บทที่ 3

วิธีการทดลอง

1. การผลิตซีอิ๊วในระดับห้องปฏิบัติการ

แช่เมล็ดถั่วเหลืองค้างคืนในน้ำจนเมล็ดถั่วพอง แยกเมล็ดถั่วเสียออกแล้วนำไปต้มจนเมล็ดถั่วนิ่ม เทเมล็ดถั่วต้มสุกผ่านผ้าขาวบาง นำมาแผ่บนกระด้งไม้ไผ่ให้อุณหภูมิลดลงถึง 40 องศาเซลเซียส เติมแป้งสาลี 33 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเมล็ดถั่วแห้ง และใส่สปอร์หัวเชื้อรา(Ozy-Kat1®) ผลิตโดยร้านกิจมงคลวัย จังหวัดอ่างทอง ตามคำแนะนำของผู้ผลิต คลุกเมล็ดถั่ว แป้งสาลี และผงสปอร์ให้ทั่วและแผ่บนกระด้งไม้ไผ่ โดยให้ความหนาของเมล็ดถั่วไม่เกิน 2 เซนติเมตร หมักโคจิที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน กลับแผ่นโคจิเพื่อระบายความร้อนทุกวัน หลังจากนั้นนำแผ่นโคจิมาเติมน้ำเกลือที่ได้จากน้ำกรองผสมกับเกลือสมุทรที่ผ่านการต้มเพื่อลดปริมาณเชื้อที่อาจจะติดมากับน้ำและเกลือ ปรับความเข้มข้นของเกลือให้เท่ากับ 20 Baume' ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง กรองส่วนที่เป็นฝุ่นออกโดยใช้ผ้ากรอง นำมาเติมในโหลหมักซึ่งมีขนาดปากโหลกว้าง 15 เซ็นติเมตร สูง 15 เซ็นติเมตรในอัตราส่วนแผ่นโคจิ 1 ส่วนต่อน้ำเกลือ 3 ส่วนโดยปริมาตร ทำการหมักเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เรียกว่าระยะโมโรมิ เก็บตัวอย่างซีอิ๊วทุกสองวันเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและโปรตีเอสแอคติวิตี

2. การแยกแบคทีเรียจากกระบวนการหมักซีอิ๊ว

แยกแบคทีเรียจากกระบวนการหมักซีอิ๊ว และทำเชื้อที่ได้ให้บริสุทธิ์โดยเขี่ยเชื้อแบบให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ เก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในอาหารวุ้นเอียง Tryptic Soy Agar (TSA) ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ การแยกแบคทีเรียทำดังนี้

2.1 ระยะโคจิ

แยกแบคทีเรียจากน้ำแช่ถั่วเหลือง ทำโดยนำน้ำแช่ถั่วเหลือง 1 มิลลิลิตร มากระจาย (spread)บน TSA ที่มี โซเดียมคลอไรด์ 5- 20% บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

การแยกแบคทีเรียจากเมล็ดถั่วเหลือง ทำโดยนำเมล็ดถั่วเหลืองต้มสุกและทิ้งให้เย็นถึง 40 องศาเซลเซียส มาวางบนอาหาร TSA ที่มี 5-20 %โซเดียมคลอไรด์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

การแยกแบคทีเรียจากเกลือสมุทร ทำเช่นเดียวกับการแยกแบคทีเรียจากเมล็ดถั่วเหลืองต้มสุก การแยกแบคทีเรียจากแป้งสาลี ทำโดยใช้ช้อนจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟทิ้งให้เย็น ตักแป้งสาลีแล้วนำไปโรยบน TSA ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 5-20% บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

การแยกแบคทีเรียจากระยะโคจิ ทำโดยการสุ่มเมล็ดถั่วจากโคจิ 3 เมล็ด ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ที่มี โซเดียมคลอไรด์ 5- 20% บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

2.2 ระยะโมโรมิ

การแยกแบคทีเรียในระยะโมโรมิทำเช่นเดียวกับการแยกแบคทีเรียจากน้ำแช่ถั่วเหลือง การแยกแบคทีเรียจากอากาศบริเวณที่ทำการหมัก ทำโดยนำ TSA ที่มี โซเดียมคลอไรด์ 5- 20% เปิดฝาจานเพาะเชื้อไว้ที่บริเวณหมัก 10 นาที ปิดฝาจานเพาะเชื้อ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

3. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีการเจริญและผลิตโปรติเอสบนอาหารวุ้น

แตะเชื้อแบคทีเรีย 1 ลูป บนอาหารวุ้นสูตรมีเดียม 73 ที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0-15 % บรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อ รายละเอียดของอาหารสูตรมีเดียม 73 มีดังปรากฏในภาคผนวก ก. บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นราดสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟตให้ท่วมโคโลนี ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เทสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟตทิ้ง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและของวงใสรอบๆโคโลนี บันทึกผลการทดลอง

4. การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย

ศึกษาลักษณะทางกายภาพและทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในข้อ 3 จำแนกชนิดตามวิธีมาตรฐานที่ระบุใน Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology และวิธีการจำแนกสายพันธุ์ ***Bacillus*** spp. ที่พบทั่วไปในอาหารซึ่งรายงานโดย Seenappa & Kempton(1981)

5. การเพิ่มจำนวนแบคทีเรียในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์และพีเอชต่างๆ

ในการหาผลของโซเดียมคลอไรด์และพีเอชต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ มีความจำเป็นต้องใช้กล้าเชื้อ (inoculum) ที่มีสมบัติทางสรีระวิทยาเช่นเดียวกันและใช้กล้าเชื้อในปริมาณที่เท่ากัน ดังนั้นจึงออกแบบการทดลองดังนี้

5.1 หาจำนวนวันที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ใช้ในการเพิ่มจำนวนเข้าสู่ระยะมิดลอค โดยใส่เชื้อแบคทีเรีย 1 ลูป (loop) ลงในอาหารเหลวสูตรมีเดียม 73 พีเอช 7.0 และไม่มี

โซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอยู่ใน Klett flasks ขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส วัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงการเพิ่มจำนวนเข้าสู่ระยะมิดลอคเพื่อหาจำนวนวันที่ต้องการ

5.2 เลี้ยงแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ตามวิธีในข้อ 5.1 จนถึงระยะมิดลอค เติมกล้าเชื้อ 5 มิลลิลิตรลงในอาหารสูตรมีเดียม 73 ที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0-20 เปอร์เซ็นต์ และพีเอช 5.0-9.0 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ใน Klett flasks ขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส วัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียและคำนวนค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ตามสูตรมาตรฐานต่อไปนี้ โดยใช้ค่า N_0, N, μ, t จากกราฟผลการทดลองที่ได้

$N = N_0 e^{\mu t}$

N_0 = ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

N = ค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา t วันที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ มีหน่วยเป็นวัน$^{-1}$

t = เวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย มีหน่วยเป็นวัน

สูตรหาอัตราการเจริญจำเพาะเป็นดังนี้

$$\ln N = \ln N_0 + \mu t$$

$$\mu t = \ln N - \ln N_0$$

$$\mu = \frac{\ln N - \ln N_0}{t}$$

6. การหาผลของโซเดียมคลอไรด์และพีเอชต่อแอคติวิตีของโปรติเอสในอาหารเหลว

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวสูตรมีเดียม 73 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และพีเอชต่างๆเช่นเดียวกับวิธีการทดลองในข้อ 5.2 เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 5 วันนำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นแรงสูง (centrifuge) 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อตกตะกอนเซล แล้วนำส่วนน้ำใสไปหาแอคติวิตีของโปรติเอสตามวิธีของKeay and Wildi (1970) และ Norberg และ Hofsten(1969)ดังนี้ บ่มส่วนน้ำใส 1.0 มิลลิลิตร 5 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วผสมกับ 1.0 มิลลิลิตร 1 % ของเคซีนซึ่งเตรียมใน 0.1 โมลาร์ บัฟเฟอร์ ที่มีค่าพีเอชต่างๆดังนี้

อะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0

ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 9.0

โดยใช้พีเอชของสารละลายเคซีน เท่ากับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกริยาโดยการเติม 2.0 มิลลิลิตรกรดไตรคลอโรอะซิติค บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนโดยใช้ไมโครเซนตริฟิวจ์ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนน้ำใส 1.0 มิลลิลิตร มาเติม 0.4 โมลาร์โซเดียมคาร์บอเนต 5.0 มิลลิลิตร และสารละลายเจือจาง 3 เท่าของโฟลินรีเอเจนต์1.0 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร

การสร้างกราฟมาตรฐานของไทโรซีน(Tyrosine)ทำโดยวิธีข้างต้นโดยใช้ไทโรซีน 0-60 ไมโครกรัมผสมกับ 0.4 โมลาร์โซเดียมคาร์บอเนต 5.0 มิลลิลิตร และสารละลายเจือจาง 3 เท่าโฟลินรีเอเจนต์ 1.0 มิลลิลิตร

ให้คำนิยามของหนึ่งยูนิตโปรติเอสแอคติวิตีว่าเป็นปริมาณแอนไซม์ที่ทำให้เกิด 0.5 ไมโครกรัมไทโรซีน ภายใต้สภาวะการทดลองที่ใช้

7. การหาโปรติเอสแอคติวิตีที่ ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์และพีเอชต่างๆ

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวสูตรมีเดียม 73 ที่พีเอช เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ และระยะเวลาเลี้ยงที่ให้แอคติวิตีของโปรติเอสสูงที่สุดจากผลที่ได้ในข้อ 6 นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลออกโดยเหวี่ยงที่ ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนน้ำใสไปตกตะกอนแยกโปรติเอสโดยใช้ 70 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียม ซัลเฟต ไดอะไลซีส และนำสารละลายที่ได้ไปหาโปรติเอสแอคติวิตีตามวิธีในข้อ 6 เพื่อคัดเลือกโปรติเอสที่มีแอคติวิตีสูงที่ พีเอช 6.0 และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเป็นภาวะเริ่มต้นของระยะโมโรมิในการหมักซีอิ๊วระดับห้องปฏิบัติการ

8. การตกตะกอนโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus megaterium* K1 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เลี้ยง ***Bacillus megaterium*** K1 ใน อาหารเหลวสูตรมีเดียม 73 พีเอช 7.0 เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ปั่นเหวี่ยงแยกส่วนน้ำใส นำส่วนน้ำใสที่ได้ 100 มิลลิลิตร มาตกตะกอนที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสพร้อมทั้งกวนตลอดเวลาโดยใช้แท่งแม่เหล็กและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณดังปรากฏในตารางการตกตะกอนเอนไซม์โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (ภาคผนวก ข) เพื่อให้ได้แอมโมเนียมซัลเฟต 0, 20, 40, 60, 70, 80, 90, 100 เปอร์เซ็นต์ ในอ่างน้ำแข็ง ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนโปรตีนโดยใช้ความเร็ว 12,000

รอบต่อนาที 30 นาที 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำใสไว้หาโปรตีเอสแอคติวิตี นำตะกอนมาละลายใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ใช้ 1 มิลลิลิตร สำหรับหาแอคติวิตี และใช้ 1 มิลลิลิตรในการทำไดอะลิซีส(dialysis)ใน 0.1 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ทิ้งข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนน้ำใสที่ได้จากการ dialysis หาโปรตีเอสแอคติวิตีโดยใช้กับกราฟมาตรฐานไทโรซีน ตามวิธีที่รายงานในข้อ 6

9. การเติมโปรตีเอสที่ได้จาก *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ K1 ในระยะโมโรมิ

เตรียมซีอิ๊วตามวิธีในข้อ 1 แบ่งซีอิ๊วที่ได้เป็น 6 โหลโดยทำการทดลองในแต่ละโหลดังนี้

โหลที่ 1 ไม่เติมเอนไซม์ กวนน้ำหมักทุกๆ 2 วัน

โหลที่ 2 ไม่เติมเอนไซม์ ไม่กวนน้ำหมัก

โหลที่ 3 เติมเอนไซม์ กวนน้ำหมักทุก 2 วัน โหลที่ 1

โหลที่ 4 เติมเอนไซม์ ไม่กวนน้ำหมัก โหลที่ 1

โหลที่ 5 เติมเอนไซม์ กวนน้ำหมักทุก 2 วัน โหลที่ 2

โหลที่ 6 เติมเอนไซม์ ไม่กวนน้ำหมัก โหลที่ 2

โดยการทดลองจะแบ่งเป็น (1) การเติมสารละลายโปรตีเอส 100 ยูนิตต่อลิตร (เป็นเอนไซม์หลังจากตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและทำการไดอะไลซิสแล้ว) (2) การเติมผงโปรตีเอส 100 ยูนิตต่อลิตร (เอนไซม์หลังจากตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต , ทำการไดอะลิซีสแล้วนำมาทำให้แห้งโดยการระเหิดแห้ง และ (3) การเติมผงโปรตีเอส 250 ยูนิตต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อส่งไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธีเคดัล โดยใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย วิธีวิเคราะห์โดยวิธีเคดัลดังแสดงในภาคผนวก ง

10. การหาความเสถียรของโปรตีเอสที่ได้จาก *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ K1ที่ 20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ พีเอช 5.0

ตกตะกอนโปรตีเอสจากส่วนน้ำใสของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมีเดียม 73 ตามวิธีทดลองที่ระบุไว้ในข้อ 7 และข้อ 8 นำสารละลายที่ได้หลังจากไดอะไลซีสมาระเหิดแห้ง เติมผงโปรตีเอสที่มีแอคติวิตี 250 ยูนิตต่อลิตร ลงในสารละลาย 0.1 โมลาร์ อะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 และความเข้มข้นของเกลือสมุทร 20 เปอร์เซ็นต์ที่บรรจุอยู่ในโหลที่ใช้หมักซีอิ๊ว ตั้งโหลไว้กลางแจ้งในที่เดียวกับที่ทำการหมักซีอิ๊ว ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 1 วัน เพื่อนำมาหาแอคติวิตีที่เหลืออยู่ตามวิธีที่ระบุในข้อ 6

11. การเก็บรักษาแบคทีเรีย *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ K1 โดยวิธีระเหิดแห้ง (lyophilization)

ใช้วิธีมาตรฐานในการเก็บ รักษาแบคทีเรียโดยวิธีระเหิดแห้ง โดยใช้เครื่องมือระเหิดแห้งของ Bangkok MIRCEN (Microbiological Resources Center) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย หลังจากนั้นทำการตรวจสอบดังต่อไปนี้

11.1 การทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อในหลอดเก็บเชื้อแบบระเหิดแห้ง

เปิดหลอดเก็บเชื้อแต่ละหลอดโดยใช้ตะไบ ใช้พาสเจอร์ปิเปตต์ เผาไฟตรงปลายให้ร้อนแดงแล้วกดทับบริเวณรอยตะไบจนหลอดแก้วร้าว เช็ดรอยร้าวด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ดึงปลายหลอดทิ้งในขวดบรรจุ 70 % แอลกอฮอล์ อย่าให้สำลีหลุดออกจากปลายหลอดเก็บเชื้อด้านที่มีแบคทีเรีย

เตรียม 0.85 %โซเดียมคลอไรด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ใช้พาสเจอร์ปิเปตต์ดูดสารละลายโซเดียมคลอไรด์บางส่วนใส่ในหลอดเก็บเชื้อ ผสมเป็นเนื้อเดียวกันแล้วดูดสารผสมกลับใส่ในหลอดที่บรรจุสารละลายโซเดียมคลอไรด์ นำสารแขวนลอยมาเขี่ยแบบโคโลนีเดี่ยวๆ 2 ซ้ำ บ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจว่ามีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นหรือไม่

11.2 การตรวจการเจริญและโปรตีเอสแอคติวิตี

แตะเชื้อแบคทีเรียในสารแขวนลอยที่เตรียมในข้อ 11.1 โดยแตะเชื้อแบคทีเรียบนอาหารวุ้น TSA บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จุดเชื้อบนอาหารวุ้นสูตรมีเดียม 73 ที่มี 0-10 % โซเดียมคลอไรด์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน ราดโคโลนีด้วยสารละลายอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายอิ่มตัวทิ้ง และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและวงใส

12. การหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการพาสเตอร์ไรส์

นำซีอิ๊วที่ผ่านการกรองโดยใช้สารช่วยกรอง(diatomaceous earth) มาแบ่งใส่ขวดขวดละ 50 มิลลิลิตร ปิดฝา นำวางในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 65,70,75 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆกันดังนี้ 10 นาที 20 นาที และ 30 นาที หลังจากนั้นนำขวดบรรจุซีอิ๊วไปทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำที่อุณหภูมิห้อง ตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ตามวิธีที่ระบุไว้ในมาตรฐานอุตสาหกรรมดังนี้

นำซีอิ๊วหลังจากการพาสเตอร์ไรส์ที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆและทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องมาเขย่าเพื่อให้แน่ใจว่าเป็นการทดสอบตัวอย่างที่เป็นตัวแทนของซีอิ๊วทั้งขวดได้

12.1 ตรวจเชื้อราโดยกระจายตัวอย่างซีอิ๊ว 1 มิลลิลิตร บนอาหารแข็ง potato dextrose agar พีเอช 5.0 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน และนำมาตรวจดูเชื้อรา และยีสต์

12.2 ตรวจหาโคลิฟอร์มแบคทีเรียโดยนำตัวอย่างซีอิ๊ว 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey Broth 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นและการเกิดกรด โดยสังเกตการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ Brom Cresal Purple ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากสีม่วงเป็นสีเหลือง และสังเกตก๊าซในหลอดดักก๊าซ ตัวอย่างน้ำซีอิ๊วจะต้องไม่มีโคลิฟอร์มแบคทีเรีย

12.3 ตรวจหาสตาฟิโลคอกไค โดยนำตัวอย่างซีอิ๊ว 0.1 มิลลิลิตรมากระจายบน Egg-Yolk Azide Agar ที่มีผิวหน้าอาหารแห้ง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เชื้อสตาฟิโลคอกไคจะทำให้เกิดวงตะกอนไข่รอบโคโลนีของเชื้อ

13. การวิเคราะห์ปริมาณทองแดง ตะกั่วในซีอิ๊วหลังการพาสเตอร์ไรส์

วิเคราะห์ปริมาณทองแดงและตะกั่วตามวิธีที่ระบุในข้อ 974.27 (AOAC 1990) ปิเปตต์ตัวอย่างซีอิ๊ว1 มิลลิลิตร ลงในถ้วย crucible ซึ่งแช่ ใน 50 เปอร์เซ็นต์กรดไนตริกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น เติม 50 เปอร์เซ็นต์กรดไนตริก 3 มิลลิลิตร ระเหยโดยใช้ความร้อนในตู้ควันโดยระวังไม่ให้สารละลายเดือด จนกระทั่งสารละลายแห้ง ทิ้งให้เย็น เติม 50 เปอร์เซ็นต์กรดไนตริก 3 มิลลิลิตร ให้ความร้อนเช่นเดิมจนกระทั่งตะกอนที่ได้มีสีเหลืองอ่อน แสดงว่าการย่อยสมบูรณ์ เติม 50 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 2 มิลลิลิตร ให้ความร้อนน้อยๆจนตะกอนละลายหมด ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วและทองแดงโดยใช้เครื่อง Atomic Absorption Spectophotometer ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14. การหาปริมาณของแข็งที่ระเหยไม่ได้

วิเคราะห์หาปริมาณของแข็งที่ระเหยไม่ได้ตามวิธีที่ระบุใน AOAC (1975) ข้อ 31.005 โดยนำตัวอย่างซีอิ๊วที่ผ่านการพาสเตอร์ไรส์แล้ว 2 กรัมมาระเหยในถ้วยอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้น(desiccator) และชั่งน้ำหนัก นำไปอบใหม่อีก 1 ชั่วโมงและทิ้งให้เย็นในโหลดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักจนกระทั่งน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลง โดยค่าความคลาดเคลื่อนของน้ำหนักน้อยกว่า 2 มิลลิกรัม คำนวณน้ำหนักเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวอย่างเดิม

$\frac{100}{\text{น้ำหนักซีอิ๊วเดิม(กรัม)}} \times$ น้ำหนักซีอิ๊วแห้ง (กรัม) = ปริมาณของแข็งที่ระเหยไม่ได้ (เปอร์เซ็นต์)

15. การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์เกลือคิดเป็นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละของน้ำหนัก

นำตัวอย่างซีอิ๊วที่ผ่านการพลาสเตอร์ไรส์แล้วมาใส่กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร หย่อนไฮโดรมิเตอร์ลงในกระบอกตวงอ่านค่าไฮโดรมิเตอร์ มีหน่วยเป็น Baume′

16. การวิเคราะห์ค่าความถ่วงจำเพาะของซีอิ๊ว

การหาค่าความถ่วงจำเพาะของซีอิ๊วโดยใช้ hydrometer วัดค่าความเข้มข้นที่แท้จริงของเกลือซึ่งมีหน่วยเป็น °Baume′ และคำนวนหาค่าความถ่วงจำเพาะตามสูตรที่ระบุโดย วิเชียร ลีลาวัชรมาศ(2534) ดังนี้

$^{\circ}Be' = A+(t-15) \times 0.05$

$^{\circ}Be'$ = ความเข้มข้นของเกลือที่แท้จริง

A = $^{\circ}Be'$ จากการอ่านด้วย hydrometer

t = อุณหภูมิ(°ซ)

0.05 = ค่าคงที่

17. การทดสอบทางประสาทสัมผัสของซีอิ๊วที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ

ทดสอบซีอิ๊วที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธีทางประสาทสัมผัส Hedonic 7-point scale testโดยใช้ซีอิ๊วที่ขายตามท้องตลาดเป็นตัวเปรียบเทียบและใช้รหัสที่ได้จากการสุ่มตัวเลขเป็นตัวแทนของตัวอย่างคือ

280 แทนซีอิ๊วที่ได้รับตรามาตรฐานอุตสาหกรรม

405 แทนซีอิ๊วที่ไม่ได้รับตรามาตรฐานอุตสาหกรรม

569 แทนซีอิ๊วที่นำเข้าจากประเทศญี่ปุ่น

627 แทนซีอิ๊วที่ได้จากการหมักระดับห้องปฏิบัติการ ไม่เติมเอนไซม์ กวนน้ำหมัก ทุก 2 วัน

691 แทนซีอิ๊วที่ได้จากการหมักระดับห้องปฏิบัติการ ไม่เติมเอนไซม์ ไม่กวนน้ำหมัก

728 แทนซีอิ๊วที่ได้จากการหมักระดับห้องปฏิบัติการ เติมเอนไซม์ กวนน้ำหมักทุก 2 วัน

758 แทนซีอิ๊วที่ได้จากการหมักระดับห้องปฏิบัติการ เติมเอนไซม์ ไม่กวนน้ำหมัก

วิธีการทดสอบ ใช้ภาชนะบรรจุซีอิ๊วคือถ้วยพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร ลึก 1 เซนติเมตร บรรจุตัวอย่างถ้วยละ 5 มิลลิลิตร และใช้เนื้อไก่ต้มไม่ปรุงรสเป็นตัวทดสอบรสชาติของซีอิ๊ว โดยผู้ทดสอบจำนวน 20 คนดื่มน้ำระหว่างการชิมแต่ละตัวอย่าง พร้อมทั้งให้คะแนนความชอบผลิตภัณฑ์ตามแบบทดสอบ Hedonic 7 point scale test (ภาคผนวก ง) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Microsoft Excel สำหรับวิธี ANOVA (Analysis of Variance)