บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

วัตถุดิบอุปกรณ์ที่สำคัญและเคมีภัณฑ์

วัตถุดิบ	ที่มา
1 น้ำนมยูเอชที (ไทย เดนมาร์ค) รสธรรมชาติ	บริษัท ไอ เอ็ม อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด
2 น้ำนมยูเอชทีหมดอายุจำหน่ายไม่เกิน 5 เดือน รสธรรมชาติ (ไทย เดนมาร์ค)	บริษัท ไอ เอ็ม อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด
3 น้ำนมถั่วเหลือง (Soybean milk) (Hang ,1971)	เตรียมจาก แช่เมล็ดถั่วเหลือง 450 g. แช่น้ำ 1400 ml. ที่ อุณหภูมิ 80 °ซ เทน้ำทิ้ง บดปั่นด้วยเครื่องบดปั่นอาหารความเร็วสูง 2 นาที เติมน้ำในอัตราส่วนถั่ว:น้ำ = 1:9 กรองด้วยผ้าขาวบาง ทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อน 121 °ซ ความดัน 15 lb/in^2 15 นาที เก็บในตู้เย็น
4 หัวเชื้อแลคติกส์ (Lactics)	Eurozyme Co., Ltd. France.
5 เอนไซม์เรนเนท (Rennet) (1 mg.,99 Unit mg. Protein by Biuret)	Sigma Chemical Co., Ltd. USA.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์ที่สำคัญที่ใช้ในการวิจัยนี้ รวบรวมแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ชนิดและแหล่งที่มาของอุปกรณ์ในการวิจัย

อุปกรณ์	แหล่งที่มา
1 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH Meter) รุ่น 70	บริษัท Beckman , USA.
2 ตู้อบแห้ง (Hot Air Oven) รุ่น UL 80	บริษัท Memmert GmbH , Germany.
3 เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ รุ่น HA-36 (Autoclave)	บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan.
4 เครื่องสกัดไขมัน รุ่น LMS/500 (Soxhlet Extractor)	บริษัท Isopad, Japan
5 เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน	บริษัท Gerharadt ,Germany
6 แผ่นให้ความร้อน (Hot Plate) รุ่น B29	บริษัท Bibby, Japan
7 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น R08	บริษัท Memmert, Germany
8 เครื่องชั่งน้ำหนัก (Balances) รุ่น A200S	บริษัท Sartorius, Japan
9 พิมพ์เนยแข็ง (Hoop)อลูมิเนียม รูปที่ 5	ศูนย์เครื่องมือ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย
10 ที่ตัดก้อนลิ่มเนยแข็ง ตะแกรงลวดทนความร้อน ขนาดตาราง 1 ซม^2	ประดิษฐ์ขึ้นเองในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
11 ฟิล์มสำหรับห่ออาหาร	บริษัท Sun Wrap , Japan
12 หม้ออลูมิเนียม หมายเลข 34,40	
13 บิกเกอร์ ขนาด 2000 มล.	บริษัท Pyrex , Kimax และอื่นๆ
14 ปิเปต หลอดแก้วและเครื่องแก้ววิเคราะห์อื่นๆ	
15 ผ้าขาวบางขนาดตาข่าย 0.1 ซม.^{2}	

เคมีภัณฑ์ ที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ แสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ชนิดสารเคมี และแหล่งที่มาของเคมีภัณฑ์

	สารเคมี	แหล่งที่มา
1	กลูโคส (Glucose)	บริษัท Merck , Germany.
2	แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	บริษัท Farmitalia Carloeba , Italy.
3	คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$)	บริษัท Merck, Germany.
4	โซเดียมซิเตรต (Sodium citrate)	บริษัท Merck ,Germany.
5	โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	บริษัท Merck ,Germany.
6	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	บริษัท Merck ,Germany .
7	แมงกานิสซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	บริษัท May and Baker Ltd., England.
8	โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	บริษัท May and Baker Ltd., England.
9	แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2 SO_4$)	บริษัท May and Baker Ltd., England.
10	กรดซัลฟุริก (H_2SO_4)	บริษัท Mallinckrodt Inc. ,USA.
11	กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	บริษัท Merck ,Germany.
12	ไดเอธิลอีเธอร์ (Diethylether)	บริษัท Merck ,Germany.

รูปที่ 5 พิมพ์เนยแข็ง

พิมพ์เนยแข็ง ทรงกระบอก สวมซ้อนทับกัน ด้านล่างมีรูให้น้ำเวย์ออก ทำจากวัสดุอลูมิเนียม หนัก 1.8 กก. ขนาดกว้าง 11.5 ซม. ลึก 5.5 ซม.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมวัตถุดิบน้ำนมยูเอชทีหมดอายุและหัวเชื้อแลคติกส์

1 การตรวจสอบสภาพน้ำนมยูเอชทีหมดอายุ

1.1 การปนเปื้อนของน้ำนมยูเอชทีที่หมดอายุการจำหน่าย โดยสุ่มตัวอย่างจากกล่องที่ปิดสนิท 2 กล่องขนาดเล็กจากกล่องบรรจุ 1 โหลและในหมายเลขรุ่นการผลิตเดียวกันจะถือเป็น 1 รุ่นการผลิต เจือจางและเลี้ยงเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อพีซีเอ (Plate count agar:ภาคผนวก ก หมายเลข 2) เพื่อตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนหลังบ่มจานเพาะไว้ที่อุณหภูมิ 37 °ซ 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีในกรณีที่พบเชื้อและขีดลากให้เป็นโคโลนีเดี่ยวโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็นเอ (ภาคผนวก ก หมายเลข 1)และจำแนกชนิดด้วยวิธีทางชีวเคมี (Harrigan,1969)

1.2 การตรวจสอบการเสียสภาพโปรตีนนมโดยใช้อัลกอฮอล์ 68 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยใช้เอธิลอัลกอฮอจ์ (ภาคผนวก ค หมายเลข 14) 3-5 หยด หยดลงในน้ำนมตัวอย่าง 1 มล. สังเกตเกล็ดตะกอนที่เกิดขึ้น เห็นได้ชัดเจนเป็นผลบวก (+) หากเห็นได้ไม่ชัดเจนเป็นบวกลบ (+/-) และไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นลบ (-) (พวงพร โชติไกร ,2525)

1.3 การเปรียบเทียบระหว่างระยะเวลาหลังหมดอายุจำหน่ายและการพบเชื้อจุลินทรีย์การเสื่อมสภาพของโปรตีนนม ลักษณะทางกายภาพของน้ำนมยูเอชทีหมดอายุจำหน่าย 2-12 เดือน

2 การเลี้ยงหัวเชื้อแลคติกส์

หัวเชื้อแลคติกส์ 1 กรัม เลี้ยงในอาหารนมพร่องมันเนย (Skim milk medium ; ภาคผนวก ก หมายเลข 3) 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เวลา 24-48 ชั่วโมง แบคทีเรียจะเติบโตและสร้างกรดแลคติกทำให้อาหารนมแข็งตัวเป็นก้อนลิ่ม จำนวนนับประมาณ 10^{7}-10^{9} เซล/ มิลลิลิตร (Bank ,1984)

3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการของหัวเชื้อแลคติกส์

หัวเชื้อแลคติกส์ที่ใช้ศึกษาในการทดลองนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Eurozyme จำกัด ประเทศฝรั่งเศส น้ำหนัก 50 กรัม บรรจุในถุงฟอยล์ มีการศึกษาจำแนกถึงชนิดของเชื้อและการปนเปื้อนที่อาจจะมีได้ โดยศึกษารายละเอียดดังต่อไปนี้

3.1 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกส์ นำหัวเชื้อแลคติกส์ที่เลี้ยงตามข้อ 2 มาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส (MRS agar ; ภาคผนวก ก หมายเลข 4)ที่อุณหภูมิ 37 °ซ 24-48 ชั่วโมงมาศึกษารูปร่าง ขนาด สีและความโปร่งแสงหรือทึบแสงของโคโลนี (Harrigan,1969)

3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ตรวจสอบการติดสีแกรม โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อกระจายเชื้อบนสไลด์สะอาด ที่มีหยดน้ำ 1 หยด ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ผ่านความร้อนให้เชื้อติดกับสไลด์ ย้อมด้วยสารละลายคริสตัลไวโอเล็ต (Crystal violet) (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) นาน 1 นาที ล้างน้ำออก เทสารละลายแกรมไอโอดีน (Gram iodine) (ภาคผนวก ข หมายเลข 5)ให้ท่วมสไลด์นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำไหลผ่าน อัลกอฮอล์ 70 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ล้างสีบางส่วนออก ล้างน้ำ และย้อมทับด้วย สีซาฟรานิน (Safranin) (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) นาน 20 วินาที ล้างออกและซับให้แห้ง นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า จัดกลุ่มแบคทีเรียตามการติดสีแกรม รูปร่างและการเรียงตัวของเซล ตามแนวจำแนกแบคทีเรีย (Buchanan,1974)

3.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและทางชีวเคมี

หัวเชื้อแลคติกส์ ข้อ 2 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำนมพร่องมันเนย (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) บ่มที่ 37 °ซ 24 ชั่วโมง น้ำนมจะจับตัวเป็นก้อนลิ่ม นำมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส บ่มที่ 37 °ซ 48 ชั่วโมงเชื้อจะเจริญเป็นโคโลนีทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีดังต่อไปนี้

3.3.1 การสร้างเอนไซม์คาตาเลส โดยหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 7) ลงบนสไลด์สะอาด ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจากโคโลนีมาแตะสารละลาย ถ้ามีฟองแกสเกิดขึ้นแสดงผลเป็นบวก ถ้าไม่มีแสดงผลเป็นลบ (Buchanan, 1974)

3.3.2 การทดสอบความสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 °ซ เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอ็มอาร์เอส (MRS Broth)(ภาคผนวก ก หมายเลข 5) ปิดฝาเกลียว บ่มเลี้ยงเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 10 ° ซ นาน 1 สัปดาห์ ตรวจผลทุกวัน ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใสเริ่มขุ่นมีตะกอน นำออกมาย้อมดู ถ้าพบแบคทีเรียหัวเชื้อแลคติกส์ ให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้ผลเป็นลบ (Harrigan, 1969)

3.3.3 การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 40 °ซ ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อที่ผ่านมาเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 40 °ซ(Harrigan, 1969)

3.3.4 การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 45 °ซ ทำการทดสอบเช่นเดียวกับข้อที่ผ่านมาเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 45 °ซ (Harrigan, 1969)

3.3.5 การทดสอบ อเซติล เมธิล คาร์บินอล (Voges-Proskauer test) เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ เอ็มอาร์ วีพี (MR-VP medium) (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 24 ชั่วโมงเติมน้ำยาทดสอบ สารละลาย ก และ ข (ภาคผนวก ข หมายเลข 8) ถ้าสีอาหารเปลี่ยนเป็นสีชมพูให้ผลเป็นบวก หลอดที่ไม่เกิดผลสีชมพูให้ผลเป็นลบ (Harrigan, 1969)

3.3.6 การทดสอบความสามารถในการทนความร้อน 60 °ซ เป็นเวลา 30 นาที เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอ็มอาร์เอส บ่มเลี้ยงจนเห็นได้ชัดว่ามีการเจริญเติบโตทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น 2 หลอดต่อการทดสอบ นำหลอดทดสอบ ไปผ่านความร้อนที่

ต้องการทดสอบ และนำทั้งสองหลอดมาขีดบนอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส บ่มที่ 37 °ซ 1 สัปดาห์ตรวจผลทุกวันทั้งสองจานเพาะ โดยผลบวกจะต้องมีเชื้อเจริญทั้งสองจาน ผลลบจะมีเชื้อที่ไม่ผ่านความร้อนเท่านั้นที่จะเติบโตส่วนจานเพาะที่ได้จากเชื้อที่ผ่านความร้อนไม่มีเชื้อเจริญขึ้นเป็นโคโลนีให้เห็น ถ้าไม่มีการเจริญทั้งสองจานเพาะถือว่าการทดสอบล้มเหลวให้ทดสอบใหม่ (Harrigan,1969)

3.3.7 การทดสอบความสามารถในการเจริญได้ในอาหารนมที่ผสม เมธิลีนบลู ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)(ภาคผนวก ก หมายเลข 9)เลี้ยงเชื้อในอาหารนมที่ผสมเมธิลีน บลู ซึ่งมีสีฟ้า บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 48-72 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูที่สีฟ้าซึ่งจะไม่จางลงและน้ำนมจะจับตัวเป็นก้อนลิ่มไม่ไหลตามแรงเอียงหลอด ให้ผลเป็นบวก บันทึกผลลบในหลอดที่ไม่ใช่ลักษณะดังกล่าว (Harrigan,1969)

3.3.8 การทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 6.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมเกลือความเข้มข้นดังกล่าว (ภาคผนวก ก หมายเลข 12) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ บันทึกผลบวกถ้าเชื้อเจริญเติบโตทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น (Harrigan,1969)

3.3.9 การทดสอบความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ปรับความเป็นกรดด่างที่ 9.2 และ 9.6 เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส ที่ปรับความเป็นกรด ด่าง ที่ 9.2 และ 9.6 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ บันทึกผลบวกถ้าเชื้อเจริญเติบโตทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น (Harrigan,1969)

3.3.10 การทดสอบความสามารถในการทำให้น้ำนมลิตมัสแข็งตัวก่อนเปลี่ยนสี โดยเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำนมลิตมัส (Litmus milk) (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ ตรวจผลทุกชั่วโมง จนกระทั่งเกิดการจับตัวแข็งเป็นก้อนลิ่ม ถ้าแข็งตัวขณะที่เป็นสีม่วงให้ผลบวก ให้ผลลบถ้าเป็นสีชมพู (Harrigan,1969)

3.3.11 การสร้างแกสจากเซมิโซลิด ซิเตรท มิลค์ เอการ์ (Semisolid citrate milk agar) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแสดงในภาคผนวก ก หมายเลข 7 เลี้ยงเชื้อลงในอาหารน้ำนมที่ผสมโซเดียมซิเตรท และเติมวุ้นที่หลอมเหลว อุณหภูมิประมาณ 48 °ซ ลงไปทีหลัง เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ ให้ผลบวกถ้ามีแกสเกิดขึ้น ให้ผลเป็นลบถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Harrigan,1969)

3.3.12 การสร้างแอมโมเนียจากอาร์จีนีน (Production of ammonia from Arginine) ใช้ห่วงเขี่ยถ่ายเชื้อเลี้ยงในอาร์จินีน บรอท (ภาคผนวก ก หมายเลข 11) เลี้ยง 2 วัน ที่ 37 °ซ พร้อมกับหลอดที่ไม่เติมเชื้อ ทดสอบโดยการใช้น้ำยาทดสอบ (ภาคผนวก ข หมายเลข 15) หยดบนสไลด์ 1 หยด ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจุ่มเชื้อมา 1 ห่วง ผสมกับน้ำยา ให้ผลบวกหากมีสีส้มหรือน้ำตาลเกิดขึ้น เปรียบเทียบกับผลลบจากหลอดควบคุมที่ไม่เติมเชื้อ (Harrigan, 1969)

4 การเจริญของหัวเชื้อแลคติกส์ในวัตถุดิบน้ำนม

4.1 ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมในการทำเนยแข็งระดับห้องปฏิบัติการโดยแปรปริมาณหัวเชื้อแลคติกส์ข้อ 2 ระหว่าง 1, 2 , 4 , 6 , 8 , 10 , 20 เปอร์เซนต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อน้ำนมพร่องมันเนย (ปริมาตรต่อปริมาตร) ตรวจวัดความสามารถในการเจริญเติบโตสร้างกรดโดยวัดค่าพีเอชที่ลดลง และใช้ระยะเวลาในการทำให้น้ำนมจับตัวเป็นก้อนลิ่มในระยะเวลาสั้นเพื่อป้องกันการปนเปื้อน โดยไม่มีตะกอนของหัวเชื้อปรากฏอยู่ซึ่งจะทำให้เนยแข็งที่ได้มีตำหนิ

4.2 ปริมาณน้ำนมถั่วเหลืองที่เหมาะสมในการผสมน้ำนมยูเอชทีหมดอายุ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการทำเนยแข็งระดับห้องปฏิบัติการ โดยผสมน้ำนมถั่วเหลืองกับน้ำนมยูเอชทีหมดอายุปริมาณ 0,10 ,20, 30, 40, 50 ,60 ,70, 80, 90, 100 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ใส่หัวเชื้อแลคติกส์ปริมาณข้อ 4.1 จับเวลาน้อยที่สุดที่ทำให้น้ำนมเกิดการจับตัวก้อนลิ่มและตรวจกลิ่นถั่วภายหลังการจับตัวเป็นก้อนลิ่มแล้ว โดยให้ผู้ทดสอบจำนวน 10 คน ให้คะแนนโดยการดมกลิ่นถั่วตามการรับรู้กลิ่นถั่ว จากน้อยที่สุด 1+ ถึงมากที่สุดเท่ากับ 4+ เลือกอัตราส่วนการผสมน้ำนมถั่วเหลืองได้มากที่สุดโดยมีกลิ่นถั่วน้อยที่สุดเป็นวัตถุดิบน้ำนมเตรียมเนยแข็ง

4.3 เปรียบเทียบความสามารถในการเติบโตและสร้างกรดในวัตถุดิบน้ำนมแต่ละชนิดดังต่อไปนี้ น้ำนมยูเอชที ,น้ำนมยูเอชทีหมดอายุ ,น้ำนมยูเอชทีหมดอายุผสมน้ำนมถั่วเหลืองในปริมาณข้อ 4.2 ใส่หัวเชื้อแลคติกส์ในปริมาณข้อ 4.1 โดยวัดพีเอชที่ลดลงแปรตามเวลา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 ปรับหัวเชื้อแลคติกส์โดยการเตรียมแลคติกส์ในข้อ 2 เลี้ยงในวัตถุดิบน้ำนม 3 ชนิด ได้แก่ น้ำนมยูเอชทีหมดอายุ น้ำนมถั่วเหลือง และน้ำนมยูเอชทีหมดอายุผสมน้ำนมถั่วเหลืองในอัตราส่วน ข้อ 4.2 เติมหัวเชื้อแลคติกส์ในปริมาณข้อ 4.1 เลี้ยงที่ 37 °ซ 24 ชั่วโมง วัดพีเอชน้ำนมวัตถุดิบที่ลดลงจากการสร้างกรด เก็บเชื้อรุ่นที่ 1 ไว้ที่ 4 °ซ 7 วัน ถ่ายเชื้อในวัตถุดิบน้ำนมชนิดเดิม เลี้ยงที่ 37 °ซ 24 ชั่วโมง วัดพีเอช และถ่ายเชื้อซ้ำจนครบ 6 รุ่นอายุ บันทึกการเปลี่ยนแปลง เฉลี่ยค่า 2 ซ้ำการทดลอง

4.5 เก็บรักษาหัวเชื้อ และตรวจสอบประสิทธิภาพ โดยการนำหัวเชื้อที่เลี้ยงตามข้อ 2 มาทำให้แห้งโดยการระเหิดแห้งภายใต้สุญญากาศ (Lyophilization) เก็บหัวเชื้อที่แห้งเป็นผงไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท เมื่อจะนำมาใช้ให้ตรวจสอบคุณภาพโดยการเลี้ยงในอาหารนมพร่องมันเนยและจับเวลาที่ทำให้จับตัวเป็นก้อนลิ่ม

<u>ปริมาณเอนไซม์เรนเนท</u>

1 ความเข้มข้นของเอนไซม์เรนเนทที่เหมาะสมในการทำเนยแข็งในระดับห้องปฏิบัติการโดยการละลายเอนไซม์ในปริมาณที่แตกต่างกัน วัดความสามารถในการทำให้น้ำนมจับตัวเป็นก้อนลิ่ม โดยใช้เวลาสั้นที่สุดและการผลิตกรดของหัวเชื้อดำเนินไปได้มากที่สุดในขั้นตอนการทำเนยแข็ง วิธีการโดยใช้เอนไซม์เรนเนทผงละลายกับน้ำกลั่นในปริมาณแปรระหว่าง 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมในน้ำนมพร่องมันเนย 10 มล. ปริมาณ 0.02 เปอร์เซนต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จับเวลาที่ทำให้น้ำนมเกิดการจับตัวเป็นก้อนลิ่มและวัดพีเอชด้วยพีเอชมิเตอร์

2 ตรวจสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ในขั้นตอนการทำเนยแข็งมีผลเปรียบเทียบความแตกต่างกันในวัตถุดิบน้ำนมแต่ละชนิดดังนี้ น้ำนมพร่องมันเนย น้ำนมยูเอชที น้ำนมยูเอชทีหมดอายุผสมน้ำนมถั่วเหลืองและน้ำนมถั่วเหลืองระหว่างขั้นตอนการผลิตเนยแข็ง โดยเติมในชั่วโมงที่ 4 ตรวจวัดระยะเวลาในการทำให้น้ำนมจับตัวเกิดเป็นก้อนลิ่ม และพีเอชวัตถุดิบน้ำนมที่ลดลง

ขั้นตอนการทำเนยแข็ง

1 วัตถุดิบน้ำนม 3 ชนิด คือ น้ำนมยูเอชที น้ำนมยูเอชทีหมดอายุไม่เกิน 5 เดือน และน้ำนมยูเอชทีหมดอายุไม่เกิน 5 เดือนผสมน้ำนมถั่วเหลือง เตรียมในบิกเกอร์ขนาด 2000 มิลลิลิตร ปิดด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ เตรียมหม้อที่ใส่น้ำสะอาด ปริมาณความสูงน้ำไม่เกินปริมาณน้ำนมวัตถุดิบในบิกเกอร์ บนแผ่นให้ความร้อน ที่ปรับให้อุณหภูมิน้ำเท่ากับ 37 °ซ ใส่บิกเกอร์ที่มีน้ำนมวัตถุดิบลงไป ปิดฝา และคอยตรวจอุณหภูมิให้คงที่ 37 °ซ

2 เติมหัวเชื้อแลคติกส์ในข้อ 2 ในขนาดที่เหมาะสมข้อ 4.1 ผสมให้เข้ากัน คงอุณหภูมิ 37 °ซ เชื้อจะเจริญเติบโตและสร้างกรด พีเอชจะลดลงตามเวลา วัดพีเอชวัตถุดิบน้ำนมโดยแยกออกมาตรวจด้วย พีเอชมิเตอร์ เมื่อพีเอชลดลงถึง 5.9 -6.0 บันทึกเวลาที่เชื้อใช้ในการสร้างกรด

3 เติมเอนไซม์เรนเนทตามข้อ 2 ผสมให้เข้ากันแล้วหยุดกวนทันที เพื่อให้เอนไซม์ทำงาน เพิ่มความร้อนเป็น 41 °ซ น้ำนมจะต้องจับตัวเป็นก้อนลิ่มใน 30 นาที ทิ้งไว้ให้เชื้อเติบโตต่อไป ประมาณ 1 ชั่วโมง

4 ตัดก้อนลิ่มนมให้เป็นรูปลูกบาศก์ด้วยที่ตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ที่ตัดนี้จะเป็นกรอบที่มีลวดเรียงขนานตามยาว ห่าง 1 ซม. และที่มีลวดเรียงตามขวาง ห่าง 1 ซม. อย่างละอัน การตัดทำโดยใช้ ที่ตัดจุ่มลงไปในก้อนลิ่ม ลากไปมาให้ทั่วภาชนะ เปลี่ยนอัน ก้อนลิ่มจะถูกตัดด้วยเส้นลวดตามยาวและขวางเป็นรูปลูกบาศก์ เพื่อให้ก้อนลิ่มแยกน้ำหางนมออกได้มากที่สุด คงความร้อนไว้ที่ 41 °ซ ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง

5 แยกน้ำหางนมออกโดยใช้การกรองด้วยผ้าขาวบางที่มีขนาดตาข่ายประมาณ 1 มม. ก้อนลิ่มนมจะกองรวมกันบนผ้าซึ่งมีที่กรองตะแกรงรองอีกชั้น น้ำหางนมที่ได้จะมีสีเหลืองอ่อนใส ทิ้งไว้ ประมาณ 1.5 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งไม่มีน้ำหยดออกมาจากก้อนลิ่ม ใส่ถุงมือที่สะอาด และรวบชายผ้าเข้าด้วยกัน ใช้แรงเค้นให้น้ำหางนมออกมากที่สุด

6 ก้อนลิ่มที่ได้ มีความแข็งไม่มากนักจะไม่สามารถซ้อนทับกันได้ จึงตัดขั้นตอนการทำเชดดาริ่งออกไป ดังนั้นจึงตัดให้เป็นชิ้นเล็กลงแล้วเติมเกลือ 1.5 เปอร์เซนต์(น้ำหนักต่อน้ำหนักก้อนลิ่มขณะนั้น)ใช้พายไม้คนให้เข้ากัน)

7 นำก้อนลิ่มมาใส่พิมพ์ รูปทรงกระบอก (Hoop) ปิดฝา ใช้น้ำหนักกดทับ 1.5 กก. ทิ้งไว้เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปเก็บในตู้เย็นอีก 18 ชั่วโมง

8 นำก้อนเนยแข็งมาหุ้มด้วยฟิล์มห่ออาหารเก็บในตู้เย็น บ่มเป็นเวลา 64 วัน ที่เลือกการบ่ม 64 วันเพราะเนยแข็งนี้มีวัตถุดิบที่ผสมน้ำนมถั่วเหลือง ซึ่งตามรายงานการศึกษา มีความชื้นมากกว่าน้ำนมโค และความชื้นเริ่มต้นของเนยแข็งที่ได้มีสูงถึง ประมาณ 70 เปอร์เซนต์ ทำให้โอกาสที่จะปนเปื้อนมีมาก และการเปลี่ยนแปลงของเนยแข็งช่วงบ่มจะสูงที่สุดใน 30 วันแรกที่บ่มการติดตามเป็นเวลา 63 วันตามรายงานของ Lee และ Marshall ,1981 ในการปฏิบัติการนี้ได้เพิ่มเป็น 64 วันเพราะเพื่อให้การตรวจวัดค่า ปริมาณโปรตีนและไขมันจะตรวจทุก 21 วัน เป็นไปในอัตราส่วนเดียวกัน โดยเพิ่มวันเก็บตัวอย่างที่ 0 ซึ่งเป็นวันผลิตอีก 1 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตรวจวัดลักษณะบางประการของวัตถุดิบน้ำนมและเนยแข็ง

1 วัตถุดิบน้ำนม

1.1 ค่าความเป็นกรดด่าง(พีเอช)โดยนำตัวอย่างน้ำนม ปริมาตร 10 มล. คนให้เข้ากันแล้ววัดพีเอชน้ำนมตัวอย่าง โดยใช้พีเอชมิเตอร์

1.2 ปริมาณความชื้น วัดโดยใช้วิธีอบแห้งและชั่งน้ำหนัก โดยชั่งน้ำนม 2.0 กรัม ใส่ถ้วยโลหะปลอดสนิม นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °ซ นาน 6 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนักและนำไปอบซ้ำ 1 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนักซ้ำ และทำซ้ำ จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ไม่ลดอีกต่อไป นำมาคำนวนน้ำหนักน้ำหรือความชื้นที่หายไปเป็นเปอร์เซนต์ของน้ำหนักตัวอย่าง (ภาคผนวก ค หมายเลข 3)

1.3 ปริมาณโปรตีน หาโดยวิธี เจดาล์ล (Kjeldahl method : ภาคผนวก ค หมายเลข 4)

1.4 ปริมาณไขมัน หาโดยวิธีสกัดด้วยเครื่องซอกท์เล็ท (Soxhlet extraction) โดยใช้สารสกัดไดเอธิลอีเธอร์ (Diethyl ether)) (ภาคผนวก ค หมายเลข 5)

2 เนยแข็ง เตรียมจากวัตถุดิบ 3 ชนิด คือ น้ำนมยูเอชที น้ำนมยูเอชทีหมดอายุและน้ำนมยูเอชทีหมดอายุผสมน้ำนมถั่วเหลือง ตรวจวิเคราะห์หาปัจจัยดังนี้คือ

1 ค่าความเป็นกรดด่าง(พีเอช) โดยตัดเนยแข็งตัวอย่าง น้ำหนัก 3.0 กรัม บดให้ละเอียดละลายด้วยซิเตรทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.4 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร วัดด้วยพีเอชมิเตอร์ ทุก 14 วัน ตลอดช่วงการบ่ม 64 วัน

2 ปริมาณความชื้น โดยตัดเนยแข็งเป็นชิ้นน้ำหนัก 1.00 กรัม ใส่ถ้วยโลหะปลอดสนิมที่ชั่งน้ำหนักแล้ว อบที่ความร้อน 60 °ซ จนแห้ง น้ำหนักไม่เปลี่ยน หาค่าเฉลี่ยวัดทุก 14 วัน ตลอดการบ่ม 64 วัน

3 ปริมาณโปรตีน หาโดยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 1.3 เปลี่ยนตัวอย่างทดสอบเป็นเนยแข็งอบแห้ง บดให้ละเอียด (ภาคผนวก ค. หมายเลข 4)

4 ปริมาณไขมัน หาโดยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 1.4 เปลี่ยนตัวอย่างทดสอบเป็นเนยแข็งอบแห้ง บดให้ละเอียด (ภาคผนวก ค. หมายเลข 5)

5 นับจำนวนแบคทีเรีย โดยการตัดเนยแข็งเป็นชิ้นน้ำหนัก 1.0 กรัม บดและเจือจางด้วยซิเตรท บัฟเฟอร์ (Citrate buffer : ภาคผนวก ข หมายเลข 11) เพาะเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อวุ้นแข็งเอ็มอาร์เอสและอาหารเลี้ยงเชื้อพีซีเอ ตรวจนับจำนวนและตรวจสอบหาเชื้อที่อาจปนเปื้อนมาระหว่างการบ่ม ทุก 14 วัน ตลอดการบ่ม 64 วัน

6 น้ำหนักเนยแข็งที่ได้ภายหลังการบ่ม 64 วัน (Cheese yield) เทียบกับปริมาณวัตถุดิบที่ใช้เป็นเปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดสอบด้วยประสาทสัมผัส (Sensory test)

ทดสอบเนยแข็งหลังบ่ม โดยใช้ผู้ทดสอบที่เคยรับประทานเนยแข็ง จำนวน 20 คน เนยแข็งควบคุมคือเนยแข็งเชดดาร์ผลิตจากน้ำนมโคสดในระดับอุตสาหกรรมจำหน่ายในท้องตลาด กับเนยแข็งที่ทำจากวัตถุดิบน้ำนมยูเอชที น้ำนมยูเอชทีหมดอายุและน้ำนมยูเอชทีหมดอายุผสมน้ำนมถั่วเหลืองในระดับห้องปฏิบัติการ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างมากน้อยตามลำดับ (การให้คะแนน ศึกษาจากภาคผนวก ค หมายเลข 6)

แบ่งเป็นลักษณะทดสอบดังต่อไปนี้

1 สี (Colour) ทดสอบโดยใช้สายตาเปรียบเทียบสีของเนยแข็งควบคุม และเนยแข็งทดสอบแต่ละชนิด ให้คะแนนความแตกต่างมากน้อยตามความรู้สึก

2 กลิ่น (Odor) ทดสอบโดยดมเนยแข็งควบคุมและเนยแข็งทดสอบแต่ละชนิดให้คะแนนความแตกต่างมากน้อยตามความรู้สึก

3 เนื้อสัมผัส (Texture) ทดสอบโดยใช้นิ้วที่สะอาดบีบเนยแข็งควบคุม และเนยแข็งทดสอบเปรียบเทียบความแข็ง ความเนียน ความเปราะ และให้คะแนนความแตกต่างโดยรวมตามความรู้สึก

4 รสชาติ (Taste) ทดสอบโดยล้างปากให้สะอาด ชิมเนยแข็งควบคุมโดยให้รสกระจายทั่วปากให้ต่อมรับรสได้สัมผัสเนยแข็งอย่างทั่วถึง อาจกลืนหรือคายทิ้งก็ได้ ล้างปาก พักสักครู่ ชิมเนยแข็งทดสอบ จนครบ ให้คะแนนความแตกต่างตามความรู้สึก

5 การยอมรับได้รวม (Acceptability) โดยพิจารณาให้คะแนนเนยแข็งควบคุมเป็น 10 คะแนนเต็ม จะตัดสินให้คะแนนยอมรับเนยแข็งแต่ละชนิดตามความรู้สึก