ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (Stool and Blanchard, 1990)

1.1 สารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M citrate buffer)

สารละลาย A : สารละลายกรดซิตริก 0.1 โมลาร์ (กรดซิตริก 21.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : สารละลายโซเดียมซิเตรต 0.1 โมลาร์ (โซเดียมซิเตรต 29.41 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ ดังตาราง

pH	0.1 M citric acid (ml)	0.1 M tri-sodium citrate(ml)
3.0	82.0	18.0
3.2	77.5	22.5
3.4	73.0	27.0
3.6	68.5	31.5
3.8	63.5	36.5
4.0	59.0	41.0
4.2	54.0	46.0
4.4	49.5	50.5
4.6	44.5	55.5
4.8	40.0	60.0
5.0	35.0	65.0
5.2	30.5	69.5
5.4	25.5	74.5
5.6	21.0	79.0
5.8	16.0	84.0
6.0	11.5	88.5
6.2	8.0	92.0

1.2 สารละลายอะซิเตต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M acetat buffer)

สารละลาย A : สารละลายกรดอะซิติก 0.2 โมลาร์ (กรดอะซิติก 11.55 มล.ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : สารละลายโซเดียมอะซิเตต 0.2 โมลาร์ (โซเดียมอะซิเตต 27.22 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ ดังตาราง ปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

pH	0.2 M acetic acid (ml)	0.2 M sodium acetate (ml)
3.6	46.3	3.7
3.8	44.0	6.0
4.0	41.0	9.0
4.2	36.8	13.2
4.4	30.5	19.5
4.6	25.5	24.5
4.8	20.0	30.0
5.0	14.8	35.2
5.2	10.5	39.5
5.4	8.8	41.2
5.6	4.8	45.2

1.3 สารละลายทริส-มาลิเอท บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M tris-maleate buffer)

สารละลาย A : สารละลายกรดทริส-มาลิเอท 0.2 โมลาร์ (tris acid maleate) (tris (hydroxymethyl) aminomethane 24.2 กรัม + กรดมาลิอิก(maleic acid) 23.2 กรัม หรือ maleic anhydride 19.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.2 โมลาร์ (0.2 M NaOH)

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 50 มล. และสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ ปรับปริมาตรเป็น 200 มล. ด้วยน้ำกลั่น

pH	0.1 M tris-maleate (ml)
5.2	7.0
5.4	10.8
5.6	15.5
5.8	20.5
6.0	26.0
6.2	31.5
6.4	37.0
6.6	42.5
6.8	45.0
7.0	48.0
7.2	51.0
7.4	54.0
7.6	58.0
7.8	63.5
8.0	69.0
8.2	75.0
8.4	81.0
8.6	86.5

1.4 สารละลาย McIlvaine บัฟเฟอร์ หรือ ซิเตรต-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M citrate phosphate buffer)

สารละลาย A : สารละลายกรดซิตริก 0.1 โมลาร์ (กรดซิตริก 19.21 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : สารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ (Na_2HPO_4, $7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ Na_2HPO_4, $12H_2O$ 71.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย Aและ B ตามพีเอชที่ต้องการ ดังตารางปรับปริมาตรเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

pH	0.1 M citric acid (ml)	0.2 M sodium phosphate (ml)
2.6	44.6	5.4
3.0	39.8	10.2
3.4	35.9	14.1
3.8	32.3	17.7
4.2	29.4	20.6
4.6	26.7	23.3
5.0	24.32	25.7
5.4	22.2	27.8
5.8	19.7	30.3
6.2	16.9	33.1
6.6	13.6	36.4
7.0	6.5	43.6

1.5 สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (0.1 M phosphate buffer)

สารละลาย A : สารละลายโมโน โซเดียมฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ (monobasic sodium phosphate) ละลายโมโนโซเดียมฟอสเฟต 27.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

สารละลาย B : สารละลายไดโซเดียมฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ (ละลาย Na_2HPO_4, $7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ Na_2HPO_4, $12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น เป็น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย Aและ B ตามพีเอชที่ต้องการ ดังตารางปรับปริมาตรเป็น 200 มล. ด้วยน้ำกลั่น

pH	0.2 M monosodium phosphate (ml)	0.2 M di-sodium phosphate(ml)
5.7	93.5	6.5
5.9	90.0	10.0
6.0	87.7	12.3
6.1	85.0	15.0
6.2	81.5	18.5
6.3	77.5	22.5
6.4	73.5	26.5
6.5	68.5	31.5
6.6	62.5	37.5
6.7	56.5	43.5
6.8	51.0	49.0
6.9	45.0	55.0
7.0	39.0	61.0
7.1	33.0	67.0
7.2	28.0	72.0
7.3	23.0	77.0
7.4	19.0	81.0
7.5	16.0	84.0
7.6	13.0	87.0
7.7	10.5	90.5
7.8	8.5	91.5
8.0	5.3	94.7

2. เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ตารางภาคผนวก 1 การเปลี่ยนความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

Ammonium sulfate concentration conversion table

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (วรรณา ชูฤทธิ์, สุกัญญา จันทะชุม, นัยทัศน์ ภู่ศรันย์ และ อรัญ หันพงศ์กิตติกูล. 2539)

1.1 อาหาร De man Rogusa Sharpe (MRS)

Proteose peptone No. 3	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.1	กรัม
Manganese sulfate ($MnSO_4 4H_2O$)	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มล.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมโดยใช้ความร้อน (ยกเว้น agar) ปรับพีเอชให้ได้ 6.5 ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 6 นอร์มอล และ กรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มอล จึงใส่วุ้นลงไป หลอมให้ละลายด้วยความร้อน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที

1.2 อาหาร Lauryl Sulfate Tryptone (LST) Broth (single strength medium)

Tryptone	20.0	กรัม
Lactose	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	2.75	กรัม
Potassium di-hydrogent phosphate (KH_2PO_4)	2.75	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Sodium lauryl sulphate	0.1	กรัม
Distilled water	1000.0	มล.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันโดยใช้ความร้อน ปรับพีเอชให้ได้ 6.8 ฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว 15 นาที

1.3 อาหาร EC (EC) broth

Pancreatic digest of casein	20.0	กรัม
Bile salt mixture or Bile salts No.3	1.5	กรัม
Lactose	5.0	กรัม
Dipototassium phosphate	4.0	กรัม
Potassium phosphate	1.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มล.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปรับพีเอชเป็น 6.9$\pm$0.2 ถ่ายอาหารใส่หลอดปริมาตร 8 มล.ต่อหลอด ภายในหลอดบรรจุอาหารใส่ durham tube ด้วย นำอาหารนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

1.4 อาหาร Plate Count Agar (PCA)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15	กรัม
pH	7.1±0.1	

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1ลิตร คนให้เข้ากัน ต้มจนสารละลายเดือด นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.5 อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15	กรัม

วิธีเตรียม

- มันฝรั่งปอกเปลือกออกให้หมด ชั่งน้ำหนักประมาณ 200 กรัม ล้างน้ำให้สะอาด
- หั่นมันฝรั่งให้เป็นชิ้นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 6 มล. พยายามหั่นให้ได้ขนาดเท่า ๆ กัน
- ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่นปริมาตร 400 มล. เมื่อน้ำเดือดให้หรี่ไฟและต้มต่อไปจนมันฝรั่งสุก กรองเอาส่วนน้ำมันฝรั่งและเติมน้ำกลั่นประมาณ 500 มล. เติมวุ้นและน้ำตาลเด็กโตส ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยการต้มให้เดือด ปรับปริมาตรอาหาร PDA ให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

1.6 อาหาร Baird Parker Agar (BPA)

Tryptone	10.0	กรัม
Meat extract	5.0	กรัม
Yeast extract	1.0	กรัม
Lithium chloride	5.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มล.

วิธีเตรียม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้เข้ากันต้มจนสารละลายเดือด ปรับพีเอชให้ได้ 6.8 แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 90 มล. นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมสารละลายต่อไปนี้ ซึ่งสารเหล่านี้ฆ่าเชื้อโดยการกรองผ่านเครื่องกรองบักเตรี

Glycine 20 %	6.3	มล.
Potassium tellurite 1%	1.0	มล.
Sodium pyruvate 20%	5.0	มล.
Egg Yolk emulsion *	5.0	มล.

*เมื่อผสมแล้วต้องใช้ทันที

วิธีเตรียม Egg Yolk emulsion

ล้างไข่ให้สะอาด แช่ใน เมอคิวริก คลอไรด์ (mercuric chloride) ร้อยละ 0.1 เจาะไข่ด้านป้านเพื่อเอาไข่ขาวออกให้หมด เทไข่แดงใส่ กระบอกตวงที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปให้เท่ากับปริมาตรของไข่แดง ใช้ปิเปตคนให้เป็นเนื้อเดียวกัน

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry (Lowry, 1951)

สารเคมี

1. สารละลาย A: คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSo_4$ $5H_2O$) ร้อยละ 1

2.สารละลาย B:โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต(sodium potassium tartrate) ร้อยละ 1

3. สารละลาย C:โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2co_3) ร้อยละ 2 ใน สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์

4. สารละลาย D: นำสารละลาย Folin ciocalteu reagent มาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น (1:1) ก่อนใช้

วิธีการ

1. เตรียมสารละลาย E โดยผสมสารละลาย A: สารละลาย B: สารละลาย C ในอัตราส่วน 1:1:98 (ปริมาตร : ปริมาตร : ปริมาตร) เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้

2.ใช้สารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน (โดยมีค่าโปรตีนไม่เกิน 0.5 มก.) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

3. ปิเปตสารละลาย E จำนวน 2.5 มล. ผสมให้เข้ากันตั้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

4. ปิเปตสารละลาย C จำนวน 0.25 มล. ลงในสารละลายผสมข้อ 3 ผสมให้เข้ากันตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

5. นำสารละลายไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตรโดยใช้ sample buffer เป็น blank ทำตามข้อ 1-4 และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้โบวินซีรัมอัลบูมิน เป็นโปรตีนมาตรฐาน

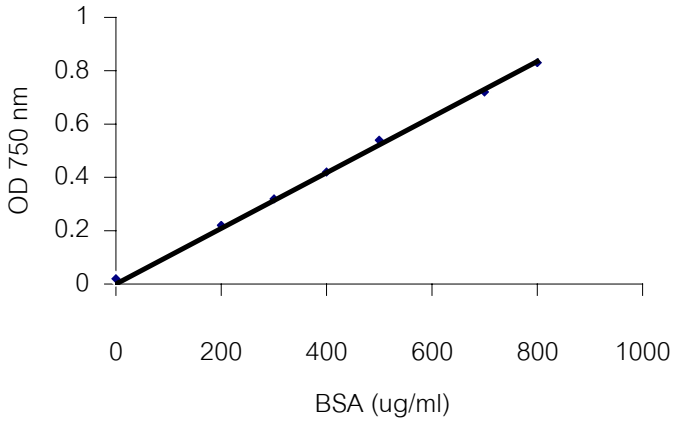
การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน BSA

1. ละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.จะได้ stock solution มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มล.

2. เจือจางสารละลายโบวินซีรัมอัลบูมิน ให้ได้ความเข้มข้น 0 50 100 150 200 250 300 350 และ 400 ไมโครกรัม/มล. มาปรับปริมาตรของแต่ละหลอดให้ได้ 10 มล. ด้วย sample buffer

3. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของแต่ละความเข้มข้นตามวิธี ข้อ 3-5

4. นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของโบวินซีรัมอัลบูมิน กราฟมาตรฐานโปรตีนโบวินซีรัมอัลบูมินที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร



$R^2 = 0.9979$

$Y = 0.001X$

ภาพภาคผนวก 1 กราฟมาตรฐานโบวินซีรัมอัลบูมิน ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

Standard curve of bovine serum albumin (BSA) at OD 750 nm

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Bradfort (Bradfort, 1976)

สารเคมี

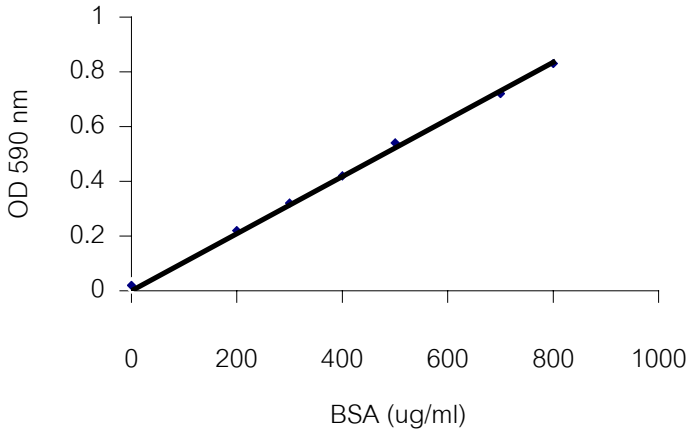
Dye reagent: ละลาย coomassie Brilliant Blue G 250 จำนวน 0.1 กรัม ในเอทานอล ร้อยละ 95 ปริมาตร 50 มล. และกรดฟอสฟอริก ร้อยละ85 ปริมาตร 100 มล. ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

วิธีการ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 40 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Dye reagent ปริมาตร 2 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

2. นำสารละลายวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

3. นำสารละลายไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 590 นาโนเมตร โดยใช้ Sample buffer เป็น blank ทำตามข้อ 1 และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้โบวินซีรัมอัลบูมิน เป็นโปรตีนมาตรฐาน



$R^2 = 0.9847$

$Y = 0.009X$

ภาพภาคผนวก 2 กราฟมาตรฐานโบวินซีรัมอัลบูมิน ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

Standard curve of bovine serum albumin (BSA) at OD 590 nm

2. การทดสอบกิจกรรมย่อยสลายโปรตีน (proteolytic activity) ในเอนไซม์และสารสกัดเอนไซม์จากพืช Anson (Narahara *et al.*,1982 อ้างโดย Chen *et al.*, 1998)

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมเคซีนเนท (Na-caseinate) เตรียมได้จากละลายโซเดียมเคซีนเนท 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล. กวนเบา ๆ ให้โซเดียมเคซีเนทละลาย จะได้สารละลายสีขาวขุ่น

2. ละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น (trichloroacetic acid,MW.163.39) 0.4 โมลาร์ เตรียมได้จากละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 65.36 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

3. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (Na_2CO_3 MW. 105.99) เตรียมได้จากละลายโซเดียมคาร์บอเนต 52.99 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

4. สารละลาย McIlvaine บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.5 (ภาคผนวก ก)

5. สารละลาย Folin ciocalteu reagent ทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่น (1:1) ก่อนใช้

วิธีการ

1. ปิเปตสารสกัดเอนไซม์ 0.5 มล. ลงในสารละลายผสม (สารละลายเคซีนร้อยละ 1 ปริมาตร 1.5 มล.และ McIlvaine บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.5 ปริมาตร 1 มล.) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. ปิเปตสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก เข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 3 มล. ลงในสารละลายผสมจากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบ/วินาที 5 นาที

3. ปิเปตส่วนใสที่ได้ปริมาตร 1 มล. ผสมกับสารละลาย Folin reagent ปริมาตร 1 มล. และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร

หนึ่งหน่วยของกิจกรรมย่อยสลายโปรตีน (ยูนิต) คือปริมาตรเอนไซม์ที่ทำให้เกิดสี เท่ากับ ไทโรซิน 1 ไมโครกรัม/ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่กำหนด

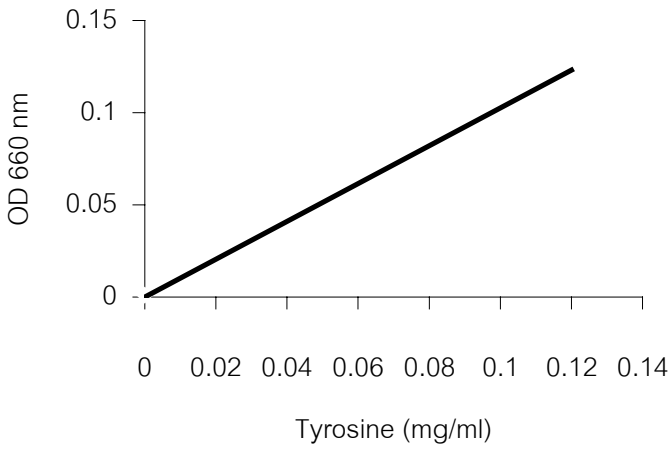
การเตรียมกราฟมาตรฐานไทโรซิน

1. ละลายไทโรซิน 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มล.จะได้ stock solution มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม/มล.

2. เจือจางสารละลายไทโรซิน (stock solution) ให้ได้ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 100 และ 120 ไมโครกรัม/มล. มาปรับปริมาตรของแต่ละหลอดให้ได้ 1000 ไมโครลิตร ด้วย sample buffer

3. วิเคราะห์ปริมาณไทโรซินของแต่ละความเข้มข้นดังวิธีการในข้อ 3

4. นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของไทโรซิน



$R^2 = 0.9917$

$Y = 1.0253X$

ภาพภาคผนวก 3 กราฟมาตรฐานไทโรซิน ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

Standard curve of tyrosine at OD 660 nm

3. การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด

3.1 การตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด

3.1.1 การวิเคราะห์ความชื้น ด้วยวิธี Gravimetric (AOAC, 1999)

วิธีการ

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. กระทำซ้ำเช่นข้อ 1 จนได้ผลแตกต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มก.

3. สำหรับตัวอย่างน้ำนม ปิเปตตัวอย่างน้ำนมที่ผสมเข้ากันดี 3 มล. ปิดฝาและชั่งน้ำหนัก นำภาชนะหาความชื้นที่ไม่มีฝาวางในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (100 องศาเซลเซียส) นาน 30 นาที นำไปอบในตู้อบ (105 องศาเซลเซียส) นาน 2 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักถ้วยหาความชื้น นำถ้วยหาความชื้นกลับไปอบต่ออีก 1 ชั่วโมง และนำไปทำให้ภาชนะหาความชื้นเย็นในโถดูดความชื้น กระทำซ้ำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งไม่เกิน 1-3 มก.

4. สำหรับตัวอย่างตะกอนโปรตีนและเนยแข็ง สุ่มตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วชั่งน้ำหนักให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-3 มก. ลงในภาชนะหาความชื้น นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าอุณหภูมิ (105 องศาเซลเซียส) นาน 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่าง จากนั้นนำกลับไปเข้าตู้อบอีก และกระทำซ้ำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งไม่เกิน 1-3 มก.

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

3.1.2 **การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน** ด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 1999)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น

2. สารเร่งปฏิกิริยา ใช้คอปเปอร์ซัลเฟต (Cu_2SO_4) 1 ส่วนต่อโปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 9 ส่วน

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้นร้อยละ 40 ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

4. สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) เข้มข้นร้อยละ 4 ละลายกรดบอริก 40 กรัม ด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มล.

5. สารละลายกรดเกลือ เข้มข้น 0.02 นอร์มอล

6. อินดิเคเตอร์ Fashiro indicator เตรียมเป็น stock solution (ชั่งเมทธิลีนบูล (methylene blue) 0.2 กรัม ละลายในเอทธานอล 200 มล. และชั่งเมทธิลเรด (methyl red) 0.05 กรัม ละลายในเอทธานอล 50 มล.) เวลาใช้นำมาผสมในอัตราส่วน stock solution 1 ส่วน ต่อ เอทธานอล 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 2 ส่วน

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 1 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 1-2 กรัม บนกระดาษกรอง ปราศจากไนโตรเจน (whatman เบอร์ 1) ห่อให้มิดชิดใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน

2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 5 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มล.

3. นำไปย่อยโดยชุดย่อยโปรตีนที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และย่อยที่ 400 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายใส

4. เติมน้ำกลั่นร้อนลงไปล้างบริเวณคอขวดให้ทั่วและให้ความร้อนต่อไปจนเกิดควันของกรดซัลฟูริก แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

5. จัดอุปกรณ์กลั่น ต่อหลอดย่อยในส่วนของเครื่องกลั่นโปรตีน และวางขวดรูปชมพู่ ที่ตำแหน่งรับสารละลายของเครื่องกลั่น โดยให้ปลายจุ่มในสารละลายกรดบอริก โดยเติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ทำการกลั่นโปรตีนตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ โดยใช้สารละลายบอริก 5 มล. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50 มล.กลั่นเป็นเวลา 4 นาที

6. ไตเตรทของเหลวที่กลั่นได้ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกมาตรฐาน จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวอมฟ้าเป็นสีชมพูที่จุดยุติ

7. ทำแบลงก์และตัวอย่างควบคุมภายในเช่นเดียวกับตัวอย่างปฏิบัติตามข้อ1-8

8. บันทึกข้อมูลและการคำนวณผลในแบบบันทึกการทดสอบหาปริมาณโปรตีน / ไนโตรเจน ทั้งหมด

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(a-b) \times N \times 1.4007 \times 6.25}{W}$$

โดยที่ a = ปริมาตรของสารละลายกรดเกลือที่ใช้เป็น มล.

B = ปริมาตรของสารละลายกรดเกลือที่ใช้กับ blank เป็น มล.

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือเป็นนอร์มอล

W = น้ำหนักตัวอย่างเป็นกรัม

1.4007 = น้ำหนักสมมูลย์ของไนโตรเจน

6.25 = ตัวเลขที่เหมาะสม

3.1.3 **การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน** โดยวิธี Werner schmid (Egan *et al.*, 1981)

สารเคมี

1. แอมโมเนีย 0.88
2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก (กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นต่อน้ำ 7:3)
3. เอทานอลร้อยละ 95
4. อีเทอร์
5. ปิโตรเลียมอีเทอร์

วิธีการ

1. อบขวดกลมสำหรับหาไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มล.ในตู้อบไฟฟ้าทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. ชั่งตัวอย่าง1-2 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอนตัวอย่างควรมีไขมันประมาณ0.3-0.7 กรัม) ลงในบิกเกอร์ขนาด 100 มล.

3. หยดแอมโมเนีย 1-2 หยด ใช้แท่งแก้วบดตัวอย่างให้ละเอียด เติมกรดไฮโดรคลอริก ปริมาตร 10 มล.

4. ปิดด้วยกระจกนาฬิกา ให้ความร้อนและกวนสารละลายเป็นครั้งคราวจนตัวอย่างละลายหมด ค่อยๆ ทำให้เย็น

5. เติมเอทานอลร้อยละ 95 ปริมาตร 10 มล. ผสมให้เข้ากัน ตั้งให้เย็น เทสารละลายตัวอย่างลงในกรวยแยก กลั้วตัวอย่างด้วยอีเทอร์ ปริมาตร 25 มล. เขย่ากรวยแยก แรงๆ เป็นเวลา 1 นาที

6. เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ ปริมาตร 25 มล. เขย่าให้เข้ากันทิ้งให้แยกชั้นไขมันสารละลายส่วนล่างเก็บไว้ในขวดกลมที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน และนำส่วนบนมาทำการสกัดซ้ำด้วยอีเทอร์และปิโตรเลียมอีเทอร์ ตามข้อ 6-7 อย่างน้อย 3 ครั้ง

7. นำสารละลายตัวอย่างที่รวมอยู่กับชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์ในขวดกลมไปทำการระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์

8. นำขวดก้นกลมไปอบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จนแห้ง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

9. ชั่งน้ำหนัก แล้วอบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนัก 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มก.

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

3.1.4 **การวัดค่าพีเอช** (AOAC, 1999)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ในบิกเกอร์ขนาด 150 มล.แล้วเติมน้ำกลั่น 100 มล. โฮโมจิไนส์เป็นเวลา 2 นาที

2. วัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดพีเอช

3.1.5 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก ด้วยวิธี Tritration (AOAC, 1999)

สารเคมี

สารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์

วิธีการ

1. นำตัวอย่างที่ใช้วัดค่าพีเอช มากรองทันทีผ่านกระดาษกรอง กลั้วล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 มล.

2. นำสารที่กรองได้ไตเตรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน ใช้ฟีนอฟทาลีน (phenolphthalein) เป็นอินดิเคเตอร์บันทึกปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ โดยปริมาตรโซเดียมไฮดอรกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 1 มล. เท่ากับกรดแลกติก 0.0090 กรัม

3.1.6 ตรวจวัดปริมาณแคลเซียม ด้วยวิธี Atomic Absorption Spectrophotometric (AOAC, 1999)

วิธีการ

1. ล้าง ถ้วยกระเบื้องเคลือบ เครื่องแก้ว และกลั้วด้วยน้ำกลั่นจากนั้นนำไปแช่ในสารละลายกรดไนตริกร้อยละ 10 เป็นเวลา 1 คืน และใช้น้ำ de-ionize ในการเตรียมสารละลายกรดไนตริกที่ใช้กับเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer

2. อบถ้วยกระเบื้องในตู้อบลมร้อน 102 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 1 กรัม นำไปเผาบน hot plateในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง นำถ้วยกระเบื้องออกมาใส่ในโถดูดความชื้น นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่าง จากนั้นนำกลับไปเข้าเผาอบอีก 30 นาที และกระทำซ้ำเช่นเดิมจนตัวอย่างในถ้วยกระเบื้องเป็นเถ้าสีขาว เมื่อเผาจนได้เถ้าสีขาวแล้วจึงนำไปเก็บในโถดูดความชื้นจนกระทั่งนำไปวัดกับเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer

3. ละลายตัวอย่างด้วยกรดไนตริกร้อยละ 2 ปรับปริมาตรเป็น 250 มล. นำสารละลายตัวอย่างฉีดเข้าเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer โดยใช้

แคลเซียมเป็นมาตรฐาน ความเข้มข้น 0-8 ppm คำนวณหาปริมาตรแคลเซียมหน่วย มก.ต่อมล.หรือ มก.ต่อ กก.

การคำนวณ

ปริมาณแคลเซียม (มก./กก.) = $\frac{\text{ค่าที่วัดได้ X100 Xปริมาตรที่ปรับตัวอย่าง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$

3.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด

3.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด โดยวิธี Standard plate count เทคนิคการ pour plate (AOAC, 1999)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Plate Count Agar (PCA)
2. เปปโตน (peptone water) ร้อยละ 0.1 ในหลอดทดลอง 9 มล. ในขวดฝาเกลียวปริมาตร 225 มล.

วิธีการทดลอง

1. ชั่งอาหารหนัก 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกทนร้อน เติมเปปโตนร้อยละ 0.1 จากขวดฝาเกลียวปริมาตร 225 มล. เขย่าให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1}

2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างเจือจาง 10^{-1} มา 1 มล. ใส่ลงในหลอดที่มีเปปโตนร้อยละ 0.1 ปริมาตร 9 มล. เขย่าให้เข้ากันหลายจะได้ตัวอย่างที่มีกำลังเจือจาง 10^{-2}

3. ทำให้ตัวอย่างเจือจางต่อไปเป็น 10^{-3} และ 10^{-4} ตามลำดับ

4. เขย่าตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-4} อีกหลาย ๆ ครั้ง แล้วใช้ปิเปต 1 มล. ดูดตัวอย่างลงในจานเพาะเลี้ยง 3 จาน จานละ 1 มล.

5. ทำเช่นเดียวกับข้อ 4 โดยใช้ปิเปตอันเดิมแต่ใช้ตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-3}

6. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้นอยู่เทลงในจากเพาะเลี้ยง (ข้อ 4 และ ข้อ 5) ประมาณจานละ 15-20 มล. แกว่งจานเพาะเลี้ยงเบาๆ เพื่อให้ตัวอย่างกับวุ้นเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง กลับจานเพาะเลี้ยงและเก็บจานเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส 24-48 ชั่วโมง สำหรับตรวจวัดเชื้อจุลินทรีย์ชนิด mesophile bacteria และบ่มที่อุณหภูมิ 4 –10 องศาเซลเซียส 7-10 วัน สำหรับตรวจวัดเชื้อจุลินทรีย์ชนิด psycophile bacteria

7. ตรวจนับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี และรายงานผลเป็น จำนวน Colony Forming Unit (CFU) ต่อกรัมตัวอย่าง

การคำนวณ จำนวน CFU ต่อกรัมตัวอย่าง

CFU = ค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี X ระดับความเจือจาง

3.2.2 **การวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์มและอี-โคไล** (AOAC, 1999)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Presumptive test

1. อาหาร LST (Lactose broth) พร้อมหลอดดักจับแก๊ส 9 มล
2. เปปโตนร้อยละ 0.1 ปริมาตร 90 มล.

Confirmed test

อาหาร EC medium พร้อมหลอดจับแก๊ส

Completed test

1. อาหาร EMB
2. อาหาร Lactose broth พร้อมหลอดจับแก๊ส
3. อาหาร Nutrient agar slant

วิธีการ

Presumptive test

1. ชั่งตัวอย่างในถุงพลาสติกทนร้อน 10 กรัม เติมเปปโตนร้อยละ 90 มล. ผสมตัวอย่างให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-1}

2. ทำการเจือจางตัวอย่างไปจนกระทั่งได้ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ 10^{-2} และ10^{-3}

3. ปิเปตตัวอย่างที่ 10^{-3} 10^{-2} และ 10^{-1} ปริมาตร 1 มล.ลงในหลอดอาหาร LST ความเข้มข้นละ 3 หลอด ตามลำดับ เขย่าตัวอย่างให้เข้ากับอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ

37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง ดูแก๊สที่หลอดดักจับแก๊ส ถ้ามีแก๊สถือว่าให้ผลบวก บันทึกผล แล้วทำ Confirmed test

Confirmed test

1. หลังจากดูผลใน 24 ชั่วโมง ว่ามีแก๊สเกิดขึ้นกี่หลอด ส่วนหลอดที่ยังไม่เกิดแก๊สให้นำกลับไปบ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง แล้วนำมาดูผลใหม่

2. นำหลอดที่มีแก๊สทุกหลอดมาเขย่าเบา ๆ แล้วถ่ายเชื้อแต่ละหลอดลงในอาหาร EC medium หลอดต่อหลอดแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 44.5$\pm$0.2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ตรวจดูผลหลอดที่ให้แก๊สแล้วบันทึกผลในตารางแล้วเปิดหาค่า Most Probable Number (MPN)

Completed test

1.ใช้ Loop ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหาร EC ที่มีแก๊สมา streak บนอาหาร EMB แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.เมื่อเชื้อขึ้นบนอาหาร EMB แล้วตรวจดูว่ามีโคโลนีที่มีลักษณะเหมือนอีโคไลหรือไม่ (โคโลนีอี-โคไล จะเป็นมันวาวสีเขียว ๆ คล้ายโลหะตัด)

3. ถ่ายเชื้อจากอาหาร EMB ลงใน Lactose broth และ nutrient agar slant แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. วันรุ่งขึ้นดูผลในอาหาร Lactose broth ว่ามีแก๊สหรือไม่ และย้อมเชื้อจาก NA slant ว่าเป็นแกรมลบแท่งที่ไม่มีสปอร์ ถ้าจาก Lactose broth ให้แก๊สและย้อมมีรูปร่างเป็นแกรมลบแท่ง แสดงว่า completed test ให้ผลบวกและบันทึกผล

3.2.3 **การวิเคราะห์ปริมาณ *Staphylococcus aureus*** โดยวิธี Standard plate count เทคนิคการ spread plate (AOAC, 1999)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Baird Parker Agar (BPA)

2. เปปโตน (peptone water) ร้อยละ 0.1 ในหลอดทดลอง 9 มล. ในขวดฝาเกลียวปริมาตร 225 มล.

วิธีการ

1. ปิเปตตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-2} ปริมาตร 0.1 มล. ลงในจานอาหาร BP 2 จาน

2. ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 โดยใช้ปิเปตอันเดิมแต่ใช้ตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-1}

3. จุ่มแท่งแก้วสำหรับ spread ลงในแอลกอฮอล์ แล้วนำแท่งแก้วมาผ่านเปลวไฟ ถือให้เย็นลงประมาณอุณหภูมิห้อง เปิดฝาจานใส่อาหาร ทำการกระจายตัวอย่างที่เหลือต่อไปจนเสร็จ

4. ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที กลับจานเพาะเลี้ยงและเก็บจานเพาะเลี้ยงไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

5. ลักษณะโคโลนีของ *S aureus* บนอาหาร BP โคโลนีเรียบ นูน สีดำ และที่ของโคโลนีสีขาว มี Clear zone รอบโคโลนี

6. เลือกโคโลนีทั้งหมดที่คาดว่าเป็น *S aureus* มาทดลองโดยเขี่ยเชื้อลงในอาหาร NB และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7. ปิเปตเชื้อจากข้อ 6 ใส่หลอดทดลองปริมาตร 0.5 มล. เติมพลาสมาของกระต่าย (rabbit plasma) 1 มล. เขย่าให้สารผสมกัน

8. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง ถ้าไม่เกิดการแข็งตัวของพลาสมาบ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมง ถ้าพลาสมาแข็งตัวแสดงว่าผลเป็นบวก

3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่ผลิตกรด (lactic acid Bacteria) (AOAC, 1999)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร De Man Rogusa Sharpe (MRS)

2. เปปโตน (peptone water) ร้อยละ 0.1 ในหลอดทดลอง 9 มล. ในขวดฝาเกลียวปริมาตร 225 มล.

วิธีการ

1. ชั่งอาหารหนัก 25 กรัมใส่ลงในถุงพลาสติกทนร้อนเติมเปปโตนร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มล. เขย่าให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1}

2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างเจือจาง 10^{-1} มา 1 มล. ใส่ลงในหลอดที่มีเปปโตนร้อยละ0.1 ปริมาตร 9 มล. เขย่าให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่มีกำลังเจือจาง 10^{-2}

3. ทำให้ตัวอย่างเจือจางต่อไปเป็น 10^{-3} และ 10^{-4} ตามลำดับ

4. เขย่าตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-4} อีกหลาย ๆ ครั้ง แล้วใช้ปิเปต 1 มล. ดูดตัวอย่างลงในจานเพาะเลี้ยง 2 จาน จานละ 1 มล.

5. ทำเช่นเดียวกับข้อ 4 โดยใช้ปิเปตอันเดิมแต่ใช้ตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-3}

6. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้นอยู่เทลงในจานเพาะเลี้ยง (ข้อ 4 และ ข้อ 5) ประมาณจานละ 15-20 มล. แกว่งจานเพาะเลี้ยงเบา ๆ เพื่อให้ตัวอย่างกับวุ้นเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง กลับจานเพาะเลี้ยงและเก็บจานเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

7. ตรวจนับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี รายงานผลเป็นจำนวน CFU ต่อกรัมตัวอย่าง

3.2.5 **การวิเคราะห์ปริมาณยีสต์และรา** (AOAC, 1999)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

2. เปปโตน (peptone water) ร้อยละ 0.1 ในหลอดทดลอง 9 มล. ในขวดฝาเกลียวปริมาตร 225 มล.

วิธีการ

1. ชั่งอาหารหนัก 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกทนร้อนเติมเปปโตนร้อยละ 0.1ปริมาตร 225 มล. เขย่าให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10^{-1}

2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างเจือจาง 10^{-1} มา 1 มล. ใส่ลงในหลอดที่มีเปปโตนร้อยละ0.1 ปริมาตร 9 มล. เขย่าให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่มีกำลังเจือจาง 10^{-2}

3. ทำให้ตัวอย่างเจือจางต่อไปเป็น 10^{-3} และ 10^{-4} ตามลำดับ

4. เขย่าตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-4} อีกหลาย ๆ ครั้ง แล้วใช้ปิเปต 1 มล. ดูดตัวอย่างลงในจานเพาะเลี้ยง 2 จาน จานละ 1 มล.

5. ทำเช่นเดียวกับข้อ 4 โดยใช้ปิเปตอันเดิมแต่ใช้ตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-3}

6. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้นอยู่เทลงในจานเพาะเลี้ยง (ข้อ 4 และ ข้อ 5) ประมาณจานละ 15-20 มล. แกว่งจานเพาะเลี้ยงเบาๆ เพื่อให้ตัวอย่างกับวุ้นเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็ง กลับจานเพาะเลี้ยงและเก็บจานเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

7. ตรวจนับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี รายงานผลเป็นจำนวน CFU ต่อกรัมตัวอย่าง

3.3 ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด

3.3.1การวัดความแข็งและความนิ่มของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด ด้วยเครื่อง Texture analyzer

วิธีการ

บรรจุตัวอย่างครีมคอทเทจชีส สเปรด ในแก้วทรงกระบอก ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 ซม.และพื้นที่หน้าตัด 11 ซม.^{3} วัดค่าแรงที่ Probe กดลงไปในตัวอย่างและแรงที่ดึง Probe ออกจากตัวอย่าง โดยใช้ cylinder probe ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มม. วัดค่าแรง (force) ความนิ่ม (softness) และความหนืด (adhesive) ของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด โดยใช้เครื่อง Texture analyzer

3.3.2 การวัดค่าสีของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด ด้วยเครื่องวัดสี

วิธีการ

1. ทำการ calibrate เครื่องทุกครั้งก่อนใช้งาน
2. นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรดใส่ในภาชนะพลาสติกสำหรับวัดค่าสี ใช้ช้อนพลาสติก เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วก้นภาชนะพลาสติก ไม่ให้เกิดช่องว่าง วางภาชนะพลาสติกลงบน port ขนาด 1.25 นิ้ว
3. ใช้ฝาครอบปิดตัวอย่าง เพื่อไม่ให้มีแสงรบกวนจากภายนอก
4. เริ่มวัดค่าสีโดยใช้ระบบสีของ Hunter color วัดค่า L* a* และ b*

เมื่อ L* แสดงถึงค่าความสว่าง (lighness) มีค่าตั้งแต่ 0-100
a แสดงถึงค่าสีแดง (+) หรือ สีเขียว (-)
b แสดงถึงค่าสีเหลือง (+) หรือสีน้ำเงิน (-)

ภาคผนวก ง

การผลิตคอทเทจชีส สเปรด

การผลิตคอทเทจชีส สเปรด ด้วยเอนไซม์จากฟักเขียว ดัดแปลงตามวิธีของ Walstra และคณะ (1999)

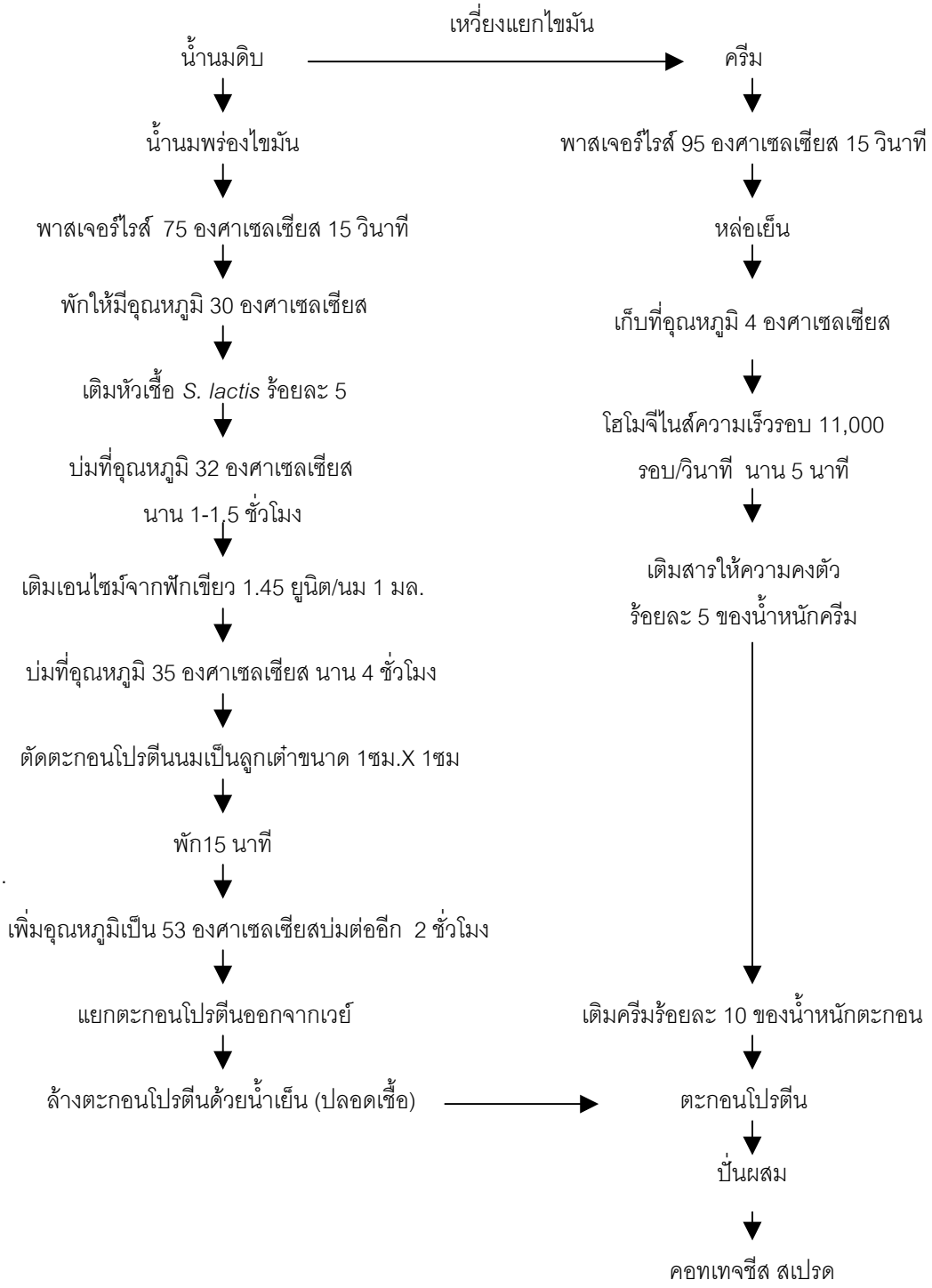
1. การเตรียมหัวเชื้อ

1. ถ่ายเชื้อ *Streptococcus lactis* จากกลีเซอรอล ปริมาตร 0.1 มล.ลงในอาหาร MRS Broth ปริมาตร 5 มล. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหาร MRS Broth อีก 2-3 ครั้ง เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์ 10^{7-9} เซลล์/มล. และนับจำนวนโคโลนีโดยวิธีการ pour plate

2. ถ่ายเชื้อ *S. lactis* ในอาหาร MRS Broth จากข้อ 1 ปริมาณ 8 มล.ลงในอาหาร MRS Broth ปริมตร 100 มล. (หัวเชื้อร้อยละ 5) เขย่าด้วยความเร็วรอบ 175-180 รอบ/วินาที ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและนับจำนวนโคโลนีโดยวิธีการ pour plate ที่ระดับการเจือจาง 10^{-5}-10^{-8} แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อทราบจำนวนเซลล์ที่แน่นอน

3 ปิเปตเชื้อ *S. lactis* ในอาหาร MRS Broth จากข้อ 2 ลงในหลอดเหวี่ยงแยกที่ปลอดเชื้อจำนวน 4 หลอด หลอดละ 25 มล.นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/วินาที นาน 15 นาที ล้างเซลล์เชื้อด้วยสารละลายปลอดเชื้อโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.85 หลอดละ 5 มล. และเหวี่ยงแยกอีกครั้ง นำตะกอนเซลล์ที่ได้ใส่ในน้ำนมพร่องไขมันพาสเจอร์ไรส์ปริมาตร 2,000 มล.ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2. การผลิตคอทเทจชีส สเปรด



ภาพภาคผนวก 4 การผลิตคอทเทจชีส สเปรด

Cottage cheese spread production

3. คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์คอทเทจชีส สเปรด (United States department of agriculture, 2001)

3.1 คุณสมบัติทางกายภาพ

- กลิ่นรส (falvor) มีกลิ่นรสคล้ายกับน้ำนมสด (fresh whole milk) หรือครีม (กรณีที่มีครีมเป็นองค์ประกอบ) มีกลิ่นรส (flavor) และกลิ่น (aroma) ของกรดแลกติกและไดอะซิทิล (diacetyl) อ่อนๆ อาจมีการเติมกรดหรือกลิ่นรสของเกลือ (salty flavor) ไม่ควรมีลักษณะผงสีขาว (chalky) กลิ่นผลไม้ (fruity) ยีสต์ (yeast)

- ลักษณะและเนื้อสัมผัส (body and texture) มีลักษณะ meaty texture แต่ถ้ามีครีมเป็นองค์ประกอบเนื้อสัมผัสจะนุ่มขึ้น เนื้อสัมผัสควรเรียบ (smooth) นุ่มเบา (velvety) ไม่เป็นเนื้อแป้ง (mealy) ไม่ร่วน (crumble) ไม่เป็นลักษณะแป้งเปียก (pasty) ไม่เหนียว (sticky) ไม่เป็นน้ำแฉะ(watery) หรือ มีลักษณะเป็นเลน (slimy)

- สีและลักษณะปรากฏ มีสีสะอาด สีขาวครีม มีขนาดของตะกอนโปรตีนสม่ำเสมอ

3.2 คุณสมบัติทางเคมี

- ปริมาณความชื้นไม่เกินร้อยละ 80 ของน้ำหนักเนยแข็ง
- ปริมาณไขมันน้อยกว่าร้อยละ 0.5 ของน้ำหนักเนยแข็ง
- พีเอช ไม่เกิน 5.2

3.3 คุณสมบัติทางจุลินทรีย์

- โคลิฟอร์ม ไม่เกิน 10 CFU/กรัม
- Psychrotrophie ไม่เกิน 100 CFU/กรัม
- ยีสต์และรา ไม่เกิน 10 CFU/กรัม