บทที่ 3

การทดลอง

แบ่งการทดลองทั้งหมดเป็นดังนี้

3.1 การเตรียมยีสต์แห้ง

3.2 การเตรียมอาหารปลากะพงขาวแบบเม็ดเปียก (moist pellet)

3.3 การทดลองเลี้ยงลูกปลากะพงขาวด้วยอาหารที่ใช้ยีสต์แทนปลาป่นในปริมาณต่าง ๆ กัน

3.4 การทดลองใช้สารกันเสียในการถนอมอาหารปลาแบบเม็ดเปียก

3.5 การวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของยีสต์แห้งและอาหารปลา

3.6 การตรวจสอบอาหารปลาที่ทดลองถนอมด้วยสารกันเสียทางจุลชีววิทยา

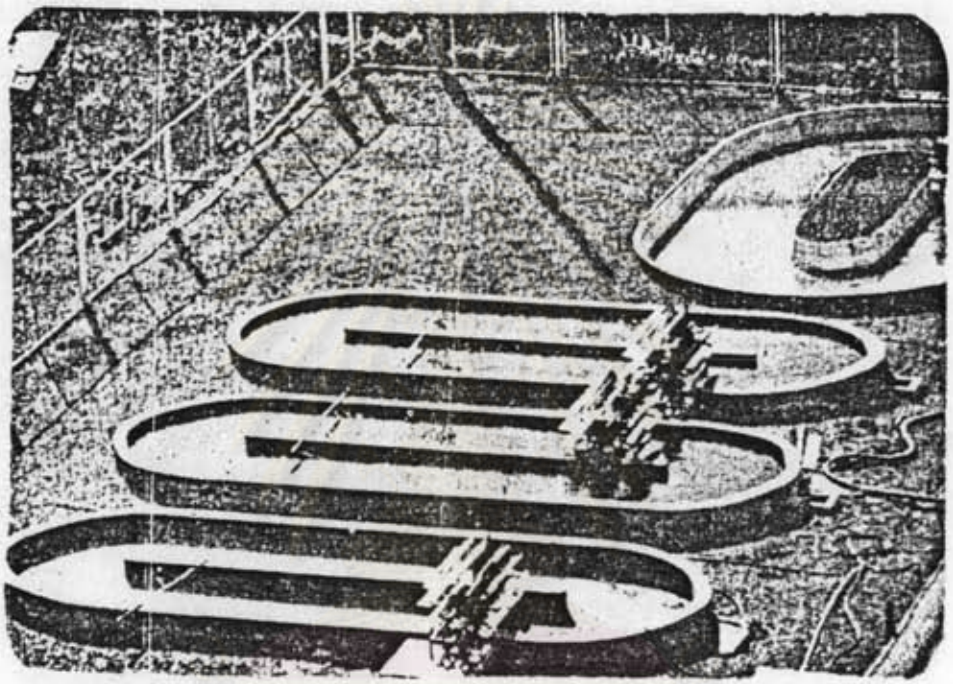
3.1 การเตรียมยีสต์แห้ง

3.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมยีสต์แห้ง ได้แก่

- อ่างเจือจาง (dilution basin) รูปไข่ที่มีเครื่องกวน (agitator) ติดตั้งอยู่ด้วย ดังรูปที่ 3-1
- เครื่องเหวี่ยง (centrifuge, Alfa Laval) ดังรูปที่ 3-2
- เครื่องอบแห้งแบบลูกกลิ้งเดี่ยว (single drum dryer)

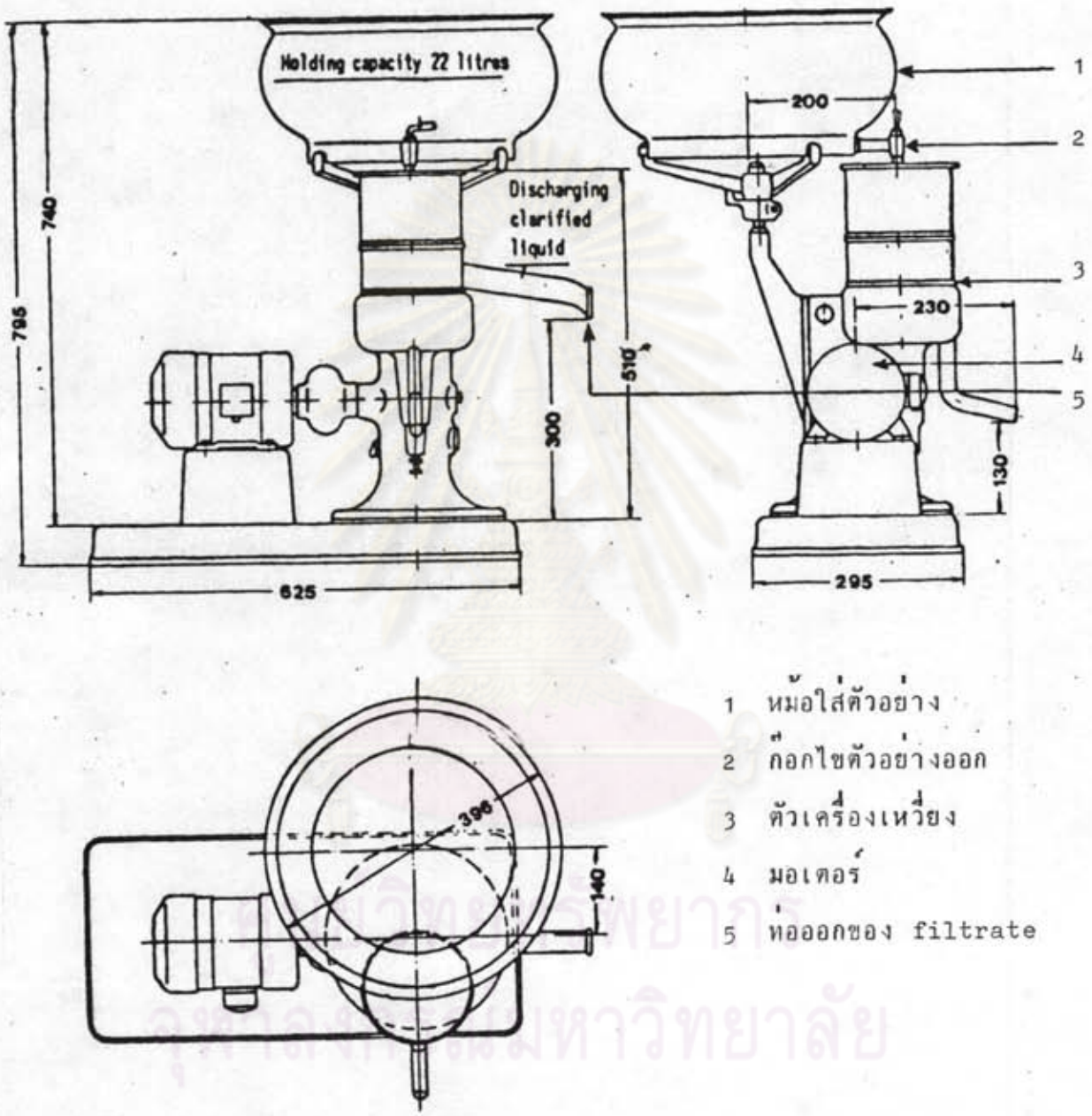
3.1.2 วิธีปฏิบัติการ

ใช้ยีสต์ Saccharomyces carlsbergensis หรืออีกชื่อหนึ่งคือ Saccharomyces uvarum ซึ่งเป็น bottom yeast จากบริษัท อมฤตบริเวอรี่ จำกัด โดยตักยีสต์จากถังหมักซึ่งอยู่ในรูปของเหลวข้น (slurry) สีกาแฟ และมีกลิ่นแอลกอฮอล์ปนอยู่มากซึ่งจะได้ยีสต์ที่มีความเข้มข้นไม่สม่ำเสมอ บางครั้งข้นมาก บางครั้งค่อนข้างใส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการปะปนของน้ำเบียร์ที่ติดมากับยีสต์ การตักยีสต์จากบริเวณส่วนบนของถังหมักจะได้ยีสต์ที่มีน้ำเบียร์ปนมาด้วยมากกว่าการตักจากบริเวณส่วนล่างความเข้มข้นที่ไม่สม่ำเสมอเช่นนี้มีผลต่อปริมาณยีสต์แห้งที่เตรียมได้ในแต่ละครั้งด้วย



รูปที่ 3-1 อ่างเจือจาง (dilution basin)

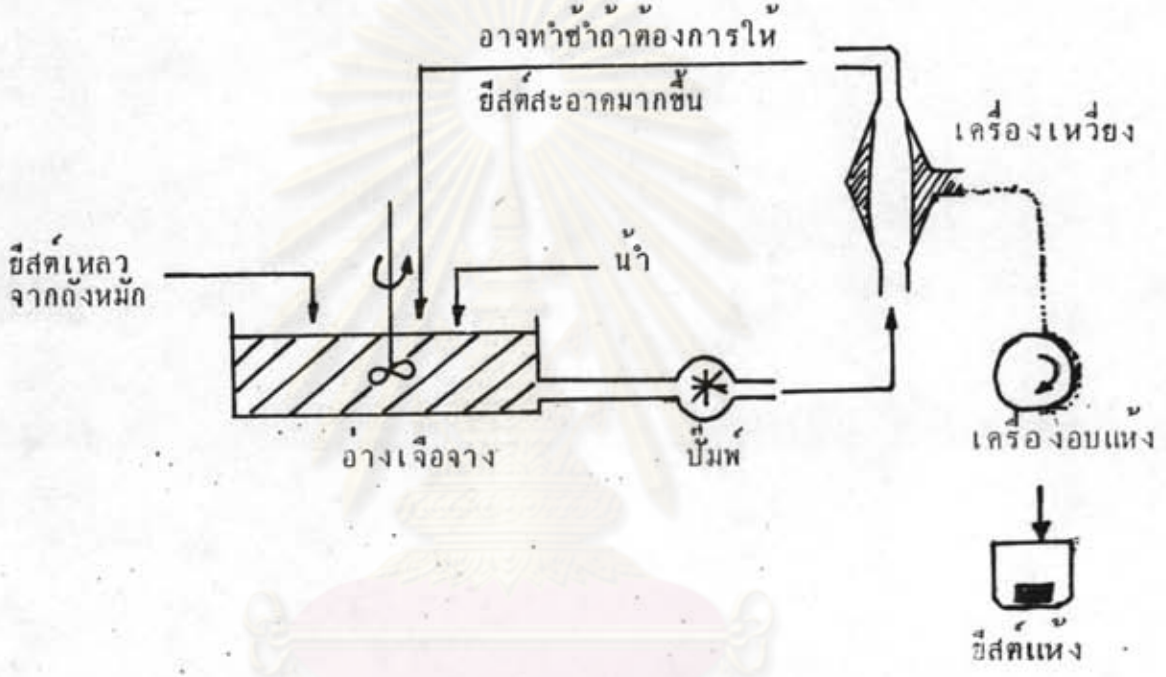
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



1 หม้อใส่ตัวอย่าง
2 ก๊อกไขตัวอย่างออก
3 ตัวเครื่องเหวี่ยง
4 มอเตอร์
5 ท่อออกของ filtrate

รูปที่ 3-2 แสดงส่วนต่าง ๆ ของเครื่องเหวี่ยง (centrifuge)

ยีสต์ที่ได้จากถังหมักนี้ถ้ายังไม่สามารถทำเป็นยีสต์แห้งได้ทันทีจะต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ (ประมาณ -2 องศาเซลเซียส) ก่อนเพราะยีสต์ยังมีชีวิตอยู่ หากเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน เซลยีสต์จะปล่อยเอ็นไซม์ไลโซไซม์(lysozyme) มาย่อยตัวเอง ทำให้ปริมาณโปรตีนของยีสต์ลดต่ำลง (11)



รูปที่ 3-3 แสดงขั้นตอนของการเตรียมยีสต์แห้ง (11)

การเตรียมยีสต์แห้ง (ทำที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร) มีขั้นตอนต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 3-3 นำยีสต์เหลวจากถังหมัก(fermentation tank) มาทำความสะอาดด้วยน้ำเพื่อล้างสิ่งเจือปนต่าง ๆ อาทิเช่น แอลกอฮอล์ ออกไปโดยผสมยีสต์กับน้ำในอัตราส่วน 1 ต่อ 20 ในอ่างเจือจางซึ่งตรงกลางอ่างมีเครื่องกวนทำหน้าที่กวนยีสต์กับน้ำให้ผสมผสานกัน จากนั้นนำของผสมนี้ไปกรองโดยใช้เครื่องเหวี่ยง นำส่วนที่เป็นเค็กมาอบแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบลูกกลิ้งเดี่ยว โดยใช้ความเร็ว 20 รอบต่อนาที และความดันไอน้ำ 7 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

3.2 การเตรียมอาหารปลากะพงขาวแบบเม็ดเปียก (moist pellet)

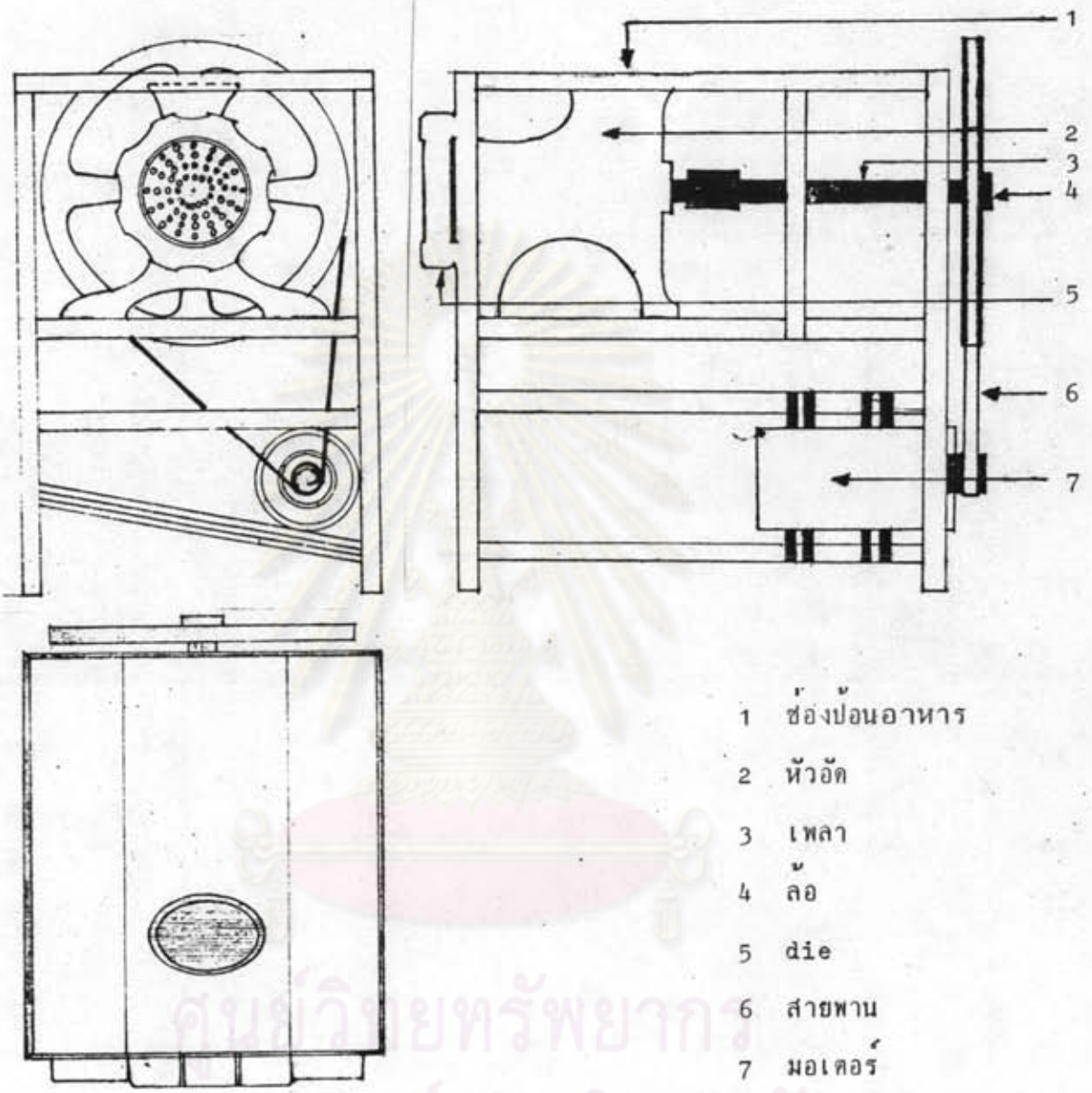
3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำอาหารปลา ได้แก่ เครื่องอัดเม็ด (extruder) ดังรูปที่ 3-4

3.2.2 วิธีปฏิบัติการ

การเตรียมอาหารปลากะพงขาวแบบเม็ดเปียกมีขั้นตอนดังรูปที่ 3-5 ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ ปลาป่นจืด ยีสต์แห้ง รำละเอียด แป้งอัลฟ่า (แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านขบวนการgelatinization มาแล้ว) น้ำมันปลา วิตะมิน-เกลือแร่ผสม (ซึ่งมีส่วนประกอบต่าง ๆ ดังแสดงในภาคผนวก ช) และน้ำ คุณค่าทางอาหารของปลาป่นจืดและรำละเอียดแสดงไว้ในตารางที่ ก-1 ของภาคผนวก ก และปริมาณของส่วนประกอบแต่ละชนิดได้แสดงไว้ในตารางที่ 3-1 โดยในที่นี้ได้กำหนดปริมาณการใช้แป้งอัลฟ่า น้ำมันปลา วิตะมิน-เกลือแร่ผสม เท่ากับร้อยละ 10,3 และ 1.6 ตามลำดับ ในการคำนวณหาปริมาณของส่วนประกอบที่เป็นตัวแปรนั้นใช้วิธี Square Method Balance ดังแสดงในภาคผนวก ค

ตารางที่ 3-1 แสดงส่วนประกอบของสูตรอาหารปลากะพงขาว

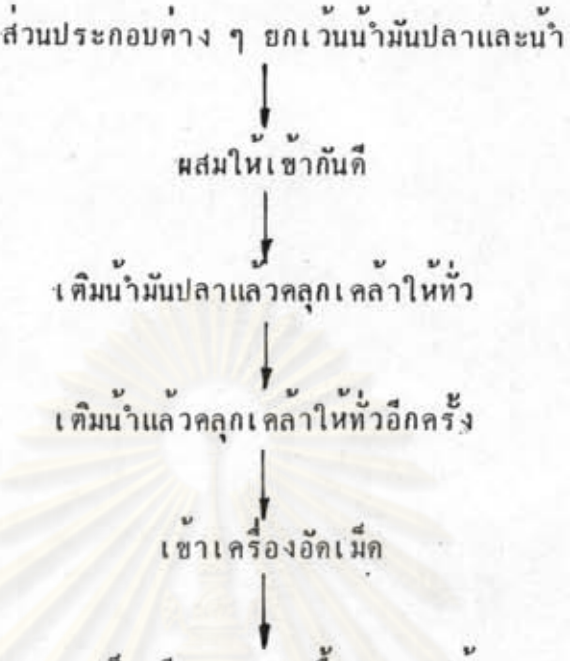
วัตถุดิบ	ร้อยละของส่วนประกอบในอาหารปลา		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
ปลาป่นจืด	58.20	47.65	36.75
ยีสต์แห้ง	-	15.88	36.75
รำละเอียด	27.20	21.87	11.90
แป้งอัลฟ่า	10.00	10.00	10.00
วิตะมิน-เกลือแร่ผสม	1.60	1.60	1.60
น้ำมันปลา	3.00	3.00	3.00
น้ำ (ต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม)	30.00	30.00	30.00



1 ช่องป้อนอาหาร
2 หัวอัด
3 เพลา
4 ล้อ
5 die
6 สายพาน
7 มอเตอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3-4 แสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ของเครื่องอัดเม็ด(extruder)



รูปที่ 3-5 แสดงขั้นตอนการเตรียมอาหารปลาแบบเม็ดเปียก (1)

3.3 <u>การทดลองเลี้ยงลูกปลากะพงขาวด้วยอาหารที่ใช้ยีสต์แทนปลาป่นในปริมาณต่าง ๆ กัน</u>

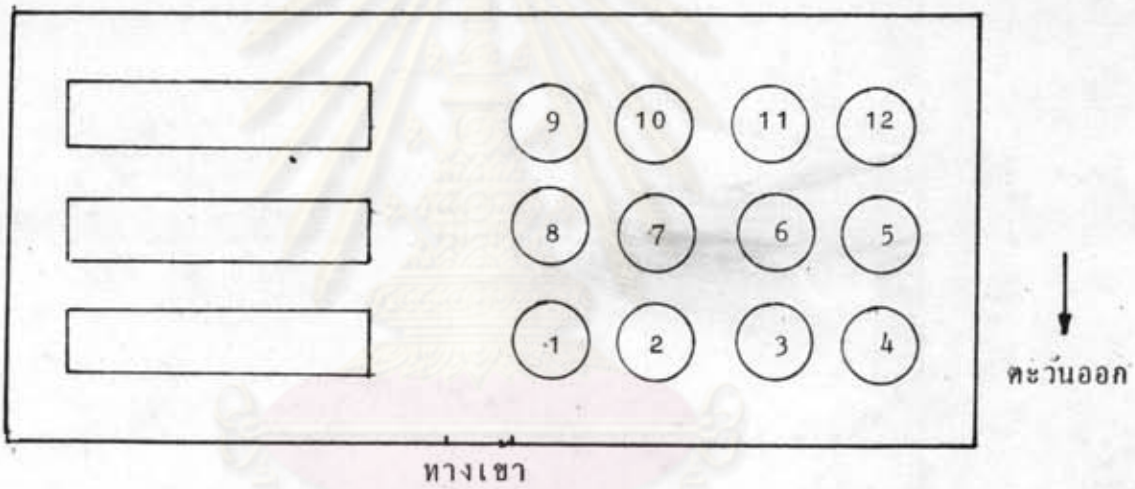
3.3.1 <u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงปลา</u> ได้แก่

- บ่อซีเมนต์รูปทรงกระบอกซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 91 เซนติเมตร และสูง 56 เซนติเมตร
- เครื่องชั่งน้ำหนัก ขนาดละเอียด 0.1 กรัม
- ไม้วัดความยาว ขนาดละเอียด 0.1 เซนติเมตร
- เทอร์โมมิเตอร์ ชนิดวัดอุณหภูมิได้จาก 0-100 องศาเซลเซียส
- Hand refractometer

3.3.2 <u>วิธีปฏิบัติการ</u>

3.3.2.1 <u>เวลาและสถานที่ที่ทำการทดลอง</u> ทำการทดลอง ณ สถานีวิจัยสัตว์ทะเล ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ระหว่าง 16 พฤศจิกายนถึง 27 ธันวาคม พ.ศ.2524 รวมเวลาทั้งสิ้น 42 วัน

ลักษณะของสถานที่ทำการทดลองหรือโรงเลี้ยงปลานั้นเป็นตึกชั้นเดียว หลังคามุงกระเบื้องทึบแสง ผนังตึกส่วนล่างก่อด้วยซีเมนต์ทึบ ส่วนบนก่อด้วยอิฐบล็อกชนิดที่มีช่องให้แสงสว่างผ่านเข้ามาภายในโรงเลี้ยงได้ โรงเลี้ยงแบ่งเป็น 2 ซีก ซีกซ้ายมือเป็นบ่อเลี้ยงกุ้ง ส่วนซีกขวาเป็นบ่อเลี้ยงปลาซึ่งใช้ทดลองจำนวน 12 บ่อ ดังแสดงในรูปที่ 3-6



= บ่อเลี้ยงปลา

= บ่อเลี้ยงกุ้ง

รูปที่ 3-6 แสดงผังของบ่อทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3.2.2 <u>การเตรียมการก่อนทดลอง</u> ก่อนทดลองได้ทำการฝึกลูกปลากะพงขาวให้คุ้นเคยกับการกินอาหารสำเร็จรูปก่อน (ใช้อาหารสูตรที่ 1 ซึ่งเป็นสูตรที่ไม่มียีสต์เป็นส่วนประกอบ) โดยใช้ลูกปลากะพงขาวที่มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร มาฝึกเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน หลังจากนั้นจึงได้นำลูกปลาทั้งหมดมาคัดแยกเอาเฉพาะที่มีความยาว 4.6 เซนติเมตรเพื่อใช้ทดลอง

3.3.2.3 <u>การวางแผนการทดลองเลี้ยงปลา</u> วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomize Design โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 การทดลอง (treatment) การทดลองละ 4 ซ้ำ (replicate) ซึ่งกำหนดให้

การทดลองที่ 1 ทำการทดลองเลี้ยงลูกปลากะพงขาวด้วยอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งเป็นสูตรที่ใช้ควบคุม (control)

การทดลองที่ 2 ทำการทดลองเลี้ยงลูกปลากะพงขาวด้วยอาหารสูตรที่ 2 ซึ่งเป็นสูตรที่ใช้ยีสต์แทนปลาป่นร้อยละ 25

การทดลองที่ 3 ทำการทดลองเลี้ยงลูกปลากะพงขาวด้วยอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งเป็นสูตรที่ใช้ยีสต์แทนปลาป่นร้อยละ 50

3.3.2.4 <u>การทดลองเลี้ยงลูกปลากะพงขาว</u>

3.3.2.4.1 นำลูกปลาที่คัดแยกไว้แล้วในหัวข้อ 3.3.2.2 มาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์จำนวน 12 บ่อ โดยปล่อยปลา 36 ตัวต่อ 1 บ่อ สำหรับแต่ละซ้ำของการทดลองหนึ่ง ๆ ได้สุ่ม (random) ตามปริมาณแสดงสว่างที่ส่องถึงบ่อดังนี้คือ (ดูรูปที่ 3-6 ประกอบ)

การทดลองที่ 1 ได้แก่บ่อหมายเลข 2 6 9 12

การทดลองที่ 2 ได้แก่บ่อหมายเลข 1 5 7 11

การทดลองที่ 3 ได้แก่บ่อหมายเลข 3 4 8 10

3.3.2.4.2 ให้อาหารลูกปลาทุกวัน ๆ ละ 3 มื้อและให้ในปริมาณร้อยละ 15 ของน้ำหนักตัวต่อวัน ทำการปรับปริมาณอาหารที่ให้ทุกครั้งที่ทำการชั่งน้ำหนักปลา หลังจากให้อาหารแล้วได้ทำการดูดเศษตะกอนต่าง ๆ ที่ตกอยู่ตามพื้นบ่อออกให้หมดเพื่อให้น้ำสะอาดอยู่เสมอ

3.3.2.4.3 นำลูกปลาทุกตัวมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาวทุก 2 สัปดาห์ ในการชั่งน้ำหนักปลาใส่ปลาในถ้วยพลาสติกที่มีน้ำบรรจุอยู่พอท่วมปลาและวัดน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ส่วนการวัดความยาวทำได้โดยนำปลามาวางบนไม้วัดและวัดความยาวตั้งแต่ปลายสุดของหางปลาจนถึงปากปลา (total length)

3.4 <u>การทดลองใช้สารกันเสียในการถนอมอาหารปลาแบบเม็ดเปียก</u>

ทดลองถนอมอาหารปลาแบบเม็ดเปียก (ใช้อาหารสูตรที่ 2) โดยใช้สารกันเสียประเภทยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (antimicrobial agent) ที่อยู่ในเกณฑ์พิจารณามี 3 ชนิดคือ ซอร์เบต (sorbates) โพรไพโอเนต (propionates) และเบนโซเอต (benzoates) เพราะสารทั้งสามชนิดนี้เป็นที่นิยมใช้กันแพร่หลาย (42,43) แต่จากการศึกษาคุณสมบัติของสารดังกล่าวพบว่าเบนโซเอตนั้นจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ดีกับอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่าง หรือ pH ไม่เกิน 4.0 (43) ดังนั้นจึงไม่เหมาะแก่การนำมาใช้ถนอมอาหารปลาดังกล่าวซึ่งมี pH ประมาณ 5.7 สำหรับซอร์เบตและโพรไพโอเนตนั้นจะใช้ได้ดีที่ pH นี้และยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์พอ ๆ กัน แต่ราคาของซอร์เบตถูกกว่า (ราคาในปี 2523 : โพรไพโอเนตกิโลกรัมละ 320 บาท ส่วนซอร์เบตกิโลกรัมละ 210 บาท) จึงได้เลือกใช้ซอร์เบต ในที่นี้ได้ศึกษาถึงความเข้มข้นของโปตัสเซียมซอร์เบตที่เหมาะสมในปริมาณต่าง ๆ กันคือ ร้อยละ 0,0.1,0.3,0.5 และ 0.7 (ต่อน้ำหนักเปียก)

3.4.1 <u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง</u> ได้แก่

- เครื่องอัดเม็ด (เช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.2.1)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (electronic pH meter)

3.4.2 <u>วิธีปฏิบัติการ</u>

3.4.2.1 <u>การวัดความเป็นกรด-ด่างของอาหารปลา</u> ผสมอาหารปลากับน้ำกลั่น (ที่เป็นกลาง) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 คนให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันและวัดความเป็นกรด-ด่างของของผสมนี้ (45)

3.4.2.2 <u>การผสมโปตัสเซียมซอร์เบตลงในอาหารปลา</u> นำวัตถุดิบต่าง ๆ ที่จะใช้ทำอาหารปลามาคลุกเคล้าให้เข้ากันดีแล้วก็ใช้น้ำที่จะต้องเติมลงไปในสูตร

(ดูรูปที่ 3-5 ประกอบ) จำนวนนั้นมาเป็นตัวทำละลายโปตัสเซียมซอร์เบตที่อยู่ในรูปของแข็งก่อน เพราะโปตัสเซียมซอร์เบตจะมีประสิทธิภาพก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาพสารละลายเท่านั้น (42) หลังจากผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากันดีแล้วจึงนำไปเข้าเครื่องอัดเม็ดเพื่อให้ได้เป็นอาหารเม็ดเปียก นำมาบรรจุในถุงพลาสติก(polyethylene) ถุงละ 250 กรัม มัดปากถุงด้วยหนังยาง เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 เดือน ทดลองทำอาหารปลาที่เติมโปตัสเซียมซอร์เบตในปริมาณต่าง ๆ กันนี้ซ้ำ 2 ชุด สังเกตการเจริญของเชื้อราบนอาหารปลาที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า บันทึกวันที่เห็นราขึ้นวันแรก และนำอาหารปลาที่เติมโปตัสเซียมซอร์เบตในปริมาณต่าง ๆ กันนี้มาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณบัคเตรี(total viable plate count) และปริมาณยีสต์และรา(total yeast and mold count) ทุก ๆ 7 วันจนกระทั่งเห็นการเจริญของเชื้อราบนอาหารปลาที่มองเห็นด้วยตาเปล่า

3.5 <u>การวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของยีสต์แห้งและอาหารปลา</u>

3.5.1 <u>การเตรียมตัวอย่างยีสต์แห้งและอาหารปลาสำหรับใช้วิเคราะห์คุณค่าทางอาหาร</u>

นำตัวอย่างยีสต์แห้งและอาหารปลามาทำให้มีอนุภาคขนาดเล็กด้วยการใช้เครื่องตีปั่นผสม (blender) สำหรับตัวอย่างที่จะใช้หาปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า และเยื่อใย จะนำมาอบแห้งจนได้น้ำหนักคงที่

3.5.2 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น</u> (45)

<u>อุปกรณ์</u> - จานอะลูมิเนียม (aluminium dish) พร้อมด้วยฝาปิด
- ตู้อบไฟฟ้าที่ปรับและควบคุมอุณหภูมิได้
- เดสิกเคเตอร์ที่มีสารดูดความชื้น

<u>วิธีการ</u>

อบจานอะลูมิเนียมพร้อมฝาปิดในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส นานประมาณ 15 นาที นำออกมาใส่ในเดสิกเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่ง

ชั่งตัวอย่างในจานอะลูมิเนียมให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2.5 กรัม อบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5-6 ชั่วโมง

นำออกมาใส่ในเดสิกเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่ง อบซ้ำนานครั้งละ 30 นาทีจนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 2 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดถือเป็นน้ำหนักจานอะลูมิเนียมและตัวอย่างหลังจากอบแห้งแล้ว

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{100(W_1 - W_2)}{W_1 - W}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักของจานอะลูมิเนียม เป็นกรัม

W_1 คือ น้ำหนักของจานอะลูมิเนียมและตัวอย่างก่อนอบ เป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักของจานอะลูมิเนียมและตัวอย่างหลังจากอบแห้งแล้ว เป็นกรัม

3.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

3.5.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณ Crude protein หรือ Kjeldahl protein (45)

สารเคมี
- กรดซัลฟุริกเข้มข้น
- เมอคิวริกออกไซด์
- โปตัสเซียมซัลเฟต
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 45
- โซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.3 นอร์มัล
- โซเดียมไธโอซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 8
- สังกะสีชิ้นเล็ก ๆ (zinc granules)
- กรดเกลือ ความเข้มข้น 0.3 นอร์มัล
- Methyl red indicator

อุปกรณ์
- ขวดย่อย (macro-Kjeldahl digestion flask)
- ตู้ควัน
- ชุดกลั่น (distillation apparatus)
- บีเกอร์ ขนาด 100, 250 มิลลิลิตร

- Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
- Heating mantle
- กระบอกตวง(cylinder) ขนาด 25 และ 50 มิลลิลิตร
- บิวเรต (burette) ขนาด 50 มิลลิลิตร

วิธีการ

ใช้ตัวอย่าง 0.7-2.2 กรัม ย่อยด้วยกรดซัลฟุริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร โดยใช้ของผสมระหว่างเมอคิวริกออกไซด์ 0.7 กรัมและโปตัสเซียมซัลเฟต 15 กรัมเป็นตัวเร่งปฏิกริยา ใส่boiling chip เล็กน้อยเพื่อป้องกันการเกิด bumping ย่อยในตู้ควันโดยจัดขวดย่อยให้เอียง ในตอนแรกใช้ความร้อนที่ไม่แรงนักจนกระทั่งฟองหายไปแล้วค่อยเพิ่มความร้อนให้แรงขึ้น ย่อยต่อไปจนได้สารละลายใส (ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง) และย่อยต่อไปอีก ≥ 30 นาที

ทำให้เย็นแล้วถ่ายสารละลายจากขวดย่อยลงสู่ขวดกลั่นด้วยน้ำกลั่นประมาณ 200 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮโอซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 8 จำนวน 25 มิลลิลิตรลงไป เขย่าให้ปรอทตกตะกอน เติมสังกะสีชิ้นเล็ก ๆ ลงไปเล็กน้อยเพื่อกันการเกิดbumping เอียงขวดกลั่นแล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 45 ลงไปให้สารละลายทั้งหมดในขวดกลั่นเป็นด่างแก่ (หรือใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์แบบเม็ด 25 กรัม) ไม่ต้องกวนแล้วรีบต่อขวดกลั่นเข้ากับส่วนต่ออื่น ๆ ของขวดกลั่นโดยให้ปลายของ condenser จุ่มในกรดเกลือความเข้มข้น 0.3 นอร์มัล จำนวน 50 มิลลิลิตร เติม methyl red indicator 5-7 หยด จากนั้นเริ่มกลั่นให้ได้ distillate อย่างน้อย 150 มิลลิลิตร นำ distillate ไปไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐานความเข้มข้น 0.3 นอร์มัล

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณ Crude protein (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \text{ปริมาณไนโตรเจนเป็นร้อยละของน้ำหนัก} \times 6.25$$

$$\text{โดยปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{1.4007\,[(A \times B)-(C \times D)]}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง(กรัม)}}$$

เมื่อ A คือ ปริมาตรของกรดเกลือ (มิลลิลิตร)

B คือ ความเข้มข้นของกรดเกลือ (นอร์มัล)

C คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน (มิลลิลิตร)

D คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน (นอร์มัล)

3.5.3.2 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณ Lowry protein (46)

สารเคมี
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล
- คอปเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 1
- โซเดียม-โปตัสเซียมทาร์เทต ความเข้มข้นร้อยละ 2
- โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 2
- Folin reagent ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล
- อัลบูมิน (albumin)

อุปกรณ์
- กรวยกรองและกระดาษกรอง
- Test tube
- Erlenmeyer flask ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร
- เครื่องปั่นผสม (blender)
- Spectrophotometer (Bausch & Lomb, Spectronic 21)

วิธีการ

ชั่งตัวอย่างให้ได้ค่าที่แน่นอนประมาณ 5 กรัมทำให้เป็น suspension ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัลจำนวน 500 มิลลิลิตร โดยนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นกรอง นำสารละลายใสที่กรองได้ 3 มิลลิลิตรมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำสารละลายนี้มา 1 มิลลิลิตรใส่ใน test tube แล้วเติมของผสม (ซึ่งประกอบด้วยสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 1, 1 มิลลิลิตร+ สารละลายโซเดียม-โปตัสเซียมทาร์เทตความเข้มข้นร้อยละ 2, 1 มิลลิลิตร+ สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 2 ซึ่งละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล, 100 มิลลิลิตร) ในปริมาณ 4 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาทีจากนั้นจึงเติมสารละลาย Folinความเข้มข้น 0.1

I15482364

นอร์มัลลงไป 4 มิลลิลิตรอย่างรวดเร็ว ตั้งทิ้งไว้ 45 นาทีแล้วนำไปวัดค่าสภาพดูดกลืนแสง (absorbance) โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทำ standard curve โดยใช้อัลบูมิน (แสดงไว้ในภาคผนวก ฏ) และทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรแทนสารละลายใสที่ได้จากการปั่นตัวอย่างกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

3.5.4 <u>การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน(crude fat)</u> (45)

<u>สารเคมี</u> - Petroleum ether

<u>อุปกรณ์</u> - กระดาษกรอง

- Thimble
- Soxhlet apparatus
- ขวดก้นกลม (round bottom flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
- เดสิกเคเตอร์ที่มีสารดูดความชื้น
- ตู้อบไฟฟ้าที่ปรับและควบคุมอุณหภูมิได้

<u>วิธีการ</u>

ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 5 กรัมห่อตัวอย่างด้วยกระดาษกรองแล้วใส่ใน thimble ใช้สำลีแผ่เป็นแผ่นบาง ๆ วางปิดปาก thimble จากนั้นใส่ thimble ลงใน Soxhlet แล้วต่อ Soxhlet เข้ากับขวดก้นกลมที่ชั่งน้ำหนักแล้วซึ่งภายในขวดบรรจุ petroleum ether ประมาณ 150 มิลลิลิตร จากนั้นนำ condenser มาต่อเข้ากับส่วนบนของ Soxhlet แล้วเริ่มกลั่นโดยปรับระดับความร้อนให้ petroleum ether หยดลงมาในอัตรา 120 หยดต่อนาทีซึ่งใช้เวลากลั่นประมาณ 16 ชั่วโมง

หลังจากนั้นถอดชุดกลั่นออก นำขวดก้นกลมซึ่งขณะนั้นมีน้ำมันที่ถูกสกัดออกมาจากตัวอย่างปนอยู่กับ petroleum ether นำไปกลั่นเพื่อแยก petroleum ether ออกไปและนำไประเหยต่อให้ petroleum ether ออกไปจนหมดในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำออกมาใส่ในเดสิกเคเตอร์ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่ง ระเหยซ้ำนานครั้งละ 15 นาทีจนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 0.001 มิลลิกรัมจดน้ำหนักที่น้อยที่สุด

คือเป็นน้ำหนักของขวดและน้ำมันหลังจากระเหยตัวสกัดออกจนหมดแล้ว

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{100(W - W_1)}{W_2}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักขวดและน้ำมันหลังจากระเหยตัวสกัดออกจนได้น้ำหนักคงที่ เป็นกรัม

W_1 คือ น้ำหนักขวด เป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่าง เป็นกรัม

3.5.5 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า (ash) (45)

อุปกรณ์ - ครูซิเบิล (crucible)
- เตาเผาไฟฟ้าที่ปรับและควบคุมอุณหภูมิได้
- เดสิกเคเตอร์ที่มีสารดูดความชื้น
- ตู้อบไฟฟ้าที่ปรับและควบคุมอุณหภูมิได้

วิธีการ

นำตัวอย่างมาประมาณ 5 กรัม ชั่งในครูซิเบิลที่เผาและชั่งน้ำหนักแล้วให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน นำไปเผาในเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 600± 20 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมงจนกระทั่งได้เถ้าสีขาวหรือสีเทา นำออกมาใส่ในเดสิกเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้องแล้วนำไปชั่ง

เผาตัวอย่างซ้ำนานครั้งละ 30 นาทีจนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดถือเป็นน้ำหนักของครูซิเบิลและตัวอย่างหลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{100(W_2 - W)}{W_1 - W}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักครูซิเบิล เป็นกรัม

W_1 คือ น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างก่อนเผา เป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่ เป็นกรัม

3.5.6 วิธีวิเคราะห์หาปริมาณเยื่อใย (crude fiber) (45)

สารเคมี
- กรดซัลฟุริกความเข้มข้น 0.255 นอร์มัล
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.313 นอร์มัล
- แอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95

อุปกรณ์
- บีเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตร
- ผ้ากรองหรือผ้าลินิน (linen cloth) ขนาด 200 เมช หรือมีเส้นด้าย 18 เส้นต่อ 1 ตารางเซนติเมตร
- กระดาษกรอง Whatman no.42 (ชนิดไม่มีเถ้า)
- กระดาษลิตมัส
- Buchner funnel และ Suction flask
- ครูซิเบิล
- ตู้อบไฟฟ้าที่ปรับและควบคุมอุณหภูมิได้
- เตาเผาไฟฟ้าที่ปรับและควบคุมอุณหภูมิได้
- เดสิกเคเตอร์ที่มีสารดูดความชื้น

วิธีการ

3.5.6.1 ใช้ตัวอย่างที่สกัดไขมันออกแล้ว ชั่งให้ได้ค่าที่แน่นอนประมาณ 2.5 กรัม ใส่ในบีเกอร์ขนาด 600 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟุริกความเข้มข้น 0.255 นอร์มัลซึ่งต้มเดือด 200 มิลลิลิตร นำไปย่อยในตู้ควันนาน 30 นาที

3.5.6.2 กรองทันทีด้วยผ้ากรองล้างด้วยน้ำร้อนจนหมดกรด ซึ่งทดสอบด้วยกระดาษลิตมัส

3.5.6.3 ถ่ายกากบนผ้ากรองลงในบีเกอร์เดิมจนหมด ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 0.313 นอร์มัลซึ่งต้มเดือดจำนวน 200

มิลลิลิตร นำไปย่อยในตู้ควันนาน 30 นาทีพอดี

3.5.6.4 นำไปกรองทันทีด้วย buchner funnel โดยใช้กระดาษกรอง Whatman no.42 ซึ่งชั่งน้ำหนักแล้ว ล้างกากด้วยน้ำร้อนจนหมดด่างแล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 จำนวน 10 มิลลิลิตร

3.5.6.5 นำกระดาษกรองที่มีกากติดอยู่ใส่ในครูซิเบิลแล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่ในเดสิกเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง นำไปชั่ง อบตัวอย่างนี้ซ้ำนานครั้งละ 30 นาทีจนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดถือเป็นน้ำหนักครูซิเบิลพร้อมกระดาษกรองและกากหลังจากอบแห้งแล้ว

3.5.6.6 เผาครูซิเบิลพร้อมกระดาษกรองและกากที่อบแห้งแล้วในเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 600 $\pm$ 20 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30 นาที แล้วนำออกมาใส่ในเดสิกเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นในอุณหภูมิห้อง นำไปชั่ง แล้วเผาซ้ำนานครั้งละ 30 นาทีจนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 1 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดถือเป็นน้ำหนักของครูซิเบิลและเถ้าหลังจากเผาแล้ว

<u>วิธีคำนวณ</u>

$$\text{ปริมาณเยื่อใย (ร้อยละของน้ำหนัก)} = \frac{100(W_2 - W_3 - W_1)}{W}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง เป็นกรัม

W_1 คือ น้ำหนักของกระดาษกรอง เป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักของครูซิเบิลพร้อมกระดาษกรองและกากหลังจากอบแห้งแล้ว เป็นกรัม

W_3 คือ น้ำหนักของครูซิเบิลและเถ้าหลังจากเผาแล้ว เป็นกรัม

3.6 <u>การตรวจสอบอาหารปลาที่ทดลองถนอมด้วยสารกันเสียทางจุลชีววิทยา</u>

ได้ทำการวิเคราะห์

3.6.1 หาปริมาณบัคเตรี (total viable plate count) ด้วยวิธี pour plate

3.6.2 หาปริมาณยีสต์และรา (total yeast and mold count) ด้วยวิธี spread plate

3.6.3 ตรวจสอบชนิดของบัคเตรีที่ย่อยโปรตีน (proteolytic bacteria) บัคเตรีที่ย่อยไขมัน (lipolytic bacteria) และบัคเตรีที่สร้างกรดแลคติค (lactic acid bacteria) โดยทดสอบกับเชื้อบัคเตรีในอาหารปลาที่เติมโปตัสเซียมซอร์เบต ร้อยละ 0.5 และ 0.7 ซึ่งเก็บไว้จนเริ่มเกิดกลิ่นบูด

3.6.1 หาปริมาณบัคเตรี (total viable plate count) ด้วยวิธี pour plate (47,48)

สารเคมี
- Plate count agar
- แอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95
- น้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.85

อุปกรณ์
- จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
- Aluminium foil
- Forcep
- ปิเปต ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- Erlenmeyer flask ขนาด 125 และ 500 มิลลิลิตร
- Dilution tube
- ตู้เลี้ยงเชื้อ (incubator)

วิธีการ

3.6.1.1 ชั่งตัวอย่าง 10 กรัมด้วย aluminium foil ที่จุ่มในแอลกอฮอล์และเผาแล้ว ใส่ใน flask ที่บรรจุ diluent (ใช้น้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ฆ่าเชื้อแล้ว) จำนวน 90 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ถือเป็น dilution 10^{-1}

3.6.1.2 ทำ 10-fold dilution โดยใช้ปิเปตที่ปราศจากเชื้อ ดูดสารละลายที่เตรียมในข้อ 3.6.1.1 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน dilution tube ที่บรรจุ diluent จำนวน 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน อันนี้ถือเป็น

dilution 10^{-2} พร้อมกันนี้ปิเปตสารละลายใน flask อีก 2 ครั้ง ๆ ละ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานที่ปราศจากเชื้อ 2 ใบ (ทำ duplicate)

3.6.1.3 ปิเปตสารละลาย dilution 10^{-2} มา 1 มิลลิลิตรใส่ใน dilution tube ที่บรรจุ diluent 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันถือเป็น dilution 10^{-3} พร้อมกันนั้นปิเปตสารละลาย dilution 10^{-2} อีก 2 ครั้ง ครั้งละ 1 มิลลิลิตรใส่ในจานที่ปราศจากเชื้อ 2 ใบ

3.6.1.4 เมื่อต้องการทำ dilution อื่น ๆ อีกทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1.3

3.6.1.5 นำ plate count agar ที่หลอมไว้แล้วและมีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสมาเทใส่จานเลี้ยงเชื้อที่มี suspension ของเชื้ออยู่ประมาณ 12 มิลลิลิตร จากนั้นหมุนจานไปทางซ้าย ขวา ด้านหน้าและหลัง ข้างละ 5 ครั้งเพื่อให้เชื้อและอาหารผสมกันและกระจายทั่วจาน

3.6.1.6 ปล่อยให้ agar แข็ง นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48± 2 ชั่วโมง

3.6.1.7 นับ plate ที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ในระหว่าง 30-300 โคโลนี กรณีที่ไม่มี plate ซึ่งมีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 ให้หาค่าโคโลนีต่อกรัมจาก plate ที่มีจำนวนใกล้เคียง 30-300 มากที่สุด

3.6.2 <u>วิธีวิเคราะห์หาปริมาณยีสต์และรา(total yeast and mold count) ด้วยวิธี spread plate</u> (47)

<u>สารเคมี</u>
- Potato dextrose agar
- แอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95
- น้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.85

<u>อุปกรณ์</u>
- จานเลี้ยงเชื้อ
- Aluminium foil
- Forcep
- ปิเปต ขนาด 0.1,1 และ 10 มิลลิลิตร
- Erlenmeyer flask ขนาด 125 และ 500มิลลิลิตร

- หลอดแก้วรูปตัว L
- Dilution tube

วิธีการ

3.6.2.1 เท potato dextrose agar ที่เตรียมไว้แล้วลงในจานเลี้ยงเชื้อ ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้ผิวหน้าของ agar แห้ง

3.6.2.2 เตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีหาปริมาณบัคเตรีในหัวข้อ 3.6.1 ตั้งแต่ข้อ 3.6.1.1 ถึง 3.6.1.4

3.6.2.3 ปิเปตเชื้อที่เตรียมไว้แล้วจากข้อ 3.6.2.2 จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารที่เตรียมไว้ในข้อ 3.6.2.1 โดยหยดลงตรงกลางอาหาร ทำ 2 ซ้ำต่อ 1 dilution

3.6.2.4 จุ่มหลอดแก้วรูปตัว L ลงในแอลกอฮอล์ ลนไฟแล้วทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่ จากนั้นเกลี่ย suspension ของเชื้อให้กระจายทั่วผิวหน้าของอาหาร

3.6.2.5 นำ plate ไป incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48± 2 ชั่วโมง

3.6.2.6 นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นบน plate แต่ละอันโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1.7

3.6.3 ตรวจสอบชนิดของบัคเตรีที่ย่อยโปรตีน (proteolytic bacteria) บัคเตรีที่ย่อยไขมัน (lipolytic bacteria) และบัคเตรีที่สร้างกรดแลคติค (lactic acid bacteria)

3.6.3.1 วิธีตรวจสอบบัคเตรีที่ย่อยโปรตีน (47)

สารเคมี
- Plate count agar
- นม UHT ชนิดจืด
- แอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95
- กรดเกลือเจือจางความเข้มข้นร้อยละ 1

อุปกรณ์
- จานเลี้ยงเชื้อ

- Loop
- Erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร

วิธีการ

3.6.3.1.1 ปิเปตนม UHT ชนิดจืดลงใน flask ที่บรรจุ plate count agar ที่ปราศจากเชื้อในปริมาณร้อยละ 10 ของ agar จากนั้นเขย่าให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

3.6.3.1.2 เทใส่จานที่ปราศจากเชื้อประมาณ plate ละ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แข็งตัว

3.6.3.1.3 ใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อที่แยกได้จากอาหารปลา ทำ point inoculation บนผิวของอาหาร

3.6.3.1.4 incubate plate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สังเกตดู clear zone รอบ ๆ โคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร ถ้าเห็น clear zone เกิดขึ้นรอบโคโลนีแสดงว่าอาจใช่บัคเตรีที่ย่อยโปรตีน การที่เกิด clear zone เป็นเพราะบัคเตรีชนิดนี้สร้าง proteolytic enzyme ออกมาย่อยสลาย casein ในนมให้กลายเป็นสารประกอบไนโตรเจน

บางครั้ง clear zone ที่เกิดขึ้นไม่ใช่เป็นผลมาจากการกระทำของบัคเตรีที่ย่อยโปรตีน แต่เกิดจาก casein ถูก peptize ด้วยกรดหรือเกลือ ดังนั้นจึงทดสอบต่อโดยการ flood ผิวหน้าของอาหารด้วยกรดเกลือเจือจาง (ใช้กรดเกลือความเข้มข้นร้อยละ 1) ถ้า clear zone นั้นหายไป แสดงว่าเชื้อนั้นไม่ใช่บัคเตรีที่ย่อยโปรตีน

3.6.3.2 วิธีตรวจสอบบัคเตรีที่ย่อยไขมัน (47)

สารเคมี
- Yeast extract agar
- น้ำมันมะกอก
- แอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95

อุปกรณ์ - เช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.6.3.1

วิธีการ

3.6.3.2.1 ปิเปตน้ำมันมะกอกลงใน flask

ที่บรรจุ yeast extract agar ที่ปราศจากเชื้อในปริมาณร้อยละ 5 เขย่าแรง ๆ เพื่อให้เกิดเป็น emulsion

3.6.3.2.2 เทหันทีลงในจานที่ปราศจากเชื้อประมาณ plate ละ 15 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้ agar แข็งตัว

3.6.3.2.3 ใช้ loop ที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อที่แยกได้จากอาหารปลา ทำ point inoculation บนผิวของอาหาร

3.6.3.2.4 incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน สังเกตดูลักษณะโคโลนีที่ขึ้นบนผิวของอาหารพร้อมทั้งตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเห็น fat globule ที่อยู่รอบ ๆ โคโลนีเป็น clear zone แสดงว่าเกิด fat hydrolysis ซึ่งแสดงว่าเชื้อที่สงสัยนั้นเป็นบัคเตรีที่ย่อยไขมัน

3.6.3.3 <u>วิธีตรวจสอบบัคเตรีที่สร้างกรดแลคติค</u> (47,49)

<u>สารเคมี</u>

- Peptone
- Yeast extract
- Sodium acetate
- Ammonium citrate
- Tween 80
- Bacto agar
- Bromocresol purple
- Calcium carbonate
- Sodium chloride
- Hydrogen peroxide
- น้ำมะพร้าว

<u>อุปกรณ์</u> - เช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.6.1

<u>วิธีการ</u>

3.6.3.3.1 เตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์เช่นเดียวกับวิธีหาปริมาณบัคเตรีในหัวข้อ 3.6.1 ตั้งแต่ข้อ 3.6.1.1 ถึง 3.6.1.4

3.6.3.3.2 นำอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

บัคเตรีที่สร้างกรดแลคติค (ซึ่งมีส่วนผสมต่าง ๆ ดังแสดงในภาคผนวก ฐ) ที่เตรียมไว้แล้ว และมีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เขย่าให้เข้ากันดี เทใส่จานที่ปราศจากเชื้อที่มี suspension ของเชื้ออยู่ประมาณ 15 มิลลิลิตร จากนั้นหมุนจานไปทางซ้าย ขวา ขึ้นบนและลงล่างท่าละ 5 ครั้ง เพื่อให้เชื้อและอาหารผสมกันและกระจานทั่วจาน

3.6.3.3.3 ปล่อยให้ agar แข็ง นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

3.6.3.3.4 สังเกตลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น ถ้ามีวงใสเกิดขึ้นรอบโคโลนีพร้อมกับสีของอาหารในวงใสเปลี่ยนสีจากม่วงเป็นเหลือง แสดงว่าโคโลนีนั้นอาจเป็นบัคเตรีที่สร้างกรดแลคติค ทดสอบต่อไปว่าเชื้อนั้นเป็นบัคเตรีที่ไม่มีเอ็นไซม์คาตาเลส (catalase negative bacteria) ด้วยหรือไม่เนื่องจากบัคเตรีที่สร้างกรดแลคติคไม่มีเอ็นไซม์ดังกล่าวโดยการหยดไฮโดเจนเปอร์ออกไซด์ลงไปบนโคโลนีที่เกิดขึ้น ถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อที่สงสัยนั้นคือบัคเตรีที่สร้างกรดแลคติค

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย