i> spp.	Teat canal, skin, milking parlor	Probably not	Hardly

ตาราง 4 (ต่อ)

Name	Source	Pathogenicity	Spoilage
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Diseased cow or milker	Mastitis, tuberculos	No
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Cow	Weak	No
<i>Psychrotrophs</i> , e.g., <i>Pseudomonas</i>	Milking utensils, cold stored milk, polluted water	Occasionally	Hydrolyze protein and fat in cold stored milk
<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>	Dung, polluted water	Intestinal disorder, Mastitis	No
<i>Staphylococcus aureus</i>	Teat canal, interior udder, skin, diseased milker	Food poisoning mastitis, ulcers	Hardly
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Teat canal, skin, milking parlor	Probably not	Hardly
<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>S. parlor</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. uberis</i> , <i>S. pyogenes</i>	Interior udder, milking parlor	Mastitis	Sour milk
<i>Streptococcus thermophiles</i>	Milking utensils, milk in churns, milking parlor	Not	Sour milk
<i>Vibrio cholerae</i>	Polluted water, Diseased milker	Cholera	No

ที่มา: ดัดแปลงจาก Walstra, et al., 1999

สาเหตุการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมดิบ

แหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบเป็นสิ่งสำคัญที่ควรรู้ เนื่องจากเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบเพิ่มสูงขึ้น แบ่งออกได้เป็น 2 สาเหตุหลักๆ ได้แก่

1. การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียจากเต้านมของโคนม

ปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำนมโคดิบจากเต้านมของโคนมแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ ได้แก่ ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบจากโคนมสุขภาพดีและจากโคนมที่เป็นโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคเต้านมอักเสบ

1.1 การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียจากโคนมสุขภาพดี

ส่วนใหญ่ในกระเปาะสร้างน้ำนม ท่อน้ำนม โพรงเก็บและพักน้ำนม จะไม่พบเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมดิบแต่สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรียได้บริเวณปลายสุดของหัวนม โดยเฉพาะกลุ่มที่ไม่ทนร้อน ได้แก่ *Micrococcus Staphylococcus* sp. และ *Corynebacterium bovis* หรืออาจพบเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นปนเปื้อนกับน้ำนมในขณะรีดนม ถ้าในขั้นตอนการรีดนมใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมดิบควรต่ำกว่า 100 โคโลนีต่อน้ำนม 1 มิลลิลิตร (Walstra, et al., 1999, p. 165)

1.2 การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียจากโคนมที่ป่วยเป็นโรค

เมื่อโคนมป่วยจากการติดเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุในการเกิดโรคสามารถเข้าสู่ น้ำนมได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อโคนมป่วยเป็นโรคเต้านมอักเสบ โรคเต้านมอักเสบ (Mastitis) หมายถึง การเปลี่ยนแปลงภายในเต้านมที่ขึ้นอยู่กับกระบวนการคายเคืองของเต้านมร่วมกับการเปลี่ยนแปลงทางสรีระและการพบเชื้อโรค ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเต้านม น้ำนมจากเต้านมที่อักเสบสามารถชี้วัดได้จากการเพิ่มของจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เพิ่มจำนวน เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย โดยเฉพาะที่เข้าสู่เต้านม เซลล์เหล่านี้เรียกอีกอย่างว่าเซลล์ของร่างกายในน้ำนม (โซมาติกเซลล์) ประกอบด้วย เม็ดเลือดขาวเป็นส่วนใหญ่ โดยจะแบ่งเป็นเต้านมอักเสบแสดงอาการ (Clinical mastitis) เต้านมแม่โคจะมีการบวมแดงร้อนแสดงการอักเสบชัดเจน น้ำนมเปลี่ยนลักษณะเป็นตะกอน ก้อน หรือออกใส แม่โคจะมีอาการไข้ร่วมขึ้นกับชนิดเชื้อที่ทำให้เกิดอาการอักเสบ และเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (Subclinical mastitis) เต้านมและลักษณะน้ำนมไม่แสดงอาการเปลี่ยนแปลงใดๆ ให้เห็นด้วยตาเปล่า แต่มีอาการติดเชื้อแฝงอยู่ในเต้านมและเซลล์ในน้ำนมมีจำนวนเพิ่มขึ้น เซลล์สร้างน้ำนมมีความเสียหายทำให้การผลิตน้ำนมลดลงอาจพัฒนาไปสู่การเป็นเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการได้ โดยเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคเต้านมอักเสบแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ประกอบด้วย

1.2.1 กลุ่มที่ก่อโรค เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดเต้านมอักเสบเมื่อมีอาการติดเชื้อเข้าสู่เต้านม เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้สามารถติดจากโคที่เป็นโรคไปสู่ตัวอื่นได้ในกระบวนการรีดนม

1) *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกติดสีน้ำเงิน รูปร่างกลมอยู่เป็นกลุ่ม โดยปกติจะไม่พบที่ผิวของเต้านมที่สุขภาพดี แต่จะพบเชื้อชนิดนี้เจริญในท่อรูนมในกรณีที่มีหัวนมมีแผล เชื้อนี้จะอาศัยอยู่ในเต้านมที่มีการติดเชื้อแล้วแพร่ไปสู่ตัวอื่นๆ โดยผ่านทางเครื่องรีดนม ทางท่อยางของหัวรีดนม ผ้าเช็ดเต้านม มือผู้รีดนม เมื่อมีการติดเชื้อ เชื้อจะทำลายเนื้อเยื่อเต้านมที่ผลิตน้ำนม ทำให้เซลล์น้ำนมสูงขึ้น มักทำให้เกิดเต้านมอักเสบแบบเรื้อรัง เต้านมมีลักษณะแข็ง มีเนื้อพังผืดแทรกอยู่ในเต้า จับคลำเต้านมไม่นุ่มสม่ำเสมอ อาจพบเชื้อในโคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการแล้วพัฒนาเป็นแบบแสดงอาการภายหลัง ลักษณะของเชื้อทำให้ยากแก่การรักษาด้วยเชื้อมักกระตุ้นให้เกิดเนื้อเยื่อตายล้อมรอบเชื้อ ทำให้ยาปฏิชีวนะที่ให้ไม่สามารถเข้าถึงไปทำลายเชื้อได้ ทำให้โคเกิดโรคเต้านมอักเสบแบบเป็นๆ หายๆ หรือแบบเรื้อรังในกรณีที่โคเป็นโรคแบบเฉียบพลัน เต้านมจะร้อนบวมแดง แม่โคมีไข้ 39-41 องศาเซลเซียส ต่อมาที่เต้านมติดเชื้อจะไหม้ (Gangrenous) แล้วเปลี่ยนเป็นเย็นลง เต้านมจะออกสีม่วงเรียกว่า Blue bag โคที่พบว่าเต้านมอักเสบจากเชื้อมักแนะนำให้คัดออกจากฝูงให้เร็วที่สุดเพื่อไม่เป็นตัวแพร่เชื้อไปสู่ตัวอื่นๆ ในฝูง

2) *Streptococcus agalactiae* เป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก รูปร่างกลมอยู่เป็นสาย บริเวณที่อยู่คือเต้านมแต่อาจพบเชื้อได้ทั่วไปในท้องนอโค เครื่องรีดนม มือผู้รีดโคสาวมักติดเชื้อมาจากการถูกเลี้ยงด้วยน้ำนมที่มีเชื้อ (น้ำนมจากเต้านมอักเสบ) ในตอนเด็ก เชื้อในน้ำนมขยายจำนวนสูงมากอาจทำให้เชื้อแบคทีเรียในน้ำนมถึงรวมของฝูงสูงขึ้นมากกว่า 100,000 เซลล์/มิลลิลิตร สามารถแพร่เชื้อสู่ตัวอื่นๆ ได้ในกระบวนการรีดนม การจัดการฟาร์มที่ไม่สะอาด การขาดมาตรการควบคุมและป้องกันเต้านมอักเสบที่รัดกุม การรีดนมไม่หมดเต้าจะมีส่วนเพิ่มความเสี่ยงของการติดเชื้อในฝูง ในเต้านมที่ติดเชื้อปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมจะสูงมากถึง 1-10 ล้านเซลล์/มิลลิลิตร และมีผลให้ค่าเซลล์ในน้ำนมในถังรวมสูงด้วย ในรายที่เป็นเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ หากไม่ทำการรักษาให้ทันอาจทำให้เป็นแบบเรื้อรังได้ เชื้อนี้ตอบสนองต่อการรักษาโดยเพนิซิลลินสามารถให้การรักษาในระยะรีดนมได้ (Lactating period)

3) *Mycoplasma bovis* เป็นทั้งเชื้อแบคทีเรียและไวรัส หลังติดเชื้อแสดงอาการอย่างรวดเร็ว การติดเชื้อน้ำนมมีลักษณะคล้ายเป็นหนอง น้ำนมลดลงมาก แพร่ติดตัวอื่นในฝูงได้ไว ไม่ค่อยตอบสนองต่อการรักษาด้วยยาปฏิชีวนะ เชื้อนี้สามารถพบได้จากอุจจาระ เลือด

ระบบทางเดินหายใจ ตา และมดลูกโคที่มีการอักเสบติดเชื้อ การใช้เข็มฉีดยาเข้าเต้าน้ำที่ไม่ปราศจากเชื้อการดูแลหัวนมที่ไม่สะอาด

4) *Corynebacterium bovis* เป็นกลุ่มแกรมบวกที่มีขนาดเล็กมาก เต้าน้ำที่ติดเชื้อจะแสดงอาการน้อย เซลล์ในน้ำนมเพิ่มสูงขึ้นในระดับ 400,00 เซลล์/มิลลิลิตร การเกิดโรคในฟาร์มมักพบในฝูงที่ไม่มีการจุ่มหัวนมหลังรีด มีการแพร่โรคจากโคที่เป็นไปยังตัวอื่นๆ ในฝูงได้และกำจัดโรคจากฝูงได้

1.2.2 กลุ่มที่มาจากสิ่งแวดล้อม (Environmental microorganism) เป็นเชื้อที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่โคอาศัยอยู่ เชื้อจะเข้าสู่เต้าน้ำได้ในช่วงระหว่างการรีดนมโคนม

1) เชื้อกลุ่ม Streptococci จากสิ่งแวดล้อมคล้ายกับ *Streptococcus agalactiae* เป็นเชื้อกลุ่มแกรมบวก รูปร่างกลมอยู่เป็นสาย พบมากในที่รองนอนและทางเดินอาหารโค มักพบติดเชื้อในช่วงหยุดรีดนม อัตราการติดเชื้อใหม่จะสูงในช่วงรีดนม ช่วงที่โคมีโอกาสติดเชื้อได้มากเป็นระยะ 2 สัปดาห์ หลังหยุดรีดนมถึง 2 สัปดาห์ก่อนคลอด ดังนั้นการให้น้ำในระยะเวลาหยุดรีดนมเป็นการป้องกันและรักษาได้ดี การติดเชื้อจะสูงมากขึ้นหากรีดนมในที่เปียกใช้ผ้าเช็ดที่สกปรกและคอนกรีตคอกพักที่ไม่สะอาด แสดงอาการโดยพบน้ำนมเปลี่ยนสี มีก้อนตะกอนเล็กๆ ปนอยู่ เต้านมบวมเล็กน้อย มักพบเป็นระยะหลังคลอดและช่วงหยุดรีดนม แบบไม่แสดงอาการ พบเซลล์ในน้ำนมอยู่ในระดับ 300,000 – 2,000,000 เซลล์/มิลลิลิตร

2) โคลิฟอร์ม เป็นเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบ รูปร่างยาว พบในอุจจาระ น้ำที่ไม่สะอาด ดิน ที่รองนอน เชื้อกลุ่มนี้ที่พบคือ *Escherichia coli* และ *Klebsiella pneumonia* การติดเชื้อมักพบในช่วงระยะหยุดรีดนมและช่วงคลอดใหม่ ดังนั้นหากโคอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่สกปรกโอกาสการติดเชื้อจะพบสูง การติดเชื้อแบบแสดงอาการพบได้ตลอดระยะการรีดนม โดยทั่วไปไม่ทำให้เกิดปัญหารุนแรงแต่บางรายอาจพัฒนาเป็นแบบเฉียบพลัน โคมิใช่ไม่กินอาหาร น้ำนมลด เต้านมบวมแดง เจ็บเมื่อแตะ น้ำนมเปลี่ยนเป็นสีเหลือง น้ำนมใสปนก้อนตะกอนเนื่องจากเชื้อตัวนี้สร้างสารชีวพิษภายใน (Endotoxin) ได้จากผนังเซลล์ สารนี้จะทำให้โคมิใช้สูง เต้านมร้อนอักเสบรุนแรง เนื่องจากการก่อโรคไว้มากแม่โคอาจตายได้ หากไม่พบอาการเชื้ออาจติดเข้าสู่ท่อนมได้ระหว่างการรีดนม

1.2.3 กลุ่มที่พบก่อโรคในบางโอกาส (Opportunistic microorganism) เชื้อในกลุ่มนี้ สามารถแยกได้จากเต้าน้ำโคที่เป็นเต้าน้ำอักเสบแบบไม่แสดงอาการ ปกติจะพบอยู่บริเวณผิวเต้าน้ำ และหัวนม เชื้อกลุ่มนี้มีมากกว่า 20 ชนิด ของ *Staphylococcus* spp. หรือ Coagulase-Negative Staphylococci (CNS) ค่าเซลล์ในน้ำนมสูงประมาณ 1,000,000 เซลล์/

มิลลิลิตร ในรายแบบไม่แสดงอาการพบอัตราการติดเชื้อสูงในระยะหยุดรีดนมและหลังคลอด การเป็นแบบแสดงอาการพบน้อย

1.2.4 กลุ่มอื่นๆ (Other microorganism) เป็นเชื้อที่พบว่าทำให้เกิดเต้านมอักเสบได้น้อย เช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinomyces pyogenes* และ *Nocardia* spp.

2. การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในขณะรีดนมและหลังจากการรีดนม

สุขลักษณะในการรีดนมและหลังจากการรีดนม เป็นส่วนสำคัญต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำนม ถ้าน้ำนมได้จากโคนมสุขภาพดีจะมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดประมาณ 10,000 เซลล์ต่อน้ำนม 1 มิลลิลิตร หรือน้อยกว่านั้น แต่ถ้าโคนมป่วยหรือการรีดนมไม่ถูกสุขลักษณะที่ดีปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดอาจสูงถึง 1,000,000 เซลล์ต่อน้ำนม 1 มิลลิลิตร ปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวกับการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย ในขณะรีดนมและหลังจากการรีดนมประกอบด้วย

2.1 โคนมในขณะรีดนมเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนสู่น้ำนมได้จากบริเวณผิวหนังของหัวนมซึ่งปนเปื้อนมาจากมูลโค ดิน หรือฝุ่นละออง รวมถึงการปนเปื้อนของเศษผิวหนังที่หลุดลอก เส้นขน เศษเล็บ โดยทั่วไปเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ สามารถปนเปื้อนในน้ำนมหลังจากการรีดนมได้ รวมถึงโคลิฟอร์ม แบคทีเรียในลำไส้ สปอร์ของแบคทีเรีย โดยเฉพาะสปอร์ของ *Clostridium* sp. ซึ่งเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้สามารถก่อให้เกิดโรคในคนได้

2.2 ดิน มูลสัตว์ และฝุ่นละออง โดยทั่วไปสปอร์ของเชื้อแบคทีเรีย พบได้ทั่วไปในอากาศ โดยเฉพาะ *Bacillus subtilis* ที่พบได้ในฟางแห้ง สปอร์ของเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถปนเปื้อนเข้าสู่หัวนมในขณะที่เครื่องรีดนมทำงาน หรือตกลงในถังนมระหว่างการรีดนมโดยตรง ดังนั้นในการรีดนมควรทำความสะอาดอุปกรณ์การรีดนม โรงเรือน และรีดนมในขณะที่โคนมมีอาการสงบเพื่อไม่ให้เกิดฝุ่นละอองเพิ่มขึ้นในขณะรีดนม

2.3 อาหารสัตว์ เชื้อแบคทีเรียในอาหารสัตว์สามารถเข้าสู่หัวนมโดยผ่านทางระบบย่อยอาหารของโคนม และผ่านมายังมูลโคซึ่งก่อให้เกิดโรคในคนได้ เชื้อแบคทีเรียที่สำคัญ ได้แก่ กลุ่มเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์รวมถึง *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* และ *Clostridium tyrobyticum* โดยเฉพาะในหญ้าหมัก พบ *Clostridium tyrobyticum* จำนวนมาก โดยในบางประเทศ เช่น ประเทศสวีเดนและแลนด์สั้งห้ามใช้หญ้าหมักในการเลี้ยงโค เนื่องจากได้ตรวจสอบพบโคนมเกิดอาการท้องร่วงเมื่อกินหญ้าหมักส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียจากมูลโคในน้ำนมเพิ่มสูงขึ้น

2.4 อุปกรณ์สำหรับการรีดนม ควรทำความสะอาดอย่างเหมาะสม

2.5 น้ำที่ใช้ในกระบวนการรีดนม ควรเป็นน้ำสะอาดและมีการตรวจสอบคุณภาพน้ำเป็นระยะ

2.6 สุขลักษณะของผู้รีดนม ควรเป็นผู้ที่ไม่เป็นโรค เนื่องจากสามารถแพร่เชื้อโรคในน้ำนมได้โดยตรง (Walstra, et al., 1999, pp. 166-168)

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในน้ำนม

การตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีวศาสตร์ของน้ำนมถือเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งปริมาณเชื้อแบคทีเรียสามารถบ่งบอกถึงความสะดวกของน้ำนม ตั้งแต่การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคเต้านมอักเสบของแม่โค รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอันเนื่องมาจากความไม่สะอาดในระหว่างกระบวนการผลิต และอาจเป็นผลมาจากกระบวนการฆ่าเชื้อโรคในกระบวนการผลิต ในปัจจุบันยังมีการใช้เกณฑ์ควบคุมคุณภาพของน้ำนมตามปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบเพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการกำหนดราคาซื้อขายอีกด้วย จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบคุณภาพเสียก่อน การตรวจสอบสามารถทำได้ดังนี้

1. การตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Standard Plate Count; SPC)

เป็นการประเมินหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบทั้งบนและในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate out agar ซึ่งเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ดี สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าเป็นจุดกลมๆ เรียกว่า โคโลนี (Colony) วิธีการใช้เทคนิค Pour plate นำตัวอย่างหยดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปปั่นที่ตู้ปั่นเชื้ออุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการนับจำนวน colony forming unit (CFU) ที่อยู่ด้านบนและด้านในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วบันทึกค่าเป็น log CFU/ml

2. การประเมินระดับของเชื้อแบคทีเรียจากการเปลี่ยนสีไวต์ต่อสภาพรีดิวซ์ (Dry reduction test)

เป็นการวัดการเกิดปฏิกิริยารีดักชันโดยมีเอนไซม์รีดักเทส (Reductase) ของเชื้อแบคทีเรีย เชื้อแบคทีเรียจะใช้ออกซิเจนจากสารละลายเมธิลีนบลู (Methylene blue) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารละลายจากเมธิลีนบลูสีน้ำเงิน หรือสีฟ้าเป็นลิโวโคเมธิลีนบลูซึ่งมีสีขาว ทำการโดยนำตัวอย่างผสมกับสารละลายเมธิลีนบลู หลังจากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิไปเรื่อยๆ บันทึกผลในครั้งแรกที่ 30 นาที และชั่วโมงที่ 1, 2 ไปเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 6 และมีอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้คือริซาซูริน (Resazurin) เมื่อเกิดปฏิกิริยารีดักชัน จะเปลี่ยนเป็นรีโซรูฟิน ซึ่งมีสีชมพู เป็นไฮโดรรีโซฟูรินซึ่งไม่มีสี สำหรับวิธีนี้สามารถอ่านผลได้ 3 วิธี คือ 10 minute test, one-hour test และ Triple-reading test วิธี 10 minute test เป็นการทดสอบที่นิยมใช้ในการตรวจสอบคุณภาพ

เบื้องต้น เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่ One-hour test และ Triple-reading test จะให้ผลการทดสอบที่เที่ยงตรงกว่า (ธารารัตน์ ชื่อตอฟ, 2558, หน้า 338-339)

3. การนับจุลินทรีย์บนแผ่นกรองใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสง (Direct epifluorescent filter technique; DEFT)

การวิเคราะห์นี้อาศัยการนับจำนวนจุลินทรีย์ที่ถูกกรองบนแผ่นกรองจุลินทรีย์ซึ่งมีขนาดรูกรองเล็กกว่าขนาดจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยตรง วิธีนี้สามารถทำได้โดยการย้อมสีเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งมีอยู่ในสภาพแขวนลอยด้วยสีที่เรืองแสง เช่น Acridine orange, DAPI, SYBR green หลังจากนั้นนำมากรองบนแผ่นกรองจุลินทรีย์ที่มีพื้นหลังสีเข้มที่มีรูกรองขนาด 0.2 หรือ 0.45 ไมโครเมตร และนับจำนวนจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดที่ใช้ตรวจสอบอนุภาคเรืองแสง แล้วนำไปคำนวณเป็นค่าจุลินทรีย์ที่เรืองแสงบนแผ่นกรองต่อมิลลิเมตรหรือต่อกรัมของตัวอย่าง (ธารารัตน์ ชื่อตอฟ, 2558, หน้า 340-341)

4. การตรวจนับเชื้อแบคทีเรียทนความร้อนในน้ำนม (Laboratory pasteurized count; LPC)

เป็นการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ทนร้อน โดยนำตัวอย่างน้ำนมที่ผ่านขบวนการพาสเจอร์ไรซ์เข้มข้นที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำตัวอย่างน้ำนมดังกล่าวไป Pour plate ตัวอย่างน้ำนมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญอยู่ด้านบนและด้านในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และสุกมา สามงามนิม, 2550)

5. การตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มในน้ำนม (Violet ref bile agar; VRBA)

เชื้อแบคทีเรียในกลุ่มโคลิฟอร์มเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างแท่ง สามารถเจริญได้โดยใช้อากาศ หรือมีอากาศเล็กน้อยได้ เชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp. และ *Citrobacter* spp. นำตัวอย่างน้ำนมเทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Violet ref bile agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลเฉพาะโคโลนีสีชมพูเข้ม ที่มีขนาดมากกว่า 0.5 มิลลิเมตร (Christen, et al., 1992)

6. การตรวจวัดปริมาณแสงซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณ ATP (ATP photometry)

โดยปกติเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้งเชื้อแบคทีเรียมี ATP (Adenosine triphosphate) อยู่ วิธีนี้อาศัยการตรวจหา ATP ซึ่งจะแปรผันตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต พบว่าปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารชีวเคมีชนิดหนึ่งคือลูซิเฟอริน (Luciferin) ถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์ลูซิเฟอเรส (Luciferase) ดังนั้นในการตรวจวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียโดยวิธีนี้จึงต้องเตรียมสารที่

เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาดังกล่าว การอ่านผลจะสังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากความเข้มของแสงซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ ATP ซึ่งแปรไปตามปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่มีในตัวอย่าง (ธารารัตน์ ชี้อตอฟ, 2558, หน้า 342)

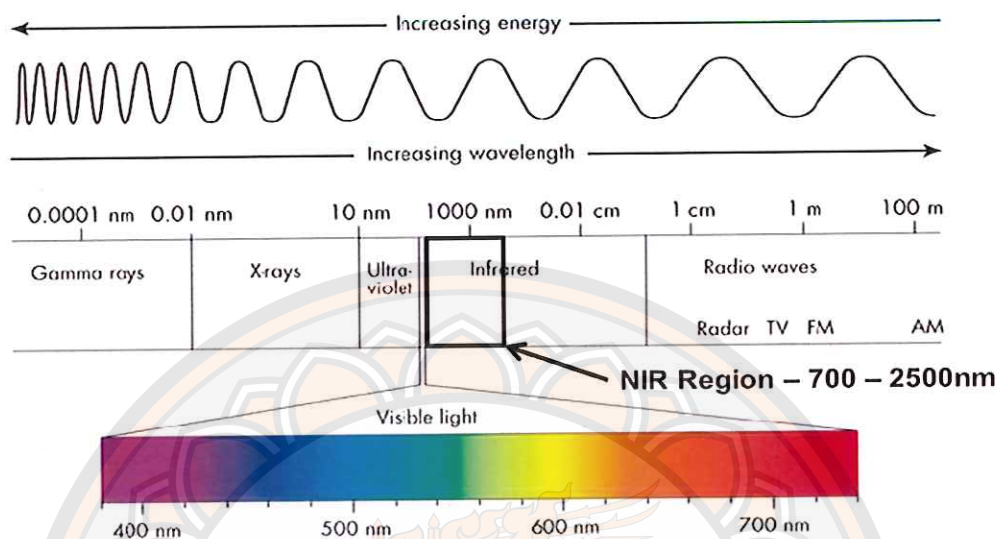
7. การตรวจวิเคราะห์สารพันธุกรรม (Genetic techniques)

การวิเคราะห์เชื้อแบคทีเรียโดยวิเคราะห์สารพันธุกรรมจะมุ่งตรวจสอบชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมที่เฉพาะสำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งๆ หรือมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกลไกการสร้างสารพิษของเชื้อแบคทีเรีย วิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ใช้มากมักเป็นการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ คือการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยาลูกโซ่การเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ (Polymerase chain reaction; PCR) และการตรวจสอบดีเอ็นเอที่เข้าคู่กันได้ (DNA hybridization) โดยอาศัยการเข้าคู่ของดีเอ็นเอติดฉลาก (Nucleic acid probe, DNA probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ (ธารารัตน์ ชี้อตอฟ, 2558, หน้า 350)

หากพิจารณาวิธีวิเคราะห์ต่างๆ ดังที่กล่าวมา พบว่าแต่ละวิธีมีข้อจำกัดมากในหลายด้าน ไม่ว่าจะเป็นความชำนาญของผู้วิเคราะห์ เนื่องจากแต่ละวิธีมีขั้นตอนการตรวจสอบที่ยุ่งยากมีหลายขั้นตอนจึงต้องอาศัยผู้มีทักษะในการวิเคราะห์เป็นผู้ตรวจสอบ ระยะเวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ วิธีส่วนใหญ่อาศัยการเพาะเลี้ยงให้เชื้อเจริญซึ่งต้องใช้เวลาอันกว่าจะสามารถอ่านผลและสรุปผลได้อีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายในเรื่องของสารเคมีและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ในแต่ละครั้ง ด้วยข้อจำกัดดังกล่าว ทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องพัฒนาเทคนิควิเคราะห์ที่สามารถลดข้อจำกัดเหล่านี้ได้แก่ มีความรวดเร็วและแม่นยำในการวิเคราะห์ ประหยัดทรัพยากร เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และมีความสะดวกในการปฏิบัติ

เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี

1. หลักการของเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี



ภาพ 2 ช่วงสเปกตรัมของคลื่นแสงอินฟราเรด

ที่มา: http://www.processsensors.com/appbl_II/?tag=near-ir

แสงย่านใกล้อินฟราเรด (Near Infrared; NIR) เป็นคลื่นแสงหรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่อยู่ในช่วงความยาวคลื่นประมาณ 800 ถึง 2500 นาโนเมตร (12000 ถึง 4000 cm^{-1}) ดังแสดงในภาพ 2 แบ่งช่วงความยาวคลื่นออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงคลื่นสั้นที่มีความยาวคลื่น 800-1100 นาโนเมตร และช่วงคลื่นยาวที่มีความยาวคลื่น 1100-2500 นาโนเมตร (Osborne, Fearn and Hindle, 1993) เมื่อฉายแสง NIR ลงบนตัวอย่าง ตัวอย่างจะมีการดูดกลืนแสงและกระตุ้นให้เกิดการสั่นของโมเลกุลใน Functional group ต่างๆ 2 ลักษณะ คือการยืดหด (Stretching) และการเปลี่ยนมุม (Bending) ช่วงความถี่ Overtones และ Combination ของหมู่ฟังก์ชัน O-H, C-H, N-H และ O = H ซึ่งเป็นโมเลกุลหลักของสารอินทรีย์และแสดงออกมาเป็นแถบรังสีหรือที่เรียกว่าสเปกตรัม (Spectrum) แต่สเปกตรัมที่แสดงออกมาเป็นลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิดที่ดูดกลืนได้ ปริมาณการดูดกลืนพลังงานแสง (Absorbance, A) จะเป็นไปตามกฎของเบียร์-แลมเบิร์ต (Beer - Lambert) คือพลังงานคลื่นแสงที่ผ่านเข้าไปในตัวอย่าง จะดูดกลืนได้โดยองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างโดยความเข้มแสงที่ถูกดูดกลืนจะเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นและความหนาขององค์ประกอบทางเคมีนั้นที่ลำแสงผ่าน (Osborne, Fearn and Hindle, 1993) สามารถแสดงความสัมพันธ์ ดังสมการ

$$A = \log(I_0/I_t) = \epsilon cd$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance)

I_0 = ความเข้มของแสงก่อนส่องผ่านตัวอย่าง

I_t = ความเข้มของแสงหลังส่องผ่านตัวอย่าง

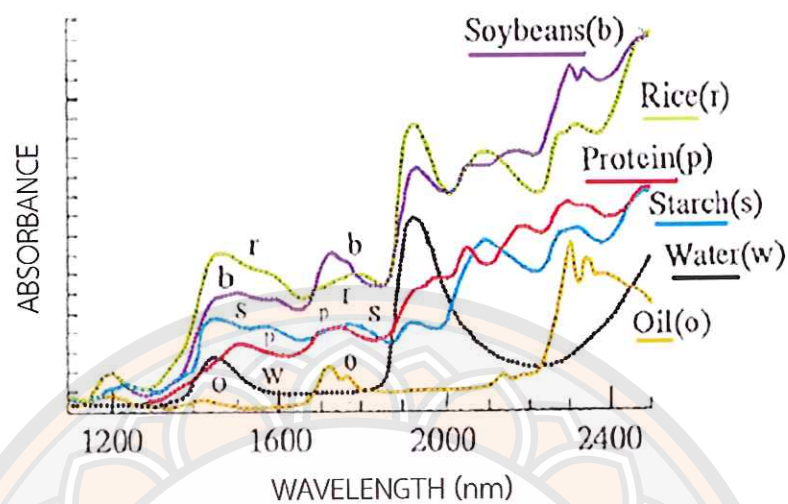
ϵ = molar absorptivity เป็นค่าคงที่ของแต่ละสารละลาย

c = ความเข้มข้นของสารละลายหรือองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่าง

d = ความหนาของเซลล์

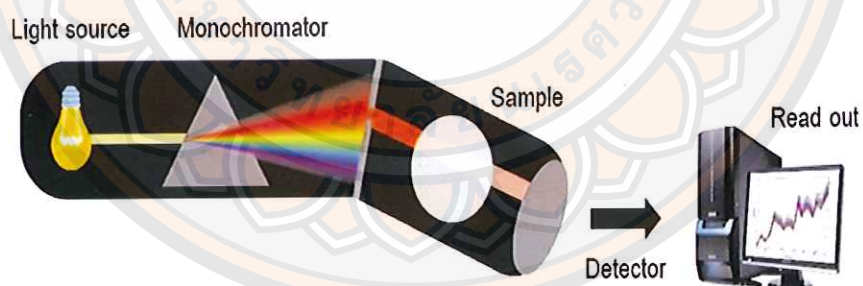
โดยแสดงผลการดูดกลืนแสงออกมาเป็นแถบรังสีหรือที่เรียกว่าสเปกตรัม (Spectrum) โดยแต่ละ สเปกตรัมที่แสดงออกมาเป็นลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิดและองค์ประกอบทางเคมีที่สารดูดกลืน (ภาพ 3) อย่างไรก็ตาม NIR สเปกตรัมจะมีลักษณะพีคกว้าง (Broad spectrum) บางที่มีพีคกว้างที่มีความเข้มข้นสูง เนื่องจากเกิดการซ้อนทับกัน (Over lapping band) บางที่อาจจะเห็นพีคคมชัด สเปกตรัมของวัสดุเกษตรและอาหารส่วนใหญ่มีพีคของน้ำเป็นพีคใหญ่และกว้างที่บริเวณ 760, 970, 1180, 1450 และ 1940 นาโนเมตร ลักษณะของสเปกตรัมเช่นนี้ ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารได้โดยตรง จำเป็นต้องใช้หลักทางเคมีเมตริก (Chemometric) มาใช้ โดยต้องทำสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าองค์ประกอบทางเคมีและสมบัติทางกายภาพหรือสมบัติอื่นที่ต้องการวิเคราะห์ กับข้อมูลของสเปกตรัม ซึ่งเรียกว่าข้อมูลเชิงแสง (Optical data) เพื่อประมาณค่าองค์ประกอบหรือสมบัติที่ต้องการ

หลักการทำงานของเครื่อง NIRS คือ แสงจากแหล่งให้พลังงานแสง (Light source) ที่มีการกระจายของแสง และควบคุมด้วยระบบโมโนโครมาเตอร์ (Monochromator) ให้อยู่ในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการ แล้วส่งผ่านไปยังตัวอย่าง (Sample) และวัดปริมาณแสงที่ตัวอย่างดูดกลืนไว้ด้วยอุปกรณ์สำหรับตรวจวัด (Detector) และแปลงเป็นสัญญาณส่งเข้าสู่ส่วนประมวลผล (Read out) ด้วยโปรแกรม ให้ออกมาในรูปที่ผู้ใช้สามารถนำค่านั้นไปใช้ได้ แล้วบันทึกผลด้วยคอมพิวเตอร์ (ภาพ 4)



ภาพ 3 สเปกตรัมการดูดกลืนแสง NIR ของข้าว ถั่วเหลือง และองค์ประกอบทางเคมีต่างๆ

ที่มา: Kawano, 1995



ภาพ 4 หลักการทำงานของเครื่อง NIRS

2. รูปแบบที่ตัวอย่างเกิดปฏิกิริยา (Interaction)

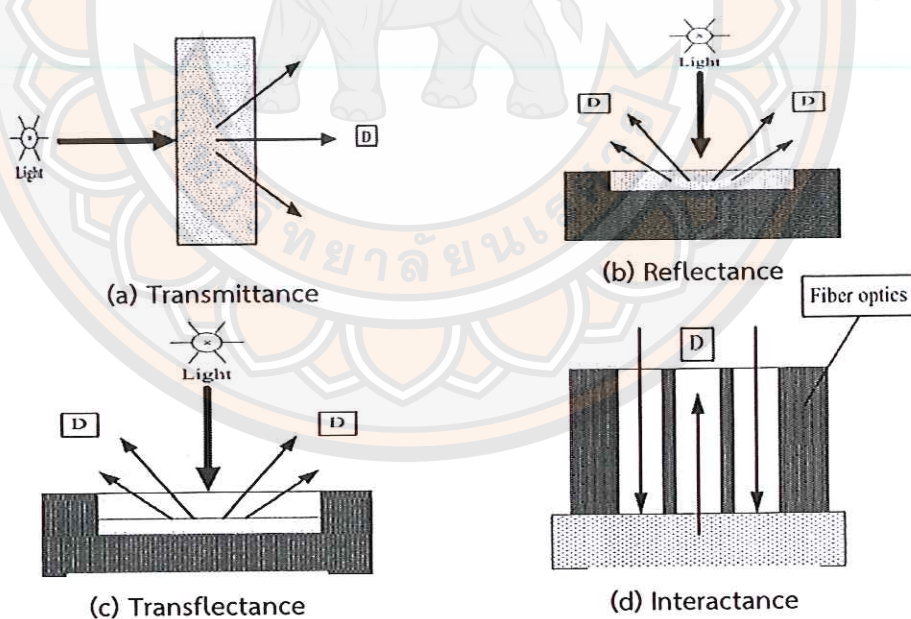
รูปแบบที่ตัวอย่างเกิดปฏิกิริยา (Interaction) กับแสง NIR นั้น จะเกิดการกระทำกับตัวอย่างได้หลายแบบ เมื่อแสงผ่านไปยังตัวอย่างที่มีลักษณะต่างกัน จะเกิดปฏิกิริยาได้ 4 ลักษณะ (ภาพ 5) ดังนี้

2.1 Transmittance แสงตกกระทบตัวอย่างด้านหนึ่งโดยที่ Detector จะวัดปริมาณแสงที่ผ่านออกมาจากตัวอย่างในด้านตรงกันข้ามดังภาพ 5a

2.2 Reflectance แสงจะตกกระทบที่ผิวของตัวอย่างและอาจแพร่กระจายในปริมาณหนึ่งก่อนแล้ววัดปริมาณแสงสะท้อนกลับออกมาโดย Detector ดังภาพ 5b

2.3 Transflectance แสงจากแหล่งกำเนิดแสงตกกระทบตัวอย่างและส่องผ่านตัวอย่างลงไปตกกระทบวัตถุที่ไม่ดูดกลืนแสง (แผ่นเซรามิกทองหรืออลูมิเนียม) ที่อยู่ด้านล่างตัวอย่าง แล้วสะท้อนกลับมายัง Detector ดังภาพ 5c

2.4 Interactance ใช้ในกรณี Fiber optics probe แสงจากแหล่งกำเนิดแสงย่าน NIR ส่องผ่านลงมายังตัวอย่างในวงแหวนด้านนอก แล้วแสงที่สะท้อนออกมาจากเนื้อตัวอย่างถูกส่งไปยัง Detector บริเวณส่วนกลาง Fiber optics probe ดังภาพ 5d



ภาพ 5 ลักษณะการเกิดปฏิกิริยาของตัวอย่างกับแสง NIR (a) Transmittance, (b) Reflectance, (c) Transflectance และ (d) Interactance

3. การวิเคราะห์ข้อมูลสำหรับการทำนายค่าของ NIRS

ก่อนจะนำสเปกตรัมไปวิเคราะห์ควรมีการนำข้อมูลสเปกตรัมไปปรับแต่งด้วยวิธีทางคณิตศาสตร์เพื่อลดความคลาดเคลื่อนให้เหลือน้อยที่สุด การแปลงข้อมูลสเปกตรัมที่ได้จากเครื่อง NIRS เพื่อลดอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อสเปกตรัม ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำให้สเปกตรัมมีความแตกต่างกัน ส่งผลต่อสมการที่สร้างขึ้น มีความแม่นยำในการทำนายลดลง ดังนั้นการแปลงข้อมูลสเปกตรัมโดยวิธีการทางคณิตศาสตร์ ถือเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยให้ขั้นตอนการสร้างสมการทำนายมีความแม่นยำมากขึ้น วิธีการทางคณิตศาสตร์ที่นิยมใช้ในการแปลงข้อมูลสเปกตรัมได้แก่

3.1 วิธีอนุพันธ์ (Derivative) เป็นการแก้ปัญหการทับซ้อนกันของจุดยอดในสเปกตรัม เพื่อแก้ปัญหาพีคที่มีฐานกว้าง (Broad peak) เนื่องจากการซ้อนทับกันของพีค (Overlapping) และอิทธิพลจากการยกตัวของเส้นสเปกตรัม (Base line shift) ที่เกิดจากการกระเจิงแสง (Scattering light) เมื่อแสงตกกระทบที่ตัวอย่างทำให้แสงเปลี่ยนทิศทาง ซึ่งมีผลต่อการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างๆ ทั้งนี้สาเหตุมาจากขนาดของตัวอย่างไม่สม่ำเสมอ การอัดตัว และการกระจายตัวของตัวอย่างภายในเซลล์บรรจุที่แตกต่างกัน รวมทั้งความชื้นภายในตัวอย่างที่แตกต่างกันด้วย (William and Norris, 2001) ประกอบด้วย 2 วิธี

3.1.1 อนุพันธ์อันดับที่ 1 (First derivative) สามารถลดปัญหาการเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ของค่าการดูดกลืนแสงของสเปกตรัมตลอดช่วงความยาวคลื่นตามแกน Y ทำให้เส้นสเปกตรัมเลือนมาติดกัน แต่พีคของสเปกตรัมยังมีฐานกว้าง จึงไม่สามารถแยกพีคออกจากกันอย่างชัดเจนได้ อีกทั้งวิธีอนุพันธ์อันดับที่ 1 ให้ความหมายเป็นค่าความชันของสเปกตรัมแต่ละความยาวคลื่นซึ่งทำให้แปลความหมายได้ยาก

3.1.2 อนุพันธ์อันดับที่ 2 (Second derivative) สามารถลดผลกระทบที่ทำให้สเปกตรัมมีขนาดเพิ่มขึ้นตลอดช่วงความยาวคลื่นตามแกน Y ที่ชัดเจนกว่าวิธีอนุพันธ์อันดับที่ 1 และแยกพีคสเปกตรัมที่มีการซ้อนทับกันออกจากกันได้อย่างชัดเจน ทำให้ทราบตำแหน่งความยาวคลื่นแต่ละสเปกตรัมจะมีลักษณะหวักลบลงมาด้านล่าง (Osborne, et al., 1993)

3.2 วิธี Multiplicative scatter correction (MSC) เป็นวิธีที่สร้างขึ้นมาเพื่อลดผลที่เกิดจากการกระเจิงแสง (scattered light) ต่อสเปกตรัมของ NIR ที่ได้จากการวัดแบบสะท้อนแพร่ (Diffuse reflectance) และแบบส่องผ่าน (Transmittance) การกระเจิงแสงจะทำให้ความชันโดยรวมของสเปกตรัมเปลี่ยนไป โดยหาค่าเฉลี่ยของข้อมูลทั้งสเปกตรัม เพื่อลดอิทธิพลของการกระเจิงของแสงที่เกิดจากสาเหตุต่างๆ ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการลดค่าผิดพลาด

3.3 วิธี Smoothing เป็นการหาค่าเฉลี่ยเคลื่อน โดยมีการแทนค่าการดูดกลืนแสงแต่ละความยาวคลื่นด้วยค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่มีจุดศูนย์กลางของ

ช่วงความยาวคลื่นตรงกับจุดที่ถูกแทนที่ ต่อจากนั้นเลื่อนช่วงไปหนึ่งความยาวคลื่น แล้วคำนวณซ้ำจนครบตลอดช่วงความยาวคลื่น ซึ่งสามารถลดปัญหาของสัญญาณรบกวนต่อค่าการดูดกลืนแสง โดยจะได้สเปกตรัมที่มีลักษณะเหมือนสเปกตรัมดั้งเดิม แต่จะเรียบสม่ำเสมอมากกว่า (Katsumoto, et al., 2001; Siesler, et al., 2002)

3.4 วิธี Standard normal variate (SNV) เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ลดอิทธิพลของการกระเจิงแสงที่เกิดจากความแปรปรวนของการดูดกลืนแสงของ NIR ออกจากสเปกตรัม ตัวอย่างที่ถูกวัดโดยวิธีการสะท้อนแบบแพร่ (Diffuse reflectance) จะทำให้เกิดสเปกตรัมที่แตกต่างกันอันเนื่องมาจากการกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอของอนุภาคในตัวอย่าง ซึ่งจะทำให้เกิดการกระเจิงแสงที่สูง และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดความแปรปรวนของข้อมูลที่วัดได้

วิธีการแปลงข้อมูลสเปกตรัมที่ดีที่สุดก็คือ วิธีที่ทำให้สามารถวิเคราะห์ได้สมการทำนายที่มีความสามารถในการทำนายปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างได้ใกล้เคียงที่สุด อย่างไรก็ตามไม่มีกฎตายตัวแน่นอนสำหรับการตัดสินใจเลือกวิธีที่จะใช้ในการแปลงข้อมูล วิธีที่ดีที่สุดคือการลองผิดลองถูกในการทดลองใช้แต่ละวิธีจนกว่าจะได้สมการทำนายที่แม่นยำสุด โดยต้องเข้าใจความหมายและคำนึงถึงข้อดีข้อเสียของแต่ละวิธีให้ชัดเจน (Hruschka, 2001)

4. วิธีการสร้างสมการ (Calibration model)

ในการสร้างสมการสำหรับการทำนายค่าองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์ด้วยเทคนิค NIR สิ่งที่สำคัญ คือ การหาตัวแปรอิสระ (ตัวแปร X) ที่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม (ตัวแปร Y) ที่ต้องการทำนายการสร้างสมการ Calibration แบ่งได้ 2 วิธีหลัก คือ

4.1 วิธีการเลือกความยาวคลื่น (Wavelength selection method) เป็นการคัดเลือกตัวแปรอิสระเฉพาะความยาวคลื่นที่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม โดยพิจารณาข้อมูลทางสถิติดังนี้

4.1.1 Simple linear regression (SLR) เป็นการสร้างสมการที่ตัวประกอบด้วยตัวแปรสองชนิดที่มีความสัมพันธ์กัน คือ ตัวแปรอิสระ (X) กับตัวแปรตาม (Y) วิธี SLR เป็นการเลือกพิจารณาความสัมพันธ์เชิงปริมาณของตัวอย่าง ที่มีความยาวคลื่นเพียงความยาวคลื่นเดียว (Single wavelength) การวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีด้วย NIRS เป็นไปไม่ได้ที่จะใช้ความยาวคลื่นใดความยาวคลื่นหนึ่งในการหาองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่าง เนื่องจากตัวอย่างประกอบด้วยองค์ประกอบหลายชนิด ดังนั้นจึงต้องใช้ข้อมูลหลายความยาวคลื่น (Multiple linear) เพื่อทำนายองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่าง (ศุมาพร เกษมสำราญ, 2545) สมการ SLR สามารถเขียนได้ดังนี้

$$Y = a + bx$$

เมื่อ $Y =$ ค่าองค์ประกอบทางเคมี

$x =$ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นตำแหน่งเดียว

$a =$ ค่าคงที่ ณ จุดตัดแกน Y เมื่อ $x = 0$

$b =$ ค่าความชันกราฟ

4.1.2 Multiple linear regression (MLR) MLR มีชื่อเรียกอย่างหนึ่งว่า ลีสสแควร์ผกผัน (Inverse least squares) เป็นการสร้างสมการ Calibration โดยสมการที่สร้างขึ้นจะประกอบไปด้วย ตัวแปรอิสระมากกว่า 1 ตัว ($X_n = X_1, X_2, \dots, X_n$) และตัวแปรตาม เป็นค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (Reference method) เทคนิคการสร้างสมการแบบนี้มีความซับซ้อนในการแสดงรูปแบบความสัมพันธ์และการสร้างสมการมากกว่าเทคนิคการถดถอยเชิงเส้นอย่างง่าย ซึ่งความยุ่งยากและซับซ้อนอยู่ที่การคัดเลือกตัวแปรอิสระ ($X_1, X_2, \dots, X_n$) ที่เหมาะสม และการหาค่าคงที่ของตัวแปรในสมการ ($a, b_1, b_2, \dots, b_n$) (ธงชัย สุวรรณสิขณณ์ และปิติพร ฤทธิเรืองเดช, 2555, หน้า 6-13) สมการ MLR สามารถเขียนได้ดังนี้

$$Y = a + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_nX_n$$

เมื่อ $X_1, X_2, \dots, X_n =$ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น n ตำแหน่ง

4.2 วิธีการวิเคราะห์โดยใช้สเปกตรัมทั้งหมด (Full spectrum analysis method) เป็นการใช้วิธีคัดเลือกหาความยาวคลื่นที่เหมาะสม (Selective wavelength) จากความยาวคลื่นทั้งหมดที่มีในสเปกตรัมมาสร้างสมการ Calibration ที่เหมาะสม จากความยาวคลื่นทั้งหมดในสเปกตรัม (Full spectrum) มาสร้างสมการ โดยทำการลดตัวแปรอิสระ และสร้างตัวแปรกลุ่มใหม่ขึ้นมา วิธีทางสถิติที่นิยมใช้ได้แก่

4.2.1 Principle components regression (PCR) เป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักกับข้อมูลที่เป็นตัวแปรอิสระ ที่ได้จากข้อมูลสเปกตรัมเพื่อลดจำนวนตัวแปรเดิมลงโดยการแบ่งกลุ่มตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันเพื่อสร้างตัวแปรขึ้นมาใหม่เรียกว่าปัจจัย หรือ องค์ประกอบ (Factors score; F) แล้วจึงนำค่าแฟกเตอร์ไปสร้างสมการเชิงถดถอย สมการ PCR สามารถเขียนได้ดังนี้

$$Y = b_0 + b_1PC_1 + b_2PC_2 + \dots + b_nPC_n$$

เมื่อ $PC_1, PC_2, \dots, PC_n =$ ค่าตัวแปรใหม่ที่ตำแหน่ง n ตัวแปร

$b_0, b_1, b_2, \dots, b_n =$ ค่าสัมประสิทธิ์ในการถ่วงน้ำหนักที่ตำแหน่ง n ตัวแปร

4.2.2 Partial least square regression (PLSR) เป็นการวิเคราะห์เทคนิคหลายตัวแปร (multivariate analysis) โดย PLSR เป็นเทคนิคในการลดจำนวนตัวแปรเช่นเดียวกับวิธี PCR แต่จะแตกต่างตรงที่ในช่วงจัดกลุ่มลดจำนวนตัวแปรโดยการสร้างตัวแปรใหม่นั้นจะมีการนำข้อมูลตัวแปรตาม (Y) เข้ามาร่วมในการสร้างตัวแปรใหม่ที่เรียกว่าคะแนนปัจจัย (Factor loading) ด้วย โดยไม่จำเป็นต้องมีการแยกไปทำขั้นตอน Regression ซึ่งคะแนนปัจจัยที่สร้างขึ้นใหม่จะมีความสัมพันธ์กับตัวแปรตามอยู่แล้ว สมการ PLSR สามารถเขียนได้ดังนี้

$$Y = b_0 + b_1F_1 + b_2F_2 + \dots + b_nF_n$$

เมื่อ $F_1, F_2, \dots, F_n$ = ค่าตัวแปรใหม่ที่มีความสัมพันธ์กับข้อมูล Y ที่ตำแหน่ง n ตัวแปร

$b_0, b_1, b_2, \dots, b_n$ = ค่าสัมประสิทธิ์ในการถ่วงน้ำหนักที่มีความสัมพันธ์กับข้อมูล Y ที่ตำแหน่ง n ตัวแปร

5. วิธีการทดสอบสมการ (Validation test)

หลังจากได้สมการ Calibration ที่เหมาะสมแล้ว จะต้องมีการทดสอบว่าสมการที่สร้างขึ้นมาจากชุดข้อมูลที่สุ่มมานั้น สามารถนำมาทำนายข้อมูลชุดอื่นที่เป็นประชากรกลุ่มเดียวกันได้หรือไม่ ต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพของสมการก่อนนำไปใช้ ซึ่งมี 2 วิธี

5.1 Full cross validation เป็นการทดสอบภายในกลุ่มตัวอย่าง (Internal validation) โดยตัวอย่างที่นำมาทดสอบสมการ คือ ตัวอย่างชุดเดียวกับที่ใช้สร้างสมการทำนายทางเคมี โดยมีการขั้นตอนทดสอบดังนี้ ตัดตัวอย่างที่ 1 ออกจากชุดตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการทำนายค่าทางเคมี จากนั้นใช้ตัวอย่างที่เหลือทำการคำนวณหาสมการ เมื่อได้สมการแล้ว จึงนำตัวอย่างที่ 1 มาทดสอบสมการ ขั้นต่อไปใส่ตัวอย่างที่ 1 กลับคืน และตัดตัวอย่างที่ 2 ออกจากชุดตัวอย่าง แล้วจึงสร้างสมการทำนายค่าทางเคมี นำสมการที่ได้จากการทำนายของตัวอย่างที่ 2 ทำขั้นตอนข้างต้นซ้ำจนกระทั่งหาค่าทางเคมีของตัวอย่างครบทั้งชุด ดังนั้นตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นจะถูกตัดออกจากชุดตัวอย่าง 1 ครั้งเท่านั้น วิธีนี้จะวัดผลโดยการดูค่า RMSECV (Root square error of cross validation)

5.2 Prediction test เป็นการทดสอบสมการโดยนำกลุ่มตัวอย่างใหม่ (External validation) มาประเมินค่าจากสมการ Calibration โดยการเตรียมตัวอย่างชุดใหม่มาทำการวิเคราะห์ในสภาวะการทดลอง รวมไปถึงการแปลงข้อมูลสเปกตรัมต้องเหมือนกันกับตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการทำนายค่าทางเคมี (Calibration set) ชุดตัวอย่างที่นำมาทดสอบสมการนี้เรียกว่าชุดทดสอบ (Validation set) แต่ค่าองค์ประกอบทางเคมีในชุดทดสอบต้องมีค่าอยู่ในช่วงเดียวกันกับชุดตัวอย่างที่ใช้สร้างสมการ วิธีนี้จะมีการพิจารณาจากค่าทางสถิติ ได้แก่ bias, RMSEP (Root

square error of prediction) ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ (Standard error of prediction; SEP)

6. ค่าทางสถิติที่ใช้ในการพิจารณาการสร้างสมการ

6.1 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; R) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination; R^2) คือ ค่าที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (X) และตัวแปรตาม (Y) หากค่าที่คำนวณได้มีค่าเข้าใกล้ 1 หรือเท่ากับ 1 หมายความว่า สมการที่สร้างขึ้นสามารถนำมาใช้ในการอธิบายค่าทำนายที่เกิดจากอิทธิพลของตัวแปรอิสระ (X) กับค่าตัวแปรตาม (Y) ที่มีความสัมพันธ์กันมาก เกณฑ์การพิจารณายอมรับค่า R ดังตาราง 5 (Williams, 2001)

6.2 ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้างสมการ (Standard error of calibration; SEC) คือ ค่าที่บอกถึงสมการที่สร้างขึ้นสามารถนำไปใช้ในการทำนายต่อไปได้ดีหรือไม่ ค่าที่คำนวณได้ควรมีค่าน้อย

6.3 ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ (Standard error of prediction; SEP) คือ ค่าที่บอกถึงการนำเอาสมการที่สร้างขึ้นมาทำนายปริมาณองค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากเครื่อง NIRS มีความแม่นยำสูงหรือต่ำ ซึ่งถ้าค่าที่คำนวณได้มีค่าน้อย หมายความว่า สมการที่สร้างขึ้นมีความแม่นยำสูง

6.4 ค่าเฉลี่ยของผลต่างระหว่างค่าที่ได้จากวิธีอ้างอิงกับค่าที่ได้จาก NIR (Average of difference between actual value and NIR value; bias) คือ ค่าเฉลี่ยของการทำนายข้อมูลของตัวแปรตาม (Y) และค่าเฉลี่ยข้อมูลของตัวแปรอิสระ (X) มีความแตกต่างกันหรือไม่ ค่าที่คำนวณได้ควรมีค่าน้อย

6.5 ค่าอัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่ม Validation set ต่อ ค่า SEP (Ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP; RPD) เกณฑ์การพิจารณาค่า RPD ดังตาราง 6 (Williams, 2001)

ตาราง 5 เกณฑ์การพิจารณาค่า R และ R²

Value of R	Value of R ²	Interpretation
Up to ± 0.5	Up to 0.25	Not usable in NIRS calibration
$\pm 0.51 - 0.70$	0.26 - 0.49	Poor correlation, research the reasons
$\pm 0.71 - 0.80$	0.50 - 0.64	Rough screening
$\pm 0.81 - 0.90$	0.66 - 0.81	Screening and approximate calibration
$\pm 0.91 - 0.95$	0.83 - 0.90	Usable with caution for most applications, including research
$\pm 0.96 - 0.98$	0.92 - 0.96	Usable in most applications, including quality assurance
$\pm 0.99 >$	0.98 >	Usable in any application

หมายเหตุ: R: Correlation coefficient คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
R²: Coefficient of determination คือ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ

ที่มา: Williams, 2001

ตาราง 6 เกณฑ์การพิจารณาค่า RPD

RPD Value	Classification	Application
0.0 - 2.3	Very poor	Not recommended
2.4 - 3.0	Poor	Rough screening
3.1 - 4.9	Fair	Screening
5.0 - 6.4	Good	Quality control
6.5 - 8.0	Very good	Process control
8.1 >	Excellent	Any application

หมายเหตุ: RPD: Ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP คือ อัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มทดสอบสมการ ต่อค่า SEP

ที่มา: Williams, 2001

7. ประโยชน์ของเทคนิค NIRS

Osborne, Fearn and Hindle (1993) รายงานว่า เครื่องมือแต่ละประเภทต่างก็มีข้อจำกัดในการใช้งาน แต่เครื่อง NIRS มีประโยชน์และข้อดีมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ทางเคมีหรือการวิเคราะห์ด้วยวิธีอื่น สำหรับการนำเครื่อง NIRS ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมมีประโยชน์มากมาย เช่น

- 7.1 ง่ายต่อการเตรียมตัวอย่าง ไม่จำเป็นต้องชั่งตัวอย่างก่อนนำมาวัดค่า
- 7.2 มีความรวดเร็วในการวัดค่า
- 7.3 การตรวจสอบเป็นแบบไม่ทำลาย ทำให้ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ สามารถจำหน่ายส่งออก หรือบริโภคต่อได้ เป็นการประหยัดต้นทุนของผลิตภัณฑ์อีกทางหนึ่ง
- 7.4 ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้ลดต้นทุนในการดูแลรักษาสภาพแวดล้อม เมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางด้านเคมี
- 7.5 สะดวกต่อการใช้งาน เนื่องจากในการปฏิบัติไม่จำเป็นต้องใช้ผู้ที่มีประสบการณ์ หรือต้องได้รับการฝึกฝนโดยเฉพาะ สามารถปฏิบัติตามคู่มือการใช้งานได้ทันที
- 7.6 ไม่จำเป็นต้องใช้สารเคมี และเครื่องแก้วเป็นจำนวนมาก ทำให้สามารถลดต้นทุนในเรื่องสารเคมี และอุปกรณ์เครื่องแก้วลงไปได้
- 7.7 เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับนำไปควบคุมคุณภาพในกระบวนการผลิต

8. งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิเคราะห์นํ้านมด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปคโตรสโกปี

ปัจจุบันมีการศึกษาการตรวจสอบคุณภาพนํ้านมโคดิบโดยใช้เทคนิค NIRS ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ เนื่องจากเป็นวิธีการตรวจสอบที่แสดงผลแบบเรียลไทม์ ง่ายต่อการใช้งาน ไม่ใช้สารเคมี และยังสามารถตรวจวัดได้เลยทันทีโดยไม่ต้องดัดแปลงหรือปรับเปลี่ยนตัวอย่าง มีการนำเทคนิค NIRS มาวิเคราะห์คุณภาพนํ้านมดิบและผลิตภัณฑ์จากนมแสดงดังตาราง 7

ตาราง 7 รายงานวิจัยที่ใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจคุณภาพน้ำนมโคดิบและ ผลิตภัณฑ์นม

Authors	Product	Constituents	Results ^a
Sato, et al. (1987)	Raw milk	Fat (%)	R=0.99, S.D.=0.09
		Protein (%)	R=0.91, S.D.=0.10
		Lactose (%)	R=0.90, S.D.=0.08
		TS (%)	R=0.99, S.D.=0.09
		Casein (%)	R=0.85, S.D.=0.09
Wehling and Prierce (1988)	Cheddar cheese	Moisture (%)	R ² =0.92, SEP=0.38
Rodriguez-Otero, Hermida and Cepeda (1995)	Cheese	Fat (%)	R ² =0.99, SEC=0.39, SECV=0.52
		Protein (%)	R ² =0.98, SEC=0.40, SECV=0.40
		TS (%)	R ² =0.99, SEC=0.41, SECV=0.62
Rodriguez-Otero and Hermidai, (1996)	Fermented milk	Fat (%)	R ² =0.997, SEC=0.07, SEP=0.08
		Protein (%)	R ² =0.981, SEC=0.07, SEP=0.14
		TS (%)	R ² =1.00, SEC=0.08, SEP=0.25
Lee, Jeon and Harbers (1997)	Cheddar cheese	Moisture (%)	R ² =1.00, SEC=0.08, SEP=0.25
		Protein (%)	R ² =0.98, SEC=0.90, SEP=1.06
		Fat (%)	R ² =0.95, SEC=0.84, SEP=1.05
Pouliot, et al. (1997)	Whey protein	Nitrogen solubility (%)	R ² =0.98, SEP=2.18
		Trypsin hydrolysis (%)	R ² =0.99, SEP=0.09
Albanell, et al. (1999)	Ovine milk	Protein (%)	R ² =0.92, SEC=0.19, SEP=0.18
		Fat (%)	R ² =0.96, SEC=0.16, SEP=0.20
		TS (%)	R ² =0.98, SEC=0.27, SEP=0.37
Chen, Lyo and Kawano (1999)	Raw milk	Fat (%)	R=0.99, SEP=0.19
Laporte and Paquin (1999)	Raw milk	Fat (%)	R=1.00, SEC=0.08, SEP=0.05
		Crud protein (%)	R=0.98, SEC=0.07, SEP=0.09
		True protein (%)	R=0.99, SEC=0.05, SEP=0.12
		Casein (%)	R=0.98, SEC=0.06, SEP=0.07

ตาราง 7 (ต่อ)

Authors	Product	Constituents	Results ^a
Tsenkova, et al. (1999)	Raw milk	Fat (%)	R=0.99, SECV=0.11
		Protein (%)	R=0.89, SECV=0.10
		Lactose (%)	R=0.85, SECV=0.08
Tarkošová and Copiková (2000)	Chocolate	Sucrose (%)	R=0.82, SEC=1.23
		Lactose (%)	R=0.80, SEC=0.39
		Fat (%)	R=0.90, SEC=0.83
Tsenkova, et al. (2000)	Raw milk	Fat (%)	R=0.99, SECV=0.14
		Protein (%)	R=0.80, SECV=0.12
		Lactose (%)	R=0.81, SECV=0.10
Tsenkova, et al. (2001)	Raw milk	SCC (log SCC/ml)	R = 0.89, SEP = 0.38
Sivakesava and Irudayaraj (2002)	Raw milk	Tetracycline (ppb)	R ² =0.87, SEP=110
Kawano, Saranwong and Terada. (2003)	Raw milk	Fat (%)	SEP=0.031
		Protein (%)	SEP=0.066
		Lactose (%)	SEP=0.090
		Non-fat solids (%)	SEP=0.108
		TS (%)	SEP=0.118
Blazquez, et al. (2004)	Cheese	Fat (%)	R=0.98, SECV=0.45
		Moisture (%)	R=0.99, SECV=0.50
		Inorganic salts (%)	R=0.90, SECV=0.26
Kawasaki, et al. (2004)	Raw milk	Fat (%)	R ² =0.94, SEP=0.48
		Protein (%)	R ² =0.73, SEP=0.17
		Lactose (%)	R ² =0.87, SEP=0.09
		SCC (log SCC/ml)	R ² =0.71, SEP=0.25

ตาราง 7 (ต่อ)

Authors	Product	Constituents	Results ^α
Saranwong and Kawano (2008)	Raw milk	Fat (%)	R ² =0.99, SEC=0.03, SEP=0.03
		Protein (%)	R ² =0.96, SEC=0.07, SEP=0.07
		Lactose (%)	R ² =0.89, SEC=0.09, SEP=0.09
		Non-fat solids (%)	R ² =0.97, SEC=0.07, SEP=0.11
		TBC (log CFU/ml)	R ² =0.83, SEC=0.60, SEP=0.55
Melfsen, et al. (2012)	Raw milk	Fat (%)	R ² =0.989, SEP=0.03
		Protein (%)	R ² =0.94, SEP=0.07
		Lactose (%)	R ² =0.73, SEP=0.09
		Urea (mg l ⁻¹)	R ² =0.31, SEP=40.23
		Fatty acid (%)	
Andueza, et al. (2013)	Goat milk	(FA, total trans FA, Isomer <i>cis9trans11</i> of CLA, <i>cis9-</i> , <i>trans10-</i> and <i>trans11-C18:1</i>)	R ² > 0.90, RPD > 3
Huang <i>et al.</i> (2016)	Milk powder	Melamine; Non fat	R=0.988
		Whole milk	R=0.980

หมายเหตุ: TS: Total solids; SCC: Somatic cell count; TBC; Total bacterial count

R^α: Multiple correlation coefficient; R²: Coefficient of determination;

R: Correlation coefficient; SECV: Standard error of cross validation;

SEC: Standard error of calibration; SEP: Standard error of prediction;

RPD: Ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP

นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิค NIRS มาใช้ในการจัดกลุ่ม Kasemsumran, Thanapase and Kiaysoonthon (2007) รายงานความสามารถในการตรวจสอบการปลอมปนน้ำและหางนมในน้ำนมด้วยเทคนิค NIRS เพื่อคัดแยกน้ำนมบริสุทธิ์และนมที่มีการเจือปนออกจากกัน การเจือปนประกอบด้วยเจือปนด้วยน้ำและการเจือปนด้วยหางนม โดยการจัดการข้อมูลด้วยวิธี Soft independent modeling of class analogy (SIMCA) และ Discrimination partial least squares (DPLS) และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความถูกต้องของ 2 วิธี ผลการเปรียบเทียบการแยกกลุ่มนมวิธี SIMCA และ DPLS พบว่าวิธี DPLS ให้ผลการแยกกลุ่มนมดีกว่าวิธี SIMCA เปอร์เซ็นต์ความถูกต้องทั้งหมดสูงกว่า 89% และ Revilla, et al. (2014) ทำการแยกน้ำนมแกะที่รวบรวมได้ใน 2 ฤดู คือ ฤดูร้อนและฤดูหนาวด้วยเทคนิค NIRS มีการจัดการข้อมูลด้วยวิธี Partial least squares discriminant analysis (PLSDA) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มน้ำนมทั้ง 2 ฤดูกาลออกจากกันได้ถึง 93%

สำหรับการประยุกต์ใช้เทคนิค NIRS ในการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย นั้น มีการศึกษาการใช้ NIRS ในการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณในอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร และในปัจจุบันยังมีการนำเทคนิค NIRS มาใช้ร่วมกับการถ่ายภาพ เรียกว่าเทคนิค NIR hyperspectral imaging โดย Alexandrakis, Downey and Scannell (2008) รายงานการตรวจสอบและแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี ทำการโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการคัดแยกชนิดของเชื้อแบคทีเรียจากเนื้อวัว ได้แก่ *Listeria innocua* FH, *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina* และ *Pseudomonas putida* โดยการจัดการข้อมูลด้วยวิธี PCA วิธี PLSDA และวิธี SIMCA พบว่า การจัดการข้อมูลด้วยวิธี PLSDA สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* ออกจากกันได้ 100% และเมื่อนำตัวอย่างกลุ่ม unknow มาทดสอบโดยใช้วิธีการจัดการข้อมูลด้วยวิธี SIMCA พบว่าสามารถแยก *Listeria innocua* FH ได้ 77% และ *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas mendocina* และ *Pseudomonas putida* แยกได้ 96.7%, 100% และ 100% ตามลำดับ และต่อมา Alexandrakis, Downey and Scannell (2012) ได้ทำการตรวจสอบการเน่าเสียของเนื้อมีไขมันไม่ทำลายตัวอย่าง นำตัวอย่างเนื้อมีไขมันบรรจุลงในถาดพลาสติกและห่อด้วยพลาสติกแรป และนำเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 4, 8 และ 14 วัน หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาจัดการข้อมูลด้วยวิธี PLSDA พบว่าสามารถแยกเนื้อมีไขมันที่ 0 วันและ 4 วัน ออกจากกันได้ 87.50% แยกเนื้อ 0 วันและ 8 วัน ออกจากกันได้ 94.70% และแยกเนื้อมีไขมัน 0 วันและ 14 วัน ออกจากกันได้ 100% นอกจากนี้ได้มีการวิจัยเพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในน้ำนม ได้แก่ Cámara-martos, et al. (2015) ได้ทำการตรวจวัดปริมาณเชื้อ

Escherichia coli และ *Pseudomonas aeruginosa* ในน้ำนมโคดิบ รวมทั้งการวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ ซึ่งรายงานโดย Numthuam and Satake (2012) พบว่าขนาดของระยะทางเดินแสงมีผลต่อประสิทธิภาพการทำนายจากการใช้แสง NIR ที่ช่วงความยาวคลื่น 700-1100 นาโนเมตร สำหรับการศึกษาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้ NIRS ในการตรวจวัดเชื้อจุลินทรีย์ดังแสดงในตาราง 8



ตาราง 8 รายงานวิจัยที่ใช้เทคนิค NIRS ในการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม
อาหารและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร

Authors	Product	Constituents	Results ^α
Horváth, et al. (2008)	Pork meat	TAPC (log colony forming units/g)	R=0.997, RMSEP=0.438
Suthiluk, et al. (2008)	Cabbage	APC (log CFU/g):	
		Washed	R=0.95, SEP=0.46
		Drained	R=0.92, SEP=0.44
Numthuan and Satake (2012)	Raw milk	TBC (log CFU/ml)	R=0.93, SEC=0.63, SEP=0.71
Barbin, et al. (2013)	Porcine meat	TVC (log CFU/g)	R=0.86, SECV=0.75
		PPC (log CFU/g)	R=0.89, SECV=0.81
Feng and Sun (2013)	Chicken breast	TVC (log CFU/g)	R=0.96, RMSEC=0.40, RPD=3.02
Huang, et al. (2013)	Pork meat	TVC (log CFU/g)	R ² =0.8308, RMSEP=0.243
He, Sun and Wu (2014)	Salmon	LAB (log CFU/g)	R=0.929, RMSEP=0.515, RPD=2.969
Cámara-martos, et al. (2015)	Raw milk	<i>E. coli</i>	R ² =0.936, RMSECV=0.284
		<i>P. aeruginosa</i>	R ² =0.597, RMSECV=0.713
		<i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	R ² =0.703, RMSECV=0.584

หมายเหตุ: APC: Aerobic plate count; TVC: Total viable count; TBC: Total bacterial count
PPC: Psychrotrophic plate count; LAB: Lactic acid bacteria; R^α: Multiple correlation coefficient; R²: Coefficient of determination; R: Correlation coefficient; SECV: Standard error of cross validation; SEC: Standard error of calibration; SEP: Standard error of prediction; RPD: Ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP; RMSEP: Root mean square error of prediction; RMSECV: Root mean square error of cross validation

จากรายงานการวิจัยพบว่าการนิยมนำเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปีในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างเนื้อสัตว์ แต่การประเมินประสิทธิภาพในการตรวจสอบคุณภาพสุขศาสตร์ของน้ำมันดิบในด้านการตรวจวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำมันดิบที่ใช้เป็นตัวกำหนดราคาน้ำมันดิบก่อนการจำหน่ายตามมาตรฐานของอุตสาหกรรมโคนม ดังนั้นเพื่อเป็นการพัฒนาระบบการตรวจสอบคุณภาพสุขศาสตร์และการประเมินราคาน้ำมันดิบอย่างยุติธรรมตามคุณภาพจริงที่ซื้อขายในแต่ละครั้ง และยังเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะเพิ่มศักยภาพในการตรวจสอบคุณภาพน้ำมันดิบเพื่อตอบสนองการขยายตัวสู่ตลาดใหญ่อาเซียนที่กำลังจะมาถึง



บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่างน้ำนมโคดิบ

เก็บตัวอย่างน้ำนมโคดิบ (ภาพ 6) จากฟาร์มเกษตรกรในเขตอำเภอองไกรลาค จังหวัดสุโขทัย ทั้งหมด 80 ตัวอย่าง ใส่ในขวดปลอดเชื้อ จากนั้นบรรจุตัวอย่างใส่ลงในกล่องน้ำแข็งเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียในระหว่างเดินทางเพื่อนำตัวอย่างกลับมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ จากนั้นแบ่งตัวอย่างน้ำนมโคดิบปริมาตร 15 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปแช่อย่างควบคุมอุณหภูมิที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ เพื่อเพิ่มระดับจำนวนเชื้อแบคทีเรียในน้ำนม แล้วแบ่งตัวอย่างน้ำนมโคดิบแต่ละหลอดทดลองมาอย่างละ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวัดปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธีมาตรฐาน และตัวอย่างน้ำนมส่วนที่เหลือนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIRS

การตรวจวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในน้ำนมโคดิบด้วยวิธีมาตรฐาน (Standard Plate Count) (APHA, 1993)

1. อุปกรณ์

- 1.1 ขวดเก็บตัวอย่างน้ำนมที่ฆ่าเชื้อแล้ว
- 1.2 จานเลี้ยงเชื้อ (Sterile petri dishes or plates)
- 1.3 Test tube พร้อมฝาปิด ขนาด 20 และ 50 มิลลิลิตร
- 1.4 Micropipette ขนาด 1 มิลลิลิตร
- 1.5 Rack ใส่หลอดทดลอง
- 1.6 ตะเกียง
- 1.7 ปากกาสีกันน้ำ

2. สารเคมี

- 2.1 Standard Plate Count Agar (Merck KGaA, Germany)
- 2.2 Peptone water (Merck KGaA, Germany)
- 2.3 Sterile distilled water

3. เครื่องมือ

- 3.1 ปากกา นับ Colony ของเชื้อแบคทีเรีย (Counter pen, Fisher scientific, USA)
- 3.2 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) (Wiscuber, Daihan, Korea)
- 3.3 ตราชั่งที่ปรับค่าได้ตามตราชั่งมาตรฐานแล้ว (Mettler Toledo, Switzerland)
- 3.4 Vortex mixer (Wisemix, Daihan, Korea)

4. วิธีการดำเนินการ

- 4.1 เขย่าตัวอย่างน้ำนมโคดิบให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer
- 4.2 ใช้ Micropipette ดูดตัวอย่างน้ำนมโคดิบปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่บรรจุสารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตร เขย่ากับ Vortex mixer ให้เข้ากัน (ได้สารละลายตัวอย่างเจือจาง $1:10^{-1}$) จากนั้นทำการเจือจางด้วยวิธีเดียวกันจนถึงระดับ 1×10^{-2} , 1×10^{-3} และ 1×10^{-4}
- 4.3 ใช้ Micropipette ดูดตัวอย่างน้ำนมที่ถูกเจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ Dilution ต่างๆ ลงบนจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ
- 4.4 เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมเหลว อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่าง จานละประมาณ 15 มิลลิลิตร จากนั้นทำการ Pour plate
- 4.5 คั่วจานเลี้ยงเชื้อ และนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- 4.6 เมื่อครบเวลา นำออกมานับจำนวน Colony forming unit (CFU) แล้วบันทึกค่าเป็น Log CFU/ml เพื่อนำไปใช้เป็นค่าอ้างอิงในการสร้างแบบจำลองการทำนายการตรวจวัดแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบด้วยเทคนิค NIRS



ภาพ 6 ตัวอย่างน้ำมันโคติบ



การตรวจสอบด้วยเทคนิค NIRS

1. อุปกรณ์

- 1.1 Sample cell ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร
- 1.2 NIR aluminum reflector ที่มีระยะ Optical pathlength ขนาด 0.1 และ 1.0 มิลลิเมตร (ภาพ 7)
- 1.3 Micropipette ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 1.4 Test tube ขนาด 20 มิลลิลิตร

2. สารเคมี

- 2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Tryptic Soy Broth: TSB) (Merck KGaA, Germany)
- 2.2 Sterile distilled water

3. เครื่องมือ

- 3.1 เครื่อง FT-Near Infrared Spectrometer (MPA, Bruker, Germany) (ภาพ 8)
- 3.2 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (WiseCircu, Daihan, Korea)

4. โปรแกรมสำหรับคำนวณทางสถิติ

- 4.1 โปรแกรม OPUS เวอร์ชัน 7.2



ภาพ 7 NIR aluminum reflector ที่มีระยะ Optical pathlength ขนาด 0.1 และ 1.0 มิลลิเมตร



ภาพ 8 เครื่อง FT-Near infrared spectrometer (MPA, Bruker, Germany)

การศึกษาที่ 1: ศึกษาอิทธิพลของระยะที่แสงผ่าน (Pathlength) ต่อประสิทธิภาพการทำนายการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Near infrared spectroscopy; NIRS) เพื่อหาขนาด Pathlength ที่เหมาะสมในการวัดสเปกตรัม NIRS ที่บรรจุในเซลล์ตัวอย่างที่มีขนาด Pathlength ต่างกัน ได้แก่ 0.1 และ 1.0 มิลลิเมตร

วิธีการทดลอง

1. นำตัวอย่างนํ้านมโคดิบปริมาตร 1 มิลลิลิตร บรรจุลงในเซลล์ตัวอย่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร แล้ววาง Aluminum reflector ที่มีระยะ Optical pathlength ขนาด 0.1 และ 1.0 มิลลิเมตร ลงในเซลล์ตัวอย่าง (ภาพ 9) เพื่อช่วยสะท้อนแสงกลับมายังตัว Detector ของเครื่อง NIRS

2. ทำการให้แสง NIR ด้วยเครื่อง Multi-purpose analyzer (MPA) FT-NIR spectrometer ที่ช่วงเลขคลื่น 12000 ถึง 4000 cm^{-1} วัดค่าการดูดกลืนแสง NIR ด้วยโหมด Transflectance ดังแสดงในภาพ 10

3. ทำการวิเคราะห์ข้อมูลและหาความสัมพันธ์ของการทำนายปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธีมาตรฐาน กับค่าการดูดกลืนแสง NIR ของนํ้านมโคดิบ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลมีวิธีดังนี้

3.1 นำสเปกตรัมดิบของตัวอย่างนํ้านมโคดิบจำนวน 50 ตัวอย่าง มาทำการปรับแต่งข้อมูลสเปกตรัมด้วย ดังนี้

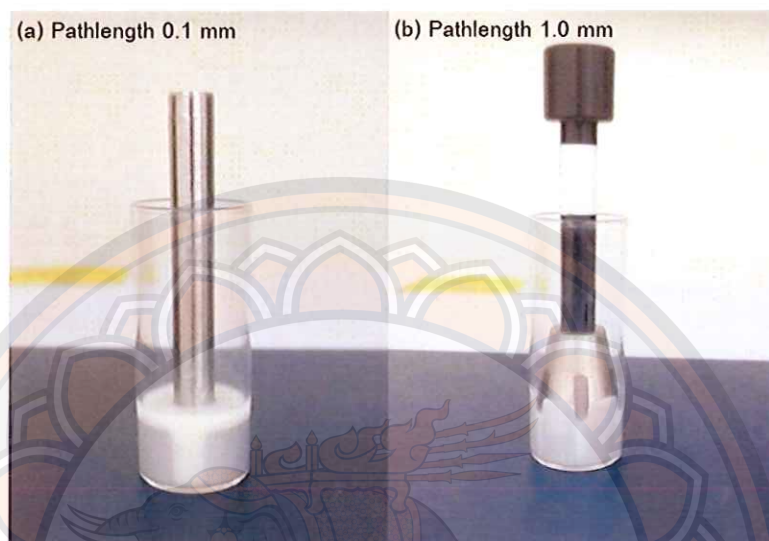
3.3.1 วิธีอนุพันธ์ (Derivative) ลำดับที่หนึ่งและลำดับที่สอง เป็นการแก้ปัญหาการทับซ้อนกันของสเปกตรัม เพื่อแก้ปัญหาฟีดที่มีฐานกว้างและที่เกิดจากการกระเจิงแสง

3.3.2 วิธี Multiplicative scatter correction (MSC) ลดผลที่เกิดจากการกระเจิงแสง

3.3.3 วิธี Standard normal variate (SNV) ลดอิทธิพลของการกระเจิงแสงที่เกิดจากความแปรปรวนของการดูดกลืนแสงของ NIR ออกจากสเปกตรัม

3.2 นำข้อมูลสเปกตรัมที่ปรับแต่งมาคำนวณเพื่อสร้างสมการ Calibration สำหรับการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในนํ้านมโคดิบ คำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าปริมาณเชื้อที่ตรวจวัดด้วยวิธี Standard Plate Count โดยวิธีทางสถิติ Partial least square regression (PLSR) แบบ Full cross validation ด้วยโปรแกรม OPUS เวอร์ชัน 7.2 จากนั้นทำการเปรียบเทียบหาระยะทางเดินแสงที่เหมาะสมสำหรับการสร้างสมการที่มีประสิทธิภาพในการทำนายสูงสุด โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; R) ที่สูงที่สุด ค่าผิดพลาดมาตรฐานในการทดสอบสมการ (Standard error of cross

validation; SECV) ที่ต่ำที่สุด และค่าอัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มทดสอบต่อค่า SEP (Ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP: RPD) ที่สูงที่สุด



ภาพ 9 เซลล์บรรจุตัวอย่าง ที่บรรจุ pathlength ขนาด (a) 0.1 และ (b) 1.0 มิลลิเมตร



ภาพ 10 ตัวอย่างน้ำมันโคติบัตด้วยเครื่อง NIRS

การศึกษาที่ 2: ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการทำนายการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Near infrared spectroscopy; NIRS) โดยแบ่งการดำเนินการศึกษาออกเป็น 2 ส่วนดังนี้

ส่วนที่ 1 ผลของระดับความเข้มข้นน้ำนมต่อประสิทธิภาพการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรีย

วิธีการทดลอง

1. นำอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Tryptic Soy Broth) ผสมกับน้ำนมโคดิบ ในอัตราส่วน 0: 10 (100%), 9: 1 (10%), 7.5: 2.5 (25%) และ 5: 5 (50%) (ภาพ 11) บรรจุลงในหลอดที่มีฝาปิด
2. นำหลอดที่มีตัวอย่างมาควบคุมอุณหภูมิในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 32 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง NIR

ส่วนที่ 2 ผลของเวลาในการบ่มตัวอย่างน้ำนมต่อประสิทธิภาพการทำนายปริมาณแบคทีเรีย

วิธีการทดลอง

1. ใช้ตัวอย่างน้ำนมความเข้มข้น 10%, 25% และ 50% ของส่วนที่ 1 (ภาพ 12) มาทำการศึกษาต่อ
2. นำหลอดตัวอย่างมาทำการบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 32 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที และระหว่างการบ่มทำการแบ่งตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสง NIR ที่ระยะเวลาบ่มต่างๆ คือ 60, 90 และ 120 นาที ดังแสดงในภาพ 13

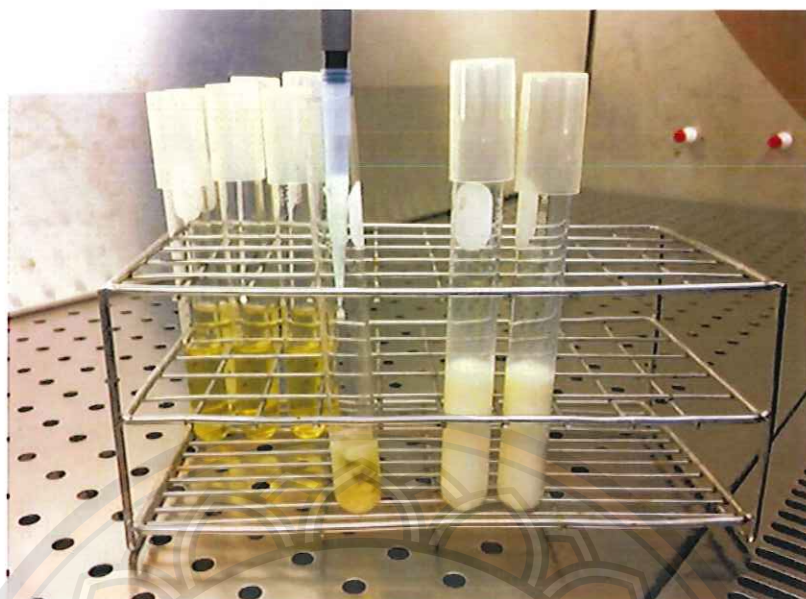
การสแกนตัวอย่างด้วยแสงเนียร์อินฟราเรดและการวิเคราะห์ข้อมูล

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้คือเครื่อง Multi-purpose analyzer (MPA) FT-NIR spectrometer ที่ช่วงเลขคลื่น 12000 ถึง 4000 cm^{-1} วัดค่าการดูดกลืนแสง NIR ด้วยโหมด Transflectance โดยการนำตัวอย่างน้ำนมแต่ละรูปแบบปริมาตร 1 มิลลิลิตร บรรจุลงในเซลล์ตัวอย่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร แล้ววาง Aluminum reflector ที่มีระยะ Optical pathlength 0.1 มิลลิเมตร ลงในเซลล์ตัวอย่าง เพื่อช่วยสะท้อนแสงกลับมายังตัว Detector ของเครื่อง NIRS

จำนวนตัวอย่างน้ำนมแต่ละรูปแบบสำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลคือ 75 ตัวอย่าง โดยการแบ่งตัวอย่างเป็นกลุ่ม Calibration 50 ตัวอย่างและสำหรับกลุ่ม Validation 25 ตัวอย่าง นำข้อมูลสเปกตรัมของตัวอย่างน้ำนมระยะเวลาบ่มต่างๆ ที่ปรับแต่งมาคำนวณเพื่อสร้างสมการ calibration สำหรับการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อน คำนวณหาความสัมพันธ์ระหว่าง

ค่าการดูดกลืนแสงกับค่าปริมาณเชื้อที่ตรวจวัดด้วยวิธี Standard Plate Count โดยวิธีทางสถิติ PLSR ด้วยโปรแกรม OPUS เวอร์ชัน 7.2 โดยข้อมูลสเปกตรัมที่ใช้สร้างสมการเป็นสเปกตรัมแบบดั้งเดิม หรือเป็นสเปกตรัมที่ผ่านการปรับแต่งข้อมูลสเปกตรัมด้วยวิธีต่างๆ และหาลักษณะข้อมูลสเปกตรัมที่เหมาะสมที่สุดในการทำนายความสัมพันธ์คัดเลือกแบบจำลองที่มีประสิทธิภาพการทำนายสูงสุดในการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำมันโคดิบ โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; R) ที่สูงที่สุด ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ (Standar error of prediction; SEP) ที่ต่ำที่สุด และค่าอัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มทดสอบต่อค่า SEP (Ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP: RPD) ที่สูงที่สุด





ภาพ 11 การเตรียมตัวอย่างน้ำมันโคติบผสมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว



ภาพ 12 ตัวอย่างน้ำมันโคติบผสมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่ความเข้มข้น (a) 10%, (b) 25% และ (c) 50% ของน้ำมันโคติ



ภาพ 13 ตัวอย่างน้ำนมโคดิบผสมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ
ที่อุณหภูมิ 32 ± 0.5 องศาเซลเซียส

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

คุณภาพน้ำนมโคดิบจากฟาร์มโคนมของเกษตรกรในเขตอำเภอกงไกรลาศ จังหวัดสุโขทัย มีค่าระดับปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม (ค่า TBC) ในน้ำนมอยู่ในช่วง 3 ถึง 4 log CFU/ml เพื่อให้ได้ระดับ TBC ที่มีช่วงกว้างขึ้นและสอดคล้องกับระดับ TBC ในน้ำนมที่ใช้เป็นเกณฑ์กำหนดราคาน้ำนม ซึ่งจะนำมาใช้เป็นค่าอ้างอิงในการสร้างแบบจำลองทำนายค่า TBC จึงนำตัวอย่างน้ำนมดิบมาบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างๆ เพื่อเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรียในการศึกษาครั้งนี้ อยู่ในช่วง 3 ถึง 6 log CFU/ml แสดงดังในตาราง 9 และ 10

การศึกษาที่ 1: ศึกษาอิทธิพลของระยะที่แสงผ่านต่อประสิทธิภาพการทำนายการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบด้วยเทคนิค NIRS

การสแกนตัวอย่างน้ำนมโคดิบด้วยตัวช่วยสะท้อนแสง ที่มีขนาด Pathlength 0.1 และ 1.0 มิลลิเมตร ด้วยเครื่อง NIRS ในโหมด transreflectance ในช่วงเลขคลื่น 12000 ถึง 4000 cm^{-1} มีสเปกตรัมแสดงดังภาพ 14 ลักษณะของสเปกตรัมมีพีคลักษณะบ้านขนาดใหญ่ 2 พีค คือพีคของพันธะ O-H ของโมเลกุลน้ำ ที่เลขคลื่น 6890 และ 5170 cm^{-1} ซึ่งมีรายงานไว้โดย Tsenkova, et al. (1999); Tsenkova, et al. (2001) และ Kesemsumran, Thanapase and Kiasoonthon (2007) ในการสแกนตัวอย่างน้ำนมตัวเดียวกัน เมื่อใช้ Pathlength ที่มีขนาดต่างกันคือ 0.1 และ 1.0 มิลลิเมตร จะพบว่าค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างจะสูงขึ้นเมื่อใช้ Pathlength ยาวขึ้น อย่างไรก็ตาม Pathlength ขนาด 1.0 มิลลิเมตร จะได้สเปกตรัมที่มี Over absorption เกิดขึ้นชัดเจนในช่วงเลขคลื่น 5170 cm^{-1} ในขณะที่ไม่พบจากการวัดด้วย Pathlength ขนาด 0.1 มิลลิเมตร โดยปรากฏการณ์ดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการศึกษาของศุมาพร เกษมสำราญ (2551) ซึ่งได้ทำการหาขนาดของ Pathlength ของเซลล์ใส่ตัวอย่างที่เหมาะสม โดยใช้เซลล์ใส่ตัวอย่างที่มี Pathlength ขนาดต่างกัน คือ 0.2, 0.3 และ 0.5 มิลลิเมตร โดยทำการวัดสเปกตรัมของตัวอย่างนมพาสเจอร์ไรส์ ด้วยโหมดการสะท้อนกลับ (Reflectance) พบว่า Pathlength 0.2 มิลลิเมตรมีความเหมาะสมกว่าการใช้ Pathlength ที่ 0.3 และ 0.5 มิลลิเมตร ซึ่งทำให้เกิด Over absorption ในสเปกตรัมของตัวอย่าง

เมื่อนำสเปกตรัมของตัวอย่างน้ำมันโคดิบซึ่งวัดด้วย Pathlength 0.1 และ 1.0 มิลลิเมตร มาสร้างแบบจำลอง Calibration และวิเคราะห์ความแม่นยำในการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Partial Least Squares Regression (PLSR) พบว่าผลการทำนาย แบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมของตัวอย่างน้ำมันโคดิบที่ใช้ขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ผ่านการปรับแต่งด้วยวิธีอนุพันธ์ลำดับที่ 1 (First derivative) มีค่าความแม่นยำที่ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; R) เท่ากับ 0.77 และค่าผิดพลาดมาตรฐานในการทดสอบสมการ (Standard error of cross validation; SECV) เท่ากับ 0.42 log CFU/ml ดังแสดงในตาราง 11 ทั้งนี้เป็นเพราะวิธีอนุพันธ์ลำดับที่ 1 สามารถลดปัญหาการเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ของค่าการดูดกลืนแสงของสเปกตรัม ที่ทำให้เกิดการซ้อนทับกันของสเปกตรัม และพบว่าค่าการทำนายจะดีขึ้นเมื่อใช้ Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธีอนุพันธ์ลำดับที่ 1 ร่วมกับวิธี Standard normal variate (SNV) โดยให้ผลการทำนายที่ดีที่สุด คือ $R = 0.88$, $SECV = 0.34$ log CFU/ml (ตาราง 9) ทั้งนี้เนื่องมาจากวิธี SNV สามารถช่วยปรับความแปรปรวนของการดูดกลืนแสงเนียร์อินฟราเรดอันเนื่องมาจากการกระเจิงของแสงในสเปกตรัมของตัวอย่างที่อาจเกิดขึ้นจากอนุภาคของไขมันและอนุภาคอื่นๆ ในตัวอย่างน้ำมัน ภาพ 15 และ 16 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำมันดิบที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานกับปริมาณแบคทีเรียที่ได้จากการทำนายด้วยเทคนิค NIRS

ตาราง 9 ข้อมูลทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในน้ำนมโคดิบจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (การศึกษาที่ 1)

Sample type	Minimum**	Maximum**	Mean**	SD.	No.
100% milk – 0.1 PL*	3.27	5.49	4.35	0.52	44
100% milk – 1.0 PL*	3.14	5.49	4.31	0.54	46

หมายเหตุ: *0.1 PL: Pathlength 0.1 mm

1.0 PL: Pathlength 1.0 mm

**Unit: log CFU/ml

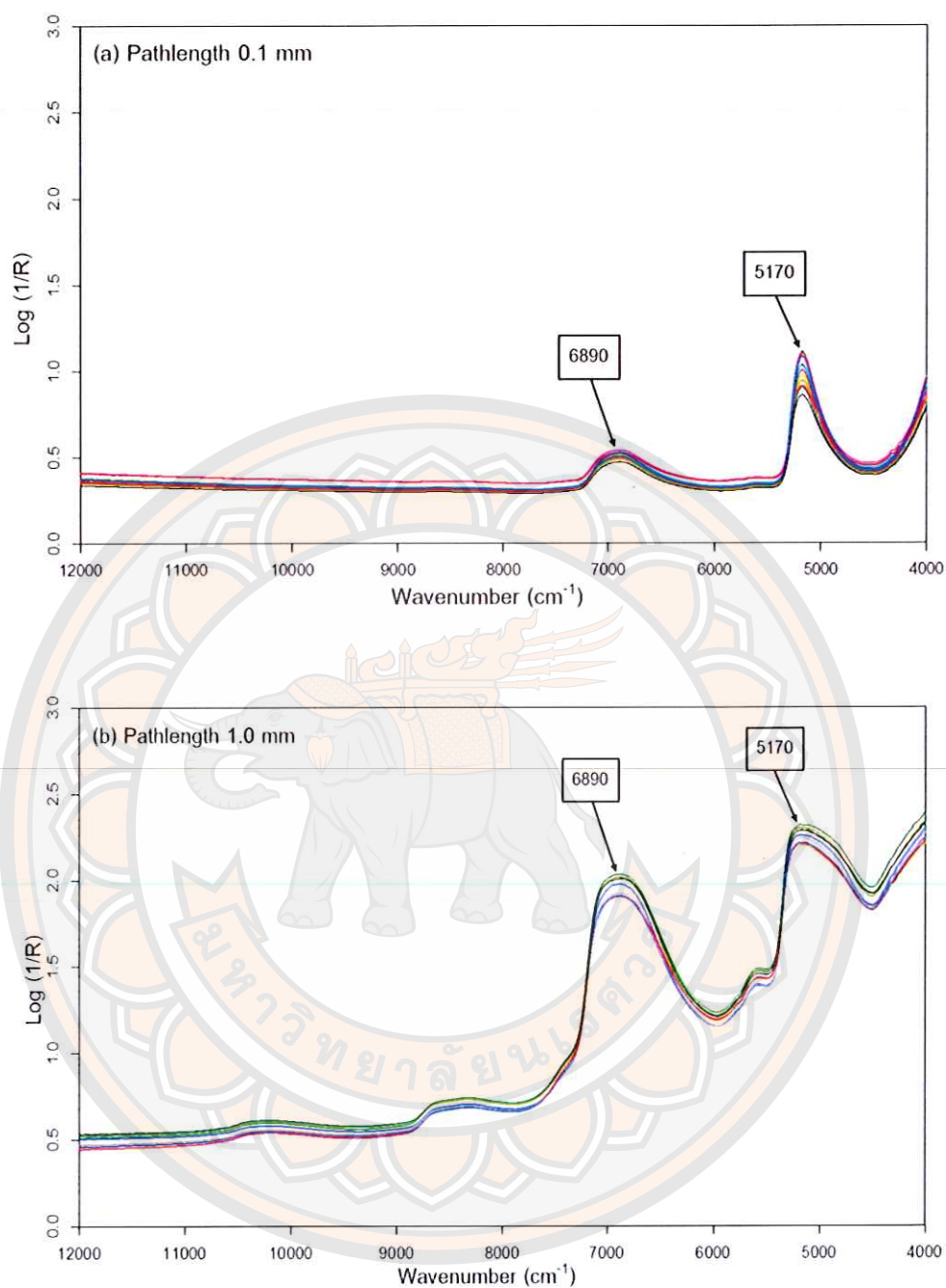
ตาราง 10 ข้อมูลทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในน้ำนมโคดิบจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน (การศึกษาที่ 2)

Items	100% milk		50% milk		25% milk		10% milk	
	Cal set	Val set	Cal set	Val set	Cal set	Val set	Cal set	Val set
No.	50	25	50	25	50	25	50	25
Min*	3.01	3.27	3.02	3.14	3.02	3.14	3.15	3.22
Max*	5.96	5.79	5.86	5.78	6.23	6.15	6.57	6.49
Mean*	4.42	4.48	4.38	4.39	4.52	4.53	4.67	4.67
SD	0.63	0.62	0.60	0.62	0.70	0.70	0.79	0.77

หมายเหตุ: Cal set: Calibration set คือ กลุ่มสร้างแบบจำลอง

Val set: Validation set คือ กลุ่มทดสอบสมการ

*Unit: log CFU/ml



ภาพ 14 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำมันโคติบเมื่อวัดด้วย Pathlength
(a) 0.1 และ (b) 1.0 มิลลิเมตร ที่เลขคลื่น 12000– 4000 cm⁻¹

ตาราง 11 ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PLSR ของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนม (100%) ที่มีขนาด Pathlength ต่างกัน

Sample type	Factor	R	SEC**	SECV**	Bais	RPD	Pretreatment
100% milk-0.1PL*							
	6	0.77	0.36	0.45	-0.009	1.17	Raw spectra
	3	0.65	0.42	0.44	-0.009	1.17	first derivative
	4	0.61	0.43	0.47	0.002	1.09	second derivative
	5	0.80	0.33	0.43	0.003	1.18	MSC
	4	0.65	0.42	0.45	-0.004	1.15	SNV
	8	0.88	0.27	0.34	-0.007	1.56	first derivative + SNV
	6	0.80	0.34	0.40	-0.030	1.28	first derivative + MSC
100% milk-1.0PL*							
	5	0.72	0.40	0.44	-0.005	1.21	Raw spectra
	4	0.77	0.36	0.42	-0.001	1.27	first derivative
	1	0.52	0.45	0.46	-0.002	1.15	second derivative
	4	0.72	0.37	0.41	0.021	1.26	MSC
	3	0.74	0.38	0.44	-0.004	1.21	SNV
	5	0.67	0.38	0.46	0.003	1.14	first derivative + SNV
	3	0.678	0.39	0.45	-0.007	1.19	first derivative + MSC

หมายเหตุ: Factor: ค่าที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างข้อมูลสเปกตรัม

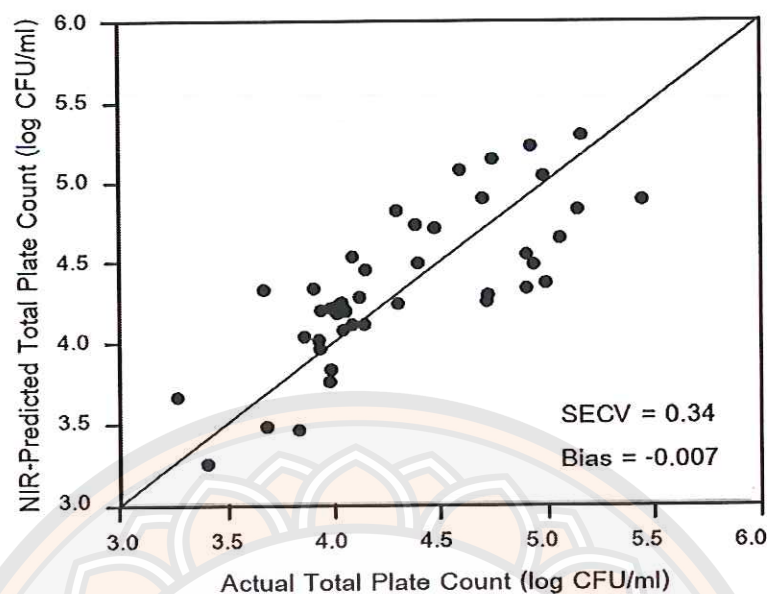
R: Correlation coefficient คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์
SEC: Standard error of calibration คือ ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้างแบบจำลอง

SECV: Standard error of cross-validation คือ ค่าผิดพลาดมาตรฐานในการทดสอบสมการ

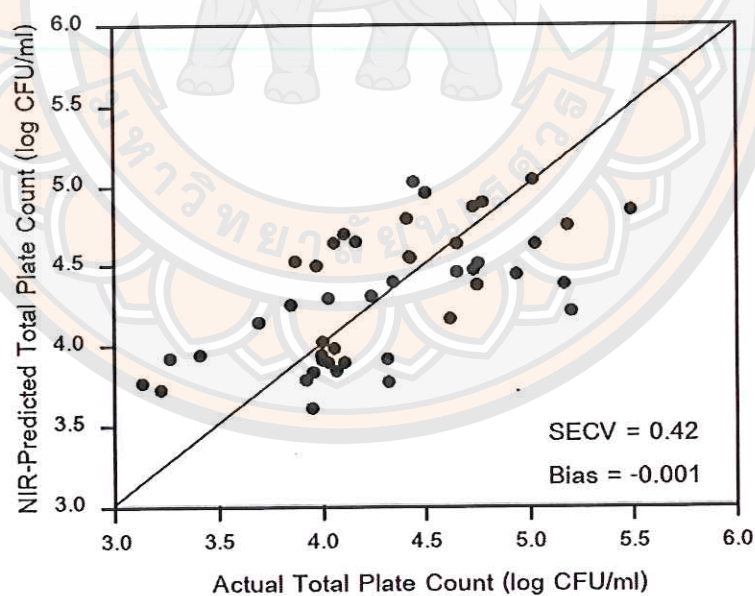
RPD: Ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP
คือ อัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มทดสอบต่อค่า SEP

* 0.1 PL: Pathlength 0.1 mm และ 1.0 PL: Pathlength 1.0 mm

** Unit: log CFU/ml



ภาพ 15 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ SNV

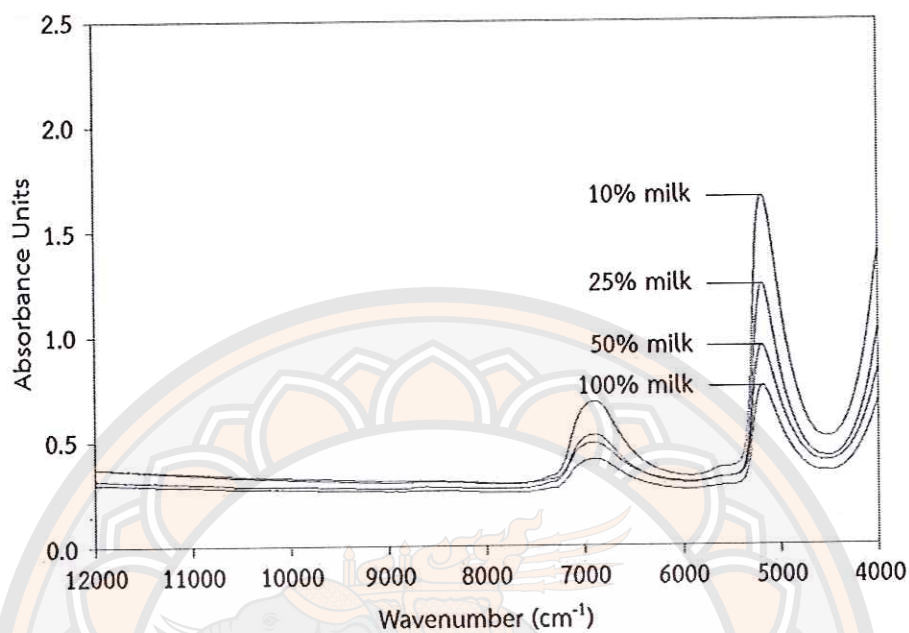


ภาพ 16 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative

การศึกษาที่ 2: ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียต่อประสิทธิภาพการทำนายการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบด้วยเทคนิค NIRS

ภาพ 17 แสดงตัวอย่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของตัวอย่างนํ้านมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ สแกนด้วยเครื่อง NIR ในโหมด transreflectance ในช่วงเลขคลื่น 12000 ถึง 4000 cm^{-1} ซึ่งพบพีคขนาดใหญ่ 2 พีคเช่นเดียวกับการศึกษาที่ 1 คือพีคของพันธะ O-H ของโมเลกุลน้ำที่เลขคลื่นประมาณ 6890 และ 5170 cm^{-1} เนื่องจากโมเลกุลน้ำ สามารถดูดกลืนแสงในช่วงเนียร์อินฟราเรดได้ดี จึงปรากฏพีคของน้ำที่มีขนาดใหญ่อย่างเห็นได้ชัดเจน (Tsenkova, et al., 1999; Tsenkova, et al., 2001; Kesemsumran, Thanapase and Kiasoonthon, 2007) หากพิจารณาจากสัดส่วนของปริมาณน้ำกับองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างนํ้านมความเข้มข้นต่างๆ แล้ว พบว่าตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของนํ้ามน้อยจะมีสัดส่วนของน้ำจากอาหารเหลวมากขึ้น ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่งพีค 6890 และ 5170 cm^{-1} ของตัวอย่าง จะสูงขึ้นตามปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมลงไปตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Kesemsumran, Thanapase and Kiasoonthon (2007) ได้ทำการตรวจสอบนมพาสเจอร์ไรส์เจือปนน้ำ พบว่าตำแหน่งพีค O-H ของน้ำจะสูงขึ้นตามปริมาณน้ำที่เติมลงไป

เพื่อหาแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบด้วยเทคนิค NIRS ได้ทำการนำนํ้านมโคดิบมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในอัตราส่วน 10%, 25% และ 50% ของนํ้านมโคดิบ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที เพื่อให้แบคทีเรียในนํ้านมเจริญเติบโตจากสารอาหารที่อยู่ในอาหารเหลว โดยสมมติฐานของการศึกษานี้คือ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารเหลวที่เกิดจากกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการบ่มที่ระยะเวลาต่างๆ จะแปรผันตามปริมาณเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นและสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการสร้างแบบจำลอง ในระหว่างการบ่มได้ทำการแบ่งตัวอย่างที่ระยะเวลาบ่ม 30, 60, 90 และ 120 นาที มาวัดค่าการดูดกลืนแสง NIR ในการศึกษาได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 ผลของระดับความเข้มข้นนํ้านมต่อประสิทธิภาพการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรีย และส่วนที่ 2 ผลของเวลาในการบ่มตัวอย่างนํ้านมต่อประสิทธิภาพการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรีย



ภาพ 17 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำนมโคดิบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่
เลขคลื่น 12000 ถึง 4000 cm^{-1}

ส่วนที่ 1 ผลของระดับความเข้มข้นน้ำนมต่อประสิทธิภาพการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรีย

เมื่อนำสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำนมโคดิบผสมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว แต่ละความเข้มข้นมาสร้างแบบจำลองด้วยวิธี PSLR พบว่าผลการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรีย จากข้อมูลการดูดกลืนแสงเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างน้ำนมโคดิบ 100% เปรียบเทียบกับตัวอย่าง น้ำนมความเข้มข้น 10%, 25% และ 50% พบว่าประสิทธิภาพการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรียจาก สเปกตรัมน้ำนมโคดิบผสมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในระดับ 10% และ 25% มีค่าความ คลาดเคลื่อนจากการทำนายที่ใกล้เคียงกันคือ มีค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ (Standard error of prediction; SEP) เท่ากับ 0.34 และ 0.37 log CFU/ml ตามลำดับ โดยตัวอย่าง น้ำนม 10% และ 25% ให้ค่าการทำนายที่มีความแม่นยำมากกว่าการทำนายผ่านตัวอย่างน้ำนมโค ดิบ 50% และ 100% แสดงในตาราง 12 ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมระดับความ เข้มข้น 10% และ 25% อาจแสดงกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่มีการใช้สารอาหารหรือการ เปลี่ยนแปลงสารอาหารในอาหารเหลว ในช่วงเวลา 30 นาที ที่ทำการบ่มในอุณหภูมิ 32 องศา เซลเซียส และอาจเห็นการเปลี่ยนแปลงชัดเจนกว่า ตัวอย่างน้ำนม 50% เนื่องจากอัตราส่วนของ น้ำนมที่สูงมากเกินไป อาจส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียยังคงให้ประโยชน์จากองค์ประกอบของน้ำนม และ เกิดการเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลวที่ยังไม่เด่นชัดเพียงพอสำหรับการหาความสัมพันธ์ในการ สร้างแบบจำลอง

ตาราง 12 ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PLSR ของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนม
ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Sample type	Factor	R	SEC*	SEP*	Bias	RPD
10% milk	8	0.98	0.18	0.34	-0.024	1.92
25% milk	9	0.93	0.29	0.37	0.075	1.92
50% milk	10	0.92	0.29	0.46	-0.017	1.42
100% milk	10	0.89	0.41	0.45	-0.084	1.72

หมายเหตุ: Factor: ค่าที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างข้อมูลสเปกตรัม

R: Correlation coefficient คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

SEC: Standard error of calibration คือ ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้าง
แบบจำลอง

SEP: Standard error of prediction คือ ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ

RPD: Ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP คือ
อัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มทดสอบต่อค่า SEP

*Unit: log CFU/ml

ส่วนที่ 2 ผลของเวลาในการบ่มตัวอย่างน้ำนมต่อประสิทธิภาพการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรีย เมื่อนำตัวอย่างน้ำนมที่ระดับความเข้มข้น 10%, 25% และ 50% มาศึกษาระยะเวลาการบ่มต่อประสิทธิภาพการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรีย โดยเพิ่มระยะเวลาบ่มเป็น 60, 90, และ 120 นาที พบว่าตัวอย่างน้ำนม 10% ที่บ่มนาน 90 นาที ให้ผลการสร้างแบบจำลองทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรียได้ดีกว่าระยะเวลาบ่มอื่นๆ ที่ $R=0.93$ และ $SEP=0.32 \log CFU/ml$ (ตาราง 13) ซึ่งสอดคล้องกับตัวอย่างน้ำนม 25% ซึ่งพบว่าการบ่มที่ระยะเวลา 90 นาที ให้ค่าการทำนายดีที่สุด เช่นเดียวกัน โดยผลการทำนายของแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมของตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที มีประสิทธิภาพการทำนายที่แม่นยำที่สุด ที่ค่า $R=0.90$, $SEP=0.18 \log CFU/ml$ และ $RPD=2.04$ แสดงในตาราง 14 ในขณะที่น้ำนมที่ระดับความเข้มข้น 50% ให้ผลการทำนายที่แม่นยำน้อยที่สุด (ตาราง 15) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในน้ำนมมีเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด โดยปกติเชื้อแบคทีเรียจะมีการแบ่งเซลล์เพิ่มแบบทวีภาค (Binary fission) และมีเวลาที่ใช้ในการแบ่งเซลล์ (Generation time) แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของเชื้อแบคทีเรีย จึงอาจเป็นไปได้ว่าข้อมูลการดูดกลืนแสงในช่วงเวลา 90 นาที จะได้มาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่สอดคล้องกับปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยรวมทั้งหมด ในขณะที่เมื่อเวลามากหรือน้อยกว่า 90 นาที อาจทำให้ได้ข้อมูลการดูดกลืนแสงที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเชื้อแบคทีเรียบางชนิดในน้ำนมโคดิบ ซึ่งทำให้เกิดค่าความคลาดเคลื่อนในการหาความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมในน้ำนม ภาพ 18 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS

จากแบบจำลองในการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ พบเลขช่วงคลื่นที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองที่ดีที่สุดของตัวอย่างน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที (ภาพ 19) คือช่วง 9400-8400 ร่วมกับ 4600-4200 cm^{-1} เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างตัวแปรสำคัญในการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากช่วงเลขคลื่นดังกล่าว พบว่าการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 9351 และ 9157 cm^{-1} มีอิทธิพลต่อแบบจำลองการทำนายเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนในน้ำนม ซึ่งเป็นการดูดกลืนแสงจากการสั่นของพันธะ O-H ขององค์ประกอบน้ำตาลแลคโตส และพันธะ C-O ขององค์ประกอบของไขมันตามลำดับ (Tsenkova, et al., 1999) นอกจากนี้ยังพบความสำคัญของการดูดกลืนแสงเลขคลื่น 4577 และ 4506 cm^{-1} ซึ่งเกิดจากการสั่นของพันธะ C=O ที่เป็นองค์ประกอบของ amide :ซึ่งมีรายงานไว้โดย Charnik-Matusiewicz, et al. (1999) และ Murayama, et al. (2000) โดยการดูดกลืนแสงดังกล่าวอาจมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเชื้อ

แบคทีเรียที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายโปรตีนโดยแบคทีเรีย (Proteolytic) (Charnik-Matusewicz, et al., 1999)

ตาราง 13 ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PLSR ของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่มต่างๆ

Incubation time (minute)	Factor	R	SEC*	SEP*	Bias	RPD
30	8	0.98	0.18	0.34	-0.024	1.92
60	8	0.91	0.32	0.46	-0.041	1.48
90	10	0.93	0.33	0.32	0.078	1.99
120	3	0.65	0.40	0.38	0.065	1.32

หมายเหตุ: Factor: ค่าที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างข้อมูลสเปกตรัม

R: Correlation coefficient คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

SEC: Standard error of calibration คือ ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้างแบบจำลอง

SEP: Standard error of prediction คือ ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ

RPD: Ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP คือ อัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มทดสอบต่อค่า SEP

*Unit: log CFU/ml

ตาราง 14 ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PLSR ของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำมัน
25% ระยะเวลาบ่มต่างๆ

Incubation time (minute)	Factor	R	SEC*	SEP*	Bias	RPD
30	9	0.93	0.29	0.37	0.075	1.92
60	6	0.90	0.53	0.34	0.006	2.00
90	8	0.90	0.13	0.18	0.162	2.04
120	9	0.76	0.44	0.45	0.044	1.31

หมายเหตุ: Factor: ค่าที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างข้อมูลสเปกตรัม

R: Correlation coefficient คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

SEC: Standard error of calibration คือ ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้าง
แบบจำลอง

SEP: Standard error of prediction คือ ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ

RPD: Ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP คือ
อัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มทดสอบต่อค่า SEP

*Unit: log CFU/ml

ตาราง 15 ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PLSR ของปริมาณเชื้อแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่มต่างๆ

Incubation time (minute)	Factor	R	SEC*	SEP*	Bias	RPD
30	10	0.92	0.29	0.46	-0.017	1.42
60	9	0.76	0.41	0.35	-0.032	1.53
90	10	0.84	0.24	0.27	0.110	1.67
120	3	0.57	0.55	0.46	-0.082	1.59

หมายเหตุ: Factor: ค่าที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างข้อมูลสเปกตรัม

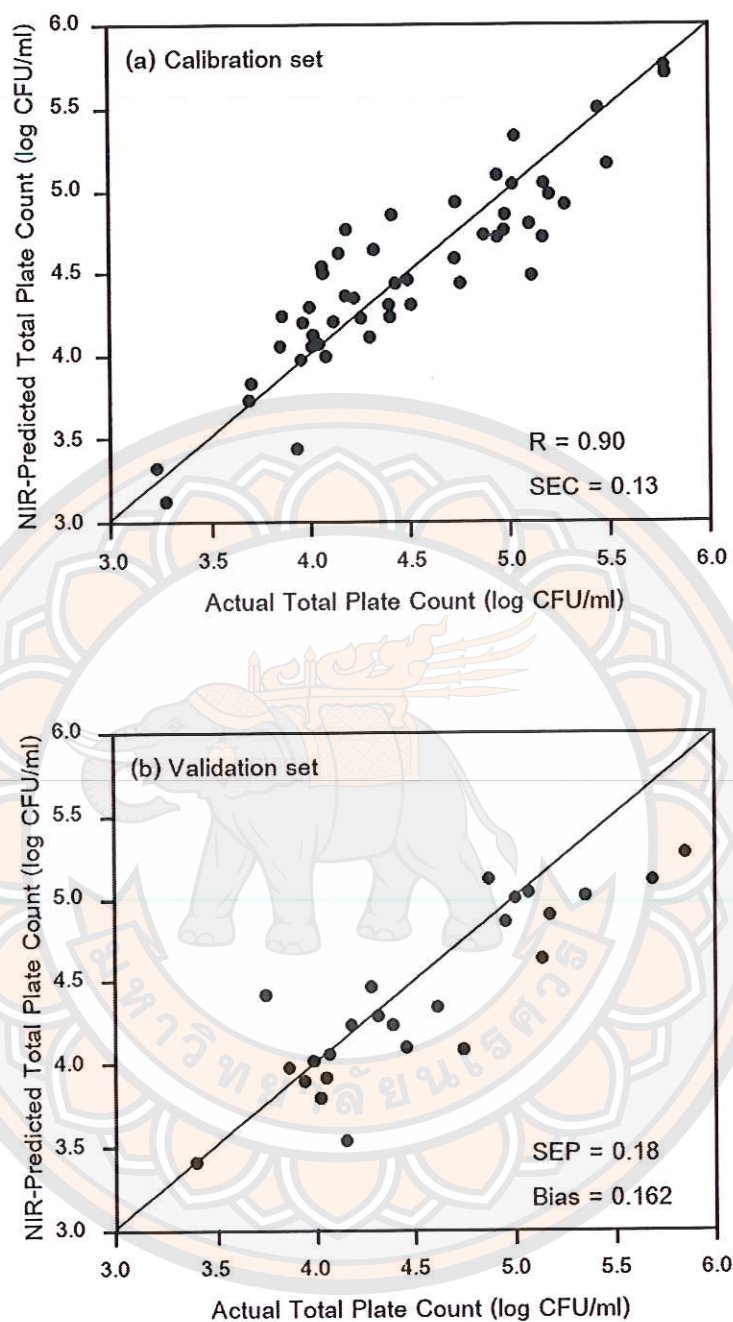
R: Correlation coefficient คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

SEC: Standard error of calibration คือ ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้างแบบจำลอง

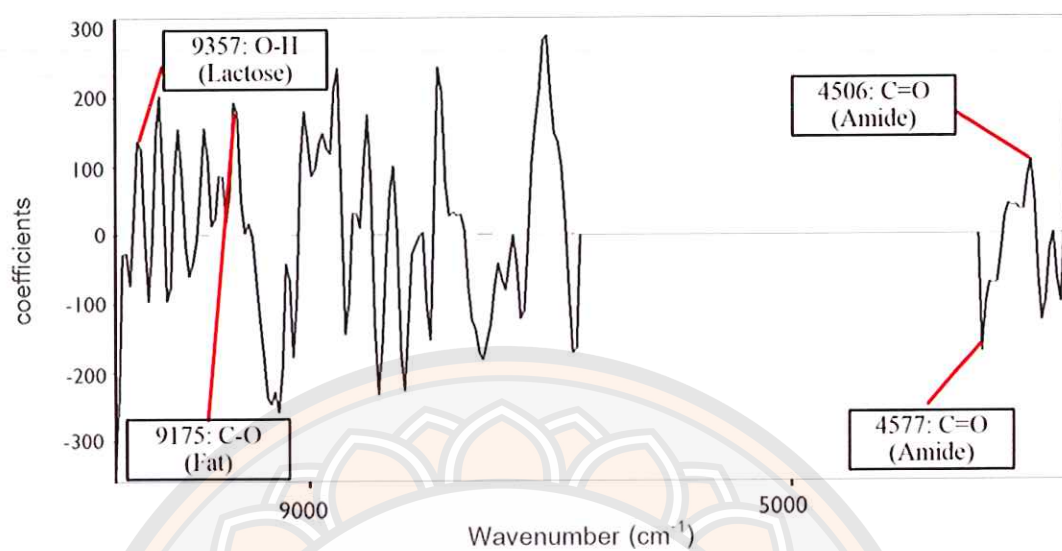
SEP: Standard error of prediction คือ ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ

RPD: Ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP คือ อัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มทดสอบต่อค่า SEP

*Unit: log CFU/ml



ภาพ 18 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 25% ระยะเวลารบ่ม 90 นาที ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ใน (a) กลุ่ม Calibration และ (b) กลุ่ม Validation



ภาพ 19 Regression coefficients ของตัวอย่างน้ำมัน 25% ระยะเวลามบ่ม 90 นาที

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

1. ผลการหาขนาด Pathlength ที่เหมาะสมสำหรับการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบด้วยเทคนิค NIRS พบว่า Pathlength ขนาด 0.1 มิลลิเมตรเหมาะสมกว่า Pathlength ขนาด 1.0 มิลลิเมตร โดยมีค่า SECV เท่ากับ 0.34 และ 0.42 ตามลำดับ
2. การพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบด้วยเทคนิค NIRS โดยใช้นํ้านมโคดิบผสมอาหารเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 10% และ 25% บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำนายได้ดีกว่าการใช้นํ้านมดิบ 100%
3. ประสิทธิภาพการทำนายมีค่าดีที่สุดได้จากข้อมูลสเปกตรัมของตัวอย่างนํ้านม 25% บ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 นาที มีค่า R เท่ากับ 0.90 และ SEP เท่ากับ 0.18 log CFU/ml
4. ความเข้มข้นของนํ้านมโคดิบและระยะเวลาที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำนายปริมาณเชื้อแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบด้วยเทคนิค NIRS ได้

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการใช้ตัวอย่างนํ้านมโคจากเกษตรกรในหลายๆ พื้นที่และเพิ่มจำนวนตัวอย่างนํ้านมโค เพื่อให้ได้ตัวอย่างนํ้านมโคที่มีช่วงระดับคุณภาพที่กว้างขึ้น ซึ่งจะทำให้แบบจำลองที่ได้มีความเสถียรและแม่นยำมากขึ้นสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในการทดแทนวิธีมาตรฐาน



บรรณานุกรม

- กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2558). *มาตรฐานการรับซื้อน้ำนมโค*. สืบค้น 5 มิถุนายน 2559, จาก <http://www.dpo.go.th/wp-content/uploads/2013/12/Announced-purchaserawmilk2015.pdf>.
- กิตติศักดิ์ อัจฉริยะขจร และสุกมา สามงามนิม. 2550. *การตรวจวินิจฉัยเต้านมอักเสบและคุณภาพนํ้านมดิบทางห้องปฏิบัติการ*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- กรมตรวจบัญชีสหกรณ์. (2555). *คู่มือระบบบัญชีธุรกิจรวบรวมและแปรรูปนํ้านมดิบ*. สืบค้น 19 พฤศจิกายน 2556, จาก http://www.cad.go.th.ewt_dl_link.php?nid=4755.
- กรมปศุสัตว์. (2547). *รายงานสรุปสถานการณ์โคนมประจำปี 2547 และแนวโน้มปี 2548*. สืบค้น 1 พฤศจิกายน 2548, จาก http://www.Dld.go.th/transfer/situation/dairy/dairy_dec_47.htm.
- ธรรมารัตน์ ชี้อตอฟ. (2558). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ธงชัย สุวรรณสิขณม และปิติพร ฤทธิเรืองเดช. (2555). *การวิเคราะห์เชิงปริมาณและคุณภาพ. ในเทคโนโลยีอินฟราเรดย่านใกล้และการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม*. สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตร และอุตสาหกรรม (น. 6-13). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิม และนิธิยา รัตนปนนท์. (2554). *Generation time*. สืบค้น 7 พฤศจิกายน 2556, จาก <http://www.foodnetworksolution.Com/wiki/word.1543/generation-time>.
- ศุมาพร เกษมสำราญ. (2545). *ขั้นตอนการสร้างสมการประเมินค่าทางเคมีและการทดสอบสมการในทางเทคนิคสเปคโตรสโกปีย่านใกล้อินฟราเรด*. ใน วารุณี ธนะพลย์, อนุพันธ์ เทิดวงศ์ วรกุล และ ธงชัย สุวรรณสิขณม (ผู้รวบรวม), *การอบรมเชิงปฏิบัติการการควบคุมคุณภาพสินค้าด้วยเทคนิค Near Infrared Spectroscopy เพื่อการแข่งขันในเวทีการค้าโลก* (น. 131-151). กรุงเทพฯ: สถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- ศุมาพร เกษมล้ำาญ. (2551). การตรวจสอบสิ่งเจือปนในน้ำนมวัวดิบแบบรวดเร็วและการหาปริมาณองค์ประกอบน้ำนมด้วยวิธีวิเคราะห์แบบเนียร์อินฟราเรดสเปคโตรสโกปี. สืบค้น 3 พฤศจิกายน 2556, จาก http://elibrary.trf.or.th/fullP/MRG4980149//MRG4980149_full.pdf.
- ส่วนข้อมูลข่าว ฝ่ายวิจัยและข้อมูลข่าว สำนักข่าวไทย. (2545). สรุปข่าวเด่น. โครงการอาหารเสริม (นม) โรงเรียน. สืบค้น 1 พฤศจิกายน 2556, จาก http://rdd.mcot.net/top/45/soc/edschool_milk_project/milk.htm.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. (2553). น้ำนมโคดิบ. สืบค้นเมื่อ 19 พฤศจิกายน 2556, จาก www.acfs.go.th/standard/download/raw_cow_milk.pdf.
- Albanell, E., Cáceres, P., Caja, G., Molina, E. & Gargouri, A. (1997). Determination of fat, protein and total solids in ovine milk by near-infrared spectroscopy. *Journal of AOAC International*, 82(3), 753-758.
- Alexandrakis, D., Downey, G. & Scannell, A.G.M. (2008). Detection and identification of bacteria in an isolated system with near infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58, 3431-3437.
- Alexandrakis, D., Downey, G. & Scannell, A.G.M. (2012). Rapid non-destructive detection of spoilage of intact chicken breast muscle using near infrared and Fourier transform mid infrared spectroscopy and multivariate statistics. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 338-347.
- American Public Health Association. (1993). *Standard methods for the examination of dairy products* (16th ed.). Washington, DC: American Public Health Association.
- Andueza, D., Rouel, J., Chilliard, Y. & Ferlay, A. (2013). Prediction of the goat milk fatty acids by near infrared reflectance spectroscopy. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(6), 612-620.
- Balain, R.M. & Smirnov, S.V. (2011). Melamine detection by mid- and near- infrared (MIR/NIR) spectroscopy: A quick and sensitive method for dairy products analysis including liquid milk, infant formula, and milk powder. *Talanta*, 85, 562-568.

- Barbin, D.F., Elmasry, G., Sun, D.W., Allen, P. & Morsy, N. (2013). Non-destructive assessment of microbial contamination in porcine meat using NIR hyperspectral imaging. *Innovative food science and emerging technology*, 17, 180-191.
- Blazquez, C., Downey, G., O'Donnell, C., O'Callaghan, D. & Howard, V. (2004). Prediction of moisture, fat and inorganic salt in processed cheese by near infrared reflectance spectroscopy and multivariate data analysis. *Journal of Near Infrared Spectrosc*, 12, 149-157.
- Cámara-Martos, F., Lopes, J.A., Moreno-Rojas, R. & Pérez-Rodríguez, F. (2015). Detection and quantification of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in cow milk by near-infrared spectroscopy. *International journal of dairy technology*, 68(3), 357-365.
- Charnik-Matusewicz, B., Murayama, R., Tsenkova, R & Ozaki, Y. (1999). Analysis of near-infrared spectra of complicated biological fluids by two-dimensional correlation spectroscopy: Protein and fat concentration-depending spectral changes of milk. *Applied Spectroscopy*, 53, 1582-1594.
- Chen, J.Y., Iyo, C. & Kawano, S. (1999). Development of calibration with sample cell composition for determining the fat content of unhomogenised raw milk by a simple near infrared transmittance method. *Journal of Near infrared spectroscopy*, 7, 265-273.
- Christen, R., Ratto, A., Baroin, A., Perasso, R., Grell, K.G. & Adoutte, A. (1992). An analysis of the origin of metazoans, using comparisons of partial sequences of the 28S RNA, reveals an early emergence of triploblasts. *The EMBO Journal*, 10, 499-503.
- Feng, Y.Z. & Sun, D.W. (2013). Determination of total viable count (TVC) in chicken breast fillets by near infrared hyperspectral imaging and spectroscopic transforms. *Talants*, 105, 244-249.

- He, H.J., Sun, D.W. & Wu, D. (2014). Rapid and real-time prediction of lactic acid bacteria (LAB) in farmed salmon flesh using near infrared (NIR) hyperspectral imaging combined with chemometric analysis. *Food Research International*, 62, 476-483.
- Huang, L., Zhao, J., Chen, Q. & Zhang, Y. (2013). Rapid detection of total viable count (TVC) in pork meat by hyperspectral imaging. *Food research international*, 54, 821-828.
- Huang, M., Kim, M.S, Delwiche, R.S., Chao, K., Qin, J., Mo, C., Esquerre, C. & Zhu, Q. (2016). Quantitative analysis of melamine in milk powder using near infrared hyperspectral imaging and band ratio. *Journal of Engineering*, 181, 10-19.
- Horváth, K, Zs., Seregély, É., Andrassy, I. & Dalmadi, J.F. (2008). A preliminary study using near infrared spectroscopy to evaluate freshness and detect spoilage in sliced pork meat. *Acta Alimentaria*, 37(1), 93-102.
- Hruschka, W. R. (2001). Data analysis: Wavelength selection methods. In P. C. Williams & K. Norris (Eds.), *Near-infrared technology in the agricultural and food industries*, (pp. 39-58). St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
- Katsumoto, Y., Jiang, J., Berry, R., & Ozaki, Y. (2001). Modern pretreatment methods in NIR spectroscopy. *Near Infrared Analysis*, 2, 29-36.
- Kawano, S. (1995). Progress in application of NIR and FT-NIR in food characterization. In A.G. Gaonkar (Eds.), *Characterization of food: Emerging Method* (pp. 185-199), Amsterdam: Elsevier Science B.V.
- Kawano, S. (2002). Application to agricultural products and foodstuffs. In H.W. Sieser, Y. Ozaki, S. Kawata, H.M. Heise (Eds.). *Near Infrared Spectroscopy: Principles, Instrument, Application* (pp. 269-288). Weinheim: Wiley-VCH.
- Kawano, S., Saranwong, S. & Terada, F. (2003). Rapid, easy-handling system for NIR compositional analysis of non-homogenized milk using a test tube. In A.M.C Davies, A. Garrido-Varo (Eds.), *Near Infrared Spectroscopy: Proceeding of the 11th International Conference* (pp. 77-79). West Sussex: NIRPublication.

- Kawasaki M., Kawamura, S., Nakatsuki, H., Natsuka, M. & Itoh, K. (2004). Monitoring milk quality during milking by near-infrared spectroscopy for dairy precision farming. *Proceeding of the 2th international symposium on machinery and mechatronics for agriculture and bio-systems engineering* (pp. 93-96). Kobe, Japan: Kobe University.
- Kesemsumran, S., Thanapase, W. & Kiaysoonthon, A. (2007). Fesasibility of near-infrared spectroscopy to detect and to quantify adulterants in cow milk. *Analytical Science*, 23(7), 907-910.
- Laporte, M.F. & Paquin, P. (1999). Near-infrared analysis of fat, protein and casein in cow's milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47, 2600-2605.
- Lee, S.J., Jeon, I.J. & Harbers, L.H. (1997). Near-infrared reflectance spectroscopy for rapid analysis of curds during cheddar cheese making. *Journal of food science*, 61(1), 53-56.
- Meilina, H., Kuroki, S., Jinendra, B.M., Ikuta, K. & Tsenkova, R. (2009). Double threshold method for mastitis diagnosis on NIR spectra of raw milk and chemometrics. *Biosystems Engineering*, 4, 243-249.
- Melfsen, A., Hartung, E. & Haessermann, A. (2012). Accuracy of milk composition analysis with near infrared spectroscopy in diffuse reflection mode. *Biosystem engineering*, 112, 210-217.
- Murayama, R., Charnik-Matusewicz, B., Wu, Y., Tsenkova, R & Ozaki, Y. (2000). Comparison between conventional spectral analysis method, chemometrics and two-dimensional correlation spectroscopy in analysis of near-infrared spectra of protein. *Applied Spectroscopy*, 54, 978-985.
- Numthuam, S. & Satake, T. (2012). Possibility of using near infrared spectroscopy for prediction of bacterial contamination in raw milk. *Khon Kaen Agriculture Journal* 40 supplement 2, 128-132.
- Osborne, B.G., Fearn, T. & Hindle, P.H. (1993). *Practical NIR spectroscopy with application in food and beverage analysis* (2nd Ed.). Addison Wesley Longman Ltd. Harlow United Kingdom: Longman Scientific & Technical.

- Pouliot, M., Paquin, P., Martel, R., Gauthier, S.F. & Pouliot, Y. (1997). Whey changes during processed determined by near infrared spectroscopy. *Journal of food science*, 62(3), 475-479.
- Revilla, I., Escuredo, O., González-Martín, M.I. & Palacios, C. (2014). Fatty acids and fat-soluble vitamins in ewe's milk predicted by near infrared reflectance spectroscopy. Determination of seasonality. *Food Chemistry*, 214, 468-477.
- Rodriguez-Otero, J.L. & Hermida, M. (1996). Analysis of fermented milk products by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of AOAC International*, 79(3), 817-821.
- Rodriguez-Otero, J.L., Hermida, M. & Cepeda, A. (1995). Determination of fat, protein and total solids in cheese by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of AOAC International*, 78(3), 802-806.
- Saranwong, S. & Kawano, S. (2008). System design for non-destructive near infrared analysis of chemical components and total aerobic bacteria count of raw milk. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 16, 389-398.
- Sato, T., Yoshino, M., Furukawa, S., Yana, N., Uozumi, J. & Iwamoto, M. (1987). Analysis of milk constituents by the near infrared spectrometric method. *Japanese Society of Zootechnical Science*, 58(8), 698-706.
- Siesler, H.W., Ozaki, Y., Kawata, S. & Heise, H.W. (2002). *Near-infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Sivakesava, S. & Irudayaraj, J. (2002). Rapid determination of tetracycline in milk by FT-MIR and FT-NIR spectroscopy. *Journal of dairy science*, 85, 487-493.
- Suthiluk, P., Saranwong, S., Kawano, S., Numthuam, S. & Satake, T. (2008). Possibility of using near infrared spectroscopy for evaluation of bacterial contamination in shredded cabbage. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(1), 160-165.
- Tarkošová, J. & Copíková, J. (2000). Fourier transform near infrared spectroscopy applied to analysis of chocolate. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 8, 251-257.

- Tsenkova, R., Atanassova, S., Itoh, K. & Toyoda, K. (2000). Near infrared spectroscopy for biomonitoring: cow milk composition measurement in a spectral region from 1,100-2,400 nanometers. *Journal of Animal Science*, 78, 515-522.
- Tsenkova, R., Atanassova, S., Kawano, S & Toyoda, K. (2001). Somatic cell count determination in cow's milk by near-infrared spectroscopy: a new diagnostic tool. *Journal of Animal Science*, 79, 2500-2557.
- Tsenkova, R., Atanassova, S., Toyoda, K., Ozaki, Y., Itoh, K. & Fearn T. (1999). Near-infrared spectroscopy for dairy management: measurement of unhomogenized milk composition. *Journal of Dairy Science*, 82(11), 2344-2351.
- Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A. & van Boekel, M. A. J. S. (1999). *Dairy technology, principles of milk properties and processes*. New York, USA: Marcel Dekker.
- Wehling, R.L. & Pierce, M.M. (1988). Determination of moisture in cheddar cheese by near infrared spectroscopy. Determination of moisture in Cheddar cheese by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 71(3), 571-574.
- Williams, P.C. (2001). Implementation of near-infrared technology. In P. C. Williams, P. & Norris, K.H. (Eds.), *Near-infrared technology in the agricultural and food industries* (pp. 163-165). St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
- Williams, P. & Norris, K.H. (2001). Variable affecting near infrared spectroscopic analysis. In P. C. Williams, P. & Norris, K.H. (Eds.), *Near-infrared technology in the agriculture and food industries* (pp. 171-185). St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.



ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยรัตนโกสินทร์

ภาคผนวก ก วิธีการคำนวณ

1. ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient: R)

$$R = \left[\frac{\sum (y_i^* - \bar{y})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \right]^{1/2}$$

2. ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มสร้างแบบจำลอง (standard error of calibration: SEC)

$$SEC = \left[\sum (d_i^2 / (n_c - p - 1)) \right]^{1/2}$$

3. ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ (standard error of prediction: SEP)

$$SEP = \left[\sum (d_i - Bias)^2 / (n_v - 1) \right]^{1/2}$$

4. Bias

$$Bias = \bar{d} = (\sum d_i) / n_v$$

5. อัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มทดสอบต่อค่า SEP (ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP: RPD)

$$RPD = \frac{\text{standard deviation of reference data in validation set}}{SEP}$$

ภาคผนวก ข ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์
ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ

ตาราง 16 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ที่ไม่ผ่านการ
ปรับแต่งสเปกตรัม

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.27	3.81	-0.54
2	3.42	3.56	-0.15
3	3.69	3.98	-0.29
4	3.70	4.30	-0.60
5	3.86	4.11	-0.25
6	3.88	4.29	-0.41
7	3.93	4.23	-0.30
8	3.95	4.51	-0.55
9	3.96	3.88	0.08
10	3.96	4.26	-0.30
11	4.00	4.10	-0.10
12	4.01	4.03	-0.02
13	4.01	3.93	0.08
14	4.04	4.24	-0.20
15	4.04	4.29	-0.26
16	4.06	3.75	0.31
17	4.06	4.20	-0.14
18	4.08	3.69	0.39
19	4.08	4.30	-0.22
20	4.11	4.75	-0.64
21	4.11	4.45	-0.33
22	4.15	4.38	-0.23

Sample	True value	Predict value	Difference
23	4.17	4.61	-0.44
24	4.18	4.30	-0.12
25	4.32	4.65	-0.33
26	4.33	3.75	0.57
27	4.42	5.16	-0.74
28	4.43	4.44	-0.01
29	4.51	5.22	-0.71
30	4.62	4.40	0.22
31	4.73	4.40	0.34
32	4.75	4.53	0.22
33	4.76	3.98	0.77
34	4.78	5.08	-0.31
35	4.94	4.30	0.64
36	4.94	4.44	0.50
37	4.96	5.23	-0.27
38	4.97	4.57	0.40
39	5.02	4.78	0.24
40	5.03	4.34	0.69
41	5.10	4.68	0.42
42	5.18	4.72	0.46
43	5.20	4.32	0.88
44	5.49	4.66	0.83
AV	4.35	4.35	-0.01
SD	0.52	0.40	0.44
Min	3.27	3.56	-0.74
Max	5.49	5.23	0.88
n	44	44	44

ตาราง 17 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำหนักโคดิบที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่ง
สเปกตรัมด้วยวิธี first derivative

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.27	3.97	-0.70
2	3.42	3.75	-0.34
3	3.69	4.62	-0.93
4	3.70	4.13	-0.43
5	3.86	3.75	0.11
6	3.88	4.43	-0.55
7	3.93	4.22	-0.29
8	3.95	4.53	-0.58
9	3.96	3.75	0.21
10	3.96	4.20	-0.24
11	4.00	4.09	-0.09
12	4.01	4.02	-0.01
13	4.01	4.15	-0.14
14	4.04	4.44	-0.40
15	4.04	4.84	-0.81
16	4.06	4.22	-0.15
17	4.06	3.79	0.28
18	4.08	4.11	-0.03
19	4.08	4.58	-0.50
20	4.11	4.65	-0.54
21	4.11	4.09	0.02
22	4.15	4.53	-0.38

Sample	True value	Predict value	Difference
23	4.17	4.15	0.01
24	4.18	4.65	-0.48
25	4.32	4.23	0.09
26	4.33	3.74	0.59
27	4.42	4.77	-0.35
28	4.43	4.44	-0.01
29	4.51	4.63	-0.12
30	4.62	4.49	0.13
31	4.73	4.49	0.24
32	4.75	4.28	0.47
33	4.76	4.40	0.36
34	4.78	4.98	-0.20
35	4.94	4.32	0.62
36	4.94	4.54	0.40
37	4.96	4.42	0.54
38	4.97	4.61	0.37
39	5.02	4.66	0.36
40	5.03	4.39	0.64
41	5.10	4.62	0.48
42	5.18	4.64	0.55
43	5.20	4.37	0.83
44	5.49	4.93	0.56

AV	4.35	4.35	-0.01
SD	0.52	0.32	0.44
Min	3.27	3.74	-0.93
Max	5.49	4.98	0.83
n	44	44	44

ตาราง 18 ผลการทำนายปริมาณเบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่ง
สเปกตรัมด้วยวิธี second derivative

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.27	4.22	-0.95
2	3.42	3.64	-0.23
3	3.69	4.48	-0.79
4	3.70	4.26	-0.57
5	3.86	4.36	-0.50
6	3.88	4.58	-0.70
7	3.93	4.12	-0.19
8	3.95	4.54	-0.58
9	3.96	4.06	-0.10
10	3.96	4.09	-0.12
11	4.00	4.07	-0.06
12	4.01	4.23	-0.22
13	4.01	3.89	0.12
14	4.04	4.14	-0.11
15	4.04	4.78	-0.74
16	4.06	4.05	0.02
17	4.06	3.92	0.14
18	4.08	4.21	-0.13
19	4.08	4.55	-0.47
20	4.11	4.49	-0.37
21	4.11	3.85	0.26
22	4.15	4.68	-0.54

Sample	True value	Predict value	Difference
23	4.17	4.34	-0.18
24	4.18	4.63	-0.45
25	4.32	4.39	-0.07
26	4.33	3.78	0.55
27	4.42	4.54	-0.13
28	4.43	4.39	0.04
29	4.51	4.37	0.14
30	4.62	4.67	-0.04
31	4.73	4.39	0.34
32	4.75	4.39	0.36
33	4.76	3.82	0.94
34	4.78	5.03	-0.25
35	4.94	4.45	0.49
36	4.94	4.45	0.49
37	4.96	4.51	0.46
38	4.97	4.45	0.52
39	5.02	4.57	0.45
40	5.03	4.50	0.53
41	5.10	4.63	0.47
42	5.18	4.53	0.66
43	5.20	4.42	0.78
44	5.49	4.66	0.83
AV	4.35	4.34	0.00
SD	0.52	0.29	0.47
Min	3.27	3.64	-0.95
Max	5.49	5.03	0.94
n	44	44	44

ตาราง 19 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่ง
สเปกตรัมด้วยวิธี MSC

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.27	3.99	-0.71
2	3.42	3.53	-0.11
3	3.69	4.21	-0.52
4	3.70	3.71	-0.01
5	3.86	4.02	-0.16
6	3.88	4.04	-0.16
7	3.93	4.31	-0.38
8	3.95	4.55	-0.60
9	3.96	4.16	-0.20
10	3.96	4.61	-0.65
11	4.00	4.20	-0.20
12	4.01	4.20	-0.19
13	4.01	3.91	0.10
14	4.04	4.20	-0.16
15	4.04	4.44	-0.40
16	4.06	4.11	-0.05
17	4.06	4.10	-0.04
18	4.08	3.17	0.90
19	4.08	4.24	-0.16
20	4.11	4.73	-0.61
21	4.11	4.09	0.02
22	4.15	4.25	-0.10

Sample	True value	Predict value	Difference
23	4.17	4.40	-0.23
24	4.18	4.37	-0.19
25	4.32	4.54	-0.22
26	4.33	4.01	0.32
27	4.42	4.88	-0.47
28	4.43	4.30	0.13
29	4.51	4.77	-0.26
30	4.62	4.74	-0.11
31	4.73	4.03	0.71
32	4.75	4.34	0.41
33	4.76	4.12	0.64
34	4.78	4.63	0.15
35	4.94	4.23	0.71
36	4.94	4.59	0.35
37	4.96	5.29	-0.33
38	4.97	4.55	0.42
39	5.02	5.57	-0.55
40	5.03	4.28	0.75
41	5.10	4.42	0.68
42	5.18	4.94	0.24
43	5.20	4.78	0.43
44	5.49	4.59	0.90

AV	4.35	4.34	0.00
SD	0.52	0.42	0.44
Min	3.27	3.17	-0.71
Max	5.49	5.57	0.90
n	44	44	44

ตาราง 20 ผลการทำนายปริมาณแบริ่งที่เรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์
ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ที่
ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.27	4.20	-0.93
2	3.42	3.73	-0.31
3	3.69	4.43	-0.73
4	3.70	4.06	-0.36
5	3.86	4.11	-0.26
6	3.88	4.71	-0.83
7	3.93	4.14	-0.21
8	3.95	4.44	-0.48
9	3.96	4.01	-0.05
10	3.96	3.99	-0.03
11	4.00	3.91	0.10
12	4.01	4.22	-0.21
13	4.01	3.92	0.09
14	4.04	4.34	-0.30
15	4.04	4.85	-0.81
16	4.06	4.15	-0.09
17	4.06	3.85	0.21
18	4.08	3.66	0.42
19	4.08	4.62	-0.54
20	4.11	4.62	-0.50
21	4.11	3.73	0.38
22	4.15	4.50	-0.35

Sample	True value	Predict value	Difference
23	4.17	4.28	-0.11
24	4.18	4.63	-0.46
25	4.32	4.38	-0.06
26	4.33	3.87	0.46
27	4.42	4.70	-0.29
28	4.43	4.40	0.03
29	4.51	4.95	-0.45
30	4.62	4.60	0.02
31	4.73	4.51	0.23
32	4.75	4.20	0.55
33	4.76	4.12	0.63
34	4.78	4.63	0.15
35	4.94	4.47	0.47
36	4.94	4.57	0.37
37	4.96	4.40	0.56
38	4.97	4.47	0.50
39	5.02	4.85	0.17
40	5.03	4.56	0.47
41	5.10	4.51	0.59
42	5.18	4.75	0.43
43	5.20	4.72	0.49
44	5.49	4.62	0.87

AV	4.35	4.35	0.00
SD	0.52	0.33	0.45
Min	3.27	3.66	-0.93
Max	5.49	4.95	0.87
n	44	44	44

ตาราง 21 ผลการทำนายปริมาณแบริ่งที่เรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำหนักโคดิบที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่ง
สเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ MSC

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.27	4.03	-0.75
2	3.42	4.02	-0.60
3	3.69	4.33	-0.64
4	3.70	3.75	-0.05
5	3.86	3.91	-0.05
6	3.88	4.07	-0.19
7	3.93	4.15	-0.22
8	3.95	4.60	-0.65
9	3.96	3.93	0.03
10	3.96	4.17	-0.21
11	4.00	3.76	0.24
12	4.01	4.24	-0.23
13	4.01	4.05	-0.04
14	4.04	4.22	-0.18
15	4.04	4.02	0.02
16	4.06	4.18	-0.12
17	4.06	4.16	-0.09
18	4.08	4.06	0.02
19	4.08	4.35	-0.28
20	4.11	4.97	-0.86
21	4.11	4.06	0.06
22	4.15	4.11	0.03

Sample	True value	Predict value	Difference
23	4.17	4.22	-0.05
24	4.18	4.40	-0.22
25	4.32	4.34	-0.02
26	4.33	4.18	0.15
27	4.42	4.85	-0.44
28	4.43	4.35	0.07
29	4.51	4.53	-0.03
30	4.62	4.91	-0.29
31	4.73	4.70	0.03
32	4.75	4.39	0.36
33	4.76	4.14	0.62
34	4.78	5.61	-0.83
35	4.94	4.61	0.33
36	4.94	4.32	0.62
37	4.96	4.94	0.03
38	4.97	4.70	0.28
39	5.02	5.04	-0.02
40	5.03	4.14	0.89
41	5.10	4.63	0.47
42	5.18	4.83	0.35
43	5.20	5.01	0.19
44	5.49	4.55	0.94

AV	4.35	4.37	-0.03
SD	0.52	0.39	0.40
Min	3.27	3.75	-0.86
Max	5.49	5.61	0.94
n	44	44	44

ตาราง 22 ผลการทำนายปริมาณแบรินที่เรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำหนักโคดิบที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่ง
สเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ SNV

Sample	True value	Predict value	Difference
1	4.08	4.20	-0.116
2	3.95	4.02	-0.0636
3	4.15	4.28	-0.137
4	4.18	4.45	-0.276
5	4.94	4.34	0.601
6	4.96	5.23	-0.263
7	4.97	4.49	0.485
8	5.10	4.65	0.447
9	4.11	4.53	-0.42
10	5.18	4.83	0.356
11	4.42	4.73	-0.315
12	4.51	4.71	-0.206
13	4.78	5.15	-0.367
14	3.70	3.48	0.221
15	3.69	4.33	-0.639
16	3.86	3.46	0.402
17	4.75	4.26	0.492
18	4.43	4.50	-0.0674
19	4.73	4.89	-0.162
20	4.32	4.82	-0.498
21	4.94	4.55	0.39
22	3.42	3.24	0.171

Sample	True value	Predict value	Difference
23	3.27	3.66	-0.388
24	4.17	4.11	0.0545
25	4.06	4.25	-0.186
26	4.04	4.23	-0.193
27	4.01	4.21	-0.203
28	4.76	4.30	0.457
29	3.96	3.96	-0.00179
30	3.93	4.34	-0.409
31	4.00	3.76	0.245
32	3.96	4.20	-0.238
33	4.01	3.83	0.178
34	4.08	4.20	-0.123
35	4.06	4.08	-0.0147
36	4.11	4.12	-0.001
37	4.33	4.24	0.0831
38	5.02	5.04	-0.0231
39	4.04	4.18	-0.143
40	3.88	4.04	-0.155
41	5.20	5.29	-0.0916
42	4.62	5.07	-0.447
43	5.49	4.89	0.598
44	5.03	4.37	0.655

AV	4.35	4.35	-0.01
SD	0.52	0.47	0.33
Min	3.27	3.24	-0.64
Max	5.49	5.29	0.66
n	44	44	44

ตาราง 23 ผลการทำนายปริมาณแบริกที่เรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ไม่ผ่านการ
ปรับแต่งสเปกตรัม

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.14	3.91	-0.78
2	3.22	3.65	-0.43
3	3.27	3.74	-0.47
4	3.42	3.72	-0.30
5	3.70	4.17	-0.47
6	3.86	4.73	-0.88
7	3.88	4.44	-0.56
8	3.93	4.38	-0.45
9	3.96	4.13	-0.17
10	3.96	3.91	0.05
11	3.98	4.28	-0.31
12	4.00	3.96	0.04
13	4.01	3.93	0.08
14	4.01	3.98	0.03
15	4.04	3.74	0.29
16	4.04	4.26	-0.22
17	4.06	5.00	-0.94
18	4.06	4.29	-0.22
19	4.08	4.01	0.06
20	4.11	4.07	0.04
21	4.11	4.16	-0.04
22	4.17	4.70	-0.54
23	4.24	4.44	-0.20
24	4.32	3.79	0.53

Sample	True value	Predict value	Difference
25	4.33	4.08	0.25
26	4.35	4.09	0.26
27	4.42	4.24	0.18
28	4.43	4.53	-0.10
29	4.43	4.33	0.10
30	4.45	4.69	-0.24
31	4.51	4.44	0.06
32	4.62	4.02	0.60
33	4.65	4.94	-0.28
34	4.65	4.29	0.36
35	4.73	4.79	-0.06
36	4.73	4.28	0.45
37	4.75	4.25	0.50
38	4.76	5.07	-0.32
39	4.78	4.92	-0.14
40	4.94	4.36	0.58
41	5.02	4.64	0.38
42	5.03	4.32	0.71
43	5.17	4.65	0.51
44	5.19	5.13	0.06
45	5.20	3.96	1.24
46	5.49	4.98	0.51
AV	4.31	4.31	0.00
SD	0.54	0.39	0.44
Min	3.14	3.65	-0.94
Max	5.49	5.13	1.24
n	46	46	46

ตาราง 24 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่ง
สเปกตรัมด้วยวิธี first derivative

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.14	3.76	-0.62
2	3.22	3.71	-0.49
3	3.27	3.91	-0.64
4	3.42	3.94	-0.52
5	3.70	4.14	-0.44
6	3.86	4.25	-0.39
7	3.88	4.52	-0.63
8	3.93	3.78	0.15
9	3.96	3.60	0.36
10	3.96	3.83	0.14
11	3.98	4.49	-0.51
12	4.00	3.93	0.07
13	4.01	4.01	0.00
14	4.01	3.90	0.11
15	4.04	3.89	0.15
16	4.04	4.29	-0.25
17	4.06	4.63	-0.57
18	4.06	3.97	0.09
19	4.08	3.83	0.25
20	4.11	4.69	-0.57
21	4.11	3.89	0.23
22	4.17	4.63	-0.47
23	4.24	4.30	-0.05
24	4.32	3.90	0.42

Sample	True value	Predict value	Difference
25	4.33	3.76	0.56
26	4.35	4.39	-0.04
27	4.42	4.78	-0.36
28	4.43	4.54	-0.11
29	4.43	4.53	-0.10
30	4.45	5.01	-0.56
31	4.51	4.94	-0.43
32	4.62	4.16	0.47
33	4.65	4.62	0.03
34	4.65	4.45	0.21
35	4.73	4.85	-0.12
36	4.73	4.46	0.27
37	4.75	4.36	0.39
38	4.76	4.50	0.25
39	4.78	4.88	-0.10
40	4.94	4.43	0.51
41	5.02	5.02	-0.01
42	5.03	4.62	0.41
43	5.17	4.37	0.79
44	5.19	4.74	0.45
45	5.20	4.20	1.00
46	5.49	4.83	0.66
AV	4.31	4.31	0.00
SD	0.54	0.40	0.42
Min	3.14	3.60	-0.64
Max	5.49	5.02	1.00
n	46	46	46

ตาราง 25 ผลการทำนายปริมาณแบริกที่เรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่ง
สเปกตรัมด้วยวิธี Second derivative

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.14	3.98	-0.84
2	3.22	3.98	-0.75
3	3.27	4.01	-0.74
4	3.42	4.03	-0.61
5	3.70	3.89	-0.20
6	3.86	3.98	-0.12
7	3.88	4.40	-0.52
8	3.93	4.31	-0.38
9	3.96	4.30	-0.34
10	3.96	4.27	-0.30
11	3.98	4.52	-0.54
12	4.00	4.28	-0.28
13	4.01	3.98	0.03
14	4.01	4.28	-0.27
15	4.04	3.98	0.06
16	4.04	4.04	0.00
17	4.06	4.57	-0.51
18	4.06	4.01	0.05
19	4.08	3.99	0.09
20	4.11	4.54	-0.43
21	4.11	3.97	0.15
22	4.17	4.54	-0.37
23	4.24	4.46	-0.21
24	4.32	3.90	0.43

Sample	True value	Predict value	Difference
25	4.33	3.93	0.39
26	4.35	4.41	-0.06
27	4.42	4.51	-0.09
28	4.43	4.33	0.09
29	4.43	4.41	0.02
30	4.45	4.51	-0.06
31	4.51	4.53	-0.02
32	4.62	4.40	0.23
33	4.65	4.52	0.14
34	4.65	4.39	0.27
35	4.73	5.10	-0.37
36	4.73	4.30	0.44
37	4.75	4.28	0.47
38	4.76	4.54	0.22
39	4.78	5.05	-0.28
40	4.94	4.28	0.67
41	5.02	4.64	0.37
42	5.03	4.34	0.69
43	5.17	4.31	0.86
44	5.19	4.99	0.20
45	5.20	3.93	1.27
46	5.49	4.41	1.09
AV	4.31	4.31	0.00
SD	0.54	0.30	0.47
Min	3.14	3.89	-0.84
Max	5.49	5.10	1.27
n	46	46	46

ตาราง 26 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำหนักโคดิบที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่ง
สเปกตรัมด้วยวิธี MSC

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.14	3.74	-0.60
2	3.22	3.43	-0.21
3	3.27	3.80	-0.53
4	3.42	3.85	-0.43
5	3.70	3.93	-0.23
6	3.86	4.21	-0.36
7	3.88	4.59	-0.71
8	3.93	4.12	-0.19
9	3.96	4.03	-0.07
10	3.96	4.22	-0.26
11	3.98	4.31	-0.34
12	4.00	4.04	-0.04
13	4.01	3.86	0.15
14	4.01	4.37	-0.36
15	4.04	3.85	0.18
16	4.04	4.41	-0.37
17	4.06	4.65	-0.59
18	4.06	4.14	-0.07
19	4.08	3.97	0.11
20	4.11	4.57	-0.46
21	4.11	3.76	0.35
22	4.17	4.62	-0.46
23	4.24	3.75	0.49
24	4.32	3.64	0.69

Sample	True value	Predict value	Difference
25	4.33	3.76	0.56
26	4.35	4.13	0.22
27	4.42	4.71	-0.29
28	4.43	4.59	-0.16
29	4.43	4.25	0.18
30	4.45	4.87	-0.42
31	4.51	5.04	-0.54
32	4.62	4.12	0.50
33	4.65	4.68	-0.03
34	4.65	4.20	0.45
35	4.73	4.88	-0.15
36	4.73	4.45	0.28
37	4.75	4.33	0.42
38	4.76	4.51	0.25
39	4.78	4.77	0.01
40	4.94	4.36	0.58
41	5.02	4.77	0.25
42	5.03	4.63	0.40
43	5.17	4.39	0.77
44	5.19	4.73	0.45
45	5.20	4.17	1.04
46	5.49	5.02	0.48
AV	4.31	4.29	0.02
SD	0.54	0.40	0.43
Min	3.14	3.43	-0.71
Max	5.49	5.04	1.04
n	46	46	46

ตาราง 27 ผลการทำนายปริมาณแบรินที่เรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่ง
สเปกตรัมด้วยวิธี SNV

Sample	True value	Predict value	Difference	Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.98	4.49	-0.51	25	4.65	4.62	0.03
2	4.11	4.69	-0.57	26	4.76	4.50	0.25
3	4.42	4.78	-0.36	27	3.93	3.78	0.15
4	4.45	5.01	-0.56	28	3.96	3.60	0.36
5	4.51	4.94	-0.43	29	3.96	3.83	0.14
6	4.73	4.85	-0.12	30	4.00	3.93	0.07
7	4.78	4.88	-0.10	31	4.01	3.90	0.11
8	5.19	4.74	0.45	32	4.06	3.97	0.09
9	3.14	3.76	-0.62	33	4.08	3.83	0.25
10	3.70	4.14	-0.44	34	4.11	3.89	0.23
11	3.86	4.25	-0.39	35	4.33	3.76	0.56
12	4.32	3.90	0.42	36	3.88	4.52	-0.63
13	4.43	4.54	-0.11	37	4.04	4.29	-0.25
14	4.73	4.46	0.27	38	4.62	4.16	0.47
15	4.75	4.36	0.39	39	5.02	5.02	-0.01
16	4.94	4.43	0.51	40	5.03	4.62	0.41
17	5.17	4.37	0.79	41	5.20	4.20	1.00
18	3.22	3.71	-0.49	42	5.49	4.83	0.66
19	3.27	3.91	-0.64	43	4.24	4.30	-0.05
20	3.42	3.94	-0.52	44	4.35	4.39	-0.04
21	4.01	4.01	0.00	45	4.43	4.53	-0.10
22	4.04	3.89	0.15	46	4.65	4.45	0.21
23	4.06	4.63	-0.57	AV	4.31	4.31	0.00
24	4.17	4.63	-0.47	SD	0.54	0.40	0.42
				Min	3.14	3.60	-0.64
				Max	5.49	5.02	1.00
				n	46	46	46

ตาราง 28 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ MSC

Sample	True value	Predict value	Difference	Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.14	3.79	-0.66	25	4.33	3.85	0.48
2	3.22	3.76	-0.54	26	4.35	4.34	0.01
3	3.27	3.97	-0.70	27	4.42	4.73	-0.32
4	3.42	3.96	-0.54	28	4.43	4.38	0.04
5	3.70	4.07	-0.37	29	4.43	4.40	0.03
6	3.86	4.26	-0.40	30	4.45	4.91	-0.46
7	3.88	4.45	-0.57	31	4.51	4.91	-0.40
8	3.93	3.91	0.02	32	4.62	4.32	0.30
9	3.96	3.82	0.14	33	4.65	4.51	0.15
10	3.96	4.02	-0.06	34	4.65	4.34	0.32
11	3.98	4.45	-0.47	35	4.73	5.28	-0.54
12	4.00	4.14	-0.14	36	4.73	4.23	0.51
13	4.01	4.07	-0.06	37	4.75	4.16	0.58
14	4.01	4.37	-0.36	38	4.76	4.35	0.41
15	4.04	3.81	0.23	39	4.78	5.22	-0.44
16	4.04	4.40	-0.36	40	4.94	4.21	0.73
17	4.06	4.42	-0.36	41	5.02	5.03	-0.02
18	4.06	4.02	0.05	42	5.03	4.56	0.47
19	4.08	3.92	0.16	43	5.17	4.21	0.96
20	4.11	4.67	-0.56	44	5.19	4.99	0.19
21	4.11	3.99	0.12	45	5.20	4.19	1.01
22	4.17	4.44	-0.28	46	5.49	4.62	0.87
23	4.24	4.21	0.03	AV	4.31	4.31	-0.01
24	4.32	3.84	0.48	SD	0.54	0.38	0.45
				Min	3.14	3.76	-0.70
				Max	5.49	5.28	1.01
				n	46	46	46

ตาราง 29 ผลการทำนายปริมาณแบริกที่เรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตร ที่ปรับแต่ง
สเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ SNV

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.14	4.19	-1.05
2	3.22	3.51	-0.28
3	3.27	3.68	-0.41
4	3.42	3.90	-0.48
5	3.70	4.28	-0.58
6	3.86	4.42	-0.56
7	3.88	4.58	-0.69
8	3.93	4.02	-0.09
9	3.96	4.19	-0.23
10	3.96	4.09	-0.13
11	3.98	4.01	-0.04
12	4.00	4.32	-0.32
13	4.01	3.89	0.12
14	4.01	4.40	-0.39
15	4.04	3.98	0.06
16	4.04	4.24	-0.21
17	4.06	4.67	-0.60
18	4.06	4.22	-0.16
19	4.08	3.41	0.67
20	4.11	4.36	-0.24
21	4.11	4.06	0.06
22	4.17	4.54	-0.38
23	4.24	3.92	0.32
24	4.32	3.62	0.70

Sample	True value	Predict value	Difference
25	4.33	3.51	0.82
26	4.35	4.02	0.33
27	4.42	4.64	-0.22
28	4.43	4.50	-0.07
29	4.43	4.39	0.04
30	4.45	5.24	-0.79
31	4.51	4.89	-0.38
32	4.62	4.44	0.18
33	4.65	4.42	0.23
34	4.65	4.32	0.34
35	4.73	4.84	-0.11
36	4.73	4.45	0.28
37	4.75	4.55	0.20
38	4.76	4.43	0.33
39	4.78	4.99	-0.21
40	4.94	4.41	0.53
41	5.02	4.98	0.04
42	5.03	4.57	0.46
43	5.17	4.15	1.02
44	5.19	4.78	0.40
45	5.20	4.16	1.04
46	5.49	4.88	0.61
AV	4.31	4.31	0.00
SD	0.54	0.41	0.47
Min	3.14	3.41	-1.05
Max	5.49	5.24	1.04
n	46	46	46

ตาราง 30 ผลการทำนายปริมาณแบริกที่เรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ในกลุ่ม Calibration

Sample	True value	Predict value	Difference	Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.02	3.22	-0.20	28	4.40	4.23	0.17
2	3.22	3.71	-0.48	29	4.43	4.63	-0.20
3	3.29	3.24	0.04	30	4.45	4.41	0.04
4	3.42	3.21	0.21	31	4.49	4.42	0.07
5	3.70	3.96	-0.26	32	4.51	4.28	0.23
6	3.76	4.02	-0.26	33	4.65	4.77	-0.12
7	3.88	4.04	-0.16	34	4.72	4.23	0.49
8	3.93	4.32	-0.39	35	4.75	4.49	0.26
9	3.96	3.91	0.05	36	4.76	4.54	0.22
10	3.96	4.16	-0.19	37	4.87	5.44	-0.57
11	4.00	4.13	-0.13	38	4.88	4.65	0.23
12	4.00	3.98	0.03	39	4.96	5.27	-0.30
13	4.01	3.98	0.04	40	4.97	4.86	0.11
14	4.04	4.30	-0.26	41	5.02	5.06	-0.04
15	4.06	4.68	-0.62	42	5.10	4.84	0.26
16	4.06	3.81	0.26	43	5.11	4.72	0.39
17	4.08	4.01	0.07	44	5.15	5.40	-0.26
18	4.11	4.47	-0.36	45	5.17	5.02	0.16
19	4.17	3.61	0.56	46	5.18	5.05	0.14
20	4.18	4.23	-0.05	47	5.36	5.22	0.14
21	4.20	4.19	0.01	48	5.49	5.17	0.32
22	4.22	4.42	-0.20	49	5.78	5.37	0.41
23	4.26	4.36	-0.11	50	5.96	5.29	0.67
24	4.29	4.89	-0.59	AV	4.42	4.42	0.00
25	4.32	4.27	0.06	SD	0.63	0.56	0.29
26	4.33	4.06	0.27	Min	3.02	3.21	-0.62
27	4.40	4.53	-0.13	Max	5.96	5.44	0.67
				n	50	50	50

ตาราง 31 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนมโคดิบ ในกลุ่ม Validation

Sample	True value	Predict value	Difference
51	3.27	3.67	-0.40
52	3.69	4.12	-0.43
53	3.85	3.55	0.30
54	3.95	4.25	-0.30
55	3.98	4.00	-0.02
56	4.01	3.95	0.06
57	4.04	4.14	-0.10
58	4.06	4.34	-0.28
59	4.11	4.23	-0.11
60	4.18	4.81	-0.63
61	4.23	4.45	-0.22
62	4.30	4.25	0.05
63	4.40	4.34	0.06

Sample	True value	Predict value	Difference
64	4.42	4.64	-0.23
65	4.47	4.68	-0.21
66	4.62	4.19	0.43
67	4.73	4.48	0.25
68	4.78	5.46	-0.69
69	4.94	4.67	0.27
70	5.01	5.46	-0.45
71	5.11	5.27	-0.16
72	5.17	4.53	0.63
73	5.28	5.36	-0.08
74	5.70	5.03	0.67
75	5.79	6.31	-0.53

AV	4.48	4.57	-0.08
SD	0.61	0.62	0.35
Min	3.27	3.55	-0.69
Max	5.79	6.31	0.67
n	25	25	25

ตาราง 32 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ในกลุ่ม Calibration

Sample	True value	Predict value	Difference	Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.27	3.10	0.17	28	4.47	4.38	0.09
2	3.70	3.81	-0.11	29	4.49	4.38	0.11
3	3.76	3.92	-0.15	30	4.62	4.69	-0.07
4	3.86	4.04	-0.19	31	4.65	4.73	-0.07
5	3.88	4.01	-0.13	32	4.73	4.89	-0.16
6	3.95	4.00	-0.04	33	4.75	4.85	-0.11
7	3.96	3.91	0.04	34	4.78	4.68	0.10
8	3.98	4.21	-0.24	35	4.87	4.86	0.01
9	4.00	4.13	-0.13	36	4.94	4.68	0.26
10	4.01	3.99	0.02	37	4.94	5.06	-0.12
11	4.01	3.95	0.07	38	4.97	4.69	0.29
12	4.04	4.12	-0.07	39	4.98	4.95	0.03
13	4.06	4.07	-0.01	40	5.02	4.92	0.10
14	4.06	4.31	-0.24	41	5.03	5.12	-0.09
15	4.08	4.06	0.01	42	5.10	5.00	0.10
16	4.11	4.34	-0.23	43	5.11	5.48	-0.37
17	4.11	4.15	-0.03	44	5.17	5.01	0.16
18	4.17	3.92	0.25	45	5.17	5.05	0.12
19	4.18	3.96	0.22	46	5.20	5.10	0.11
20	4.22	4.27	-0.05	47	5.28	5.43	-0.15
21	4.23	4.23	0.00	48	5.88	5.76	0.12
22	4.29	4.24	0.05	49	6.20	6.25	-0.05
23	4.30	4.26	0.04	50	6.56	6.38	0.17
24	4.33	4.42	-0.09	AV	4.53	4.53	0.00
25	4.40	4.28	0.12	SD	0.64	0.62	0.14
26	4.40	4.40	0.00	Min	3.27	3.10	-0.37
27	4.42	4.29	0.13	Max	6.56	6.38	0.29
				n	50	50	50

ตาราง 33 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ในกลุ่ม Validation

Sample	True value	Predict value	Difference
51	3.42	3.22	0.19
52	3.85	4.49	-0.64
53	3.93	3.81	0.12
54	3.96	4.30	-0.33
55	4.00	4.29	-0.28
56	4.04	4.25	-0.21
57	4.06	4.30	-0.24
58	4.08	4.52	-0.44
59	4.15	4.31	-0.16
60	4.18	4.16	0.03
61	4.26	4.21	0.04
62	4.32	4.29	0.03
63	4.40	4.51	-0.11
64	4.43	4.83	-0.40
65	4.51	4.52	-0.02
66	4.72	4.58	0.15
67	4.76	4.82	-0.07
68	4.88	5.19	-0.31
69	4.96	4.65	0.32
70	5.01	4.76	0.26
71	5.08	5.02	0.06
72	5.15	5.29	-0.15
73	5.18	4.49	0.69
74	5.45	5.36	0.09
75	6.26	5.49	0.78
AV	4.52	4.55	-0.02
SD	0.62	0.50	0.32
Min	3.42	3.22	-0.64
Max	6.26	5.49	0.78
n	50.00	50.00	50.00

ตาราง 34 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ในกลุ่ม Calibration

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.14	2.79	0.34
2	3.15	3.60	-0.45
3	3.42	3.52	-0.10
4	3.70	3.83	-0.13
5	3.85	3.77	0.08
6	3.86	4.14	-0.28
7	3.93	3.95	-0.02
8	3.95	4.04	-0.08
9	3.96	3.76	0.21
10	3.98	4.26	-0.28
11	4.00	3.83	0.17
12	4.01	4.16	-0.15
13	4.04	4.11	-0.07
14	4.04	4.46	-0.42
15	4.06	3.97	0.09
16	4.06	4.11	-0.04
17	4.08	4.15	-0.07
18	4.11	4.33	-0.21
19	4.15	4.24	-0.09
20	4.17	4.52	-0.35
21	4.20	4.67	-0.47
22	4.22	4.13	0.09
23	4.26	4.50	-0.24
24	4.29	4.43	-0.14
25	4.33	4.33	0.00
26	4.40	4.29	0.11
27	4.40	4.11	0.29

Sample	True value	Predict value	Difference
28	4.42	4.33	0.08
29	4.47	4.54	-0.07
30	4.49	4.90	-0.41
31	4.62	4.45	0.17
32	4.65	4.35	0.31
33	4.73	4.52	0.21
34	4.75	4.47	0.28
35	4.78	4.99	-0.21
36	4.87	5.10	-0.23
37	4.94	4.85	0.09
38	4.96	5.16	-0.20
39	4.98	5.14	-0.16
40	5.01	4.61	0.41
41	5.03	5.02	0.01
42	5.08	5.15	-0.07
43	5.11	4.82	0.30
44	5.15	5.34	-0.19
45	5.18	4.85	0.34
46	5.20	5.19	0.01
47	5.36	4.79	0.58
48	5.45	5.03	0.42
49	5.79	5.23	0.56
50	6.20	6.20	0.00
AV	4.46	4.46	0.00
SD	0.63	0.58	0.26
Min	3.14	2.79	-0.47
Max	6.20	6.20	0.58
n	50	50	50

ตาราง 35 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ในกลุ่ม Validation

Sample	True value	Predict value	Difference
51	3.29	4.35	-1.07
52	3.76	3.70	0.06
53	3.88	4.58	-0.70
54	3.96	3.84	0.12
55	4.00	4.55	-0.55
56	4.01	3.84	0.18
57	4.06	4.44	-0.38
58	4.08	3.95	0.13
59	4.11	4.09	0.02
60	4.18	3.73	0.46
61	4.23	4.14	0.09
62	4.30	4.20	0.10
63	4.40	4.22	0.18
64	4.45	4.52	-0.07
65	4.51	4.82	-0.31
66	4.72	4.41	0.32
67	4.76	5.23	-0.47
68	4.88	5.47	-0.59
69	4.97	4.55	0.42
70	5.02	5.21	-0.19
71	5.10	5.14	-0.04
72	5.17	4.82	0.35
73	5.28	5.57	-0.29
74	5.78	4.96	0.82
75	5.86	5.46	0.40
AV	4.51	4.55	-0.04
SD	0.63	0.57	0.43
Min	3.29	3.70	-1.07
Max	5.86	5.57	0.82
n	25	25	25

ตาราง 36 ผลการทำนายปริมาณแบริดที่เรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาป้อน 90 นาที ในกลุ่ม Calibration

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.15	3.59	-0.44
2	3.27	3.22	0.05
3	3.42	4.07	-0.66
4	3.76	3.70	0.06
5	3.86	3.89	-0.03
6	3.93	4.28	-0.35
7	3.95	4.39	-0.44
8	3.98	4.24	-0.26
9	4.00	3.97	0.03
10	4.01	4.50	-0.49
11	4.04	4.38	-0.35
12	4.06	3.63	0.43
13	4.06	4.18	-0.12
14	4.11	4.16	-0.04
15	4.15	4.17	-0.02
16	4.18	4.50	-0.32
17	4.18	4.74	-0.56
18	4.23	4.81	-0.58
19	4.26	4.25	0.01
20	4.32	4.23	0.09
21	4.33	4.29	0.04
22	4.40	4.50	-0.10
23	4.42	4.22	0.20
24	4.45	4.68	-0.23
25	4.49	4.55	-0.06
26	4.62	5.05	-0.43
27	4.65	4.23	0.42

Sample	True value	Predict value	Difference
28	4.73	4.41	0.33
29	4.75	4.65	0.10
30	4.78	4.60	0.18
31	4.87	4.61	0.26
32	4.94	4.82	0.12
33	4.96	4.76	0.21
34	4.98	5.25	-0.27
35	5.01	5.03	-0.02
36	5.03	4.36	0.67
37	5.08	5.45	-0.38
38	5.11	4.58	0.53
39	5.15	4.32	0.83
40	5.17	5.26	-0.08
41	5.18	5.34	-0.16
42	5.28	5.48	-0.20
43	5.36	5.79	-0.43
44	5.78	5.11	0.67
45	5.79	5.50	0.28
46	5.88	5.31	0.57
47	6.15	5.30	0.85
48	6.26	6.21	0.05
49	6.40	6.22	0.18
50	6.56	6.70	-0.14
AV	4.67	4.67	0.00
SD	0.79	0.70	0.37
Min	3.15	3.22	-0.66
Max	6.56	6.70	0.85
n	50	50	50

ตาราง 37 ผลการทำนายปริมาณแบริดที่เรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์
ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ในกลุ่ม Validation

Sample	True value	Predict value	Difference
51	3.22	3.57	-0.34
52	3.70	3.80	-0.10
53	3.88	4.11	-0.23
54	3.96	4.05	-0.09
55	4.01	3.78	0.23
56	4.04	4.78	-0.74
57	4.08	4.19	-0.11
58	4.17	4.33	-0.16
59	4.22	4.46	-0.23
60	4.30	4.55	-0.25
61	4.40	3.78	0.62
62	4.43	4.11	0.32
63	4.51	4.54	-0.04

Sample	True value	Predict value	Difference
64	4.72	4.36	0.36
65	4.76	4.93	-0.17
66	4.88	4.42	0.46
67	4.97	4.42	0.55
68	5.02	5.24	-0.23
69	5.10	4.92	0.18
70	5.17	4.65	0.52
71	5.20	5.49	-0.28
72	5.45	4.80	0.65
73	5.86	6.12	-0.27
74	6.23	5.47	0.76
75	6.49	5.95	0.54

AV	4.67	4.59	0.08
SD	0.79	0.66	0.40
Min	3.22	3.57	-0.74
Max	6.49	6.12	0.76
n	25	25	25

ตาราง 38 ผลการทำนายปริมาณแบริกที่เรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ในกลุ่ม Calibration

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.02	2.69	0.34
2	3.14	3.48	-0.35
3	3.42	4.41	-0.99
4	3.69	4.46	-0.77
5	3.76	4.31	-0.55
6	3.85	4.43	-0.58
7	3.88	4.51	-0.63
8	3.93	4.47	-0.54
9	3.96	4.57	-0.61
10	3.96	4.43	-0.47
11	4.00	4.19	-0.19
12	4.00	4.51	-0.50
13	4.01	4.14	-0.12
14	4.04	4.32	-0.28
15	4.06	4.67	-0.60
16	4.06	4.21	-0.14
17	4.08	4.12	-0.04
18	4.08	3.75	0.33
19	4.15	3.86	0.29
20	4.17	4.62	-0.45
21	4.18	4.59	-0.41
22	4.20	4.08	0.12
23	4.23	4.30	-0.07
24	4.26	4.58	-0.32
25	4.30	4.34	-0.03
26	4.32	4.34	-0.02
27	4.40	4.21	0.20
28	4.40	4.17	0.23
29	4.43	4.75	-0.32
30	4.45	4.58	-0.13
31	4.49	4.46	0.03
32	4.51	4.61	-0.10
33	4.65	4.41	0.24
34	4.72	4.19	0.53
35	4.75	4.62	0.13
36	4.76	4.39	0.37
37	4.87	4.67	0.20
38	4.88	4.77	0.11
39	4.94	4.69	0.25
40	4.96	4.77	0.20
41	4.98	4.52	0.46
42	5.02	4.62	0.40
43	5.08	4.76	0.32
44	5.10	4.56	0.54
45	5.15	4.42	0.72
46	5.17	4.44	0.73
47	5.19	4.92	0.26
48	5.28	4.44	0.84
49	5.45	5.14	0.31
50	5.96	4.88	1.08
AV	4.41	4.41	0.00
SD	0.59	0.38	0.45
Min	3.02	2.69	-0.99
Max	5.96	5.14	1.08
n	50	50	50

ตาราง 39 ผลการทำนายปริมาณแบริดที่เรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์
ด้วยวิธีมาตรฐานของน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ในกลุ่ม Validation

Sample	True value	Predict value	Difference	Sample	True value	Predict value	Difference
51	3.22	3.40	-0.18	64	4.42	4.70	-0.28
52	3.70	4.29	-0.59	65	4.47	4.41	0.06
53	3.86	4.27	-0.41	66	4.62	4.47	0.16
54	3.95	3.93	0.02	67	4.73	4.95	-0.22
55	3.98	4.10	-0.12	68	4.78	4.90	-0.12
56	4.01	4.22	-0.21	69	4.94	4.53	0.41
57	4.04	4.31	-0.27	70	4.97	4.55	0.43
58	4.06	4.71	-0.64	71	5.03	4.49	0.54
59	4.11	4.25	-0.13	72	5.11	4.39	0.72
60	4.18	3.95	0.23	73	5.17	4.42	0.75
61	4.22	4.48	-0.26	74	5.36	4.75	0.61
62	4.29	4.37	-0.08	75	5.78	4.60	1.18
63	4.33	4.30	0.03				
				AV	4.45	4.39	0.06
				SD	0.59	0.33	0.45
				Min	3.22	3.40	-0.64
				Max	5.78	4.95	1.18
				n	25	25	25

ตาราง 40 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ในกลุ่ม Calibration

Sample	True value	Predict value	Difference	Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.02	3.45	-0.43	28	4.73	4.54	0.19
2	3.15	3.78	-0.64	29	4.76	4.74	0.02
3	3.29	3.80	-0.51	30	4.78	5.01	-0.23
4	3.42	3.16	0.26	31	4.88	4.49	0.39
5	3.70	3.98	-0.28	32	4.94	5.11	-0.17
6	3.76	4.34	-0.58	33	4.96	5.05	-0.09
7	3.88	3.86	0.02	34	4.97	4.48	0.50
8	3.93	3.99	-0.06	35	5.01	4.83	0.19
9	3.96	3.85	0.11	36	5.02	4.72	0.30
10	3.98	4.33	-0.35	37	5.10	5.23	-0.13
11	4.01	3.73	0.28	38	5.11	5.39	-0.28
12	4.01	4.30	-0.29	39	5.17	5.12	0.05
13	4.04	3.84	0.21	40	5.17	4.71	0.47
14	4.06	4.27	-0.21	41	5.20	4.99	0.21
15	4.06	4.46	-0.40	42	5.28	5.50	-0.22
16	4.08	4.50	-0.42	43	5.70	5.18	0.52
17	4.15	3.65	0.50	44	5.79	5.49	0.30
18	4.18	4.33	-0.16	45	5.88	5.63	0.25
19	4.20	4.25	-0.05	46	5.95	6.02	-0.06
20	4.23	3.47	0.76	47	6.15	5.68	0.48
21	4.30	3.95	0.35	48	6.26	6.51	-0.25
22	4.32	4.23	0.09	49	6.49	6.25	0.24
23	4.40	4.57	-0.17	50	6.74	6.77	-0.03
24	4.40	4.43	-0.03	AV	4.65	4.65	0.00
25	4.47	5.02	-0.55	SD	0.86	0.79	0.33
26	4.49	4.52	-0.03	Min	3.02	3.16	-0.64
27	4.72	4.78	-0.06	Max	6.74	6.77	0.76
				n	50	50	50

ตาราง 41 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ในกลุ่ม Validation

Sample	True value	Predict value	Difference	Sample	True value	Predict value	Difference
51	3.27	3.95	-0.68	64	4.75	4.71	0.04
52	3.69	4.19	-0.50	65	4.87	5.06	-0.19
53	3.86	3.92	-0.07	66	4.94	4.41	0.54
54	3.96	3.41	0.55	67	4.98	4.90	0.08
55	4.00	3.67	0.33	68	5.08	5.14	-0.06
56	4.04	4.46	-0.42	69	5.15	5.08	0.07
57	4.06	3.78	0.29	70	5.18	5.14	0.04
58	4.11	3.41	0.70	71	5.36	4.55	0.82
59	4.18	4.06	0.12	72	5.86	6.24	-0.38
60	4.26	4.04	0.22	73	5.96	5.10	0.86
61	4.40	4.81	-0.41	74	6.33	6.26	0.06
62	4.42	4.72	-0.30	75	6.56	5.93	0.63
63	4.51	4.96	-0.46				
				AV	4.71	4.64	0.08
				SD	0.84	0.79	0.44
				Min	3.27	3.41	-0.68
				Max	6.56	6.26	0.86
				n	25	25	25

ตาราง 42 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ในกลุ่ม Calibration

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.02	3.87	-0.85
2	3.22	3.40	-0.18
3	3.42	4.06	-0.65
4	3.70	4.46	-0.76
5	3.76	4.36	-0.60
6	3.86	3.71	0.15
7	3.88	3.66	0.22
8	3.95	4.57	-0.61
9	3.96	3.98	-0.02
10	3.98	4.46	-0.48
11	4.00	4.52	-0.52
12	4.01	4.90	-0.89
13	4.04	4.68	-0.65
14	4.06	3.85	0.21
15	4.06	4.52	-0.45
16	4.08	4.49	-0.41
17	4.11	4.06	0.05
18	4.15	3.93	0.22
19	4.17	4.84	-0.67
20	4.20	4.13	0.07
21	4.22	4.45	-0.22
22	4.26	5.10	-0.85
23	4.29	4.82	-0.53
24	4.32	4.06	0.26
25	4.33	3.77	0.55
26	4.40	4.38	0.03
27	4.42	4.23	0.18

Sample	True value	Predict value	Difference
28	4.47	4.13	0.34
29	4.49	4.55	-0.06
30	4.62	4.83	-0.21
31	4.65	5.01	-0.35
32	4.73	4.18	0.55
33	4.76	5.13	-0.38
34	4.88	4.36	0.52
35	4.94	5.16	-0.22
36	4.96	4.61	0.35
37	4.97	5.06	-0.09
38	5.02	4.66	0.35
39	5.03	4.40	0.63
40	5.11	4.59	0.52
41	5.15	4.75	0.40
42	5.17	4.65	0.53
43	5.18	4.79	0.39
44	5.28	4.62	0.66
45	5.36	4.95	0.41
46	5.49	5.12	0.37
47	5.70	5.17	0.53
48	5.86	5.52	0.34
49	5.96	4.72	1.24
50	6.23	5.66	0.58
AV	4.52	4.52	0.00
SD	0.70	0.49	0.50
Min	3.02	3.40	-0.89
Max	6.23	5.66	1.24
n	50	50	50

ตาราง 43 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ในกลุ่ม Validation

Sample	True value	Predict value	Difference
51	3.14	3.86	-0.73
52	3.69	3.60	0.09
53	3.85	4.42	-0.57
54	3.93	4.43	-0.50
55	3.96	3.96	0.00
56	4.00	4.15	-0.14
57	4.04	4.29	-0.25
58	4.08	3.91	0.17
59	4.11	3.71	0.40
60	4.18	3.94	0.24
61	4.23	3.87	0.36
62	4.30	4.45	-0.15
63	4.40	4.77	-0.37

Sample	True value	Predict value	Difference
64	4.43	4.07	0.36
65	4.51	4.42	0.09
66	4.72	5.21	-0.49
67	4.87	5.21	-0.34
68	4.94	4.55	0.39
69	4.98	4.89	0.09
70	5.08	4.64	0.44
71	5.17	4.72	0.44
72	5.20	5.16	0.04
73	5.45	5.08	0.37
74	5.79	5.81	-0.02
75	6.15	5.96	0.20

AV	4.53	4.52	0.01
SD	0.70	0.63	0.35
Min	3.14	3.60	-0.73
Max	6.15	5.96	0.44
n	25	25	25

ตาราง 44 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ในกลุ่ม Calibration

Sample	True value	Predict value	Difference	Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.22	3.33	-0.11	28	4.43	4.43	0.00
2	3.27	3.12	0.15	29	4.49	4.45	0.04
3	3.69	3.73	-0.04	30	4.51	4.30	0.20
4	3.70	3.83	-0.14	31	4.72	4.58	0.14
5	3.85	4.05	-0.21	32	4.73	4.92	-0.18
6	3.86	4.24	-0.38	33	4.76	4.43	0.33
7	3.93	3.44	0.49	34	4.87	4.72	0.15
8	3.95	3.97	-0.02	35	4.94	5.08	-0.14
9	3.96	4.20	-0.23	36	4.94	4.71	0.23
10	4.00	4.29	-0.29	37	4.97	4.75	0.22
11	4.01	4.05	-0.04	38	4.98	4.84	0.13
12	4.01	4.12	-0.11	39	5.02	5.02	0.00
13	4.04	4.07	-0.02	40	5.03	5.31	-0.28
14	4.06	4.53	-0.47	41	5.10	4.79	0.32
15	4.06	4.49	-0.43	42	5.11	4.48	0.63
16	4.08	3.99	0.08	43	5.17	4.71	0.46
17	4.11	4.20	-0.09	44	5.17	5.03	0.14
18	4.15	4.61	-0.47	45	5.20	4.96	0.24
19	4.18	4.36	-0.18	46	5.28	4.90	0.38
20	4.18	4.76	-0.58	47	5.45	5.48	-0.04
21	4.22	4.35	-0.12	48	5.49	5.14	0.35
22	4.26	4.23	0.03	49	5.78	5.74	0.04
23	4.30	4.11	0.19	50	5.79	5.69	0.10
24	4.32	4.64	-0.31	AV	4.49	4.49	0.00
25	4.40	4.30	0.10	SD	0.61	0.54	0.27
26	4.40	4.23	0.17	Min	3.22	3.12	-0.58
27	4.42	4.85	-0.43	Max	5.79	5.74	0.63
				n	50	50	50

ตาราง 45 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ในกลุ่ม Validation

Sample	True value	Predict value	Difference	Sample	True value	Predict value	Difference
51	3.42	3.41	0.01	64	4.47	4.10	0.37
52	3.76	4.41	-0.65	65	4.62	4.34	0.28
53	3.88	3.98	-0.10	66	4.75	4.08	0.67
54	3.96	3.90	0.06	67	4.88	5.11	-0.23
55	4.00	4.02	-0.01	68	4.96	4.85	0.12
56	4.04	3.80	0.24	69	5.01	4.99	0.02
57	4.06	3.91	0.15	70	5.08	5.02	0.06
58	4.08	4.05	0.03	71	5.15	4.63	0.52
59	4.17	3.54	0.63	72	5.18	4.89	0.30
60	4.20	4.23	-0.04	73	5.36	5.00	0.36
61	4.29	4.46	-0.16	74	5.70	5.10	0.60
62	4.33	4.28	0.05	75	5.86	5.26	0.60
63	4.40	4.23	0.17				
				AV	4.54	4.38	0.16
				SD	0.63	0.53	0.31
				Min	3.42	3.41	-0.65
				Max	5.86	5.26	0.67
				n	25	25	25

ตาราง 46 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ในกลุ่ม Calibration

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.02	4.13	-1.11
2	3.22	3.48	-0.26
3	3.27	3.05	0.22
4	3.69	3.96	-0.27
5	3.76	3.85	-0.08
6	3.86	3.59	0.27
7	3.88	3.93	-0.05
8	3.95	4.32	-0.36
9	3.96	4.13	-0.17
10	3.98	4.21	-0.23
11	4.00	4.34	-0.34
12	4.01	4.11	-0.10
13	4.01	4.27	-0.25
14	4.04	3.68	0.36
15	4.06	4.64	-0.58
16	4.06	4.58	-0.51
17	4.08	4.32	-0.24
18	4.11	4.47	-0.36
19	4.15	4.10	0.05
20	4.18	4.33	-0.15
21	4.20	4.46	-0.27
22	4.23	4.94	-0.71
23	4.26	5.10	-0.85
24	4.30	4.24	0.06
25	4.32	4.56	-0.24
26	4.40	4.75	-0.35
27	4.40	4.19	0.21

Sample	True value	Predict value	Difference
28	4.43	4.46	-0.03
29	4.45	4.49	-0.05
30	4.49	4.83	-0.34
31	4.51	4.61	-0.10
32	4.65	4.62	0.03
33	4.72	4.14	0.58
34	4.73	4.41	0.32
35	4.75	4.48	0.27
36	4.78	4.91	-0.13
37	4.87	4.62	0.25
38	4.94	4.53	0.41
39	4.96	4.89	0.07
40	4.98	4.81	0.17
41	5.08	5.24	-0.16
42	5.11	4.51	0.61
43	5.15	4.69	0.46
44	5.17	4.53	0.65
45	5.20	4.66	0.54
46	5.36	4.73	0.63
47	5.45	5.33	0.12
48	5.79	5.39	0.39
49	6.20	6.18	0.02
50	6.23	4.66	1.58
AV	4.47	4.47	0.00
SD	0.68	0.52	0.44
Min	3.02	3.05	-1.11
Max	6.23	6.18	1.58
n	50	50	50

ตาราง 47 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 25% ระยะเวลาป้อน 120 นาที ในกลุ่ม Validation

Sample	True value	Predict value	Difference	Sample	True value	Predict value	Difference
51	3.14	3.84	-0.70	64	4.42	4.49	-0.07
52	3.42	3.97	-0.55	65	4.47	4.59	-0.12
53	3.85	4.55	-0.70	66	4.62	3.66	0.96
54	3.93	4.04	-0.11	67	4.73	5.06	-0.33
55	3.96	4.86	-0.89	68	4.76	4.37	0.38
56	4.00	4.21	-0.20	69	4.88	4.42	0.46
57	4.04	4.28	-0.24	70	4.97	4.67	0.31
58	4.06	4.14	-0.07	71	5.10	4.69	0.41
59	4.08	3.87	0.21	72	5.17	4.72	0.44
60	4.17	4.20	-0.03	73	5.28	4.56	0.72
61	4.22	4.39	-0.17	74	5.49	4.54	0.95
62	4.29	4.40	-0.11	75	5.88	5.42	0.46
63	4.33	4.23	0.09				
				AV	4.45	4.41	0.04
				SD	0.64	0.39	0.49
				Min	3.14	3.66	-0.89
				Max	5.88	5.42	0.96
				n	25	25	25

ตาราง 48 ผลการทำนายปริมาณเบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ในกลุ่ม Calibration

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.22	3.39	-0.16
2	3.27	3.33	-0.06
3	3.42	3.42	-0.01
4	3.69	3.78	-0.09
5	3.76	3.83	-0.07
6	3.85	4.30	-0.46
7	3.88	4.22	-0.34
8	3.93	4.04	-0.11
9	3.96	3.91	0.05
10	3.96	3.75	0.21
11	4.00	4.08	-0.08
12	4.00	3.73	0.27
13	4.01	4.24	-0.23
14	4.04	4.21	-0.17
15	4.06	4.71	-0.65
16	4.06	4.00	0.06
17	4.08	4.07	0.01
18	4.08	4.31	-0.23
19	4.11	3.84	0.27
20	4.15	4.36	-0.22
21	4.18	3.86	0.32
22	4.18	4.25	-0.07
23	4.22	4.49	-0.27
24	4.23	4.25	-0.02
25	4.29	3.99	0.30
26	4.32	4.60	-0.28
27	4.40	4.08	0.32

Sample	True value	Predict value	Difference
28	4.40	4.19	0.21
29	4.42	4.33	0.09
30	4.43	4.39	0.04
31	4.49	4.55	-0.06
32	4.62	4.60	0.03
33	4.72	4.56	0.16
34	4.73	4.88	-0.15
35	4.76	4.73	0.02
36	4.87	5.05	-0.18
37	4.94	5.11	-0.17
38	4.96	5.15	-0.19
39	4.98	4.73	0.25
40	5.02	4.86	0.16
41	5.08	5.13	-0.05
42	5.10	5.59	-0.49
43	5.15	4.99	0.16
44	5.17	5.16	0.01
45	5.18	4.90	0.29
46	5.20	5.28	-0.07
47	5.45	5.01	0.43
48	5.49	4.97	0.53
49	5.79	5.44	0.34
50	5.96	5.60	0.36
AV	4.45	4.45	0.00
SD	0.62	0.57	0.25
Min	3.22	3.33	-0.65
Max	5.96	5.60	0.53
n	50	50	50

ตาราง 49 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ในกลุ่ม Validation

Sample	True value	Predict value	Difference
51	3.29	4.21	-0.92
52	3.70	4.09	-0.39
53	3.86	4.06	-0.20
54	3.95	4.44	-0.49
55	3.98	5.02	-1.04
56	4.01	3.94	0.07
57	4.04	4.13	-0.08
58	4.06	3.96	0.10
59	4.11	4.49	-0.38
60	4.17	4.16	0.01
61	4.20	4.26	-0.06
62	4.26	4.60	-0.34
63	4.33	3.90	0.43

Sample	True value	Predict value	Difference
64	4.40	4.23	0.18
65	4.47	4.92	-0.45
66	4.65	4.73	-0.08
67	4.75	4.27	0.48
68	4.88	4.88	0.00
69	4.97	4.87	0.11
70	5.03	4.81	0.22
71	5.11	5.00	0.12
72	5.17	4.30	0.87
73	5.28	5.06	0.22
74	5.78	5.13	0.65
75	5.86	5.30	0.56

AV	4.49	4.51	-0.02
SD	0.64	0.43	0.45
Min	3.29	3.90	-1.04
Max	5.86	5.30	0.87
n	25	25	25

ตาราง 50 ผลการทำนายปริมาณเบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ในกลุ่ม Calibration

Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.29	3.93	-0.64
2	3.42	3.44	-0.03
3	3.70	3.97	-0.27
4	3.76	3.62	0.15
5	3.86	4.56	-0.70
6	3.88	4.07	-0.19
7	3.95	4.13	-0.17
8	3.96	3.85	0.11
9	3.98	4.38	-0.40
10	4.00	4.28	-0.28
11	4.01	4.12	-0.11
12	4.01	4.27	-0.25
13	4.04	3.87	0.17
14	4.06	4.70	-0.64
15	4.06	4.10	-0.03
16	4.08	4.05	0.03
17	4.11	4.07	0.04
18	4.11	4.46	-0.35
19	4.17	4.37	-0.21
20	4.18	4.57	-0.39
21	4.20	4.20	-0.01
22	4.22	4.12	0.11
23	4.26	4.33	-0.08
24	4.29	4.02	0.27
25	4.32	4.64	-0.32
26	4.33	4.22	0.11
27	4.40	4.12	0.28

Sample	True value	Predict value	Difference
28	4.40	4.26	0.14
29	4.43	4.70	-0.28
30	4.45	4.96	-0.52
31	4.49	4.77	-0.27
32	4.51	4.65	-0.15
33	4.65	4.87	-0.21
34	4.72	4.44	0.29
35	4.75	4.79	-0.04
36	4.76	4.69	0.06
37	4.87	4.74	0.13
38	4.88	4.71	0.17
39	4.94	4.78	0.16
40	4.96	4.61	0.36
41	4.98	4.25	0.73
42	5.01	4.39	0.63
43	5.03	4.97	0.06
44	5.08	4.88	0.20
45	5.11	4.69	0.42
46	5.15	5.38	-0.23
47	5.17	4.42	0.76
48	5.18	4.77	0.42
49	5.28	5.10	0.18
50	5.79	5.01	0.78
AV	4.42	4.42	0.00
SD	0.53	0.40	0.34
Min	3.29	3.44	-0.70
Max	5.79	5.38	0.78
n	50	50	50

ตาราง 51 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ในกลุ่ม Validation

Sample	True value	Predict value	Difference	Sample	True value	Predict value	Difference
51	3.69	4.12	-0.43	64	4.42	4.60	-0.19
52	3.85	4.23	-0.38	65	4.47	4.15	0.32
53	3.93	4.16	-0.23	66	4.62	5.02	-0.40
54	3.96	4.23	-0.27	67	4.73	4.73	0.00
55	4.00	4.01	-0.01	68	4.78	5.03	-0.25
56	4.04	4.78	-0.74	69	4.94	4.78	0.16
57	4.06	3.87	0.20	70	4.97	4.81	0.16
58	4.08	4.34	-0.26	71	5.02	4.97	0.04
59	4.15	4.54	-0.40	72	5.10	5.03	0.07
60	4.18	4.21	-0.03	73	5.17	4.57	0.59
61	4.23	4.18	0.06	74	5.20	4.96	0.24
62	4.30	4.22	0.08	75	5.49	4.84	0.66
63	4.40	4.21	0.19				
				AV	4.47	4.50	-0.03
				SD	0.50	0.37	0.33
				Min	3.69	3.87	-0.74
				Max	5.49	5.03	0.66
				n	25	25	25

ตาราง 52 ผลการทำนายปริมาณเบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ในกลุ่ม Calibration

Sample	True value	Predict value	Difference	Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.02	3.04	-0.02	28	4.40	4.78	-0.38
2	3.22	3.75	-0.53	29	4.40	3.94	0.47
3	3.27	3.86	-0.58	30	4.43	4.18	0.25
4	3.42	3.35	0.06	31	4.45	4.81	-0.36
5	3.69	3.98	-0.29	32	4.49	5.13	-0.64
6	3.76	3.99	-0.23	33	4.51	4.27	0.23
7	3.85	4.22	-0.37	34	4.65	4.81	-0.15
8	3.88	4.31	-0.43	35	4.72	4.27	0.45
9	3.93	3.93	0.00	36	4.76	4.99	-0.23
10	3.96	4.09	-0.12	37	4.78	4.94	-0.17
11	3.98	3.90	0.08	38	4.88	4.41	0.47
12	4.00	4.08	-0.08	39	4.94	4.92	0.02
13	4.01	3.76	0.25	40	4.97	5.00	-0.03
14	4.04	4.55	-0.51	41	5.02	4.55	0.47
15	4.04	3.88	0.16	42	5.08	4.87	0.21
16	4.06	3.85	0.21	43	5.10	5.03	0.07
17	4.06	4.31	-0.25	44	5.11	4.91	0.20
18	4.08	4.77	-0.69	45	5.15	4.88	0.27
19	4.11	4.07	0.05	46	5.17	4.94	0.23
20	4.17	4.01	0.16	47	5.18	4.71	0.47
21	4.18	3.94	0.23	48	5.28	5.21	0.07
22	4.20	4.33	-0.13	49	5.36	4.98	0.39
23	4.22	4.14	0.08	50	5.86	5.38	0.48
24	4.26	4.03	0.23	AV	4.38	4.38	0.00
25	4.29	4.44	-0.15	SD	0.60	0.51	0.32
26	4.32	4.47	-0.15	Min	3.02	3.04	-0.69
27	4.33	4.09	0.24	Max	5.86	5.38	0.48
				n	50	50	50

ตาราง 53 ผลการทำนายปริมาณเบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ในกลุ่ม Validation

Sample	True value	Predict value	Difference	Sample	True value	Predict value	Difference
51	3.14	3.45	-0.31	64	4.40	4.51	-0.11
52	3.29	3.37	-0.08	65	4.42	4.21	0.20
53	3.70	3.67	0.03	66	4.47	4.54	-0.07
54	3.86	3.74	0.12	67	4.62	4.32	0.30
55	3.96	3.64	0.32	68	4.73	3.99	0.74
56	4.00	4.07	-0.07	69	4.87	5.13	-0.26
57	4.01	4.35	-0.34	70	4.96	4.53	0.44
58	4.06	3.89	0.17	71	5.03	4.39	0.64
59	4.08	3.46	0.62	72	5.11	4.88	0.23
60	4.15	4.42	-0.27	73	5.17	4.58	0.59
61	4.18	4.48	-0.30	74	5.20	4.61	0.60
62	4.23	4.91	-0.68	75	5.79	5.43	0.35
63	4.30	4.41	-0.11				
				AV	4.39	4.28	0.11
				SD	0.62	0.53	0.37
				Min	3.14	3.37	-0.68
				Max	5.79	5.43	0.74
				n	25	25	25

ตาราง 54 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ในกลุ่ม Calibration

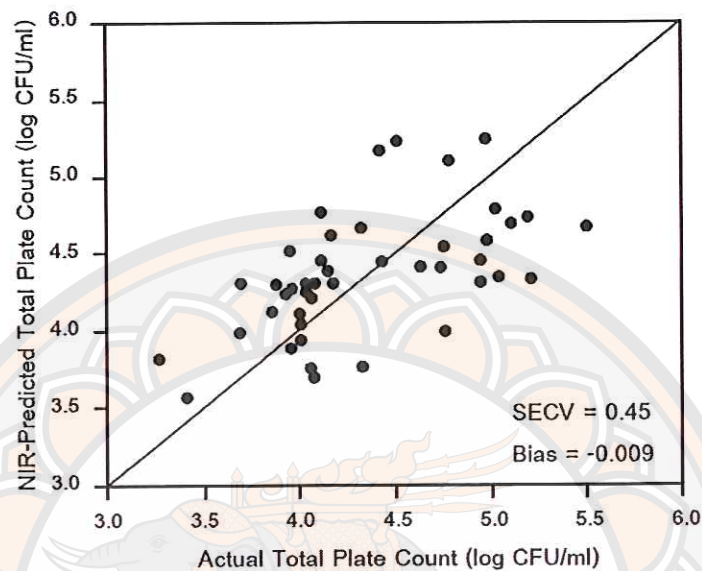
Sample	True value	Predict value	Difference
1	3.27	4.20	-0.92
2	3.69	4.06	-0.37
3	3.70	4.36	-0.66
4	3.85	4.40	-0.56
5	3.86	4.07	-0.22
6	3.93	4.24	-0.31
7	3.95	4.08	-0.13
8	3.96	4.30	-0.34
9	3.98	4.50	-0.52
10	4.00	4.23	-0.23
11	4.01	4.26	-0.25
12	4.04	4.64	-0.60
13	4.06	4.66	-0.59
14	4.06	4.50	-0.44
15	4.08	4.19	-0.12
16	4.11	4.51	-0.40
17	4.15	4.21	-0.06
18	4.18	4.16	0.02
19	4.18	4.51	-0.33
20	4.22	4.68	-0.46
21	4.23	4.37	-0.14
22	4.29	4.29	0.00
23	4.30	4.19	0.11
24	4.33	4.21	0.12
25	4.40	4.23	0.17
26	4.42	4.56	-0.14
27	4.43	4.55	-0.13

Sample	True value	Predict value	Difference
28	4.47	4.44	0.03
29	4.49	4.59	-0.10
30	4.62	4.30	0.33
31	4.65	4.71	-0.06
32	4.73	4.55	0.18
33	4.75	4.27	0.48
34	4.78	5.89	-1.11
35	4.87	4.58	0.29
36	4.94	5.16	-0.22
37	4.94	4.40	0.54
38	4.97	4.82	0.15
39	4.98	4.42	0.56
40	5.03	4.50	0.53
41	5.08	4.65	0.43
42	5.11	4.61	0.50
43	5.11	4.51	0.61
44	5.17	4.52	0.65
45	5.17	4.65	0.52
46	5.20	4.72	0.48
47	5.28	4.68	0.60
48	5.45	5.04	0.41
49	5.49	4.68	0.82
50	5.86	4.99	0.87
AV	4.50	4.50	0.00
SD	0.56	0.32	0.46
Min	3.27	4.06	-1.11
Max	5.86	5.89	0.87
n	50	50	50

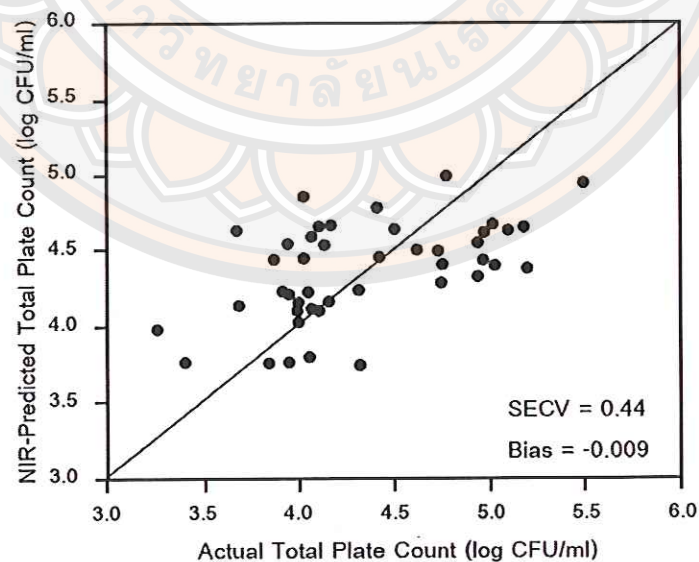
ตาราง 55 ผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจาก NIRS และค่าจากการวิเคราะห์ด้วย
วิธีมาตรฐานของน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ในกลุ่ม Validation

Sample	True value	Predict value	Difference	Sample	True value	Predict value	Difference
51	3.42	4.11	-0.70	64	4.45	5.12	-0.67
52	3.76	4.17	-0.40	65	4.51	4.79	-0.29
53	3.88	4.47	-0.59	66	4.72	4.46	0.26
54	3.96	4.13	-0.17	67	4.76	4.61	0.14
55	4.00	4.29	-0.29	68	4.88	4.44	0.44
56	4.01	4.49	-0.48	69	4.96	4.85	0.12
57	4.06	4.04	0.02	70	5.02	5.14	-0.13
58	4.08	4.20	-0.12	71	5.10	5.01	0.09
59	4.17	4.13	0.04	72	5.15	4.82	0.33
60	4.20	4.32	-0.12	73	5.18	4.82	0.37
61	4.26	4.64	-0.39	74	5.36	4.62	0.75
62	4.32	4.43	-0.11	75	5.79	6.11	-0.32
63	4.40	4.23	0.17				
				AV	4.50	4.58	-0.08
				SD	0.58	0.45	0.36
				Min	3.42	4.04	-0.70
				Max	5.79	6.11	0.75
				n	25	25	25

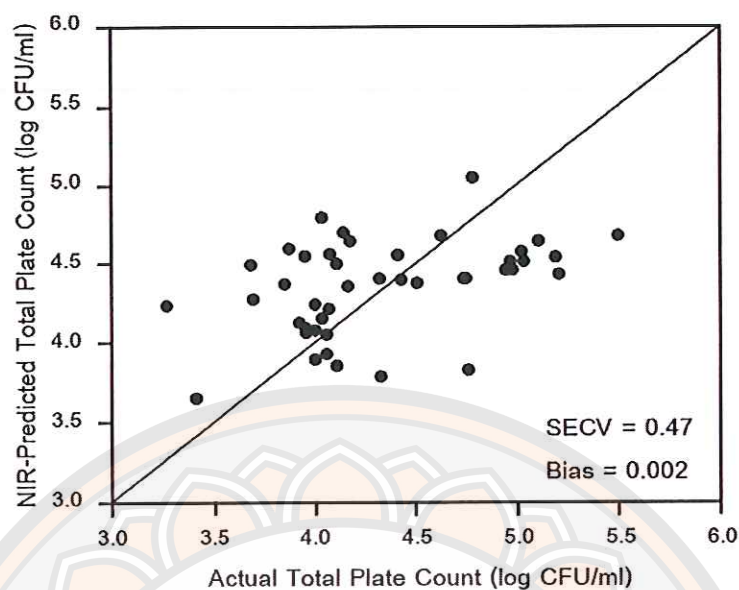
ภาคผนวก ค ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม ที่ได้จากวิธีการตรวจสอบทาง
จุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS



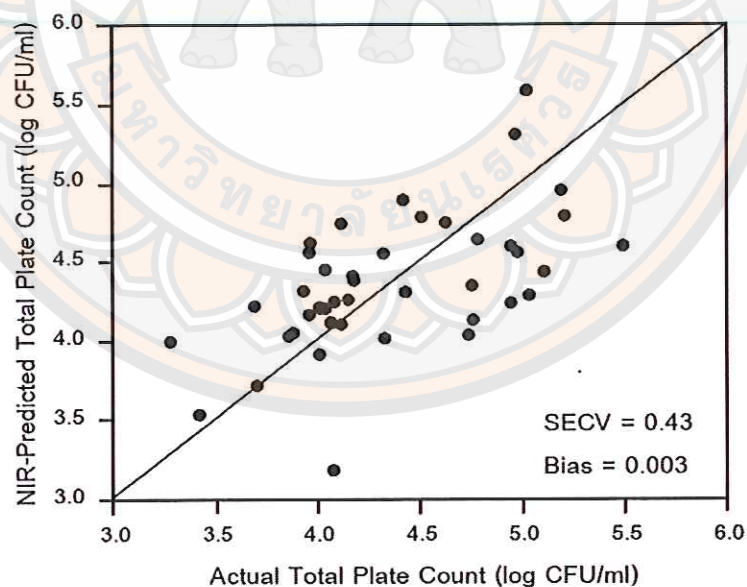
ภาพ 20 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตรได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านไม่การ
ปรับแต่งสเปกตรัม



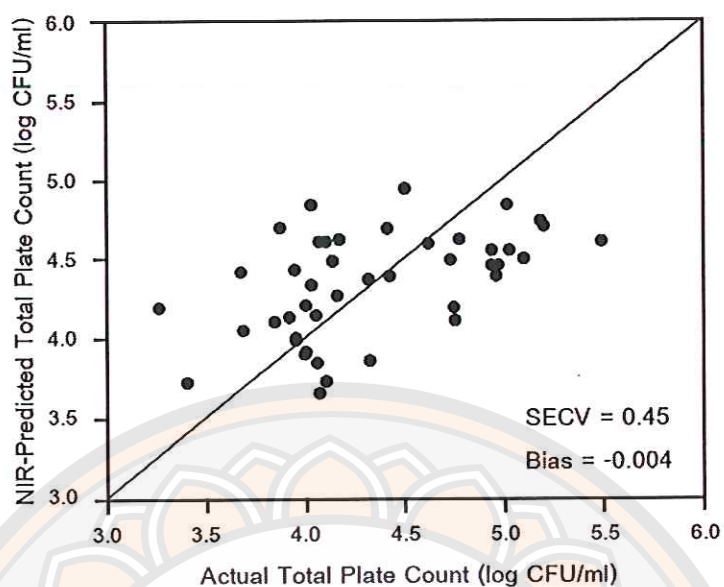
ภาพ 21 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตรได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการ
ปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative



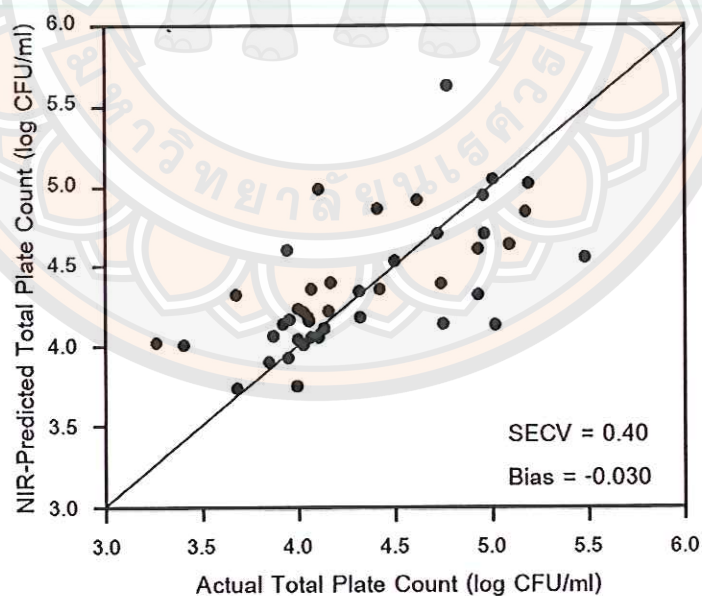
ภาพ 22 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตรได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี second derivative



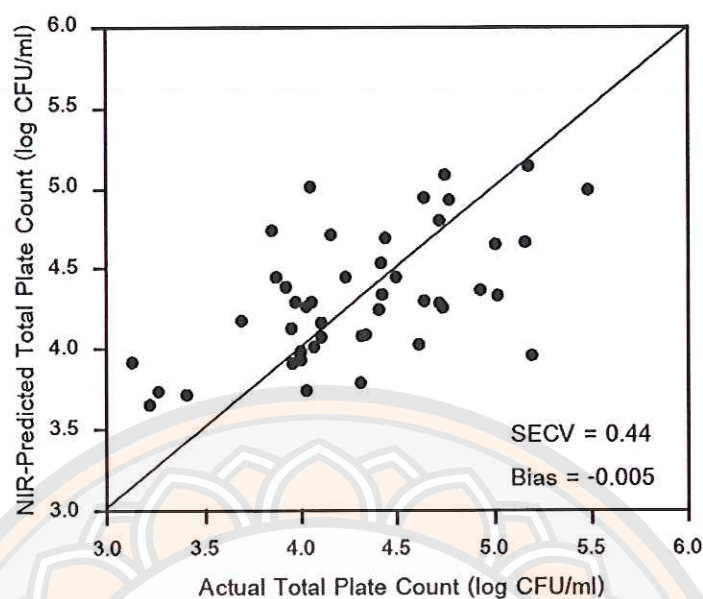
ภาพ 23 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตรได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC



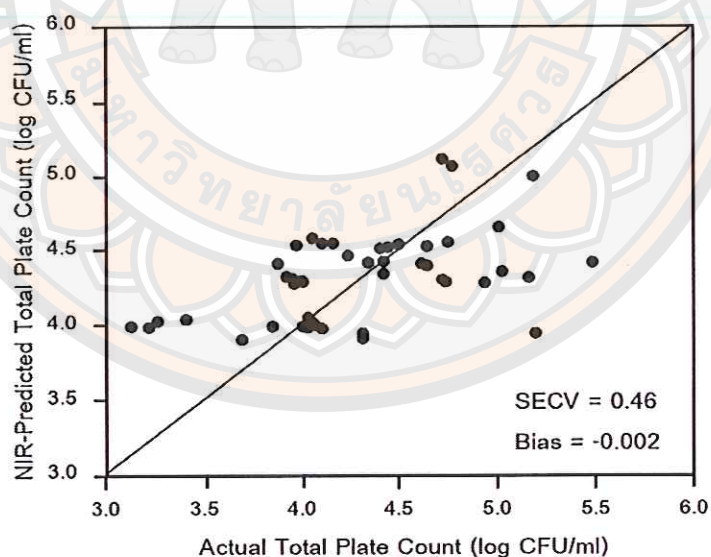
ภาพ 24 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตรได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV



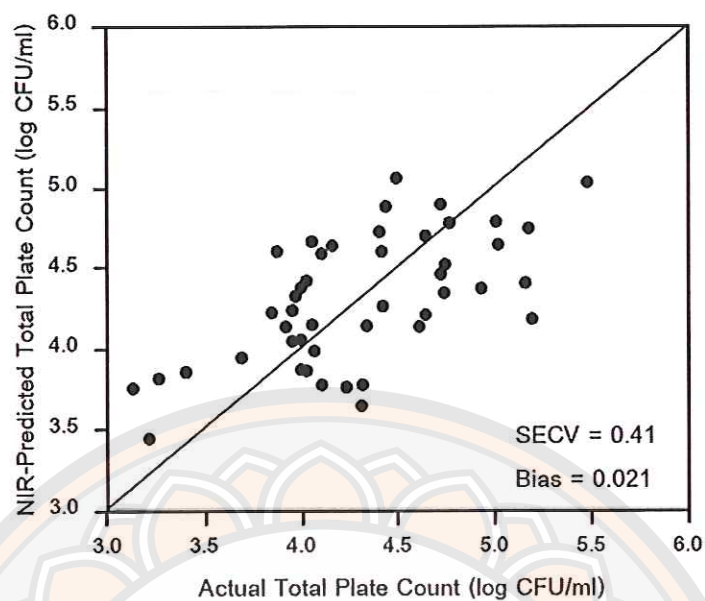
ภาพ 25 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 0.1 มิลลิเมตรได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ MSC



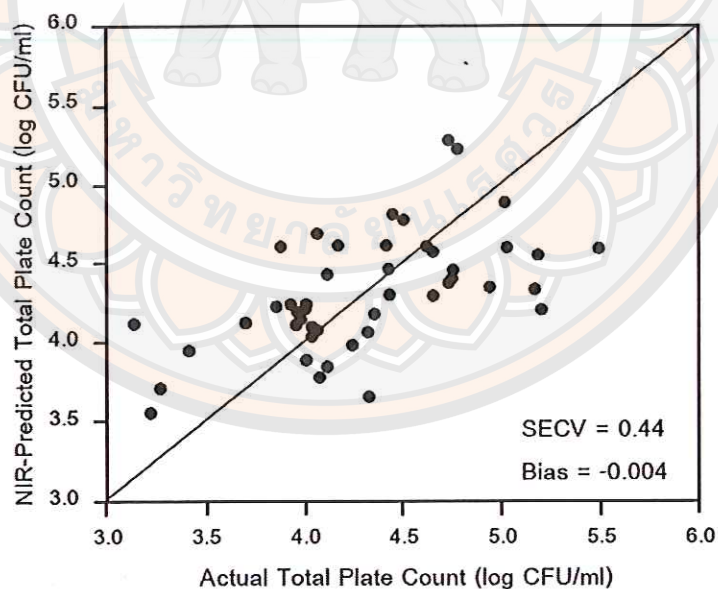
ภาพ 26 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตรได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านไม่การปรับแต่งสเปกตรัม



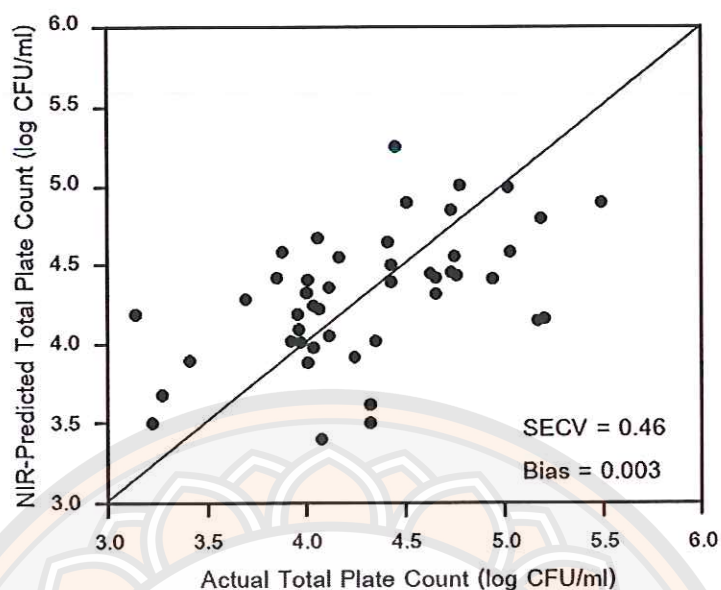
ภาพ 27 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตรได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี second derivative



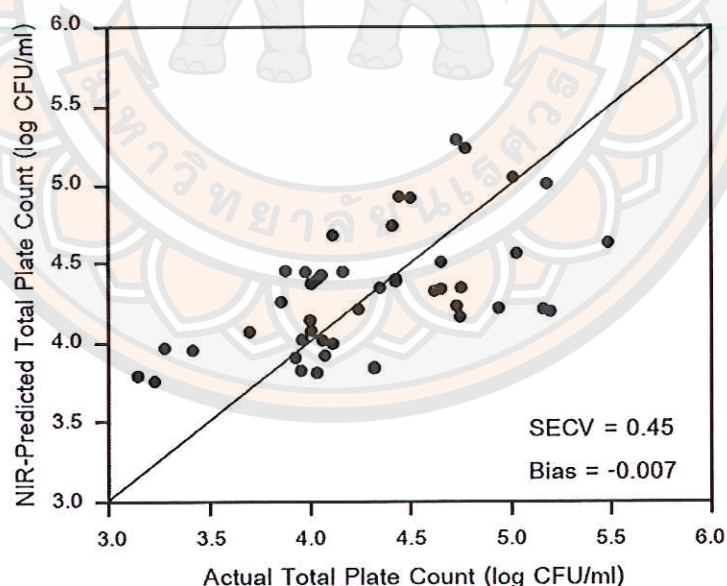
ภาพ 28 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตรได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่าน การปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี MSC



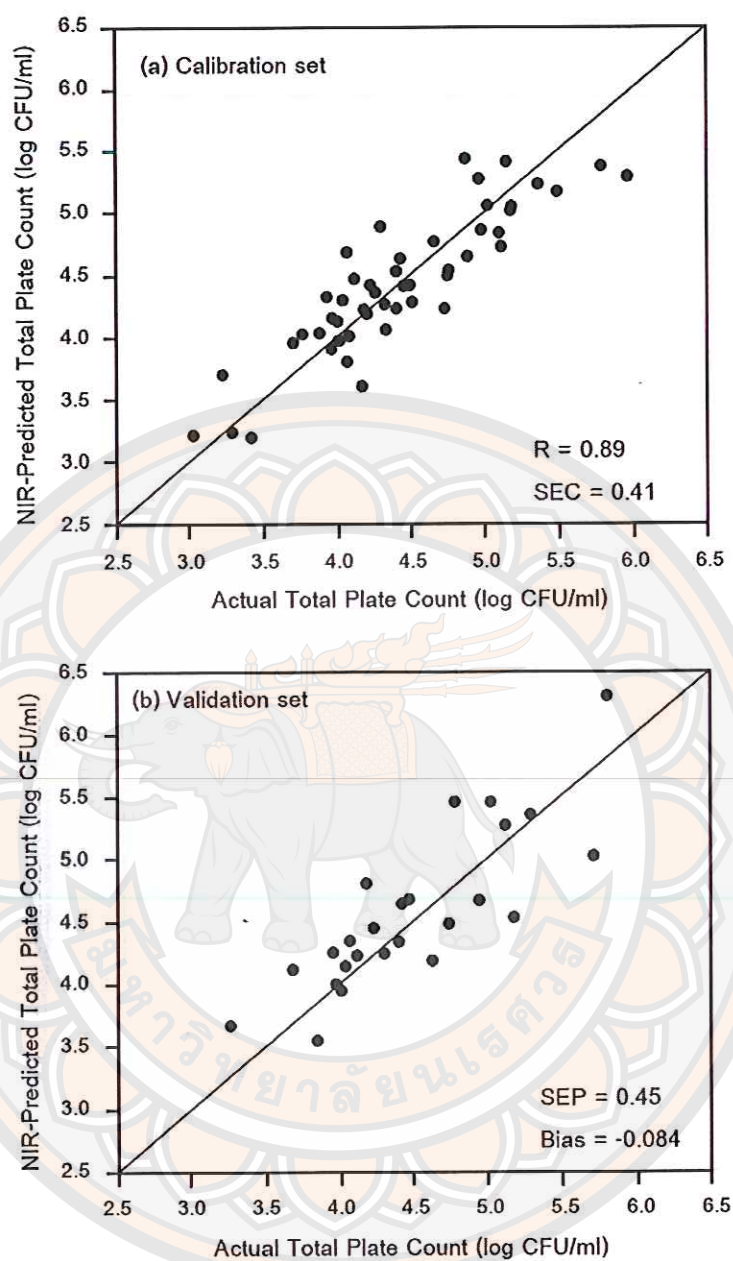
ภาพ 29 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตรได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี SNV



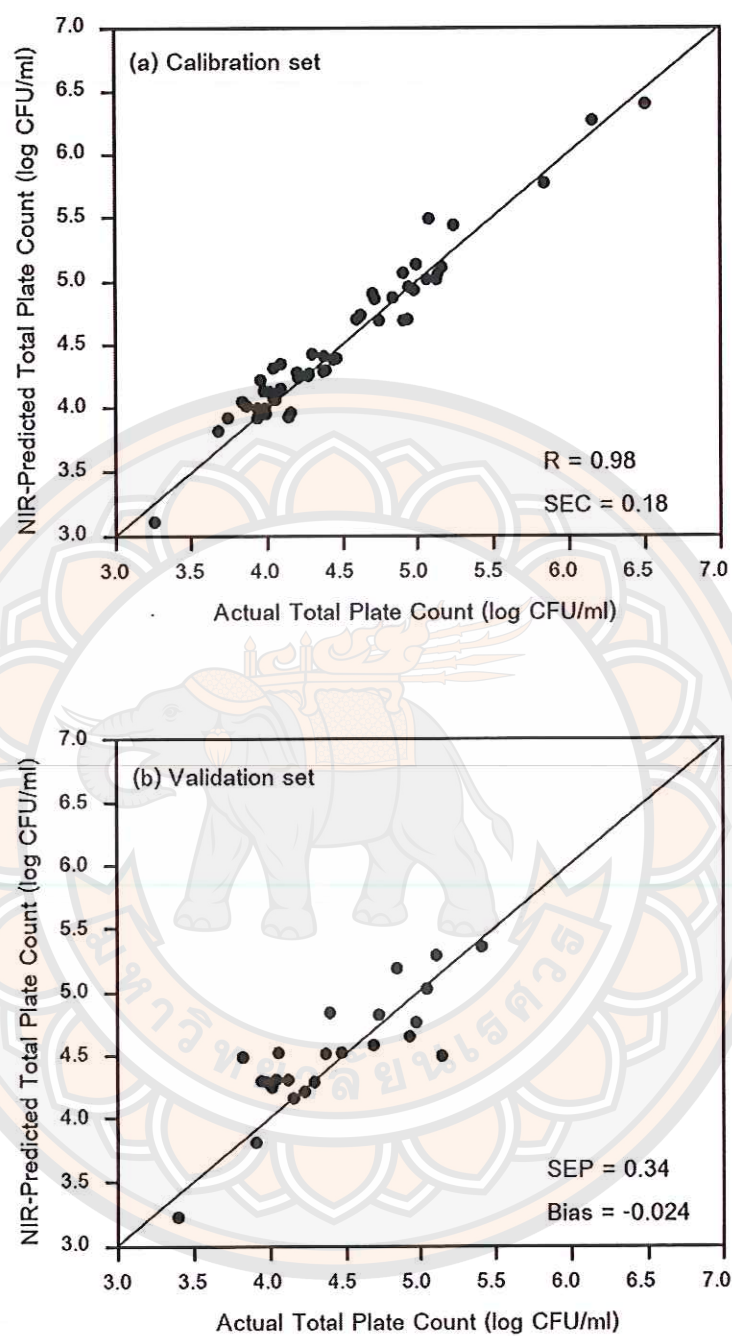
ภาพ 30 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตรได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ SNV



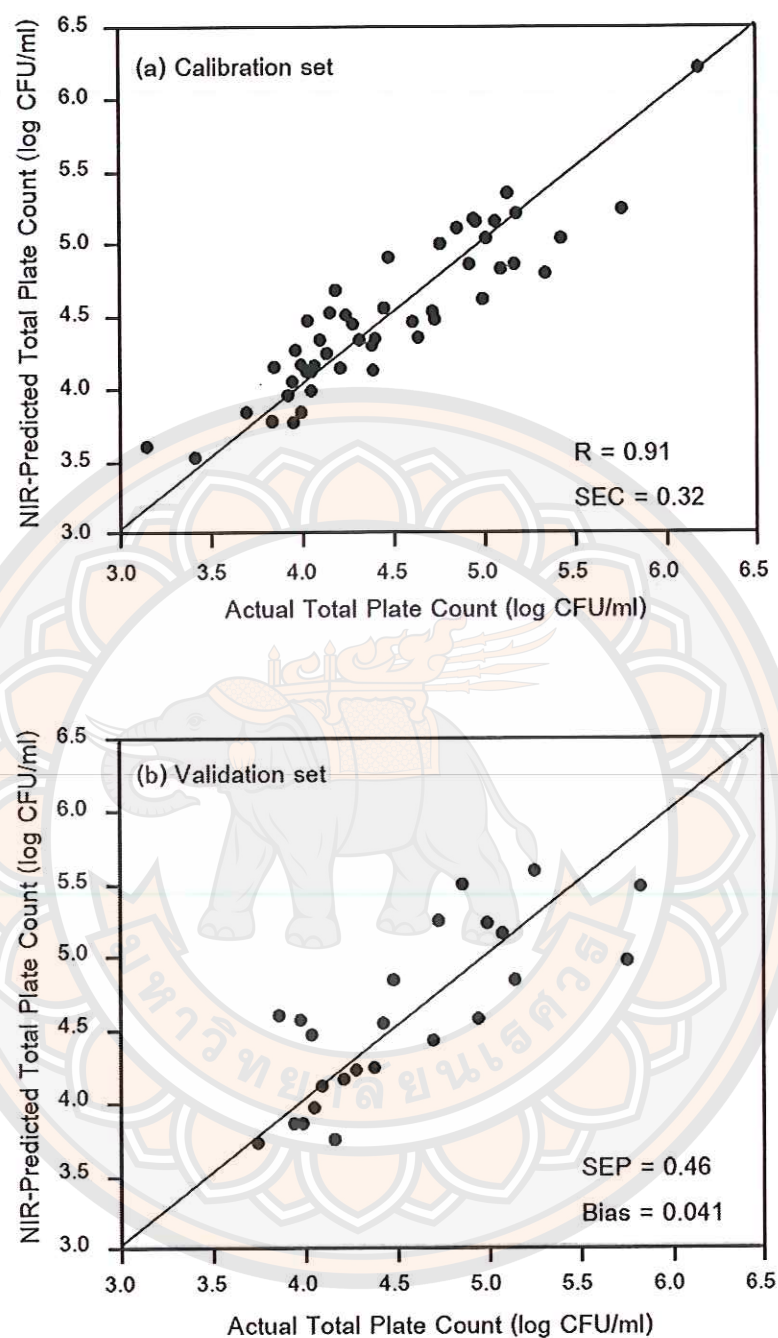
ภาพ 31 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ ที่มีขนาด Pathlength 1.0 มิลลิเมตรได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ที่ผ่านการปรับแต่งสเปกตรัมด้วยวิธี first derivative ร่วมกับ MSC



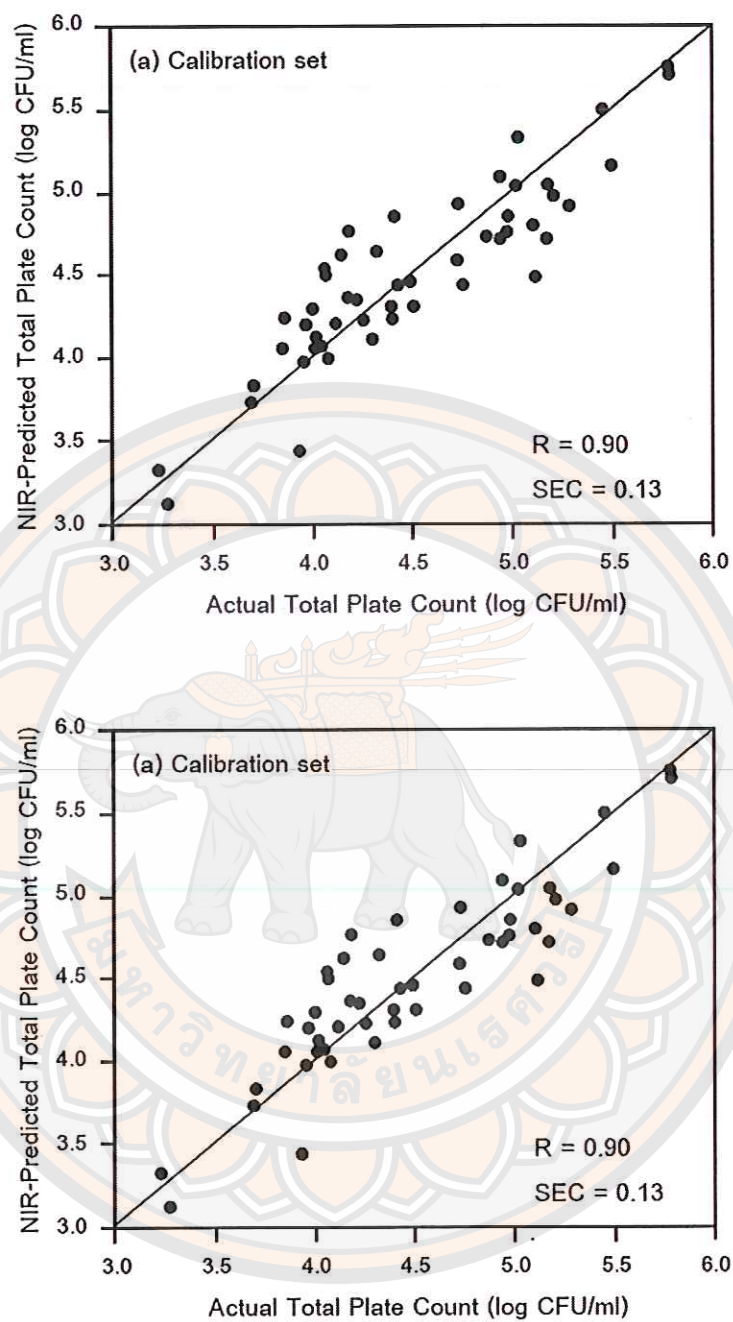
ภาพ 32 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในนํ้านมโคดิบ ที่ได้จากการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทางNIRS ในกลุ่ม (a) Calibration และ (b) กลุ่ม Validation



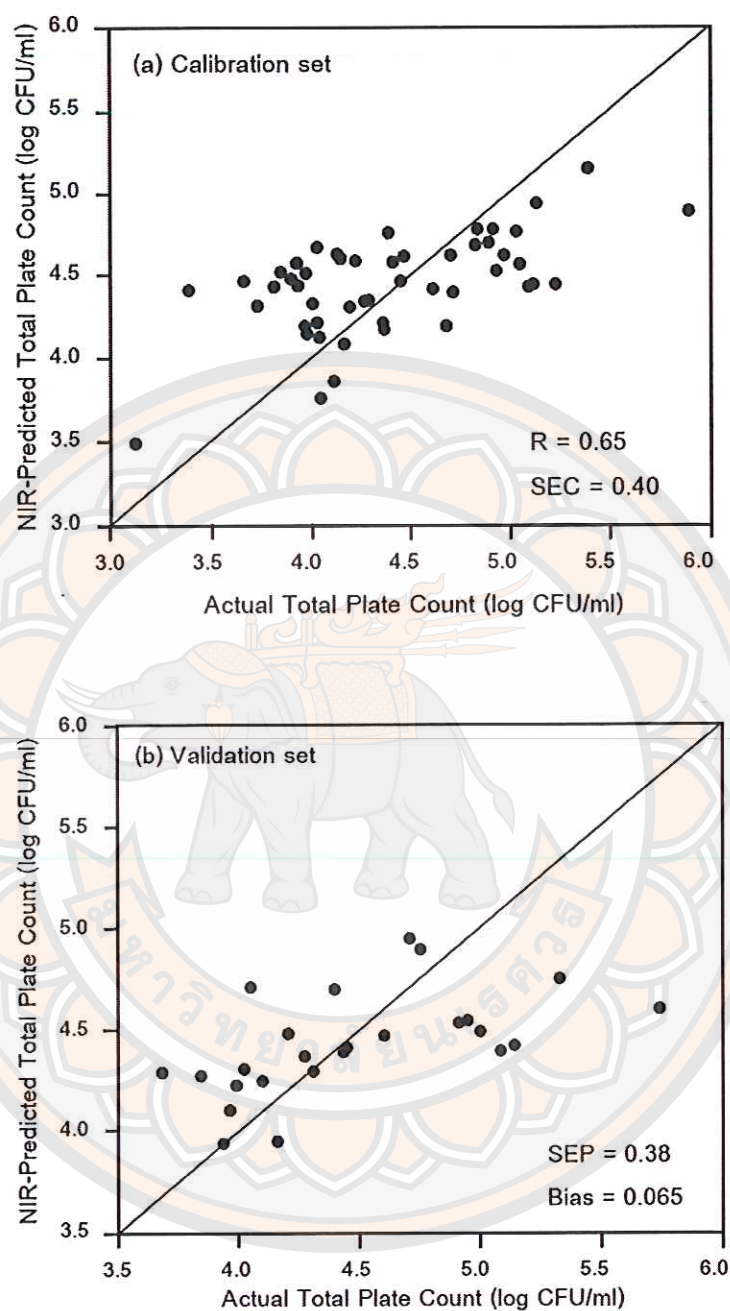
ภาพ 33 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 10%ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ที่ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ในกลุ่ม (a) Calibration และ (b) กลุ่ม Validation



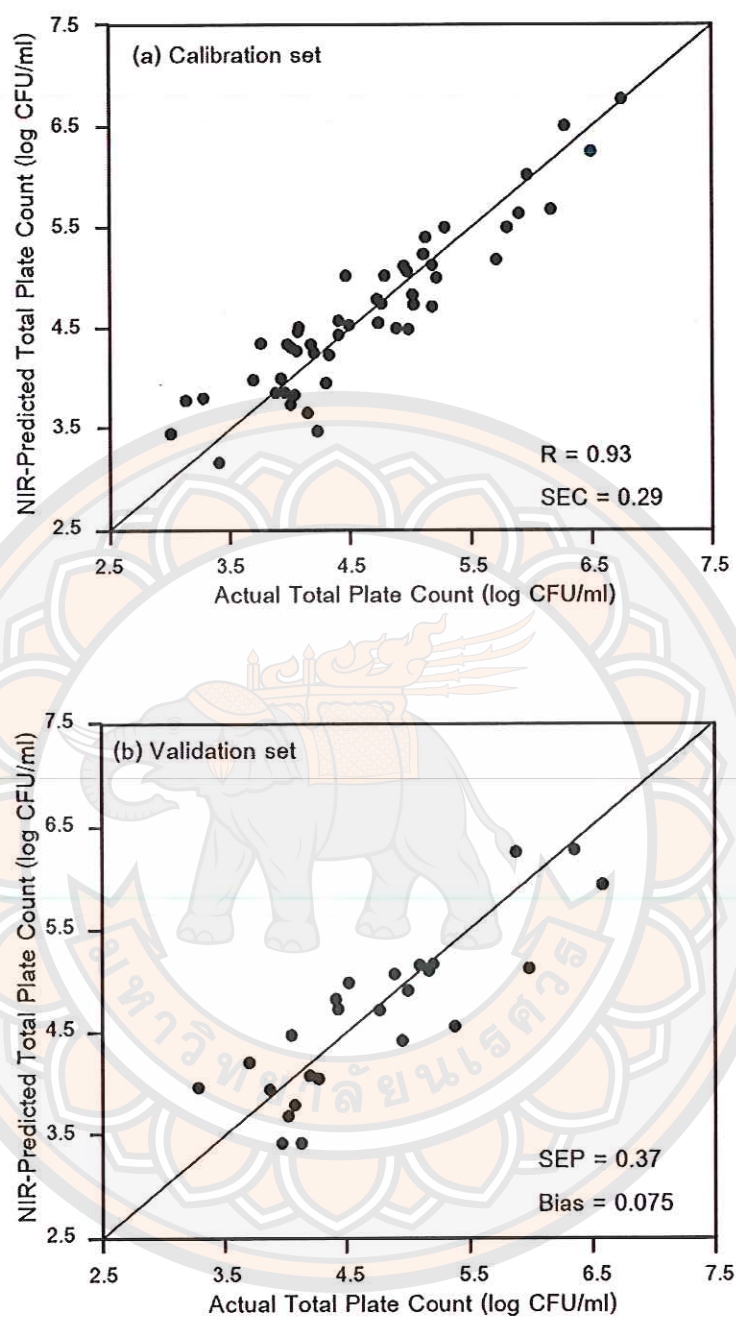
ภาพ 34 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ที่ได้
จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ในกลุ่ม (a) Calibration
และ (b) กลุ่ม Validation



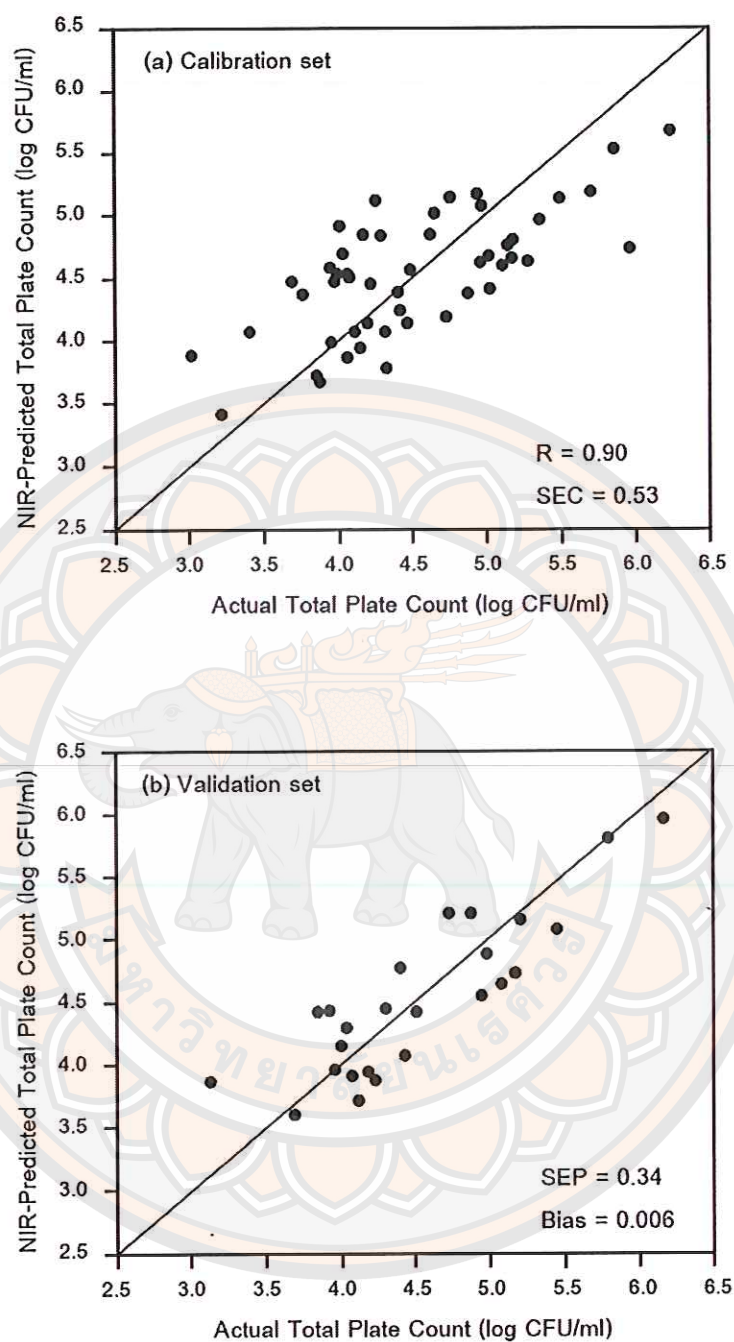
ภาพ 35 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 10% ระยะเวลารบ่ม 90 นาที ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ในกลุ่ม (a) Calibration และ (b) กลุ่ม Validation



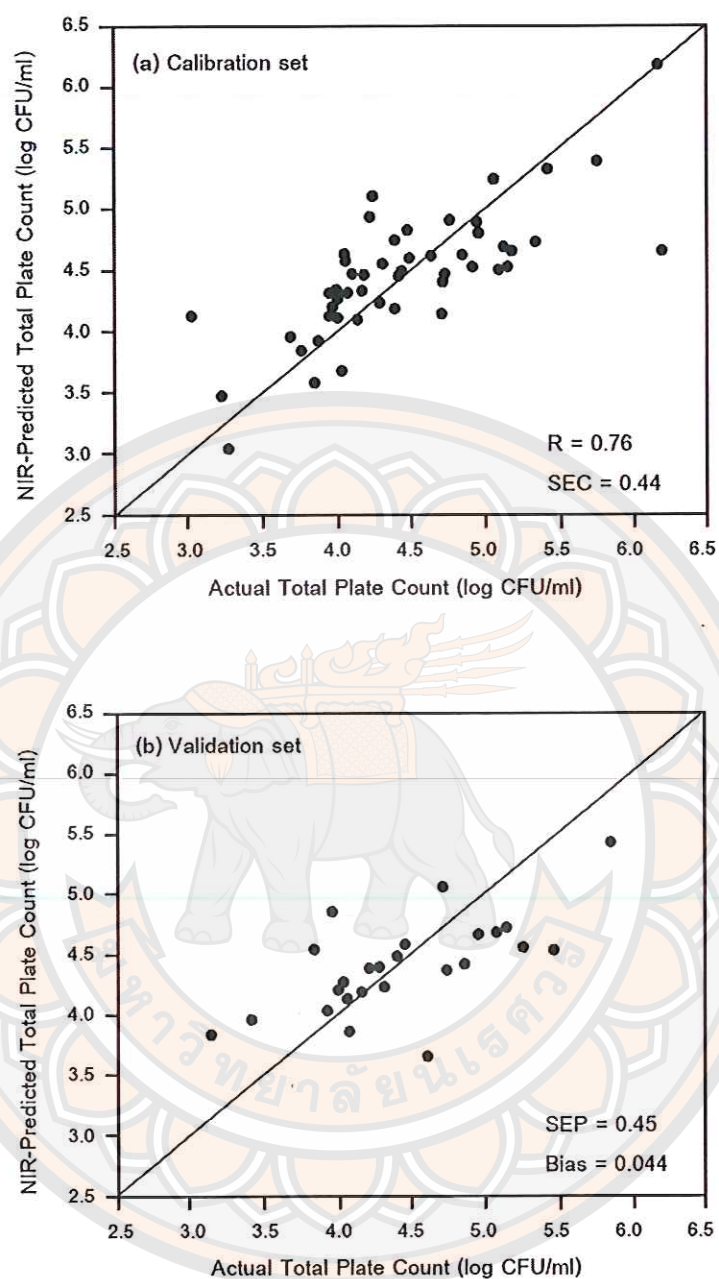
ภาพ 36 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 10% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ที่ได้
จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ในกลุ่ม (a) Calibration
และ (b) กลุ่ม Validation



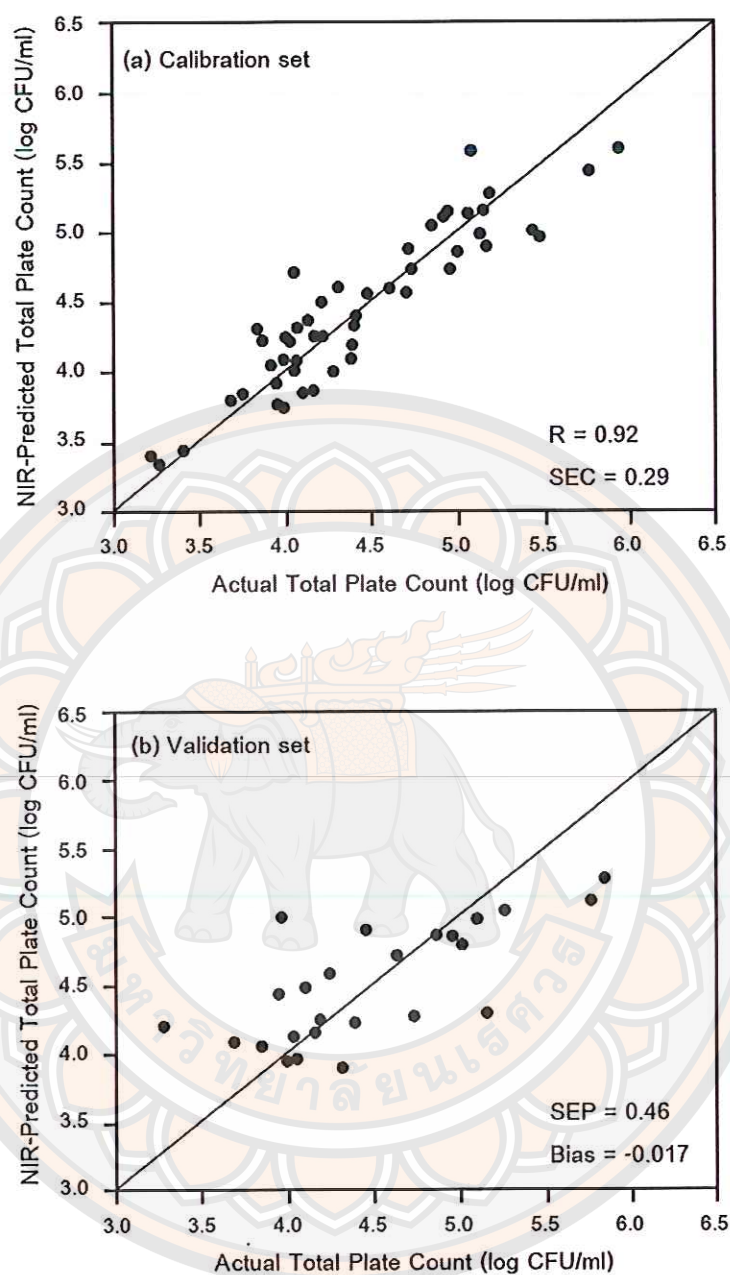
ภาพ 37 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 30 นาที ที่ได้
จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ในกลุ่ม (a) Calibration
และ (b) กลุ่ม Validation



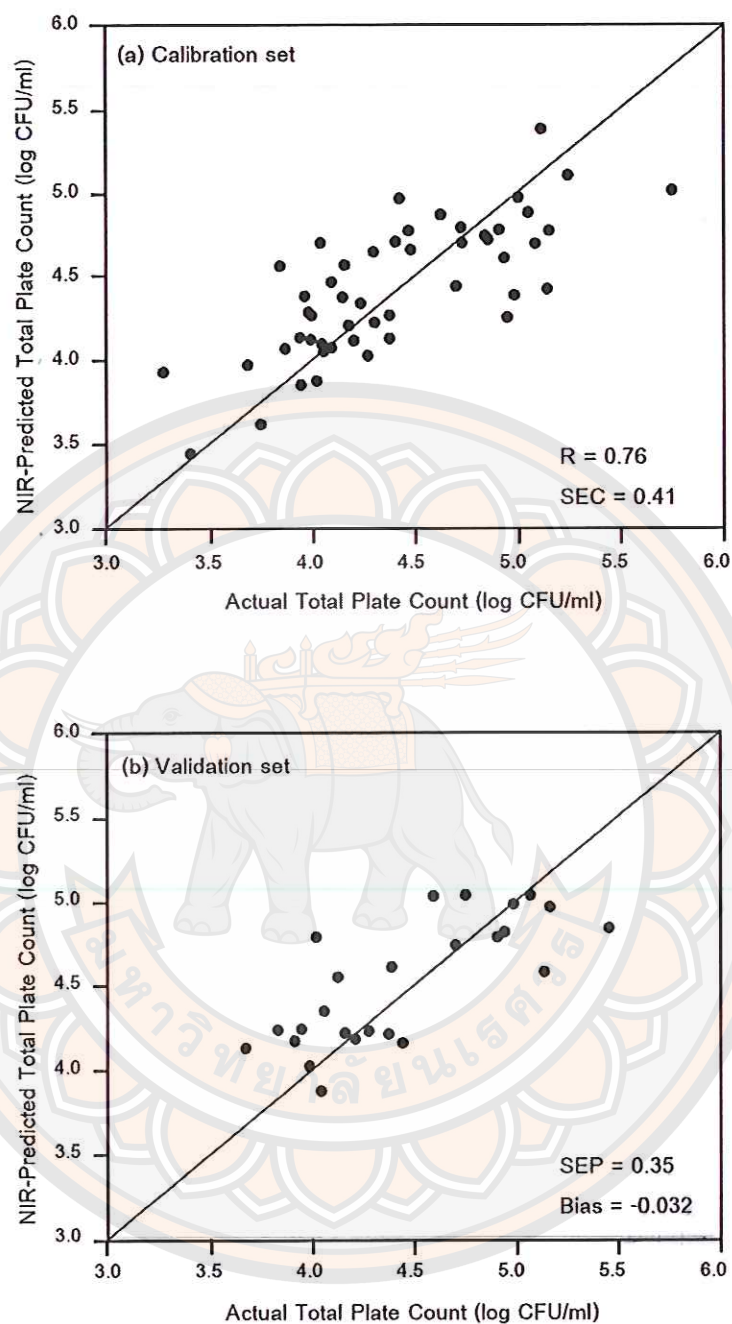
ภาพ 38 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่ม 60 นาที ที่ได้
จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ในกลุ่ม (a) Calibration
และ (b) กลุ่ม Validation



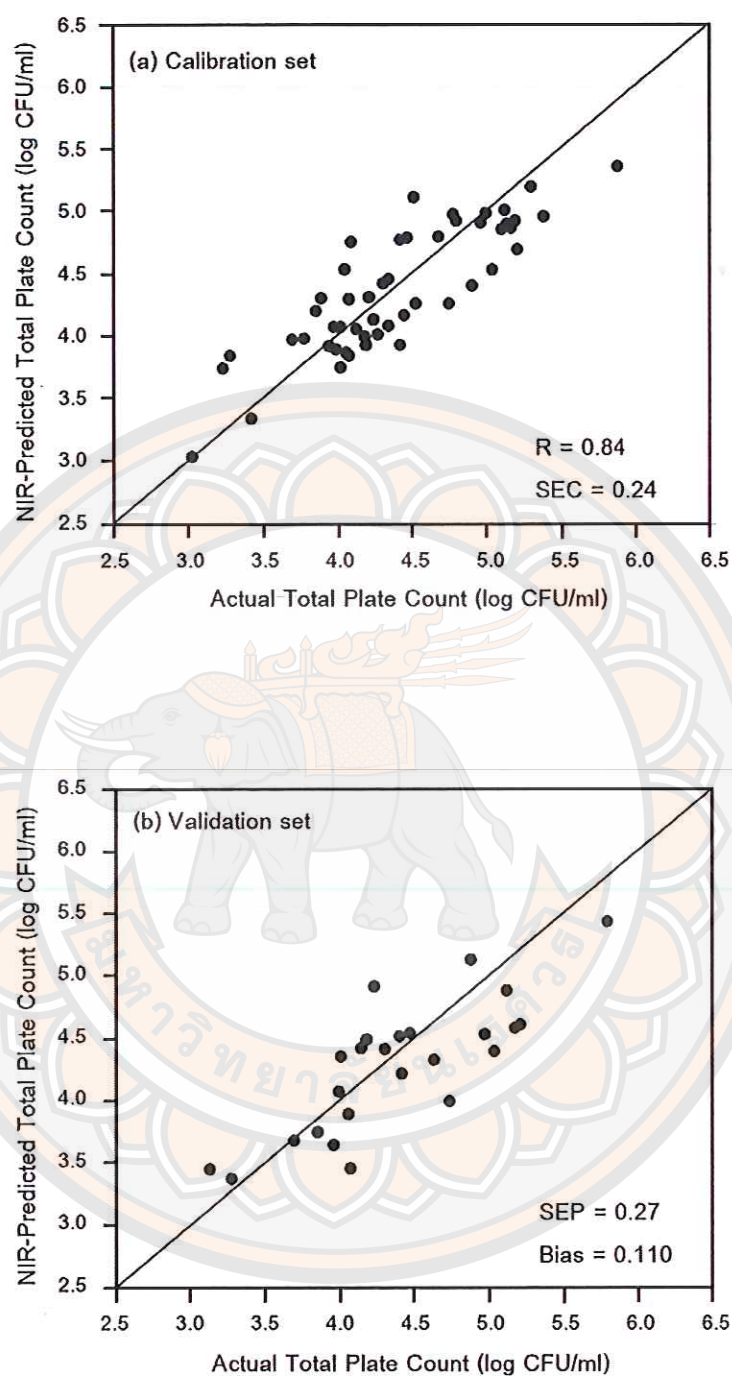
ภาพ 39 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 25% ระยะเวลารบ่ม 120 นาที ที่ได้
จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ในกลุ่ม (a) Calibration
และ (b) กลุ่ม Validation



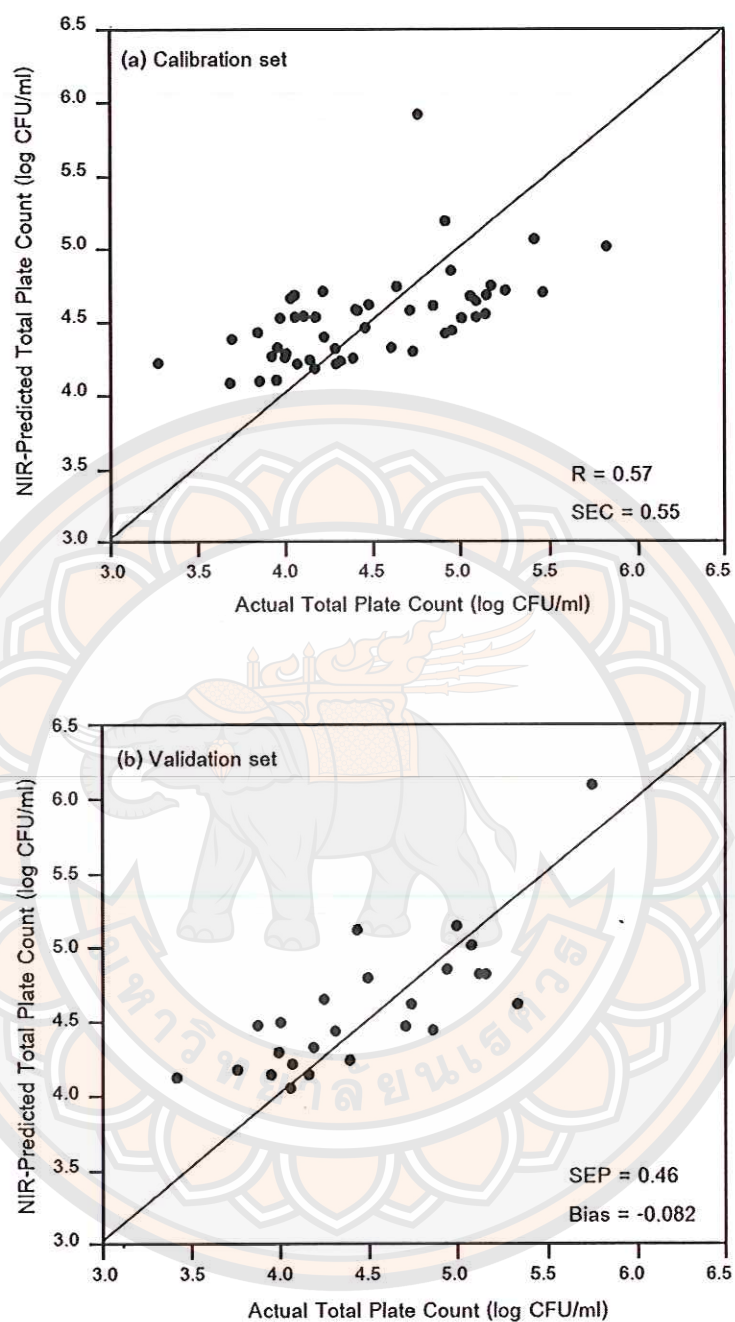
ภาพ 40 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 50% ระยะเวลารบ่ม 30 นาที ที่ได้
จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ในกลุ่ม (a) Calibration
และ (b) กลุ่ม Validation



ภาพ 41 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 50% ระยะเวลารบ่ม 60 นาที ที่ได้
จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ในกลุ่ม (a) Calibration
และ (b) กลุ่ม Validation



ภาพ 42 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ได้จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ในกลุ่ม (a) Calibration และ (b) กลุ่ม Validation



ภาพ 43 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนม 50% ระยะเวลาบ่ม 120 นาที ที่ได้
จากวิธีการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและวิธีทาง NIRS ในกลุ่ม (a) Calibration
และ (b) กลุ่ม Validation

ภาคผนวก ง ผลงานตีพิมพ์งานวิจัย

ACN2015

12th Asian Congress of Nutrition

Nutrition and Food for Longevity:
For the Well-Being of All

Yokohama, Japan



May 14(Thu) - 18(Mon), 2015

[Organized by]

Japan Society of Nutrition and Food Science (JSNFS)

Science Council of Japan (SCJ)



[Under the Auspice of]

Federation of Asian Nutrition Societies (FANS)



Abstract Book



OS12-2

Possibility of Total Bacterial Quantification in Raw Milk using Near Infrared Spectroscopy

Sonthaya Numthuan, Jutaporn Hongpathong, Natthapakorn Suk-osit,
Nuchcha Yodwisadpanid, Rangsun Charoensook, Wandee Tartrakoon
Naresuan University, Thailand

Enumeration of bacterial amount in raw milk is one of the important procedures toward the maintenance of national health condition. This study was undertaken to determine the possibility of using near infrared (NIR) spectroscopy for a rapid analysis of total aerobic bacterial count (TBC) in raw milk. Non-homogenized raw milks collected from dairy cows were scanned by NIR spectroscopy in transmittance mode with optical pathlengths of 0.15 and 1.0 mm. In order to study the effect of bacterial activities on the TBC prediction efficiency, raw milk samples were added into culture broth with ratio of 1:9 and allowed bacterial growing by incubating in 32°C water bath for 120 minutes. The NIR measurements of the diluted milk samples were performed at the 30, 60, 90 and 120 minute of incubation times. The TBC calibration models were developed using partial least squares regression. Raw milk spectra of 0.15-mm pathlength provided better calibration results, with the correlation coefficient (R) of 0.88 and root mean square error of cross validation (RMSECV) of 0.33 log CFU/ml, than those of 1.0-mm pathlength ($R = 0.75$, RMSECV = 0.42 log CFU/ml). Superior results were obtained from the spectra of the diluted milk in culture broth. The best calibration was from those incubated for 60 minutes with $R = 0.96$ and RMSECV = 0.29 log CFU/ml. The results indicated that important information for NIR-TBC quantification in raw milk were significantly from bacterial activities during their growth. It was concluded that NIR spectroscopy had a potential to be used as a rapid TBC determination method.

keywords: raw milk, total bacteria, near infrared spectroscopy

OS12-4

Microchannel emulsification a promising technique for generating monodisperse oil-in-water emulsions encapsulating quercetin

Nauman Khalid^{1,2}, Isao Kobayashi¹, Marcos A. Neves^{1,3},
Kunihiko Uemura¹, Mitsutoshi Nakajima^{1,3}, Hiroshi Nabetani^{1,2}
¹National Food Research Institute, Japan, ²The University of Tokyo, Japan, ³University of Tsukuba, Japan

Introduction

Quercetin is a flavonoid found in numerous fruits and vegetables. The solubility of quercetin in aqueous-based formulations is quite low. Encapsulation is the recommended strategy to increase the bioavailability in aqueous based formulations. Microchannel (MC) emulsification can be used to improve monodispersity and droplet size controllability. This process can produce monodisperse emulsions with average droplet diameters of 1 to 550 micrometer with coefficients of variation <5%.

Objectives

The study was conducted to encapsulate quercetin in food-grade oil-in-water emulsions stabilized by different emulsifiers by using MC emulsification.

Materials & Methods

A straight through MC array (WMS 1-2) comprised of a series of discrete 80 by 10 micrometer outlets on each MC line. The effective cross-sectional area was 1 cm² and the inner diameter of the cylindrical inlets was 10 micrometer. A Milli-Q water solution containing 1% (wt) Tween 20, sodium cholate, decaglycerol monolaurate or bovine serum albumin was used as the continuous phase, while the dispersed phase constitute 0.1-0.4 mg mL⁻¹ quercetin in different vegetable oils or medium chain triglyceride (MCT). The emulsification process was carried by injecting the dispersed phase at a flow rate of 3 mL h⁻¹, while the continuous phase was supplied continuously at flow rates of 250 to 500 mL h⁻¹.

Results & Findings

Successful MC emulsification was carried out with different vegetable oils and MCT. The generated monodisperse droplets had Sauter mean diameter of 28 to 34 micrometer and span width below 0.2. All the evaluated food-grade emulsifiers stabilized the oil-in-water droplets over 15 days at 4 and 25°C. The monodisperse oil-in-water emulsions stabilized by Tween 20 have encapsulation efficiency more than 80% after 15 days of storage at 4 and 25°C.

Conclusion

Oil-in-water emulsions encapsulating quercetin was successfully formulated with straight through MC emulsification with good encapsulation efficiency at 4 and 25°C.

keywords: Microchannel emulsification, Quercetin, Encapsulation

OS12-3

Factors for the Water-Solubility or Water-Dispersibility of the Complex between Peptide mixture and Poorly Water-Soluble Nutrients and Drugs

Oshima Tatsuya, Yamashita Risa, Iwakiri Takeru, Wang Bin,
Sugahara Mariko, Inada Asuka, Baba Yoshinari
University of Miyazaki, Japan

Objectives

The poorly water-soluble nutrients and drugs generally show low bioavailability, because of lower solubility in digestive liquor. Many kinds of techniques for the enhancement of water-solubility or water-dispersibility of poorly water-soluble materials have been reported. In recent years, the authors have developed the complex formation of a peptide mixture (Pep) obtained as protein hydrolysate and poorly soluble materials. In the present study, the water-solubility or dispersibility of the complex between various materials and compared, in order to clarify the factors determining the solubility of the complex.

Material & Methods

Milk casein was enzymatically hydrolyzed using chymotrypsin by lyophilization, to obtain the peptides mixture (Pep) as a white solid. The complex was prepared by mixing an aqueous solution of complex with a water-miscible organic solution of a poorly water-soluble material followed by removal of organic solvent *in vacuo* and lyophilization. The complex was suspended in aqueous solution and the water dispersibility was evaluated. The apparent solubility of the complex in aqueous solution was determined by the permeability through 0.8 micrometer membrane. The concentration in the filtrate was determined using UV-vis or HPLC.

Results and Finding

The complex containing indomethacin, ibuprofen, or prednisolone was water-soluble. In contrast, the complex containing heme iron, lipoic acid, curcumin, retinoic acid, or quercetin became water-insoluble. The results suggest that the resulting complex was classified to two: The complex containing relatively hydrophobic materials (logP > 3.9) with higher molecular weight should be water-dispersible. The complex containing moderately hydrophobic materials (logP < 3.9) with lower molecular weight seems to be water-soluble.

Conclusions

The complexes between poorly water-soluble materials and peptides should be water-soluble or water-dispersible in aqueous media, according to the properties of the incorporated material.

keywords: Poorly Water-Soluble, Solubility, Bioavailability

OS12-5

Nanoemulsion (NE) delivery system boosts oral bioavailability and cellular uptake of lipophilic nutraceuticals

Tannoy Kumar Dey, Pubali Dhar
University of Calicut, India

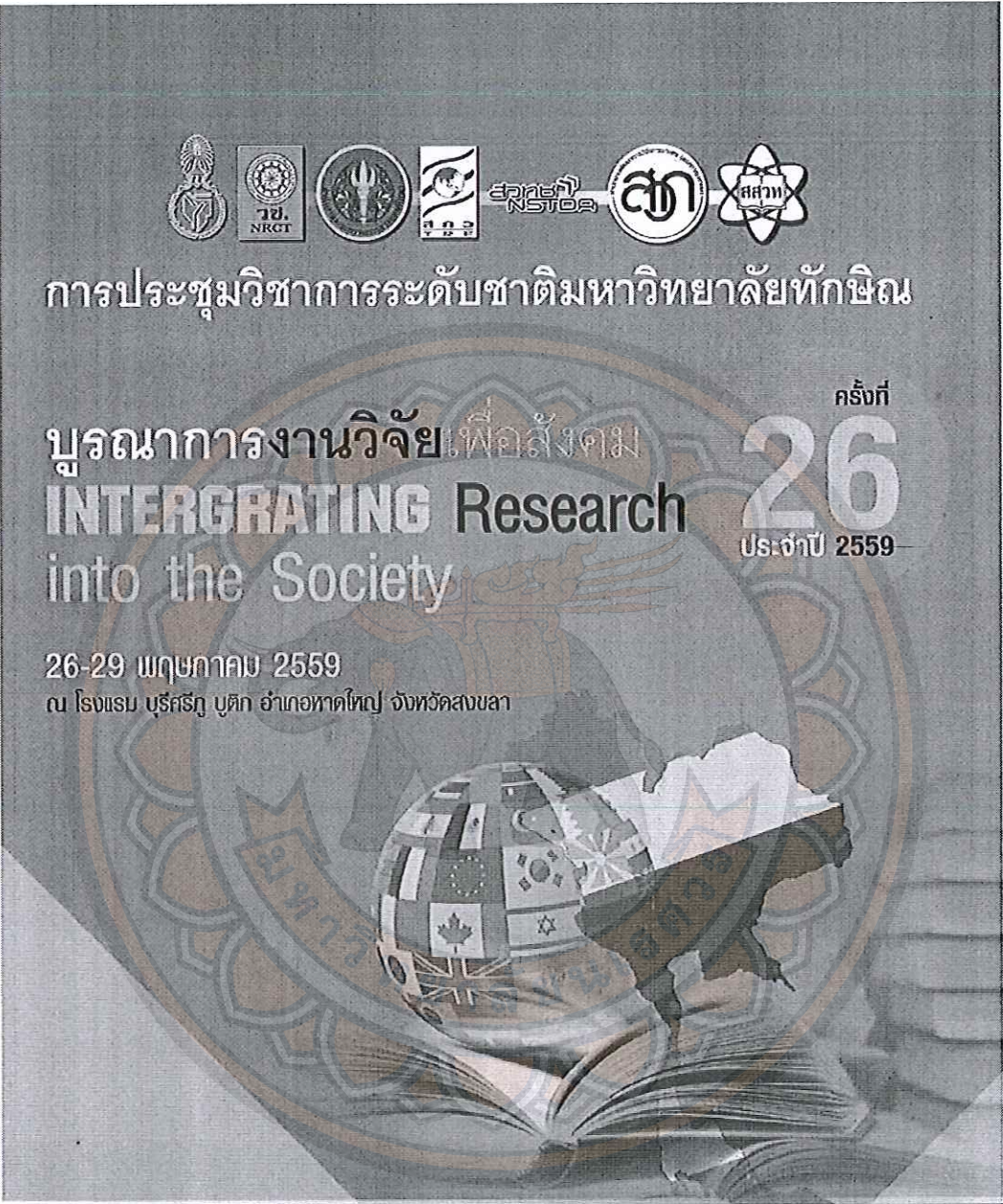
Poor water-soluble bioactive components have limited oral bioavailability but that could be increased with a decrease in their particle size. The aim of the present study is to produce suitable nanoemulsion formulations which may have been an apt alternative to improve permeability and bioavailability of such compounds.

NE of fish lipid oil, rich in EPA-DHA, was developed using surfactants like Tween 20 and Span 80. Morphology, hydrodynamic diameter, zeta potential and shelf-life were measured. The stability checked for *in-vitro* lipid release/droplet stability in simulated (Salivary, gastric and small intestine). *Ex-situ* everted rat intestine model and *in situ* rat intestinal perfusion method was used to bioabsorption. Finally, real-time cellular uptake efficiency of the emulsion system was studied by flow-cytometry in Peripheric Mononuclear Cells (PBMC).

NE formulated with surfactant concentration > 0.5%, had hydrodynamic diameter in the range of 151.9 - 89.7nm. TEM micrograph shown the particles to be spherical in appearance. *In-vitro* digestion had confirmed the NE droplets to be stable in the simulated *in situ* and *in-situ* experiments confirmed the inverse relationship between absorption of EPA-DHA and their particle sizes. NE had improved permeability of EPA-DHA by >30%, compared to conventional droplets. Significantly higher ($P < 0.01$) incorporation of NE droplets into the PBMCs over the conventional emulsion was established. The kinetics paradigm of the NE incorporation into the PBMCs was dependent and irrespective of their sub-populations (i.e. both the adherent and non-adherent cells).

NE delivery technique bettered the oral bioavailability of lipophilic Nutraceuticals like EPA-DHA to the circulating cell blood. This technique can be used for delivering several other bioactive components like vitamins, polyphenols, drugs etc.

keywords: Oral bioavailability, Gastrointestinal absorption, Nano



การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยทักษิณ

ครั้งที่ 26 ประจำปี 2559

บูรณาการงานวิจัยเพื่อสังคม
INTERGRATING Research
into the Society

26-29 พฤษภาคม 2559
 ณ โรงแรม บุรีศรีภูมิ บุคค อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

จัดโดย

- มหาวิทยาลัยทักษิณ
- สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)
- สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)
- สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
- สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (สวก.)
- สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)
- สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.)

ISBN 974-451-209-1

การพัฒนาวิธีตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมโคดิบด้วยเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี
Method Development for Determination of Total Bacterial Amount in Raw Milk Using
Near Infrared Spectroscopy

จุฑาทพร หงษ์มาทอง¹ และสนธยา คุ้มแก้ว^{2*}
Jutaporn Hongpathong¹ and Sonthaya Numthuan^{2*}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมโคดิบด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี ทำการศึกษาโดยใช้น้ำนมโคดิบและน้ำนมโคผสมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในอัตราส่วน 10%, 25% และ 50% นำตัวอย่างน้ำนมที่อัตราส่วนต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 32°C ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงเนียร์อินฟราเรดของตัวอย่างที่เวลาบ่ม 30, 60, 90 และ 120 นาที ทำการวิเคราะห์แบบจำลองทำนายปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธี partial least square regression (PLSR) ทดสอบการทำนายปริมาณแบคทีเรียจากน้ำนมโคดิบมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) เท่ากับ 0.89 และค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ (SEP) เท่ากับ 0.45 log CFU/ml และการทำนายมีความแม่นยำมากขึ้นเมื่อผ่านการจัดการตัวอย่างเป็นน้ำนมโคดิบ 25% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ($R=0.90$, $SEP=0.18$ log CFU/ml) ดังนั้นการใช้ น้ำนมดิบผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำนายปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี

คำสำคัญ: น้ำนมดิบ, เนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปี, แบคทีเรียทั้งหมด

Abstract

This research is to study the method development for determination of total aerobic bacterial count (TBC) in raw milk by near infrared (NIR) spectroscopy. Raw milk and the 10%, 25%, and 50% milk in culture broth were used as samples. The samples were incubated at 32°C and the NIR spectra of milk samples at incubation period for 30, 60, 90 and 120 minutes were acquired. The TBC calibration model were performed using partial least squares regression (PLSR). The prediction accuracy provided from raw milk spectra was the correlation coefficient (R) of 0.89 and standard error of prediction (SEP) of 0.45 log CFU/ml. Superior results were obtained from the 25% milk samples incubated for 90 minutes ($R=0.90$, $SEP=0.18$ log CFU/ml). The results indicated that spectral data of diluted milk in culture broth could improve the prediction efficiency of TBC in raw milk using NIR spectroscopy.

Keywords: Raw Milk, Near Infrared Spectroscopy, Total Bacteria

¹ นิสิตปริญญาโท, ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร 65000

² อ.ดร., ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร 65000

* Corresponding author. Tel.: 038-2939552. E-mail address: sonthaya@nru.ac.th

บทนำ

คุณภาพน้ำนมดิบมีความสำคัญมากต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์นม โดยเฉพาะคุณภาพทางจุลชีวศาสตร์ หรือการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำนม ซึ่งเป็นสาเหตุหลักในการทำให้คุณภาพน้ำนมและอายุการเก็บรักษาลดลง การปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำนมทำให้เกิดปัญหามากมายในอุตสาหกรรมนม เช่น การเสื่อมเสียของของน้ำนม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอันไม่พึงประสงค์ของ สี กลิ่น และรสชาติของน้ำนม ซึ่งสาเหตุดังกล่าวอาจส่งผลไปถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์นมต่างๆ และรวมไปถึงปัญหาสุขภาพของผู้บริโภคที่บริโภคผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ก่อโรค หรือมีปริมาณแบคทีเรียสูงเกินไป อาจก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ด้วยเหตุนี้จึงมีการสร้างระบบการตรวจสอบคุณภาพน้ำนมดิบขึ้น เพื่อป้องกันและควบคุมคุณภาพน้ำนมดิบให้อยู่ในมาตรฐาน ปัจจุบันมีเกณฑ์ควบคุมคุณภาพของน้ำนมตามปริมาณแบคทีเรียที่ตรวจพบ ในประเทศไทยได้กำหนดคุณภาพน้ำนมเกรดหนึ่งไว้ที่ระดับแบคทีเรียไม่เกิน 200,000 โคโลนีต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และยังมีการกำหนดคุณภาพน้ำนมดิบสำหรับการผลิตนมสดตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (มอก.) ให้อยู่ที่ระดับแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมดิบไม่เกิน 500,000 โคโลนีต่อลูกบาศก์เซนติเมตร นอกจากนี้ปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมดิบยังเป็นที่สนใจอย่างยิ่งสำคัญในการกำหนดราคาซื้อขายน้ำนมในปัจจุบัน สำหรับราคาของน้ำนมดิบที่เกษตรกรแต่ละรายจะได้รับนั้น จะแปรไปตามคุณภาพของน้ำนมดิบที่ตนผลิตได้ หากเกษตรกรสามารถผลิตน้ำนมดิบที่มีคุณภาพสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ก็จะได้รับค่าตอบแทนหรือราคาการรับซื้อ เช่น ตามมาตรฐานปริมาณจำนวนจุลินทรีย์ในน้ำนมดิบน้อยกว่า 150,000 โคโลนีต่อลูกบาศก์เซนติเมตร จะได้เงินเพิ่มขึ้น 0.20 บาทต่อลิตรกรัม เป็นต้น แต่ในทางกลับกันถ้าคุณภาพน้ำนมดิบต่ำกว่ามาตรฐาน เกษตรกรรายนั้นจะถูกปรับลดราคาการรับซื้อน้ำนมดิบลงเช่นกัน

สำหรับวิธีการตรวจนับแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบในปัจจุบันมักใช้วิธีการตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมด (Standard plate count: SPC) ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะทราบผลปริมาณแบคทีเรียได้หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 32°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีขั้นตอนการตรวจสอบที่ยุ่งยากมีหลายขั้นตอนจึงต้องอาศัยผู้ที่มีทักษะในการวิเคราะห์เป็นผู้ตรวจสอบ การพัฒนาการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีวศาสตร์ของน้ำนมดิบให้มีความรวดเร็วจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมนม เพื่อสร้างความเชื่อมั่นของคุณภาพของผลิตภัณฑ์นมและเกิดความโปร่งใสในการซื้อขายน้ำนมดิบ

ปัจจุบันเทคโนโลยีอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Near Infrared Spectroscopy: NIRS) เป็นวิธีที่กำลังได้รับความนิยมเนื่องจากทุกวงการอุตสาหกรรม เนื่องจากเทคนิคนี้มีความรวดเร็วในการตรวจสอบ ประหยัด ง่ายง่าย มีการแสดงผลแบบเรียลไทม์ และไม่ใช่สารเคมี หลักการวัดค่าการโดยให้แสงในช่วงความยาวคลื่น 700-2500 นาโนเมตร กระทบลงบนตัวอย่าง ทำให้เกิดการสั่นของพันธะต่างๆ โมเลกุลสารอินทรีย์ เช่น C-H, N-H และ O-H และเกิดสเปกตรัมการดูดกลืนแสง จากนั้นจึงนำข้อมูลสเปกตรัมมาสร้างแบบจำลองทำนายค่าองค์ประกอบที่ต้องการโดยใช้หลักทางเคมีเมตริกซ์ (chemometric) สำหรับในอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์นม มีการนำเทคนิค NIRS มาวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการต่างๆ ของน้ำนม เช่น ปริมาณโปรตีน ไขมัน น้ำตาลแลคโตส และองค์ประกอบอื่นๆ [1-3] และผลิตภัณฑ์นมชนิดต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นปริมาณไขมัน น้ำตาล และความชื้นในชีสโกแกลต [4] การทำนายปริมาณความชื้น ไขมัน และเกลือในกระบวนการทำเนยแข็ง [5] นอกจากนี้ยังมีการนำมาสอบการปลดปล่อยน้ำและหางนมในน้ำนม [6] และการปลอมปนของเนยไขมันในเนยผง [7] เป็นต้น ซึ่งสำหรับในด้านตรวจสอบคุณภาพจุลชีวศาสตร์ของน้ำนมดิบ มีการนำมาใช้ตรวจหาจำนวนเม็ดเลือดขาวในน้ำนม [8, 9] หากแต่ยังไม่มีการประเมินประสิทธิภาพในการตรวจสอบคุณภาพจุลชีวศาสตร์ของน้ำนมดิบในด้านการตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบ เพื่อเป็นการพัฒนาระบบการตรวจสอบคุณภาพจุลชีวศาสตร์ของน้ำนมดิบแบบครบวงจร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความประสงค์ในการพัฒนาวิธีการตรวจวัดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำนมโคดิบด้วยเทคนิค NIRS เพื่อทดแทนวิธีการวิเคราะห์แบบมาตรฐาน

วิธีการวิจัย

ตัวอย่างน้ำนมโคดิบ

เก็บตัวอย่างน้ำนมโคดิบจากฟาร์มเกษตรกรในเขตอำเภอกงไกรลาศ จังหวัดสุโขทัย ใส่ในขวดปลอดเชื้อ จากนั้นบรรจุตัวอย่างใส่ลงในกล่องน้ำแข็งเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในระหว่างเดินทางเพื่อนำตัวอย่างกลับมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ จากนั้นแบ่งตัวอย่างน้ำนมโคดิบปริมาณ 15 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปแช่อย่างควบคุมอุณหภูมิที่ 32°C เป็นระยะเวลาต่างๆ เพื่อเพิ่มระดับจำนวนแบคทีเรียในนม จากนั้นแบ่งตัวอย่างน้ำนมโคดิบแต่ละหลอดทดลองมาอย่างละ 1 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวัดปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธีมาตรฐาน และตัวอย่างนมส่วนที่เหลือนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NIRS

การตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียบนแผ่นในน้ำนมโคดิบด้วยวิธีมาตรฐาน (Standard Plate Count)

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (2000) [10] นำตัวอย่างนม 1 มิลลิลิตรที่แบ่งไว้ ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย 0.1% peptone ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เพื่อเจือจางตัวอย่างที่ละ 10 เท่า ดูดตัวอย่างที่เจือจางในระดับต่างๆ จำนวน 1 มิลลิลิตร แล้วหยดลงในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที ลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่างนม และทำการ pour plate จนตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเนื้อเดียวกัน ในทันทีและรอให้อาหารแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการนับจำนวน colony forming unit (CFU) แล้วบันทึกค่าเป็น log CFU/ml

การเตรียมตัวอย่างน้ำนมโคดิบสำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสงเนียร์อินฟราเรด

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะของรูปแบบตัวอย่างน้ำนมโคดิบต่อประสิทธิภาพการทำนายปริมาณแบคทีเรีย โดยแบ่งการดำเนินการศึกษาออกเป็น 2 ส่วนดังนี้

ส่วนที่ 1 ผลของระดับความเข้มข้นน้ำนมต่อประสิทธิภาพการทำนายปริมาณแบคทีเรีย: ทำการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างน้ำนมโคดิบ (100%) เปรียบเทียบกับตัวอย่างนมที่ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (Tryptic soy broth; Merk KGaA, Germany) ในระดับ 10%, 25% และ 50% ของความเข้มข้นนม เพื่อนำควบคุมอุณหภูมิที่ 32°C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง NIR

ส่วนที่ 2 ผลของเวลาในการบ่มตัวอย่างนมต่อประสิทธิภาพการทำนายปริมาณแบคทีเรีย: ใช้ตัวอย่างน้ำนมโคดิบ 10% และ 25% มาทำการศึกษาต่อ เนื่องจากเป็นระดับความเข้มข้นที่ให้การทำนายดี โดยนำน้ำนมที่ความเข้มข้นดังกล่าวมาบ่มเป็นระยะเวลารวม 120 นาที และระหว่างการทำการแบ่งตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสง NIR ที่ระยะเวลาย่อยต่างๆ คือ 30, 60, 90 และ 120 นาที

การสแกนตัวอย่างด้วยแสงเนียร์อินฟราเรดและการวิเคราะห์ข้อมูล

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือเครื่อง multi-purpose analyzer (MPA) FT-NIR spectrometer (Bruker, Bremen, Germany) ที่ช่วงเลขคลื่น 12000 ถึง 4000 cm^{-1} วัดค่าการดูดกลืนแสง NIR ด้วยโหมด transreflectance โดยให้นำตัวอย่างนมแต่ละรูปแบบปริมาณ 1 มิลลิลิตร บรรจุลงในเซลล์ตัวอย่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 เซนติเมตร แล้ววาง aluminum reflector ที่มีระยะ optical pathlength 0.15 มิลลิเมตร ลงในเซลล์ตัวอย่าง เพื่อช่วยสะท้อนแสงกลับมายังตัว detector ของเครื่อง NIRS

จำนวนตัวอย่างนมแต่ละรูปแบบสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลคือ 75 ตัวอย่าง ทำการแบ่งตัวอย่างแต่ละรูปแบบออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มสร้างแบบจำลอง (calibration set) จำนวน 50 ตัวอย่าง และกลุ่มทำนาย (prediction set) จำนวน 25 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) นำข้อมูลสเปกตรัมของตัวอย่างน้ำนมความเข้มข้นต่างๆ และระยะเวลาย่อยต่างๆ มาสร้างแบบจำลองวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับปริมาณแบคทีเรียด้วยวิธี partial least squares regression (PLSR) ด้วยโปรแกรม OPUS เวอร์ชัน 7.2 จากนั้นนำตัวอย่างกลุ่มทำนายมาทดสอบความแม่นยำของแบบจำลอง และคัดเลือก

แบบจำลองที่มีประสิทธิภาพการทำนายสูงสุดในการทำนายปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในน้ำนมโคดิบ โดยพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R) ที่สูงสุด ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบสมการ (SEP) ที่ต่ำที่สุด และค่าอัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มทดสอบต่อค่า SEP (Ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP. RPD) ที่สูงที่สุด

ตารางที่ 1 ข้อมูลทางสถิติของปริมาณแบคทีเรียปนเปื้อนในน้ำนมโคดิบจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน

Items	100% milk		50% milk		25% milk		10% milk	
	Cal set	Val set	Cal set	Val set	Cal set	Val set	Cal set	Val set
No.	50	25	50	25	50	25	50	25
Min*	3.01	3.27	3.02	3.14	3.02	3.14	3.15	3.22
Max*	5.96	5.79	5.86	5.78	6.23	6.15	6.57	6.49
Mean*	4.42	4.48	4.38	4.39	4.52	4.53	4.67	4.67
SD	0.63	0.62	0.60	0.62	0.70	0.70	0.79	0.77

*Unit: log CFU/ml

Cal set: Calibration set คือ กลุ่มเทรนแบบจำลอง

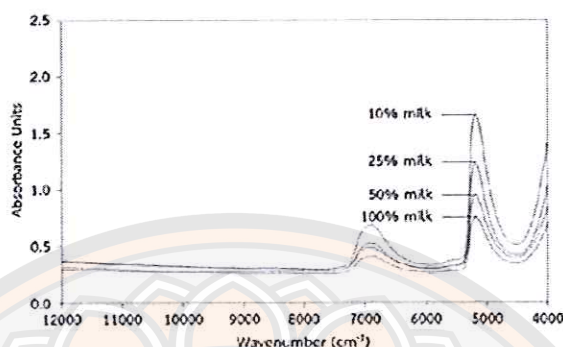
Val set: Validation set คือ กลุ่มทดสอบสมการ

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

คุณภาพน้ำนมโคดิบของเกษตรกรในเขตอำเภอกงไกรลาศ จังหวัดสุโขทัย มีค่าความสะอาดของน้ำนมหรือปริมาณแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำนมอยู่ในช่วง 3 ถึง 4 log CFU/ml เพื่อให้ได้แบบจำลองการทำนายที่ครอบคลุมปริมาณแบคทีเรียที่กว้างขึ้น จึงนำตัวอย่างน้ำนมดิบ นมที่อุณหภูมิ 32 °C ที่เวลาต่างๆ เพื่อเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย โดยมีปริมาณแบคทีเรียที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองทำนายปริมาณแบคทีเรียในการศึกษาครั้งนี้อยู่ในช่วง 3 ถึง 6 log CFU/ml แสดงดังในตารางที่ 1

ภาพที่ 1 แสดงตัวอย่างสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของตัวอย่างน้ำนมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงเลขคลื่น 12000 ถึง 4000 cm^{-1} ซึ่งพบที่คลื่นใหญ่ 2 พีค คือ พีคของพันธะ O-H ของโมเลกุลน้ำที่เลขคลื่นประมาณ 6890 และ 5170 cm^{-1} เนื่องจากโมเลกุลน้ำสามารถดูดกลืนแสงในช่วงเอนิราเรดได้ดี จึงปรากฏพีคของน้ำที่มีขนาดใหญ่อย่างเห็นได้ชัดเจน [2, 6, 8] หากพิจารณาจากสัดส่วนของปริมาณน้ำกับองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างน้ำนมความเข้มข้นต่างๆ แล้ว พบว่าตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของน้ำน้อยจะมีสัดส่วนของน้ำจากอาหารเหลวมากขึ้น ดังนั้นค่าการดูดกลืนแสงที่ตำแหน่งพีค 6890 และ 5170 cm^{-1} ของตัวอย่าง จะสูงขึ้นตามปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมลงไปตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Kesemsunran *et al.* (2007) [6] ได้ทำการตรวจสอบเมทาสเจอโรสเชื้อปนเปื้อน พบว่าตำแหน่งพีค O-H ของน้ำจะสูงขึ้นตามปริมาณน้ำที่เติมลงไป

ตารางที่ 2 แสดงผลการทำนายปริมาณแบคทีเรียจากข้อมูลการดูดกลืนแสงเอนิราเรดของตัวอย่างน้ำนมดิบ 100% เปรียบเทียบกับตัวอย่างน้ำนมความเข้มข้น 10%, 25% และ 50% พบว่าประสิทธิภาพการทำนายปริมาณแบคทีเรียจากสเปกตรัมน้ำนมโคดิบผสมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวในระดับ 10% และ 25% มีค่าความคลาดเคลื่อนจากการทำนายที่ใกล้เคียงกันคือ มีค่า SEP เท่ากับ 0.34 และ 0.37 log CFU/ml ตามลำดับ โดยตัวอย่างน้ำนม 10% และ 25% ให้ค่าการทำนายที่มีความแม่นยำมากกว่าการทำนายผ่านตัวอย่างน้ำนมโคดิบ 50% และ 100%



ภาพที่ 1 สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของตัวอย่างนมโคดิบระดับความเข้มข้น
ต่างๆ ที่เลขคลื่น 12000-4000 cm^{-1}

ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียในนมวัวระดับความเข้มข้น 10% และ 25% อาจแสดงกิจกรรมของแบคทีเรียที่มีการใช้สารอาหารหรือการเปลี่ยนแปลงสารอาหารในอาหารเหลว ในช่วงเวลา 30 นาที ที่ทำการบ่มในอุณหภูมิ 32°C และอาจเห็นการเปลี่ยนแปลงชัดเจนกว่าตัวอย่างนม 50% เนื่องจากอัตราส่วนของนมวัวที่สูงมากเกินไป อาจส่งผลให้อุณหภูมิหรือยังลงใช้ประโยชน์จากองค์ประกอบของนม และเกิดการเปลี่ยนแปลงของอาหารเหลวที่ยังไม่แตกตัวเพียงพอสำหรับการหาความสัมพันธ์ในการสร้างแบบจำลอง

เมื่อนำตัวอย่างนมวัวที่ระดับ 10% และ 25% มาศึกษาระยะเวลาการบ่มต่อประสิทธิภาพการทำนายปริมาณแบคทีเรีย โดยเพิ่มระยะเวลาบ่มเป็น 60, 90, และ 120 นาที พบว่าตัวอย่างนม 10% ที่บ่มนาน 90 นาที ให้ผลการสร้างแบบจำลองทำนายปริมาณแบคทีเรียได้ดีกว่าระยะเวลาบ่มอื่นๆ ($R=0.93$, $\text{SEP}=0.32 \log \text{CFU/ml}$) ซึ่งสอดคล้องกับตัวอย่างนม 25% ที่พบว่าการบ่มที่ระยะเวลา 90 นาที ให้ค่าการทำนายดีที่สุดเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 3) โดยผลการทำนายของแบบจำลองที่ได้จากสเปกตรัมของตัวอย่างทุกอย่าง พบว่าตัวอย่างนม 25% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที มีประสิทธิภาพการทำนายที่แม่นยำที่สุด ที่ค่า $R=0.90$, $\text{SEP}=0.18 \log \text{CFU/ml}$ และ $\text{RPD}=2.04$ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากข้อมูลการดูดกลืนแสงขององค์ประกอบในนมและในอาหารเหลวที่เปลี่ยนแปลงไปตามกิจกรรมของแบคทีเรียในระหว่างการบ่มที่ระยะเวลาดังกล่าว เนื่องจากในนมวัวมีแบคทีเรียหลายชนิด โดยปกติแบคทีเรียจะมีการแบ่งเซลล์เพิ่มแบบทวีคูณ (binary fission) และมีเวลาที่ใช้ในการแบ่งเซลล์ (generation time) แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของแบคทีเรีย จึงอาจเป็นไปได้ว่าข้อมูลการดูดกลืนแสงในช่วงเวลา 90 นาที จะได้มาจากการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของแบคทีเรียที่สอดคล้องกับปริมาณแบคทีเรียโดยรวมทั้งหมด ในขณะที่เมื่อเวลานานหรือน้อยกว่า 90 นาที อาจทำให้ได้ข้อมูลการดูดกลืนแสงที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียบางชนิดในนมดิบ จึงเกิดค่าความคลาดเคลื่อนในการหาความสัมพันธ์กับปริมาณแบคทีเรียรวมในนม ภาพที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียในนมโคดิบที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐานกับปริมาณแบคทีเรียที่ได้จากการทำนายด้วยเทคนิค NIRS สำหรับเลขช่วงคลื่นที่ใช้ในการสร้างแบบจำลองที่ดีที่สุดของตัวอย่างนม 25% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที คือช่วง $9400\text{-}8400$ ร่วมกับ $4600\text{-}4200 \text{ cm}^{-1}$ เมื่อพิจารณาจากโครงสร้างตัวแปรสำคัญในการสร้างแบบจำลองเพื่อทำนายปริมาณแบคทีเรียจากช่วงเลขคลื่นดังกล่าว พบว่าการดูดกลืนแสงที่เลขคลื่น 9351 และ 9157 cm^{-1} มีอิทธิพลต่อแบบจำลองการทำนายแบคทีเรียปนเปื้อนในนม ซึ่งเป็นการดูดกลืนแสงจากการสั่นของพันธะ O-H ขององค์ประกอบน้ำตาลแลคโตส และพันธะ C-O ขององค์ประกอบไขมันตามลำดับ

[2] นอกจากยังพบความสำคัญของการดูดกลืนแสงเลขคลื่น 4577 และ 4506 cm^{-1} ซึ่งเกิดจากการสั่นของพันธะ C=O ที่เป็นองค์ประกอบของ amide [11, 12] ที่อาจเกิดมาจากกระบวนการย่อยสลายโปรตีนโดยแบคทีเรีย (Proteolytic) [11]

ตารางที่ 2 ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PLS regression ของปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนมที่มีความเข้มข้นต่างๆ

Sample type	Factor	R	SEC	SEP	Bias	RPD
10% milk	8	0.98	0.18	0.34	-0.024	1.92
25% milk	9	0.93	0.29	0.37	0.075	1.92
50% milk	10	0.92	0.29	0.46	-0.017	1.42
100% milk	10	0.89	0.41	0.45	-0.084	1.72

Factor: ค่าที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างข้อมูลทดลอง

R: correlation coefficient คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

SEC: standard error of calibration คือ ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มตัวอย่าง

SEP: standard error of prediction คือ ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบ

RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP คือ อัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มทดสอบต่อค่า SEP

ตารางที่ 3 ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี PLS regression ของปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำนม 25% ระยะเวลาบ่มต่างๆ

Incubation time (minute)	Factor	R	SEC	SEP	Bias	RPD
30 min	9	0.93	0.29	0.37	0.075	1.92
60 min	6	0.90	0.52	0.34	0.006	2.00
90 min	8	0.90	0.13	0.18	0.162	2.04
120 min	9	0.76	0.44	0.45	0.044	1.31

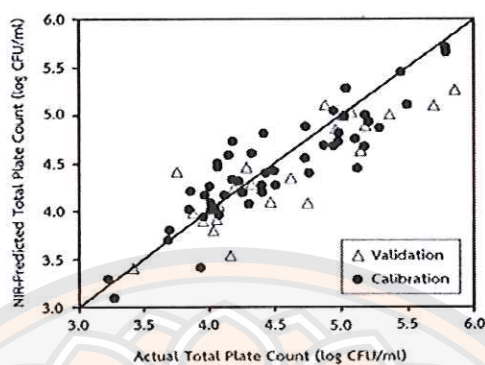
Factor: ค่าที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างข้อมูลทดลอง

R: correlation coefficient คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์

SEC: standard error of calibration คือ ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มตัวอย่าง

SEP: standard error of prediction คือ ค่าผิดพลาดมาตรฐานในกลุ่มทดสอบ

RPD: ratio of standard deviation of reference data in validation set to SEP คือ อัตราส่วนของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มทดสอบต่อค่า SEP



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบ 25% ระยะเวลาบ่ม 90 นาที ที่ได้จากการตรวจสอบทางจุลชีววิทยา และวิธีทาง NIRS

สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรด โดยการใช้น้ำนมโคดิบผสมอาหารเลี้ยงเชื้อในอัตราส่วน 10% และ 25% บ่มที่อุณหภูมิ 32°C ระยะเวลา 30 นาที มีความแม่นยำมากกว่าน้ำนมโคดิบ 100% และประสิทธิภาพการทำนายมีค่าดีที่สุดจากข้อมูลสเปกตรัมของตัวอย่างน้ำนม 25% บ่มที่อุณหภูมิ 32°C เป็นระยะเวลา 90 นาที ดังนั้นความเข้มข้นของน้ำนมโคดิบและระยะเวลาที่เหมาะสมจะช่วยให้ประสิทธิภาพในการทำนายปริมาณแบคทีเรียในน้ำนมโคดิบด้วยเทคนิคเนียร์อินฟราเรดสเปกโตรสโกปีได้ นอกจากนี้การใช้เครื่อง NIRS ในการตรวจสอบยังสามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีมาตรฐาน และยังช่วยประหยัดเวลาในการวิเคราะห์ให้ทราบผลได้ภายใน 2 ชั่วโมง

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา ระดับปริญญาโท ประจำปี 2559 สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ และทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ สัญญาเลขที่ R2557C012

เอกสารอ้างอิง

- [1] Laporte, M.F. and Paquin, P. (1999) Near-infrared analysis of fat, protein and casein in cow's milk *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 47, 2600-2605.
- [2] Tsenkova, R., Atanassova, S., Toyoda, K., Ozaki, Y., Itoh, K. and Fearn, T. (1999) Near-infrared spectroscopy for dairy management: Measurement of unhomogenized milk composition. *Journal of Dairy Science* 82(11), 2344-2351.

- [3] Kawano, S., Saranwong, S. and Terada, F. (2003). Rapid, easy-handling system for NIR compositional analysis of non-homogenized milk using a test tube. In A.M.C Davies, A. Garrido-Varo (Eds.), **Near Infrared Spectroscopy: Proceeding of the 11th International Conference**, 77-79. West Sussex : NIRPublication.
- [4] Tarkošová, J. and Čopíková, J. (2000). Fourier transform near infrared spectroscopy applied to analysis of chocolate. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, 8, 251-257.
- [5] Blazquez, C., Downey, G., O'Donnell, C., O'Callaghan, D. and Howard, V. (2004). Prediction of moisture, fat and inorganic salt in processed cheese by near infrared reflectance spectroscopy and multivariate data analysis. **Journal of Near Infrared Spectroscopy**, 12, 149-157.
- [6] Kesemsurran, S., Thanapase, W. and Kaysoonthon, A. (2007). Fesability of near-infrared spectroscopy to detect and to quantify adulterants in cow milk. **Analytical Science**, 23(7), 907-910.
- [7] Balain, R.M. and Smimov, S.V. (2011). Melamine detection by mid- and near- infrared (MIR/NIR) spectroscopy: A quick and sensitive method for dairy products analysis including liquid milk, infant formula, and milk powder. **Talanta**, 85, 562-568.
- [8] Tsenkova, R., Atanassova, S., Kawano, S. and Toyoda, K. (2001). Somatic cell count determination in cow's milk by near-infrared spectroscopy: a new diagnostic tool. **Journal of Animal Science**, 79, 2500-2557.
- [9] Meilina, H., Kuroki, S., Jinendra, B.M., Ikuta, K. and Tsenkova, R. (2009). Double threshold method for mastitis diagnosis on NIR spectra of raw milk and chemometrics. **Biosystems Engineering**, 4, 243-249.
- [10] AOAC (2000). **Official Methods of Analysis**, 16th edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington. USA
- [11] Chamik-Matusiewicz, B., Murayama, R., Tsenkova, R. and Ozaki, Y. (1999). Analysis of near-infrared spectra of complicated biological fluids by two-dimensional correlation spectroscopy: Protein and fat concentration-dependent spectral changes of milk. **Applied Spectroscopy**, 53, 1582-1594.
- [12] Murayama, R., Chamik-Matusiewicz, B., Wu, Y., Tsenkova, R. and Ozaki, Y. (2000). Comparison between conventional spectral analysis method, chemometrics and two-dimensional correlation spectroscopy in analysis of near-infrared spectra of protein. **Applied Spectroscopy**, 54, 978-985.

Received: 8 June 2016 | Revised: 24 September 2016 | Accepted: 17 October 2016
DOI 10.1111/ffs.12335

ORIGINAL ARTICLE

WILEY | Journal of Food Safety

Method development for the analysis of total bacterial count in raw milk using near-infrared spectroscopy

Sonthaya Numthuan¹ | Jutaporn Hongpathong¹ | Rangsun Charoensook^{1,2} |
Saowaluk Rungchang¹

¹Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Muang, Phitsanulok 65000, Thailand

²Center for Agricultural Biotechnology, Naresuan University, Muang, Phitsanulok 65000, Thailand

Correspondence
Sonthaya Numthuan, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Muang, Phitsanulok 65000, Thailand.
Email: sonthayan@nu.ac.th

Abstract

The possibility use of near-infrared (NIR) spectroscopy in the region of 9000–4000 cm^{-1} to determine total bacterial count (TBC) in raw milk and the influence of bacterial cultivation on TBC prediction accuracy were studied. Raw milk samples were diluted 10-fold with tryptic soy broth and then cultivated at 32 °C for 2 hr. NIR measurements were performed after cultivation times of 30, 60, 90, and 120 min. Partial least squares regression was used to develop calibration models for TBC. The best calibration result was obtained from the 90 min-cultivation samples, with the correlation coefficient (R) of .90 and root mean square error of prediction of .32 $\log_{10}$ CFU/mL. The analysis of the calibration structure indicated that important information for TBC prediction was from chemical compositional changes and bacterial metabolites. The NIR method combined with bacterial cultivation was satisfactory for the rapid analysis of TBC in raw milk.

Practical applications

The number of bacteria in raw milk is an important indicator for hygienic quality and milk grading system which consequently reflects a milk price. The proposed method allows satisfied performance for TBC determination in raw milk in 90 min as compared to the 48 hr required using the plate count method. The NIR method developed in this study seems to be an effective tool for a rapid evaluation of bacterial contamination in raw milk. An integration between determination of milk hygienic quality and chemical compositional quality using NIR spectroscopy will facilitate a rapid and multicomponents analysis and become a powerful tool for a practical use in the competitive dairy industry.

KEYWORDS

raw milk, total bacteria, near-infrared, rapid method, dairy safety

1 | INTRODUCTION

Bacterial contamination of milk causes many problems in the dairy industry. It can cause negative changes in milk by releasing undesirable metabolites and enzymes that degrade milk texture, color, odor, or flavor, and then result in shorter shelf life. High number of contaminated bacteria can also affect quality of milk products. For example, they can decrease the yield and quality of cheese curd and may cause cracks and off-flavors in cheese (Ledenbach and Marshall 2009). Milk and its products may cause serious illnesses in consumers if they contain harmful microorganisms and their toxins (De Reu, Grijspeerd, & Herman 2004; Manna, Maurye, Dutta, & Samanta 2013). Effective

management in the dairy industry includes strict regulation of the number of total bacteria in raw milk, which is used as a basic hygienic indicator (Bava et al. 2011; Dhuol and Osman 2014). Basic hygiene requirements for the total bacterial count (TBC) in milk differ between countries, ranging from 100,000 to 500,000 CFU/mL (European Commission 2004; Draaiyer, Dugdill, Bennett, & Mounsey 2009). The bacterial count is one of an important factor that determines the price of milk; price calculations for fresh milk are based on its quality. Good management of the dairy farm produces milk with TBC less than the standard value, which then receives bonus prices; milk with low hygienic quality receives deducted prices. In Thailand, farmers who produce milk with standard value of TBC, ranging from 400,000 to 500,000

CFU/ml, will earn a basic milk price. The price of premium grade of milk, TBC < 100,000 CFU/ml, increases with a bonus of .50 Baht per 1 kg of milk, while the prices of low quality with TBC higher than 500,000 CFU/ml will be deducted from .20 to .50 Baht per 1 kg of milk. Quality-based pricing systems have thus given rise to intensive tests for milk quality and hygiene in the dairy industry.

The plate count technique is conventionally used in regulatory testing programs to evaluate the hygienic quality of raw milk. However, this analytical method is laborious and time-consuming. Developments in microbiological analysis in the past several decades have led to quantitative techniques that are rapid but complex and expensive and are able to analyze single targets only. These techniques include adenosine triphosphate bioluminescence tests (Larson et al. 2003), flow cytometric method (Bunthof and Abee 2002; McHugh and Tucker 2007), electrochemical techniques (Palenzuela, Simonet, García, Ríos, & Valcárcel 2004; Numthuam, Suthiluk, & Satake 2011), and molecular biotechnology techniques (Ott, Musfeldt, Ullmann, Hampe, & Schreiber 2004; Kim et al. 2015).

Near-infrared (NIR) spectroscopy offers advantages in analysis for being simple and rapid and for being suitable for multicomponent systems. It has been widely used in quality evaluation of many agricultural and food products such as milk and its derivatives. Multiple constituents in milk and dairy products have been determined by NIR (Tsenkova, Atanasova, Itoh, & Toyoda 2000; Blazquez, Downey, O'Donnell, O'Callaghan, & Howard 2004; Oca, Ortiz, Sarabia, Gredilla, & Delgado 2012; Coppa et al. 2014). In the hygienic evaluation of milk, NIR spectroscopy has been used for the determination of the somatic cell count (Pradova et al. 2001; Albanell et al. 2003). Few studies, however, have reported the potential use of NIR spectroscopy in short-wavelength regions (700–1100 nm) in the quantification of total bacteria in milk (Al-Qadiri, Lin, Al-Holy, Cavinato, & Rasco 2008; Saranwong and Kawano 2008). Saranwong and Kawano (2008) pointed out that the important NIR spectral data for TBC determination probably include absorption bands of milk constituents related to bacterial metabolism. Therefore, cultivation of bacteria in nutrient broth before spectral analysis may be beneficial in that it increases useful information used in TBC calibration models. The objective of this study, therefore, was to investigate the feasibility of NIR spectroscopy in terms of simplicity, speed, and accuracy as a method for the determination of the basic hygienic quality of raw milk. We aimed to develop the calibration of TBC values using a long-wavelength region (1100–2500 nm; wave-number range of 9000–4000 cm^{-1}). The influence of bacterial cultivation on the performance of the calibration models was studied. The effects of pathlength and cultivation period on the prediction efficiency were also examined.

2 | MATERIALS AND METHODS

The study consists of two experiments. First, we studied the effect of pathlength on the ability of NIR spectroscopy in transmittance mode to determine the TBC, since an optimal pathlength enables acquisition of spectra at high signal-to-noise ratio (Jensen and Bak 2002). Next,

we cultivated bacteria in liquid medium in order to allow for their metabolism before the NIR measurement.

2.1 | Experiment 1: effect of pathlength on the performance of TBC calibrations

2.1.1 | Sample preparation

Raw milk was collected from individual milking cows in a local dairy farm in Sukhothai Province, Thailand. It was stored in crushed ice and then transported to the laboratory at Naresuan University, Phitsanulok Province, Thailand, within 2 hr after milking. It was then aseptically prepared by dividing it among sterile capped glass test tubes (20(2) × 125(H) mm) and incubated at 32 °C for different periods to mimic different levels of bacterial contamination of raw milk samples. The raw milk samples were divided into two portions, one for NIR measurement and the other for microbiological testing for reference.

2.1.2 | NIR spectral acquisition

An MPA Fourier transform NIR spectrometer (Bruker Optics, Ettlingen, Germany) equipped with an integrating sphere and an InGaAs detector was used. The NIR spectrum of each raw milk sample was acquired in transmittance mode at 8 cm^{-1} spectral resolution with a background of 32 scans. Two aluminium reflectors with optical pathlengths of .1 and 1.0 mm were used for reflecting NIR light back to the detector. Prior to the NIR measurement, all milk samples were held at 32 °C for exactly 30 min to avoid spectral changes caused by temperature changes (Al-Qadiri et al. 2008). One milliliter of each milk sample was placed in a glass sample cell (22(2) × 40(H) mm), and the aluminium reflector was immediately immersed in the sample for the spectral acquisition. The reflector was washed with autoclaved distilled water and sanitized with 70% ethanol before use in the next scan.

2.1.3 | Data analysis

NIR spectral data within the range of 9000–4000 cm^{-1} were analyzed by using OPUS version 7.2 software (Bruker Optics). Spectral pretreatment through standard normal variate normalization method was done to reduce multiplicative interferences of scatter and particle size in the spectral scan (Barnes, Dhanoa, & Lister 1989). Calibration models were established by partial-least-squares (PLS) regression to obtain the fundamental relation between the spectral data and reference TBC values. Latent variables (factors) of the PLS models were determined by leave-one-out cross validation. The performance and predictive ability of the PLS models were evaluated from their correlation coefficient (*R*) and root-mean-square error of cross validation (RMSECV).

2.2 | Experiment 2: effect of bacterial cultivation on the performance of TBC calibrations

2.2.1 | Sample preparation

Raw milk samples with different amounts of bacteria prepared similarly to those in Experiment 1 were diluted tenfold with sterile tryptic soy broth (TSB; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) to equalize

TABLE 1 Characteristics of calibration and validation sample sets used for establishment of calibration models for total bacterial count determination in raw milk

Items	Raw milk (30 min)		10% milk (30 min)		10% milk (60 min)		10% milk (90 min)		10% milk (120 min)	
	Cal.	Val.	Cal.	Val.	Cal.	Val.	Cal.	Val.	Cal.	Val.
Minimum	3.14	3.22	3.14	3.22	3.14	3.22	3.14	3.22	3.14	3.22
Maximum	6.42	5.79	6.42	6.16	6.20	6.16	6.42	6.16	6.42	6.16
Average	4.58	4.50	4.60	4.57	4.56	4.53	4.60	4.57	4.58	4.57
Standard deviation	.74	.64	.77	.69	.73	.67	.77	.69	.74	.69
No. of sample	49	24	50	25	49	24	50	25	49	25

Abbreviations: Cal., calibration set; Val., validation set; Unit, log₁₀ CFU/ml.

the starting nutrient matrix values among samples. Bacteria residing in 10% raw milk were then cultivated at 32 °C in a shaking water bath. We allowed the bacteria to metabolize for 30, 60, 90, and 120 min and then obtained the NIR spectra of the samples for each cultivation period.

2.2.2 | NIR spectral acquisition

To obtain spectral data containing information for the bacterial metabolic activity, NIR measurements were performed by scanning the 1 ml milk samples after cultivation times of 30, 60, 90, and 120 min. The instrument specification and measuring conditions were the same as those for Experiment 1. The aluminium reflector with optical pathlength of .1 mm was used in this experiment.

2.2.3 | Data analysis

Software and spectral preprocessing method identical to those in Experiment 1 were used. PLS calibration for TBC was performed by using the calibration set of samples to determine latent variables. The data were divided into sets of 50 calibration samples and 25 validation samples. One or two outliers were dropped to eliminate observation data at the extremes. Characteristics of calibration and validation sample sets are presented in Table 1. The performance and predictive ability of the PLS models were evaluated from the *R* value and the root-mean-square error of prediction (RMSEP).

2.4 | Microbiological analysis

Standard plate count method, according to the American Public Health Association (1993) was used to quantify total bacteria in the raw milk samples. Serial dilutions were made by adding 1 ml of raw milk to 9 ml of buffered peptone water (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Subsequently, 1 ml of the diluted raw milk was plated in duplicate into prepared plate count agar (Merck KGaA) through the pour plate technique. After setting, plates were inverted in an incubator at 32 °C for 48 hr. Visible colonies were then counted and used as reference values for the NIR calculation. The TBC was recorded in log₁₀ CFU/ml.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Experiment 1: effect of pathlength on the performance of TBC calibrations

We used 45 raw milk samples in this experiment. TBCs of the milk samples to be used for the calibration models varied from 3.22 to 5.86 log₁₀ CFU/ml, which was comparable to the bacterial level specified in the milk payment system in Thailand. Original spectra of raw milk samples obtained at optical pathlengths of .1 and 1.0 mm are shown in Figure 1. Clearly, the overall absorption intensity of spectra of milk at

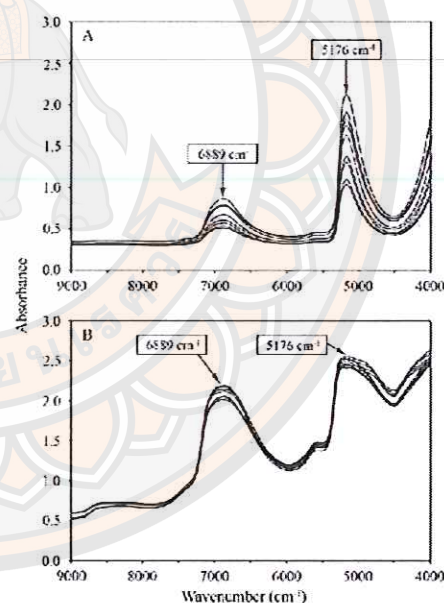
**FIGURE 1** NIR spectra of raw milk samples measured with pathlength of .1 mm (A) 1.0 mm (B)

TABLE 2 PLS calibration and validation results for TBC values of raw milk samples measured with different pathlengths

Pathlength	Factor	R	RMSEC	RMSECV	Bias	Region (cm ⁻¹)
1.0 mm	4	.71	.43	.49	.001	7552–6094, 4605–4243
.1 mm	8	.87	.33	.43	-.012	7506–6094, 4605–4243

Abbreviations: R, correlation coefficient; RMSEC, root-mean-square error of calibration; RMSECV, root-mean-square error of cross validation; Bias, the average of difference between reference value and NIR value.

1.0 mm pathlength is stronger than that of milk spectra at .1 mm pathlength because the pathlength of the former is longer. There are two strong bands centered at 6889 and 5176 cm⁻¹ corresponding to water absorption. Absorption bands of other milk constituents such as protein, lactose, and bacterial itself are relatively weak in comparison with the water band and are thus difficult to discern in the spectra (Tsenkova, Atanasova, Itoh, & Toyoda 2000; Woo, Terazawa, Chen, Terada, & Kawano 2002). Spectral noise could be observed at around 5200–4000 cm⁻¹ at a pathlength of 1.0 mm. This may be due to the substantial effect of the pathlength on the spectral quality of aqueous samples and its strong influence on the signal-to-noise ratio (Segtnan and Isaksson 2000; Jensen and Bak 2002). Table 2 shows the PLS results for the TBCs computed from the spectra collected at .1 and 1.0 mm pathlengths. The shorter pathlength seemed to be appropriate for the determination of the TBC of milk, with $R = .89$ and $RMSECV = .43$ log₁₀ CFU/ml. As a result, a pathlength .1 mm was used for the NIR measurement in the next experiment.

3.2 | Experiment 2: effect of bacterial cultivation on the performance of TBC calibrations

In this experiment, we focused on the potential use of the data associated with bacterial metabolic activity in predicting the performance of TBC calibration. Since the composition of raw milk normally varies among cows, we diluted raw milk 10-fold in tryptic soy broth, assuming that dilution reduces the variation of nutrients in each sample and facilitates spectral information changes in accordance with the number of bacteria. The milk bacteria were incubated for 2 hr because it was an effective duration that allows detection of changes in essential constituents necessary for bacterial growth, such as glucose and oxygen (Palenzuela, Simón, García, Ríos, & Vekárce 2004; Numthuam et al. 2009; Numthuam, Sutthiluk, & Satake 2011). Characteristic absorption bands of the 10% milk sample are similar to those of raw milk obtained at .1 mm

pathlength (spectra not shown). Table 3 shows calibration and validation results for TBC determination using spectra of the 10% milk sample incubated for different periods (30, 60, 90, and 120 min) and of the raw milk sample incubated for 30 min. The spectra of raw milk provided superior PLS calibration results in terms of validation errors (RMSEP) over those obtained with 10% milk samples incubated at various times, except the sample incubated for 90 min. The best PLS results for the determination of TBC obtained from the 90 min-cultivation samples have an R value of .90 and RMSEP of .32 log₁₀ CFU/ml. Figure 2 illustrates the relation between the reference TBC values and the TBC predicted by NIR regression. The promising prediction based on use of the raw milk samples was probably from the primary changes in milk compositions caused by bacteria. The poor predictive capability of using the 10% milk sample incubated for 30 min was believed to be caused by loss of information due to bacteria after the dilution. Increasing the incubation period could enhance the performance of determination, with 90 min resulting in the best performance. The time for doubling required by common bacteria in raw milk, such as *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus* sp., varies from about 20 to 80 min under optimal conditions (Walstra, Wouters, & Geurts 2006). Thus, cultivation for 90 min may allow cell division for almost all bacterial population; in particular, a dominant population of *Lactobacillus* sp. with generation time of 60–80 min, might provide bacteria-related information necessary for establishing the calibration model. This hypothesis could be supported by the regression coefficient plots in Figure 3. The complexity of the calibration structures, that is, the presence of many strong peaks, may be due to changes in metabolites and carbon sources of bacteria (Saranwong and Kawano 2008). Spectral regions used for the TBC calibrations between each sample type differ and partially overlap. Similar regions between 7506–6094 and 5454–4598 cm⁻¹ were used to compute PLS models of the 10% milk samples cultivated for all periods. The regions from 5050–4830 cm⁻¹ are dominated by N-H absorption bands of proteins

TABLE 3 PLS calibration and validation results for TBC values of raw milk and 10% milk samples incubated for different times

Sample	Factor	R	RMSEC	RMSEP	Bias	Region (cm ⁻¹)
Raw milk-30 min	9	.84	.41	.40	-.060	7506–5446, 4605–4420
10% milk-30 min	6	.86	.38	.57	-.150	7506–6094, 5454–4598
10% milk-60 min	7	.87	.34	.44	.088	7506–6094
10% milk-90 min	10	.90	.39	.32	.049	9002–7498, 5445–4243
10% milk-120 min	8	.85	.36	.48	.075	7506–6094, 5030–4598

Abbreviations: R, correlation coefficient; RMSEC, root-mean-square error of calibration; RMSEP, root-mean-square error of prediction; Bias, the average of difference between reference value and NIR value.

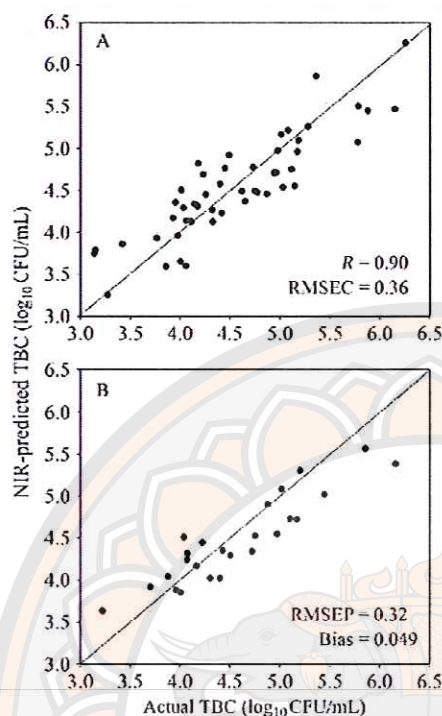


FIGURE 2 Scatter plots between actual and NIR-predicted values of total bacteria in calibration set (A) and validation set (B) of the 90 min-cultivation samples

(Tsenkova, Atanassova, Itoh, & Toyoda 2000; Tsenkova, Atanassova, Kawano, & Toyoda 2001) that may be related to the high protein source in TSB. Water absorption seemed to be an important predictor of TBC in foods (Suthluk, Saranwong, Kawano, Numthuan, & Satake, 2008;

Saranwong and Kawano 2008; Feng and Sun 2013), as can be observed at $7575\text{--}6666\text{ cm}^{-1}$. The dominant water band at approximately 5176 cm^{-1} may also be found in the original spectra. Interestingly, the $9000\text{--}7500\text{ cm}^{-1}$ region became observable in the calibration structure of the 90th min samples, indicating vital information for the prediction of bacterial amount. High coefficients for this region for the 90th min samples may be a result of the effect of bacterial generation time explained earlier: that is, the change in levels of metabolism-associated compounds at 90 min to the proportion corresponding to the initial number of bacteria in raw milk. The peaks at 8392 , 8326 , 8260 , and 8215 cm^{-1} may indicate changes in constituents and metabolites, namely, water, amides, and amino acids (Williams and Norris 2001; Feng and Sun 2013). The observed peaks at 4756 , 4381 , and 4293 cm^{-1} may be related to glucose (Malin, Ruchti, Blank, Thennadi, & Monfre 1999), which is a major carbon source in TSB. The peaks at 4992 and 4568 cm^{-1} indicated absorbance by urea and protein, wastes from bacterial metabolism (Tsenkova, Atanassova, Kawano, & Toyoda 2001). Divergent region of $6060\text{--}5500\text{ cm}^{-1}$ was observed in the calibration structure of the raw milk samples that could be related to the milk water content (Coppa et al. 2014), suggesting the significance of water absorption for TBC prediction using raw-milk NIR spectra (Saranwong and Kawano 2008).

4 | CONCLUSION

NIR spectroscopy in the long-wavelength region ($9000\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$) combined with bacterial cultivation was possible to predict the TBC of contaminated raw milk. A 1 mm pathlength was appropriate for spectral acquisition of milk samples in transmittance mode. The cultivation of milk bacteria in tryptic soy broth for 90 min before the NIR measurement could improve the TBC prediction accuracy. The spectral region of $9000\text{--}7500\text{ cm}^{-1}$ contains vital information for predicting the bacterial count of raw milk. The calibration structure of the best model suggested that information on chemical compositional changes and bacterial metabolites may be used. The developed method seems to be an effective tool for determining TBC for bacteria incubated for 90 min; in contrast, 24–48 hr is required by the plate count method. The repeatability and reproducibility of this method should be checked

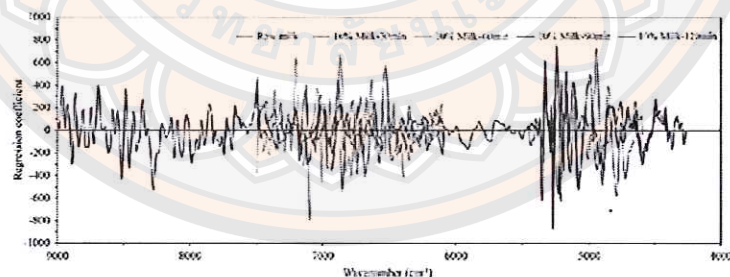


FIGURE 3 The regression coefficient plots of calibration models for TBC determination using spectra of raw milk (blue line), and 10% milk incubated for 30 min (red line), 60 min (orange line), 90 min (black line), and 120 min (green line)

with a large sample size and further developed into a practical and stable system for evaluation of the basic hygienic quality of raw milk.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was conducted as part of the project entitled "Development of rapid method for hygienic quality determination of raw milk using near infrared spectroscopy," funded by Naresuan University Research Fund In Science and Technology (No. R2557C012).

REFERENCES

- Albanell, E., Caja, G., Such, X., Rovai, M., Salama, A. A., & Casals, R. (2003). Determination of fat, protein, casein, total solids, and somatic cell count in goat's milk by near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of AOAC International*, 86, 746–752.
- Al-Qadiri, H. M., Lin, M., Al-Holy, M. A., Cavinato, A. G., & Rasco, B. A. (2008). Monitoring quality loss of pasteurized skim milk using visible and short wavelength near-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Dairy Science*, 91, 950–958.
- American Public Health Association. (1993). *Standard methods for the examination of dairy products* (16th ed). Washington, DC: American Public Health Association.
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., & Lister, S. J. (1989). Standard normal variate transformation and de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, 43, 772–777.
- Bava, L., Zucali, M., Sandrucci, A., Brasca, M., Vanoni, L., Zanini, L., & Tamburini, A. (2011). Effect of cleaning procedure and hygienic condition of milking equipment on bacterial count of bulk tank milk. *Journal of Dairy Research*, 78, 211–219.
- Blázquez, C., Downey, G., O'Donnell, C., O'Callaghan, D., & Howard, V. (2004). Prediction of moisture, fat and inorganic salts in processed cheese by near infrared reflectance spectroscopy and multivariate data analysis. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 12, 149–157.
- Bunthof, C. J., & Abee, T. (2002). Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 2934–2942.
- Coppa, M., Revello-Chion, A., Giaccone, D., Ferlay, A., Tabacco, E., & Borresini, G. (2014). Comparison of near and medium infrared spectroscopy to predict fatty acid composition on fresh and thawed milk. *Food Chemistry*, 150, 49–57.
- De Reu, K., Grijspeerd, K., & Herman, L. (2004). A Belgian survey of hygiene indicator bacteria and pathogenic bacteria in raw milk and direct marketing of raw milk farm products. *Journal of Food Safety*, 24, 17–36.
- Dhuol, K. R. R., & Osman, A. M. (2014). Study on total bacteria count of raw milk produced in the farm of the college of Veterinary Medicine and Animal Production - Sudan University of Science and Technology. *International Journal of Current Research and Academic Review*, 2, 1–06.
- Draayer, J., Dugdill, B., Bennett, A., & Mounsey, J. (2009). *Milk testing and payment systems: resource book: a practical guide to assist milk producer groups*. Rome: Animal Production and Health Division, FAO.
- European Commission. (2004). Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of The Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L 139 of 30 April 2004.
- Feng, Y.-Z., & Sun, D.-W. (2013). Determination of total viable count (TVC) in chicken breast filets by near-infrared hyperspectral imaging and spectroscopic transforms. *Talanta*, 105, 244–249.
- Jensen, P. S., & Bak, J. (2002). Near-Infrared transmission spectroscopy of aqueous solutions: Influence of optical pathlength on signal-to-noise ratio. *Applied Spectroscopy*, 56, 1600–1604.
- Kim, D.-H., Chon, J.-W., Kim, H., Kim, H.-S., Choi, D., Hwang, D.-G., & Seo, K.-H. (2015). Detection and enumeration of lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeast in kefir grain and milk using quantitative real-time PCR. *Journal of Food Safety*, 35, 102–107.
- Larson, E. L., Aiello, A., Gomez-Duarte, C., Lin, S. X., Lee, L., Della-Latta, P., & Lindhardt, C. (2003). Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate marker for microbial load on hands and surfaces in the home. *Food Microbiology*, 20, 735–739.
- Ledenbach, L. H., & Marshall, R. T. (2009). Microbiological spoilage of dairy products. In: W. H. Sperber and M. P. Doyle (Eds.) *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*. (pp. 41–67). New York: Springer Science+Business Media.
- Malin, S. F., Ruchti, T. L., Blank, T. B., Thennadil, S. N., & Monfre, S. L. (1999). Noninvasive prediction of glucose by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Clinical Chemistry*, 45, 1651–1658.
- Manna, S. K., Maurye, P., Dutta, C., & Samanta, G. (2013). Occurrence and virulence characteristics of *Aeromonas* species in meat, milk and fish in India. *J. Food Safety*, 33, 461–469.
- McHugh, I. O., & Tucker, A. L. (2007). Flow cytometry for the rapid detection of bacteria in cell culture production medium. *Cytometry A*, 71, 1019–1026.
- Numthum, S., Suthiluk, P., & Satake, T. (2011). Potential use of oxygen electrode for rapid determination of bacterial contamination in foods. *Journal of Food Safety*, 31, 219–224.
- Numthum, S., Suzuki, H., Fukuda, J., Suthiluk, P., Rungchang, S., & Satake, T. (2009). Rapid measurement and prediction of bacterial contamination in milk using an oxygen electrode. *Foodborne Pathogens Disease*, 6, 187–192.
- Oca, M. L., Ortiz, M. C., Sarabia, L. A., Gredilla, A. E., & Delgado, D. (2012). Prediction of Zamorano cheese quality by near-infrared spectroscopy assessing false non-compliance and false compliance at minimum permitted limits stated by designation of origin regulations. *Talanta*, 99, 558–565.
- Ott, S. J., Musfeldt, M., Ullmann, U., Hampe, J., & Schreiber, S. (2004). Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 2566–2572.
- Palenzuela, B., Simonet, B. M., García, R. M., Ríos, A., & Valcárcel, M. (2004). Amperometric screening of bacterial food contamination using a composite modified electrode. *Analytica Chimica Acta*, 524, 167–174.
- Pravdova, V., Wolczak, B., Massart, D. L., Kawano, S., Toyoda, K., & Tsenkova, R. (2001). Calibration of somatic cell count in milk based on near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 450, 131–141.
- Saranwong, S., & Kawano, S. (2008). System design for non-destructive near infrared analyses of chemical components and total aerobic bacteria count of raw milk. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 16, 389–398.
- Segtnan, V. H., & Isaksson, T. (2000). Evaluating near infrared techniques for quantitative analysis of carbohydrates in fruit juice model systems. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 8, 109–116.
- Suthiluk, P., Saranwong, S., Kawano, S., Numthum, S., & Satake, T. (2008). Possibility of using near infrared spectroscopy for evaluation of bacterial contamination in shredded cabbage. *International Journal of Food Science Technology*, 43, 160–165.
- Tsenkova, R., Atanassova, S., Itoh, K., & Toyoda, K. (2000). Near infrared spectroscopy for biomonitoring Cow milk composition measurement

- in a spectral region from 1,100 to 2,400 nanometers. *Journal of Animal Science*, 78, 515–522.
- Tserkova, R., Alanassova, S., Kawano, S., & Toyoda, K. (2001). Somatic cell count determination in cow's milk by near-infrared spectroscopy: a new diagnostic tool. *Journal of Animal Science*, 79, 2550–2557.
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. 2006. *Dairy technology: principles of milk properties and processes* (2nd ed., pp. 517–521). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Williams, P., & Norris, K. 2001. *Near infrared technology in the agricultural and food industries* (2nd ed., pp. 19–37). St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists.
- Woo, Y. -A., Terazawa, Y., Chen, J. U., Terada, F., & Kawano, S. (2002). Development of a new measurement unit (MilkSpec-1) for rapid determination of fat, lactose, and protein in raw milk using Near-Infrared transmittance spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 56, 599–604.

