บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

กีรวัฒน์ ชื่นจิตต์ นิติยา บุดทะยา และอรอินทุ์ ประไชโย. (2553). การควบคุมการเกิดเด็กซ์แทรนในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย. ใน **รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการโครงงานอุตสาหกรรมและวิจัยสำหรับปริญญาตรี ประจำปี** 2552. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ณฐิณี สุววรณสิงห์. (2533). **เด็กซ์แทรนเนสที่ผลิตโดยแบคทีเรียในทะเล**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

บริษัท ไทยชูการ์ มิลเลอร์ จำกัด. (2553). **กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย**. สืบค้นเมื่อ 21 มิถุนายน 2553, จาก http://www.thaisugarmillers.com/tsmc-02-02.html

มธุรส จันทร์ศุภมงคล. (2543). **การผลิตและการศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์เด็กซ์แตรนเนสโดยเชื้อรา** *Penicillium pinophilum* TISTR 3386. วิทยานิพนธ์ วท.ม., สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

สัณห์ พณิชยกุล. (2543). การคัดเลือก *Leuconostoc mesenteroides* ที่ผลิตเด็กซ์แทรนซูเครสสูงจากโรงงานน้ำตาล การทำบริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์. ใน **รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการประเภทอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี** 2542-2543. ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและตาล. (3 มิถุนายน 2459). **กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย**. สืบค้นเมื่อ 16 กุมภาพันธ์ 2553, จาก http://www.ocsb.go.th/searchResult.asp

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและตาล. (มิถุนายน 2552). **รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2551/52**, สืบค้นเมื่อ 19 พฤษภาคม 2553, จาก http://www.ocsb.go.th/

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (18 กันยายน 2552). **สถิติการส่งออก น้ำตาลทราย : ปริมาณและมูลค่าการส่งออกรายเดือน**. สืบค้นเมื่อ 19 พฤษภาคม 2553, จาก http://www.farmkaset.org/contents/

Alamdari, A. and Tabkhi, F. (2004). Kinetics of hexamine crystallization in industrial scale. Chemical Engineeringand processing, 43 (7), 803-810

Barker, PE. And Ajongwen, NJ. (1991). The production of enzyme dextransucrase using nonaerated fermentation techniques. **Biotechnology and Bioengineering**, 37(8), 703-707.

Biotest Pharmaceuticals Corporation. (June, 2006). New YM (Rose Bengal) Agar Strips Validation Study Product No. 941 196. **Biotest – From Nature for Life**. Retrieved May 15, 2010, from http://pdffinder.net/New-YM-(Rose-Bengal)-Agar-Strips-Validation-Study-Product-No.-941-196.html

Björkroth, K. J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel, W. H., Korkeala, H. J. and Vandamme, P. (2002). Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 52(1), 141–148.

Björkroth, K. J. and Holzapfel, WH. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. **The Prokaryotes**, 4, 267–319.

Bounaix, M.S., Robert, H., Gabriel, V., Morel, S.,Remaud-Siméon, M., Gabriel, B. and Fontagné-Faucher, C. (2010). Characterization of dextran-producing *Weissella* strains isolated from sourdoughs and evidence of constitutive dextransucrase expression. **Federation of European Microbiological Societies**, 311(1), 18 – 26.

Bourne, E.J., Hutson, D.H. and Weigel, H. (1961). Oligosaccharides in dextran-producing cultures of *Streptococcus bovis*. Biochemical Journal, 79(3), 549-553

Brown, D.E. and McAvoy, A. (1989). A pH controlled fed-batch process for dextransucrase production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 48(4), 405–414.

Cayré, M. E., Vignolo, G. and Garro, O. (2003). Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures. **Food Microbiology**, 20(5), 561 – 566.

Chaplin M.F. and Bucke C. (1992). **Enzyme technology**. London: Cambridge University.

Choi, H.-J., Cheigh, C.-I., Kim, S.-B., Lee, J.-C., Lee, D.-W., Choi, S.-W., Park, J.-M.and Pyun, Y.-R. (2002). *Weissella kimchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 52(2), 507–511.

Collins, M. D., Samelis, J., Metaxopoulos, J. and Wallbanks, S. (1993). Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. **Journal of Applied Bacteriology**, 75(6), 595–603.

Eggleston, G. (2002). Deterioration of cane juice-sources and indicators. **Food Chemistry**, 78(1), 95-103.

Eggleston, G. and Harper, W. (2006). Determination of sugarcane deterioration at the factory: development of a rapid, easy and inexpensive enzymatic method to measure mannitol. **Food Chemistry**, 98(2), 366-372.

Eom, H., Seo, D. M. and Han, N. S. (2007). Selection of psychrotropic *Leuconostoc* spp. producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, 117(1), 61-67.

Galvez-Mariscal, A. and Lopez-Munguia, A. (1991). Production and characterization of a dextranase from an isolation *Paecilomyces lilacium* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 36(3), 327-331

Garvie, Ei. (1984). Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of *Leuconostoc* from other lactic bacteria. **Method in microbiology**, 16, 147-178.

Greenwood, D. and Slack, R.C.B. (1981).The antibacterial activity of hexamine (methenamine), hexamine hippurate and hexamine mandelate. **Infaction**, 9(5), 223-227

Hammes, W. P. and Vogel, R. F. (1995). The genus *Lactobacillus*. In B. J. B. Wood and W. Holzapfel (Eds.), **The Genera of Lactic Acid Bacteria** (pp. 19-54). Glasgow: Blackie Academic and Professional.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H.A., Staley, J. T. and Williams, S. T. (1994). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** (9th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

James, C. P. C. and Chung, C. C. (1993).**Cane sugar handbook**, New York: John Wily & Sons.

Jeanes, A., Haynes, W.C., Wilham, C.A., Rankin, J.C., Melvin, E.H. and Austin, M.J. (1954). Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria. **Journal of the American Chemical Society**, 76(20), 5041–5052.

Katina, K., Maina, N.H., Juvonen, R., Flander, L., Johansson, L., Virkki, L.,Tenkanen, M. and Laitila, A. (2009). In situ production and analysis of *Weissella confusa* dextran in wheat sourdough. **Food Microbiology**, 26(7), 734–743.

Kelly, W.J., Asmundson, R.V., Harrison, G.L., and Huang, C.M. (1995). Differention of dextran-producing *Leuconostoc* strains from fermented rice cakc (puto) using pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, 26(3), 345-352.

Koepsell, H.J. and Tsuchiya, H.M. (1952). Enzymatic synthesis of dextran. **Journal of Bacteriology**, 63(2), 293–295.

Lappan, R.E. and Fogler, H.S. (1994). *Leuconostoc mesenteroides*: kinetics with application to bacterial profile modification. **Biotechnology and Bioengineering**, 43(9), 856-873.

Larrahondo, J. E., Bricelño, C.O., Rojas, M., and Palma, M. (2006). An assessment of after harvest sucrose losses from sugarcane field to factory. **International Association of Professionals in Sugar and Integrated Technologies**, 8(4), 233-238

Lück, E. and Jager, M. (1997). **Antimicrobial food additives : characteristics, uses,effects.** Retrieved November 26, 2011, from http://books.google.co.th/books?id=eydHuVtm-p8C&pg=PA236&lpg=PA236&dq=hexamethylenetetramine%2BAnti-Microbial+Effect&source=bl&ots=mrhcxJ8LwD&sig=6rm-rAi7jE-

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

88jh7293QHtvJ2rc&hl=th&ei=6OOeTvPfNIXwrQfr27DKCQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q&f=true

Lee, J.-S., Lee, K. C., Ahn, J.-S., Mheen, T.-I., Pyun, Y.-R. and Park, Y.-H. (2002). *Weissella koreensi* sp. nov., isolated from kimchi. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 52, 1257–1261.

Magnusson, J., Jonsson, H., Schnürer, J. and Roos, S. (2002). *Weissella soli* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 52(3), 831–834

McLeod, J. W. and Gordon, J. (1923). Catalase production and sensitiveness to hydrogen peroxide amongst bacteria: with a scheme of classification based on these properties. **Journal of Pathology and Bacteriology**, 26(3), 326-331

Medawar, W., Strehaiano, P. and Dèlia, M. (2003). Yeast growth: lag phase modeling in alcoholic media. **Food Microbiology**, 20(5), 527 - 532

Milintawisamai, N., Niamsanit, S., Ngasan, C., Maungmontri, R., Buttapeng, W., Kotrsri, R., Pliansinchai, A. and Weerathaworn, P. (2009). Efficacy of dimethyl benzyl ammonium chloride and microbial contamination studies in a modern sugarcane milling unit in Thailand. **Sugar Technology**, 11(2), 208-212.

Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, RM. and Remaud-Siméon M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International DairyJournal**,11(9), 675–685.

Nickelson, R. and Finne, G. (1992).Fish, crustaceans, and precooked seafoods.In C.Vanderzant and D. F. Splittstoesser (Eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods** (3rd ed., p. 875-895). Washington, DC: American Public Health Association.

Parker, M. T. and Ball, L C. (1976). Streptococci and aerococci associated with systemic infection in man. Journalof Medical Microbiology, 9(3), 275-302

Santos, M., Teixeira, J. and Rodrigues, A. (2000). Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). **Biochemical Engineering Journal**, 4(3), 177-188.

Schleifer, K.H. and Ludwig, W. (1995). Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. **Systematic and Applied Microbiology**, 18, 461-467.

Shamala, T.R. and Prasad, M.S. (1995). Preliminary studies on the production of high and low viscosity dextran by *Leuconostoc spp*. **Process Biochemistry**, 30(3), 237–241.

Sharpe, M. E., Garvie, E. I. and Tilbury, R. H. (1972). Some slime-forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 23(2), 389-397.

Solomon, S. (2000). Post-harvest cane deterioration and its milling consequences. **Sugar Technology**, 2(1-2), 1-18.

Srionnual, S., Yanagida, F., Lin, L. H., Hsiao, K. N. and Chen, Y. s. (2007).*Weissellicin* 110, a Newly Discovered Bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, Isolated from Plaa-Som, a Fermented Fish Product from Thailand. Applied and Environmental Microbiology, **73(7), 2247–2250**

Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, 36(1), 1-29.

Tanasupawat, S., Shida, O., Okada, S. and Komagata, K. (2000).Lactobacillus acidipiscis sp.nov.and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 50(4), 1479–1485.

Tieking, M. and Gänzle, M. G. (2005). Exopolysaccharides from cerealassociated lactobacilli. **Food Science and Technology**, 16(1-3),79–84

Van Hijum, SA., Kralj, S., Ozimek, LK., Dijkhuizen, L. and van Geel-Schutten, GH. (2006). Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. **Microbiology and Molecular Biology**, 70(1), 157–176.

Yusof, S., Shian, L. S. and Osman, A. (2000). Changes in quality of sugar-cane juice upon delayed extraction and storage. **Food Chemistry**, 68(4), 395-401.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

PCA (Plate Count Agar)

เตรียมโดยทำการชั่ง PCA 23.5 กรัม (ที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป) ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเทใส่เพลทที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว ทำการทดสอบความปราศจากการปนเปื้อนเชื้อด้วยการนำไปบมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเพลทที่ปราศจากการปนเปื้อนไปใช้ในการทดลอง

MRS broth และ MRS Agar

เตรียมโดยทำการชั่ง MRS 55.15 กรัม (ที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป) ถ้าเตรียมเป็นอาหารเหลว (broth) ไม่ต้องเติมวุ้น (Agar) ลงไป ถ้าเตรียมเป็นอาหารแข็งให้เติมวุ้นลงไป โดยชั่งวุ้น 15 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาเทใส่เพลทที่ผ่านการอบฆ่าเชื่อแล้ว ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว ทำการทดสอบความปราศจากการปนเปื้อนเชื้อด้วยการนำไปบมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเพลทที่ปราศจากการปนเปื้อนไปใช้ในการทดลอง

Rose Bengal agar

เตรียมโดยการชั่ง Rose Bengal agar 32.2 กรัม (ที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป) เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาเทใส่เพลทที่ผ่านการอบฆ่าเชื่อแล้ว ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว ทำการทดสอบความปราศจากการปนเปื้อนเชื้อด้วยการนำไปบมที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเพลทที่ปราศจากการปนเปื้อนไปใช้ในการทดลอง

การเตรียม MRS ที่มีซูโครสร้อยละ 20 และแวนโคมัยซิน ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่ง MRS 55.15 กรัม ซูโครส 200 กรัม และวุ้น 15 กรัม เติมน้ำปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้อุ่น โดยอุณหภูมิไม่เกิน 55 องศาเซลเซียส แล้วเติมแวนโคมัยซินความเข้มข้น 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เทใส่เพลทที่ผ่านการอบฆ่าเชื่อแล้ว ทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว ทำการทดสอบความปราศจากการปนเปื้อนเชื้อด้วยการนำไปบมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำเพลทที่ปราศจากการปนเปื้อนไปใช้ในการทดลอง

การเตรียมน้ำอ้อยสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

เตรียมโดยนำน้ำอ้อยสดที่ซื้อจากตลาดมาผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อสามารถเก็บรักษาน้ำอ้อยไว้ใช้ครั้งต่อไป โดยสามารถเก็บไว้ใช้ไม่เกิน 15 วัน นอกจากนี้ยังช่วยให้กากตะกอนต่างๆ ในน้ำอ้อยตกลงอยู่ที่ก้นขวดทำให้สามารถแยกเอาเฉพาะส่วนใสของน้ำอ้อยไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อได้ โดยนำน้ำอ้อยสดไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำน้ำอ้อยที่เก็บรักษาไว้มาใช้สามารถทำได้โดยนำน้ำอ้อยที่เก็บรักษาไว้มาเทเอาเฉพาะส่วนใสของน้ำอ้อย แล้วนำมาปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 5.0-5.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพื่อนำไปเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในการทดลองต่อไป

สารละลายเปปโตน (Peptone) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดยการชั่งเปปโตน (Peptone) 1.0 กรัม ละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลอง จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมสารเคมี และวิธีการวิเคราะห์

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

โดยนำตัวอย่างน้ำอ้อยที่ได้จากโรงงานน้ำตาลมาทำการเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน (Peptone) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) เพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในช่วงที่นับได้ (10^{-4} – 10^{-6}) แล้วนำสารละลายเชื้อเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ย (Spread plate) ลงบนอาหารแข็งสูตร PCA (Plate Count Agar) เพื่อหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตน้ำตาล จากนั้นนำจานเพาะเชื้อที่เกลี่ยแล้วทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนโคโลนี โดยเลือกจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30 – 300 โคโลนีมาคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ รายงานผลเป็น Colony Forming Unit/ml (cfu/ml) สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{จำนวนโคโลนี X dilution factor}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่นำมา Spread plate (0.1 มิลลิลิตร)}}$$

Dilution factor คือ ส่วนกลับของระดับความเจือจาง

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณยีสต์รา

นำตัวอย่างน้ำอ้อยที่ได้จากโรงงานน้ำตาลมาทำการเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในช่วงที่นับได้ (10^{-4} – 10^{-6}) แล้วนำสารละลายเชื้อเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ย (Spread plate) ลงบนอาหารแข็งสูตร Rose Bengal agar เพื่อหาปริมาณยีสต์และราทั้งหมดที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตน้ำตาล จากนั้นนำจานเพาะเชื้อที่เกลี่ยแล้วทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนโคโลนี โดยเลือกจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30 – 300 โคโลนีมาคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ รายงานผลเป็น cfu/ml

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียแลคติก

นำตัวอย่างน้ำอ้อยที่ได้จากโรงงานน้ำตาลมาทำการเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในช่วงที่นับได้ (10^{-4} – 10^{-6}) แล้วนำสารละลายเชื้อเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ย (Spread plate) ลงบนอาหารแข็งสูตร MRS เพื่อหา

ปริมาณจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตน้ำตาล จากนั้นนำจานเพาะเชื้อที่เกลี่ยแล้วทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนโคโลนี โดยเลือกจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30 – 300 โคโลนีมาคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ รายงานผลเป็น cfu/ml

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณ *Leuconostoc* spp.

นำตัวอย่างน้ำอ้อยที่ได้จากโรงงานน้ำตาลมาทำการเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในช่วงที่นับได้ (10^{-4}– 10^{-6}) แล้วนำสารละลายเชื้อเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ย (Spread plate) ลงบนอาหารแข็งสูตร MRS ที่มีซูโครสร้อยละ 20 และแวนโคมัยซิน (Vancomycin) ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อหาปริมาณจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Leuconostoc* spp. (ภาคผนวก ก) ที่ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตน้ำตาล จากนั้นนำจานเพาะเชื้อที่เกลี่ยแล้วทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนโคโลนี โดยเลือกจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30 – 300 โคโลนีมาคำนวณหาปริมาณจุลินทรีย์ รายงานผลเป็น cfu/ml

การย้อมสีแกรม (gram staining)

หลักการ

การย้อมสีวิธีกรัม (Gram) จัดเป็น differential stain ที่สำคัญที่สุดซึ่งใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียจากการย้อม วิธีนี้จะแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 2 พวก ซึ่งขึ้นอยู่กับการติดสีที่ใช้ย้อมแบคทีเรียที่ยังคงติดสี Crystal violet (สีน้ำเงินหรือสีม่วง) หลังจากล้างด้วยแอลกอฮอล์ เรียกว่า "Gram-positive" ส่วนพวกที่ไม่ติดสีของ crystal violet แต่ติดสีที่ย้อมทับ (counter stain) ของ safranin (สีแดง) เรียกว่า "Gram-negative" การย้อมสีกรัมนั้นในขั้นแรกย้อม smear ด้วยสี crystal violet เซลล์แบคทีเรียทุกเซลล์บน smear จะติดสีม่วงหรือน้ำเงิน เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังหนาจึงติดสี crystal violet ได้ดี และเมื่อเติมสารละลายไอโอดีนลงไปจะรวมกับสี crystal violet ได้เป็นผลึกที่มีโครงสร้างซับซ้อน (crystal violet iodine complex) ทำให้สีติดดียิ่งขึ้น ต่อมาเมื่อล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย ethyl alcohol 95% ขั้นตอนนี้แบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีไขมันอยู่ในส่วนประกอบของผนังเซลล์มาก ไขมันจะถูกละลายออกมากับแอลกอฮอล์ ทำให้รูของผนังเซลล์กว้างขึ้น ผลึกของสีจึงหลุดออกมาจากผนังเซลล์ ตอนนี้แบคทีเรียแกรมลบจึงไม่ติดสี ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งมีส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่เป็นไขมันอยู่น้อย ผลึกของสีจึงยังคงติดแน่นอยู่ ขั้นต่อมาเมื่อย้อมทับด้วยสี safranin ซึ่งมีสีแดง ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบซึ่งเดิมไม่ติด

สีจะติดสีแดงในขั้นตอนนี้ แกรมบวกยังคงเห็นเป็นสีน้ำเงินหรือสีม่วงเหมือนเดิม ซึ่งจะเห็นความแตกต่างระหว่างแกรมบวกและแกรมลบได้ชัดเจน

สีและสารละลายที่ใช้ทั้งหมด

1. Crystal violet
2. เอทธิลแอลกอฮอล์ 95%
3. น้ำกลั่น
4. สารละลายไอโอดีน
5. Safranin

การเตรียมสีในการย้อมแกรม

1. **Ammonium oxalate crystal violet**

ต้องทำการเตรียมสารละลาย Gram's crystal violet และAmmonium oxalate ผสมเข้าด้วยกัน โดยวิธีการเตรียมทำตามขั้นตอนต่อไปนี้

1.1 เตรียม Gram's crystal violet

- Crystal violet 2.0 กรัม
- เอทธิลแอลกอฮอล์ 20.0 มิลลิลิตร
- ให้ทำการละลาย Crystal violet ในเอทธิลแอลกอฮอล์

1.2 เตรียม Ammonium oxalate

- Ammonium oxalate , C.P 0.8 กรัม
- น้ำกลั่น 80.0 มิลลิลิตร

ละลาย Ammonium oxalate ในน้ำกลั่น เมื่อได้ทั้ง Gram's crystal violet และ Ammonium oxalate แล้ว จากนั้นให้ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกันและคนให้เข้ากัน

2. **สารละลายไอโอดีน**

- Iodine , C.P 1.0 กรัม
- Potassium Iodide, C.P (KI) 2.0 กรัม
- น้ำกลั่น 300.0 มิลลิลิตร

ผสม Iodine และ Potassium Iodide ในโกร่ง ใช้สากบดให้ละเอียด แล้วจึงค่อยๆเติมน้ำกลั่นลงไป ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกับน้ำกลั่น

3. Safranin

- Safranin 0.25 กรัม
- เอทิลแอลกอฮอล์ 10.00 มิลลิลิตร

- น้ำกลั่น 100.00 มิลลิลิตร

ละลาย Safranin ในเอทธิลแอลกอฮอล์ แล้วจึงเติมน้ำกลั่น และทำการคนให้เข้ากัน จากนั้นจึงกรองผ่านกระดาษกรองเอาแต่ส่วนที่เป็นของเหลวสีแดงไปใช้

วิธีการการย้อมสีแกรม (Gram staining)

1. การเตรียมแบคทีเรียบนสไลด์เพื่อย้อมสี ให้แตะจุลินทรีย์ในรูปสารแขวนลอยไปบนสไลด์แล้วใช้ลูป (Loop) เกลี่ยออกให้เป็นแผ่นฟิลม์บางๆ (smear) เพื่อให้จุลินทรีย์กระจายตัวออกจากกัน ปล่อยให้แห้ง (air dry)

2. เมื่อแห้งแล้วจึงผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้งเพื่อเป็นการตรึงเซลล์ให้ติดบน สไลด์ (fix)

3. หลังจากนั้นหยดคริสตัล ไวโอเลต (Crytal violet) ให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ลงในอ่างน้ำ แล้วชะด้วยสารละลายไอโอดีน

4. หลังจากนั้นหยด สารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อและทิ้งไว้นาน 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอลล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าให้เกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันทีโดยให้น้ำผ่านเบาๆ ซับด้วยกระดาษซับ

5. จากนั้นทำการย้อมด้วยการหยดสีซาฟานินโอ (Safanin-O) ให้ท่วมรอยเกลี่ยเชื้อ ทิ้งไว้นาน 1นาที จากนั้นเทสีทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำ จากนั้นซับให้แห้ง

6. จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พวกที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกจะติดม่วงอมสีน้ำเงิน ส่วนพวกแกรมลบจะติดสีแดง

การทดสอบคะตะเลส (Catalase test)

หลักการ

การทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (catalase) จากการศึกษาของ Mcleod and Gordon (1923) ได้แบ่งแบคทีเรียตามความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ส่วนพวกที่ไม่สร้างคะตะเลส มักมีแนวโน้มว่าจะตายถ้าในอาหารนั้นไม่มีน้ำตาลหรือไม่ก็เป็นเพราะสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) หรือเกิดการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จากการที่เชื้อถูกแสงและอากาศ ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารพิษของเซลล์สิ่งมีชีวิต จึงมีการเก็บ stock culture ไว้ที่อากาศจำกัดและมืด

กลไกในการทำงานของ catalase มีดังสมการข้างล่าง ซึ่งถ้ามีการสร้างฟอง O_2 ถือว่าได้ผลเป็นบวก โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ในการทดสอบ catalase จะอยู่ระหว่าง 0.5-5.0% และ 1 หยดของ 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะให้ผลดีที่สุด และในการทดสอบต้องใช้เชื้อที่อายุไม่เกิน 24 ชั่วโมง เพราะ catalase จะมีอยู่เฉพาะในเซลล์ที่มี

ชีวิตเท่านั้น ดังนั้นการอ่านผลลบผิดพลาด (false negative) สามารถเกิดขึ้นได้ ถ้าใช้เชื้ออายุมากเกินไป

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} H_2O + O_2$$

การอ่านผล : ผลบวกเกิดฟอง O_2และผลลบไม่เกิดฟอง O_2 กรณีเป็น *Leucunostoc* spp. อ่านผลเป็นลบ

วิธีการทดสอบคะตะเลส

1. คัดเลือกโคโลนีของเชื้อจุลลินทรีย์ที่ต้องการทดสอบ โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อแล้วเกลี่ยลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาด

2. จากนั้นหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (Hydrogen peroxide solution) ลงบนเชื้อที่เกลี่ยไว้บนกระจกสไลด์

3. สังเกตผลโดยถ้าเกิดฟองก๊าซขึ้นจะแปลผลเป็นบวก (+) คือมีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Enzyme catalase) ถ้าไม่เกิดฟองก๊าซจะแปลผลเป็นลบ (-) คือไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

Fermentation test

นำจุลินทรีย์ที่แยกได้มาเขี่ยลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลอดทดลองที่ใส่หลอดดักแก๊สไว้ด้านใน ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตุผล โดยถ้ามีแก๊สในหลอดดักแก๊สให้แปลผลเป็นบวก คือเชื้อมีการหมักแล้วได้แก๊ส ถ้าไม่มีแก๊สในหลอดดักแก๊สให้แปลผลเป็นลบ คือเชื้อมีการหมักแล้วไม่ได้แก๊ส

การทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตและการผลิตสารเอกซ์โซโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharide; EPS) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

นำจุลินทรีย์ที่แยกได้มาเขี่ยลงในอาหารเหลว MRS ที่เพิ่มซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 35 40 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง ดูความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์ที่แยกได้ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และดูความสามารถในการผลิตสารเอกซ์โซโพลีแซคคาไรด์ได้จากลักษณะความหนืดของอาหารเหลว โดยหากมีการสร้างสารเอกซ์โซโพลีแซคคาไรด์อาหารเหลวจะมีลักษณะเหนียวหนืด

วิธีการหากิจกรรมเอนไซม์เด็กแทรนซูเครส

1. **การเตรียม** Stock solution

1.1 การเตรียม 0.2 % NaN_3 Stock solution โดยทำการชั่ง sodium azide (NaN_3) 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการกรอง 0.2 % NaN_3 ผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.4 μm เพื่อเก็บรักษาไว้ใช้ในครั้งต่อไป

1.2 การเตรียม 0.01 M $CaCl_2$ Stock solution โดยทำการชั่ง $CaCl_2$ 0.111 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำ 0.01 M $CaCl_2$ Stock solution ไปทำการฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เพื่อเก็บรักษาไว้ใช้ในครั้งต่อไป

1.3 การเตรียม 0.02 M $C_2H_3NaO_2$ Stock solution โดยทำการชั่ง 1.6406 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้เป็น 5.2 ด้วยกรดอะซิติก (acetic acid) แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำ 0.02 M $C_2H_3NaO_2$ Stock solution ไปทำการฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เพื่อเก็บรักษาไว้ใช้ในครั้งต่อไป

1.4 การเตรียม 3 M Sucrose Stock solution โดยทำการชั่ง Sucrose 102.69 กรัม ละ ลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำ 3 M Sucrose Stock solution ไปทำการฆ่าเชื้อ ที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที เพื่อเก็บรักษาไว้ใช้ในครั้งต่อไป

2. **การเตรียมตัวอย่าง**

2.1 ทำการเขี่ยเชื้อจากอาหารวุ้นเอียง 3-5 ลูป ลงในน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลอง ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 ทำการถ่ายเชื้อจากหลอดทดลองในปริมาตร 0.1 – 0.2 มิลลิลิตร ลงในฟลาก์สขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีน้ำอ้อย 100 มิลลิลิตร เพื่อให้มีปริมาณเชื้อตั้งต้นอยู่ในช่วง 10^4-10^6 บ่มเชื้อที่ อุณหภูมิที่ทำการศึกษา ให้อากาศโดยการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3 เก็บตัวอย่างโดยปิเปตอาหารเหลวมา 1.2 มิลลิลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาตัวเซลล์ออก โดยปั่นที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บเอาเฉพาะส่วนใส 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเพื่อนำไปทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป

3. **การวัดปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส**

3.1 ผสมสารสดสอบดังตาราง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตาราง 17 การเตรียมสารละลายทดสอบสำหรับการวัดปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส

Stock solution	ปริมาตร (มิลลิลิตร)
0.2 % NaN_3 Stock solution	1.5
0.01 M $CaCl_2$ Stock solution	1.5
0.02 M $C_2H_3NaO_2$ Stock solution	1.5
3 M Sucrose Stock solution	7.5
น้ำกลั่น	3.0
Total	15.0

3.2 นำสารละลายตัวอย่างที่ใส่หลอดทดลองไว้จากข้อ 2.3. มาผสมกับสารละลายทดสอบในข้อ 3.1. ในอัตราส่วน 1:1 คือ ถ้าปิเปตสารตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ให้ผสมกับสารละลายทดสอบ 1 มิลลิลิตร ด้วยเครื่อง vortex mixer ให้เข้ากัน

3.3 จากนั้นนำสารละลายผสมที่ได้ไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เอนไซม์ในสารละลายตัวอย่างทำปฏิกิริยากับสารละลายทดสอบ

3.4 หยุดปฏิกิริยาโดย 10 % Pyridine (v/v) คือ ถ้าตัวอย่างกับสารละลายทดสอบมีปริมาตรรวมกันทั้งหมดเท่ากับ 2 มิลลิลิตร ให้ใช้ Pyridine 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จากนั้นเก็บสารตัวอย่างที่ได้ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฟรุกโตสด้วยวิธีการหาปริมาณน้ำตาลด้วยการฉีด HPLC โดย 1 หน่วยเด็กซ์ทรานซูเครส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถก่อให้เกิดฟรุกโตส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

การวิเคราะห์ปริมาณซูโครส กลูโคสและฟรุกโตส

โดยนำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มากรองผ่าน membrane filter ขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการกรองแล้วมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคสและฟรุกโตสโดยวิธี High performance liquid chromatograhy (HPLC) คอลัมน์ที่ใช้วิเคราะห์คือ คอลัมน์ชนิด NH2 (5 µm) อุณหภูมิคอลัมน์ เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส วัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นส่วนผสมของอะซีโตไนไตรล์ (Acetonitrile; CH_3CN) และน้ำ (75:25) โดยกำหนดอัตรา

การไหล (Flow rate) เท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจวัดสัญญาณ (Detector) คือ RID Detector ปริมาณตัวอย่างที่ฉีดเท่ากับ 10 ไมโครลิตร วัดพื้นที่ใต้พีคที่ได้ จากนั้นเมื่อได้พื้นที่ใต้พีคแล้วนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณหาปริมาณสาร หรือคำนวณได้จาก

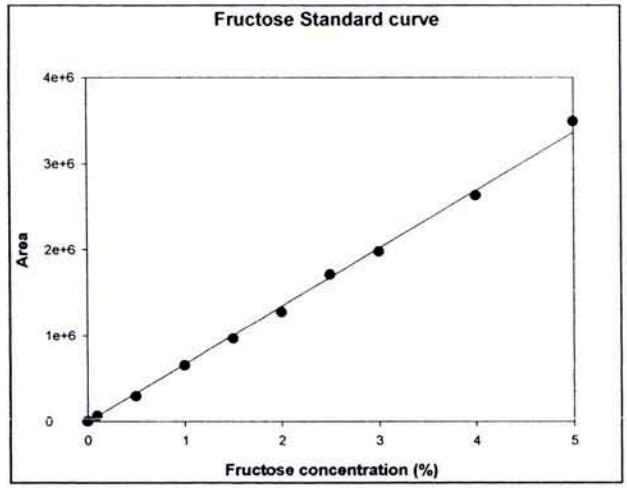
$$\text{ความเข้มข้นของฟรุกโตส หรือ กลูโคส หรือซูโครส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้พีค}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})} \times 10$$

การเตรียมสารละลายฟรุกโตสมาตรฐาน

เตรียมสารละลายฟรุกโตสมาตรฐานความเข้มข้น 50 % (w/v) โดยทำการชั่งฟรุกโตส 5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร จะได้ Fructose stock solution ที่มีความเข้มข้น 50 % จากนั้นนำ 50% Fructose stock solution มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-5 เปอร์เซ็นต์ ดังตาราง

ตาราง 18 การเตรียมกราฟมาตรฐานฟรุกโตส

ลำดับ	% Fructose	50% Fructose stock solution (ml)	น้ำกลั่น (ml)	ปริมาตรของสารละลายฟรุกโตสสุดท้าย(ml)
1	0.0	0.00	5.00	5
2	0.5	0.05	4.95	5
3	1.0	0.10	4.90	5
4	1.5	0.15	4.85	5
5	2.0	0.20	4.80	5
6	2.5	0.25	4.75	5
7	3.0	0.30	4.70	5
8	4.0	0.40	4.60	5
9	5.0	0.50	4.50	5



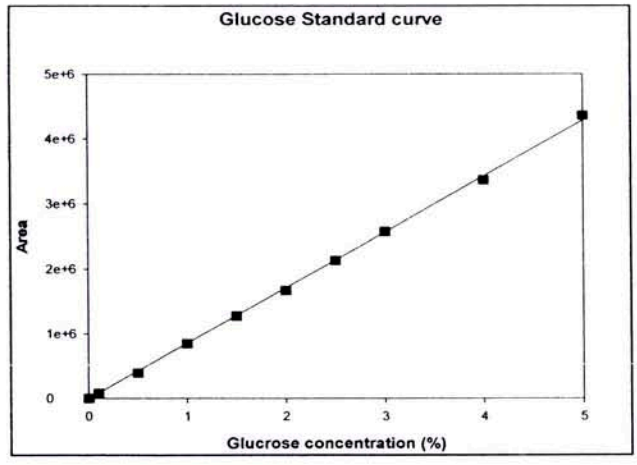
ภาพ 54 กราฟมาตรฐานฟรุกโตส

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมโดยทำการชั่งกลูโคส 5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร จะได้ Glucose stock solution ที่มีความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำ 50% Glucose stock solution มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 0 - 5 เปอร์เซ็นต์ ดังตาราง

ตาราง 19 การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

ลำดับ	% Glucose	50% Glucose stock solution (ml)	น้ำกลั่น (ml)	ปริมาตรของสารละลายกลูโคสสุดท้าย(ml)
1	0.0	0.00	5.00	5
2	0.5	0.05	4.95	5
3	1.0	0.10	4.90	5
4	1.5	0.15	4.85	5
5	2.0	0.20	4.80	5
6	2.5	0.25	4.75	5
7	3.0	0.30	4.70	5
8	4.0	0.40	4.60	5
9	5.0	0.50	4.50	5



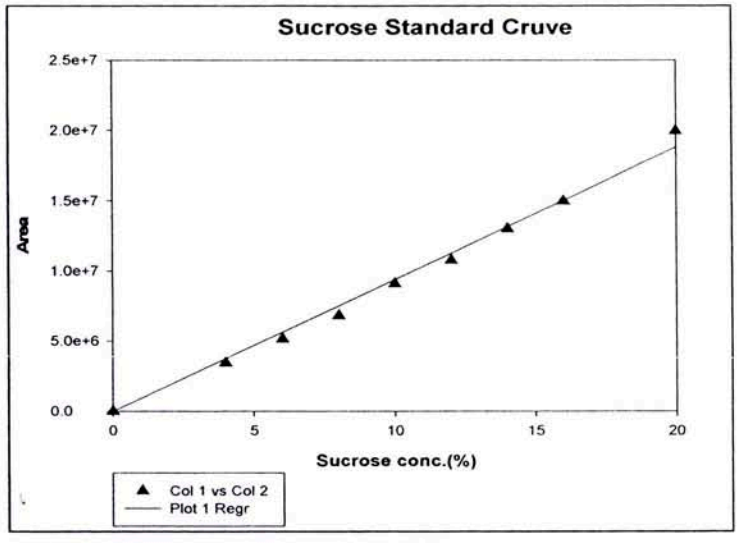
ภาพ 55 กราฟมาตรฐานกลูโคส

การเตรียมสารละลายซูโครสมาตรฐาน

เตรียมโดยทำการชั่งซูโครส 5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร จะได้ Sucrose stock solution ที่มีความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำ 50% Sucrose stock solution มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 0 – 20 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 20 การเตรียมกราฟมาตรฐานซูโครส

ลำดับ	% Sucrose	ปริมาตร 50% Sucrose stock solution (ml)	น้ำกลั่น (ml)	ปริมาตรของสารละลายซูโครส สุดท้าย(ml)
1	0	0.00	5.00	5
2	4	0.40	4.60	5
3	6	0.60	4.40	5
4	8	0.80	4.20	5
5	10	1.00	4.00	5
6	12	1.20	3.80	5
7	14	1.40	3.60	5
8	16	1.60	3.40	5
9	20	2.00	3.00	5



ภาพ 56 กราฟมาตรฐานซูโครส

การหาปริมาณ Crude dextran (Shamala and Prasad, 1995, pp. 238-239)

สามารถทำได้โดยนำอาหารเหลวที่ผ่านการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่สภาวะต่างๆ ตามที่ระบุในแผนการทดลองมาตกตะกอนด้วยแอบโซลูทเอทานอล (absolute ethanol) ในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้ Crude dextran ตกตะกอน 1 คืน จากนั้นทำการกรองแยกเอาส่วนที่เป็นตะกอนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักคงที่

ภาคผนวก ค ข้อมูลสำหรับการพัฒนาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

ตาราง 21 ข้อมูลของ *Weissella cibaria* ที่อุณหภูมิ 20 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการประมาณค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

W. cibaria at 20 ^{0}C biocide 0ppm

Time (h)	Growth (log_{10}cfu/ml)	Enzyme activity (DSU/ml)	Sucrose (mg/ml)	Fructose (mg/ml)	Glucose (mg/ml)	Crude Dextran (mg/ml)	Total (mg/ml)
0	6.49	0.00	154.69	8.87	10.83	0.00	174.39
2	6.84	0.00	153.18	8.47	10.05	0.10	171.80
4	7.67	0.02	155.50	8.44	10.77	0.20	174.91
6	8.04	0.07	151.42	9.46	10.30	0.35	171.53
8	8.65	0.84	149.21	11.50	10.10	1.45	172.26
12	8.67	1.75	130.05	20.25	9.61	8.05	167.96
16	8.97	2.05	113.37	28.60	9.46	21.65	173.08
20	9.20	2.38	82.45	45.60	10.40	46.70	185.15
24	9.23	2.90	67.09	57.85	11.52	64.40	200.86

W. cibaria at 30 ^{0}C biocide 0ppm

Time (h)	Growth (log_{10}cfu/ml)	Enzyme activity (DSU/ml)	Sucrose (mg/ml)	Fructose (mg/ml)	Glucose (mg/ml)	Crude Dextran (mg/ml)	total (mg/ml)
0	5.52	0.00	176.52	12.73	16.84	0.00	206.09
2	6.13	0.06	177.54	12.52	15.82	0.60	206.48
4	7.32	0.06	180.94	12.97	16.17	1.50	211.58
6	8.18	0.42	176.79	13.62	15.15	2.40	207.96
8	8.77	0.44	172.93	16.34	15.09	7.70	212.06
12	8.92	0.50	148.72	20.80	15.04	29.35	213.91
16	8.83	0.66	141.22	24.10	15.33	57.65	238.30
20	8.85	0.67	134.24	25.99	14.64	72.35	247.22
24	8.69	0.77	129.29	24.93	12.94	81.45	248.61

ตาราง 21 (ต่อ)

W. cibaria at 35 ^{0}C biocide 0ppm

Time (h)	Growth (log_{10}cfu/ml)	Enzyme activity (DSU/ml)	Sucrose (mg/ml)	Fructose (mg/ml)	Glucose (mg/ml)	Crude Dextran (mg/ml)	Total (mg/ml)
0	5.68	0.00	168.55	13.01	20.84	0.00	202.40
2	6.57	0.00	167.94	13.01	20.68	0.65	202.28
4	8.02	0.05	167.98	13.29	20.97	0.80	203.04
6	7.99	0.10	168.43	13.95	20.84	0.80	204.02
8	8.01	0.12	165.11	14.93	20.14	1.30	201.48
12	7.70	0.13	163.70	16.31	20.27	1.85	202.13
16	6.70	0.15	162.29	16.73	20.28	2.10	201.40
20	4.97	0.16	162.08	17.47	20.33	2.35	202.23
24	3.23	0.18	160.59	17.46	20.27	4.45	202.77

W. cibaria at 40 ^{0}C biocide 0ppm

Time (h)	Growth (log_{10}cfu/ml)	Enzyme activity (DSU/ml)	Sucrose (mg/ml)	Fructose (mg/ml)	Glucose (mg/ml)	Crude Dextran (mg/ml)	Total (mg/ml)
0	5.60	0.00	172.89	14.01	17.16	0.00	204.06
2	6.81	0.02	172.38	13.94	16.78	0.15	203.25
4	8.03	0.02	173.89	13.99	15.90	0.75	204.53
6	9.70	0.08	171.99	14.73	14.96	0.05	201.73
8	7.61	0.13	170.09	15.34	13.69	0.20	199.32
12	7.90	0.13	170.33	15.63	13.15	1.60	200.71
16	3.95	0.13	170.59	16.43	13.99	1.58	202.59
20	3.06	0.12	169.88	16.57	14.03	0.98	201.46
24	1.10	0.12	170.59	16.79	13.47	1.08	201.93

ตาราง 22 ข้อมูลของ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ที่อุณหภูมิ 20 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการประมาณค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลอง

L. mesenteroides TISTR 473 at 20 ^{0}C biocide 0ppm							
Time (h)	Growth (log_{10}cfu/ml)	Enzyme activity (DSU/ml)	Sucrose (mg/ml)	Fructose (mg/ml)	Glucose (mg/ml)	Crude Dextran (mg/ml)	Total (mg/ml)
0	5.92	0.00	157.07	8.33	11.18	0.00	176.58
2	6.66	0.03	158.47	8.35	11.54	0.35	178.71
4	7.88	0.05	159.50	8.59	11.25	1.25	180.59
6	8.00	0.17	157.25	8.90	10.87	1.25	178.27
8	9.05	0.62	149.77	10.69	10.27	2.15	172.88
12	8.88	1.37	122.67	20.43	10.31	13.70	167.11
16	8.92	1.43	112.91	32.27	10.28	22.20	177.66
20	8.82	1.61	85.70	51.11	10.66	51.15	198.62
24	9.00	1.94	72.23	63.44	13.26	61.45	210.38

L. mesenteroides TISTR 473 at 30 ^{0}C biocide 0ppm							
Time (h)	Growth (log_{10}cfu/ml)	Enzyme activity (DSU/ml)	Sucrose (mg/ml)	Fructose (mg/ml)	Glucose (mg/ml)	Crude Dextran (mg/ml)	Total (mg/ml)
	5.73	0.00	169.00	12.79	14.22	0.00	196.01
2	6.30	0.02	162.97	12.38	13.01	0.55	188.91
4	7.56	0.20	157.26	12.04	12.51	1.80	183.61
6	8.51	0.28	152.81	13.45	12.07	6.65	184.98
8	8.80	0.61	137.71	15.20	11.59	9.75	174.25
12	8.84	0.67	106.93	17.44	11.64	33.20	169.21
16	8.84	0.68	115.52	22.47	11.89	80.05	229.93
20	8.75	0.70	97.13	22.72	11.06	83.25	214.16
24	8.57	0.74	95.65	23.47	10.91	86.15	216.18

ตาราง 22 (ต่อ)

L. mesenteroides TISTR 473 at 35 ^{0}C biocide 0ppm							
Time (h)	Growth (log_{10}cfu/ml)	Enzyme activity (DSU/ml)	Sucrose (mg/ml)	Fructose (mg/ml)	Glucose (mg/ml)	Crude Dextran (mg/ml)	Total (mg/ml)
0	5.64	0.00	164.56	12.62	21.13	0.00	198.31
2	6.59	0.01	161.13	12.96	20.49	1.20	195.78
4	7.31	0.01	162.51	13.14	20.41	1.40	197.46
6	7.80	0.03	162.19	13.56	20.30	1.25	197.30
8	7.74	0.05	162.32	13.79	20.06	1.65	197.82
12	6.43	0.06	157.86	14.05	19.34	1.90	193.15
16	5.63	0.07	156.97	14.04	19.15	2.50	192.66
20	4.46	0.08	156.61	14.45	19.44	3.00	193.50
24	2.91	0.08	156.47	14.84	20.48	3.75	195.54

L. mesenteroides TISTR 473 at 40 ^{0}C biocide 0ppm							
Time (h)	Growth (log_{10}cfu/ml)	Enzyme activity (DSU/ml)	Sucrose (mg/ml)	Fructose (mg/ml)	Glucose (mg/ml)	Crude Dextran (mg/ml)	Total (mg/ml)
0	5.61	0.00	155.26	18.27	25.59	0.00	199.12
2	6.47	0.00	154.17	18.18	24.79	0.55	197.69
4	7.99	0.00	153.41	18.24	25.54	0.30	197.49
6	7.75	0.00	153.01	17.91	24.32	1.05	196.29
8	7.45	0.00	152.78	18.00	23.87	0.75	195.40
12	2.46	0.00	152.10	18.27	24.86	0.95	196.18
16	-	0.00	154.08	18.83	24.19	0.90	198.00
20	-	0.00	152.66	18.70	23.83	0.60	195.79
24	-	0.00	154.89	19.13	25.27	0.35	199.64

ตาราง 23 ข้อมูลของ *Weissella cibaria* และ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการทวนสอบความถูกต้องของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

W. cibaria at 25 ^{0}C biocide 0ppm

Time (h)	Growth (log_{10}cfu/ml)	Enzyme activity (DSU/ml)	Sucrose (mg/ml)	Fructose (mg/ml)	Glucose (mg/ml)	Crude Dextran (mg/ml)	Total (mg/ml)
0	5.66	0.00	164.79	13.27	19.10	0.00	197.16
2	5.99	0.01	163.16	13.49	19.28	5.10	201.03
4	7.83	0.03	162.67	13.51	19.21	4.35	199.74
6	7.66	0.17	162.01	14.80	19.25	4.25	200.31
8	8.56	0.32	157.50	16.35	19.04	6.25	199.14
12	8.52	0.42	148.59	21.56	18.91	7.45	196.51
16	8.72	0.62	140.73	25.99	18.82	8.10	193.64
20	8.71	0.75	134.48	31.96	18.81	19.10	204.35
24	8.71	0.82	129.07	35.84	18.63	21.50	205.04

L. mesenteroides TISTR 473 at 25 ^{0}C biocide 0ppm

Time (h)	Growth (log_{10}cfu/ml)	Enzyme activity (DSU/ml)	Sucrose (mg/ml)	Fructose (mg/ml)	Glucose (mg/ml)	Crude Dextran (mg/ml)	Total (mg/ml)
0	5.70	0.00	159.76	12.76	19.47	0.00	191.99
2	5.96	0.01	156.74	12.63	19.10	0.75	189.22
4	7.44	0.03	156.62	12.65	19.11	1.15	189.53
6	8.00	0.13	156.77	13.78	19.17	2.15	191.87
8	8.15	0.28	156.34	15.00	19.35	3.70	194.39
12	8.48	0.41	153.35	19.47	19.43	4.05	196.30
16	8.58	0.50	145.74	22.64	18.92	7.50	194.80
20	8.54	0.58	141.78	27.33	19.11	11.35	199.57
24	8.59	0.69	129.68	29.68	17.93	16.25	193.54

ตาราง 24 ข้อมูลของ *Weissella cibaria* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้ในการหาค่า Weighted sum of squared errors (WSSE)

W. ciberia	ข้อมูลจากการทดลอง					ข้อมูลที่ได้จากแบบจำลอง					ผลต่างของข้อมูลจากการทดลองกับแบบจำลอง				
Time (h)	Xdata	Edata	Sdata	Fdata	Ddata	Xdata	Edata	Sdata	Fdata	Ddata	Xdata	Edata	Sdata	Fdata	Ddata
0	5.68	0.00	165.98	13.17	0.00	5.20	0.00	172.32	4.29	1.24	0.48	0.00	-6.34	8.88	-1.24
0	5.63	0.00	163.61	13.37	0.00	5.20	0.00	172.32	4.29	1.24	0.44	0.00	-8.71	9.08	-1.24
2	5.95	0.00	164.46	13.65	2.80	6.03	0.14	171.24	4.79	1.69	-0.07	-0.14	-6.78	8.86	1.11
2	6.02	0.01	161.87	13.33	7.40	6.03	0.14	171.24	4.79	1.69	0.00	-0.13	-9.37	8.54	5.71
4	7.91	0.01	165.02	13.79	2.10	6.87	0.29	168.16	6.34	3.08	1.04	-0.28	-3.15	7.45	-0.98
4	7.76	0.04	160.32	13.23	6.60	6.87	0.29	168.16	6.34	3.08	0.89	-0.25	-7.85	6.90	3.52
6	7.69	0.16	166.13	14.78	1.10	7.60	0.46	163.08	8.95	5.43	0.09	-0.30	3.05	5.83	-4.33
6	7.62	0.18	157.90	14.82	7.40	7.60	0.46	163.08	8.95	5.43	0.03	-0.28	-5.18	5.87	1.97
8	8.51	0.38	158.64	16.73	4.20	8.14	0.62	156.10	12.58	8.70	0.37	-0.25	2.54	4.15	-4.50
8	8.61	0.27	156.37	15.97	8.30	8.14	0.62	156.10	12.58	8.70	0.48	-0.36	0.26	3.39	-0.40
12	8.49	0.42	148.27	21.93	6.50	8.66	0.94	137.60	22.27	17.42	-0.16	-0.52	10.67	-0.35	-10.92
12	8.56	0.41	148.91	21.20	8.40	8.66	0.94	137.60	22.27	17.42	-0.10	-0.53	11.31	-1.07	-9.02
16	8.76	0.63	138.58	25.96	7.60	8.70	1.23	115.60	33.85	27.84	0.07	-0.60	22.98	-7.89	-20.24
16	8.67	0.62	142.88	26.03	8.60	8.70	1.23	115.60	33.85	27.84	-0.02	-0.61	27.28	-7.82	-19.24

ตาราง 24 (ต่อ)

W. ciberia	ข้อมูลจากการทดลอง					ข้อมูลที่ได้จากแบบจำลอง					ผลต่างของข้อมูลจากการทดลองกับแบบจำลอง				
Time (h)	Xdata	Edata	Sdata	Fdata	Ddata	Xdata	Edata	Sdata	Fdata	Ddata	Xdata	Edata	Sdata	Fdata	Ddata
20	8.69	0.75	133.30	31.90	23.20	8.53	1.47	93.14	45.68	38.50	0.16	-0.72	40.16	-13.78	-15.30
20	8.72	0.75	135.67	32.02	15.00	8.53	1.47	93.14	45.68	38.50	0.19	-0.72	42.53	-13.66	-23.50
24	8.75	0.81	129.26	36.21	23.70	8.30	1.68	72.42	56.61	48.33	0.45	-0.87	56.85	-20.40	-24.63
24	8.66	0.83	128.88	35.46	19.30	8.30	1.68	72.42	56.61	48.33	0.37	-0.84	56.47	-21.15	-29.03
										WSSE	0.04	6.23	0.42	1.43	5.89

ตาราง 25 ข้อมูลของ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้ในการหาค่า Weighted sum of squared errors (WSSE)

L. mesenteroides TISTR 473	ข้อมูลจากการทดลอง					ข้อมูลที่ได้จากแบบจำลอง					ผลต่างของข้อมูลจากการทดลองกับแบบจำลอง				
Time (h)	Xdata	Edata	Sdata	Fdata	Ddata	Xdata	Edata	Sdata	Fdata	Ddata	Xdata	Edata	Sdata	Fdata	Ddata
0	5.68	0.00	161.18	12.99	0.00	5.50	0.00	161.48	0.00	0.47	0.18	0.00	-0.30	12.99	-0.47
0	5.72	0.00	158.34	12.53	0.00	5.50	0.00	161.48	0.00	0.47	0.22	0.00	-3.13	12.53	-0.47
2	5.92	0.00	158.12	12.82	0.50	6.43	0.11	160.13	0.59	1.00	-0.51	-0.11	-2.00	12.23	-0.50
2	5.99	0.01	155.36	12.44	1.00	6.43	0.11	160.13	0.59	1.00	-0.44	-0.10	-4.76	11.85	0.00
4	7.27	0.03	160.90	13.19	1.10	7.39	0.23	156.36	2.45	2.67	-0.11	-0.20	4.55	10.74	-1.57
4	7.60	0.04	152.33	12.10	1.20	7.39	0.23	156.36	2.45	2.67	0.21	-0.19	-4.03	9.66	-1.47
6	7.93	0.12	159.65	14.00	1.60	8.15	0.37	150.10	5.64	5.55	-0.22	-0.24	9.55	8.35	-3.95
6	8.06	0.13	153.89	13.56	2.70	8.15	0.37	150.10	5.64	5.55	-0.09	-0.23	3.79	7.92	-2.85
8	7.96	0.27	159.06	15.61	3.60	8.60	0.51	141.48	10.12	9.58	-0.64	-0.24	17.58	5.49	-5.98
8	8.34	0.29	153.63	14.39	3.80	8.60	0.51	141.48	10.12	9.58	-0.26	-0.22	12.15	4.27	-5.78
12	8.52	0.41	156.18	19.67	4.00	8.78	0.80	118.68	22.09	20.36	-0.26	-0.39	37.50	-2.42	-16.36
12	8.45	0.42	150.53	19.27	4.10	8.78	0.80	118.68	22.09	20.36	-0.34	-0.38	31.84	-2.83	-16.26

ตาราง 25 (ต่อ)

L. mesenteroides TISTR 473	ข้อมูลจากการทดลอง					ข้อมูลที่ได้จากแบบจำลอง					ผลต่างของข้อมูลจากการทดลองกับแบบจำลอง				
Time (h)	Xdata	Edata	Sdata	Fdata	Ddata	Xdata	Edata	Sdata	Fdata	Ddata	Xdata	Edata	Sdata	Fdata	Ddata
16	8.57	0.45	145.81	22.61	9.60	8.52	1.08	92.30	36.01	32.88	0.05	-0.63	53.51	-13.40	-23.28
16	8.59	0.55	145.66	22.67	5.40	8.52	1.08	92.30	36.01	32.88	0.07	-0.53	53.35	-13.34	-27.48
20	8.56	0.59	143.14	27.41	13.00	8.14	1.34	66.84	49.46	44.99	0.42	-0.75	76.29	-22.06	-31.99
20	8.53	0.58	140.42	27.26	9.70	8.14	1.34	66.84	49.46	44.99	0.39	-0.76	73.58	-22.20	-35.29
24	8.65	0.67	129.23	29.28	18.40	7.74	1.58	45.32	60.84	55.23	0.91	-0.91	83.91	-31.57	-36.83
24	8.53	0.72	130.13	30.08	14.10	7.74	1.58	45.32	60.84	55.23	0.79	-0.86	84.81	-30.77	-41.13
										WSSE	0.04	7.85	1.32	4.75	21.40

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – ชื่อสกุล กิตติมา เขียวอรุณ

วัน เดือน ปี เกิด 5 เมษายน 2529

ที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 38 หมู่ 13 ตำบลวังพิกุล อำเภอบึงสามพัน จังหวัดเพชรบูรณ์

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2552 วท.บ (เทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม) มหาวิทยาลัยนเรศวร