ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสูตร MRS medium ประกอบด้วย

- Tryptone 2%
- Yeast extract 1%
- Meat extract 2%
- Glucose 2%
- K_2HPO_4 0.2%
- Triammomium citrate 0.4%
- Sodium acetate 0.5%
- Tween 80 0.1%
- $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.028%
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.058%
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.074%

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.5 ด้วยสารละลาย HCl เข้มข้น 1 N นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารสูตร MRS-Sago starch medium ประกอบด้วย

อาหารสูตร MRS medium ที่เติมแป้งสาคู ลงไปแทนน้ำตาลกลูโคส 2% ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.5 ด้วยสารละลาย HCl เข้มข้น 1 N นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที สำหรับแป้งสาคูดิบจะนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาทำการทดลอง

3. การเตรียม Sodium – citrate buffer ความเข้มข้น 0.1 M ,pH 5.5

1. เตรียม Stock A : 0.1 M citric acid (21.01 g of $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ in H_2O 1,000 ml)
2. เตรียม Stock B : 0.1 M sodium citrate (29.41 g of $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ in H_2O 1,000 ml)
3. ดูดสารละลายจาก Stock A 14.8 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายจาก Stock B 35.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร

4. การเตรียม Stock enzyme

4.1 enzyme α- amylase ให้มีกิจกรรม 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

โดย enzyme α- amylase มีกิจกรรม 52.9 ยูนิตต่อมิลลิกรัม

กิจกรรม 52.9 ยูนิต	ใช้	enz.	1	มิลลิกรัม
กิจกรรม 500 ยูนิต	จะต้องใช้	enz.	9.45	มิลลิกรัม
	หรือเท่ากับ	enz.	9.45	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง enzyme α- amylase 0.189 กรัม ละลายในสารละลาย Sodium citrate buffer 20 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่าน filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ขวดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเก็บในตู้เย็น

4.2 enzyme glucoamylase ให้มีกิจกรรม 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

โดย enzyme glucoamylase มีกิจกรรม 21,100 ยูนิตต่อกรัม

กิจกรรม 21,100 ยูนิต	ใช้	enz.	1	กรัม
กิจกรรม 500 ยูนิต	จะต้องใช้	enz.	0.024	กรัม
	หรือเท่ากับ	enz.	0.024	กรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง enzyme glucoamylase 0.480 กรัม ละลายในสารละลาย Sodium citrate buffer 20 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่าน filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ใส่ขวดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเก็บในตู้เย็น

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธี Somogyi-Nelson method (Nelson, 1944)

สารเคมี

1. สารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent)

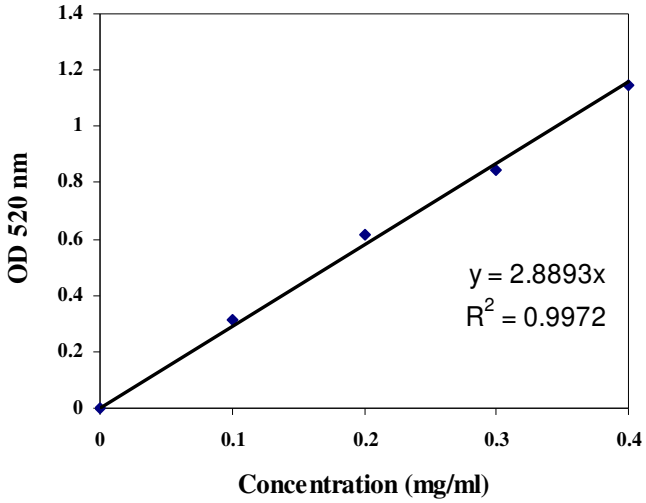
   เตรียมโดยละลาย Sodium Potassium Tartate 12 กรัม Na_2CO_3 anhydrous 24 กรัม $NaHCO_3$ 16 กรัม และ Na_2SO_4 (anhydrous) 144 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และเติมสารละลายที่มี $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 4 กรัม และ Na_2SO_4 36 กรัม (ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ก่อน) ผสมให้เข้ากัน ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วันก่อนนำไปใช้กรอง (หากมีตะกอน) และเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลายเนลสัน (Nelson reagent) เตรียมโดย

   ละลาย $(NH_4)\ MoO_4 \cdot 4H_2O$ 50 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตรเติมกรดกำมะถันเข้มข้น 42 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน เติม $Na_2Has_2O_4 \cdot 7H_2O$ 3 กรัม ที่ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1-2 วันที่อุณหภูมิ 37 °ซ กรอง (หากมีตะกอน) และเก็บในขวดสีชา

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น โดยบรรจุสารละลายมาตรฐานในหลอดทดสอบหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายคอปเปอร์ 0.5 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันที เติมสารละลายเนลสัน 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสง
2. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

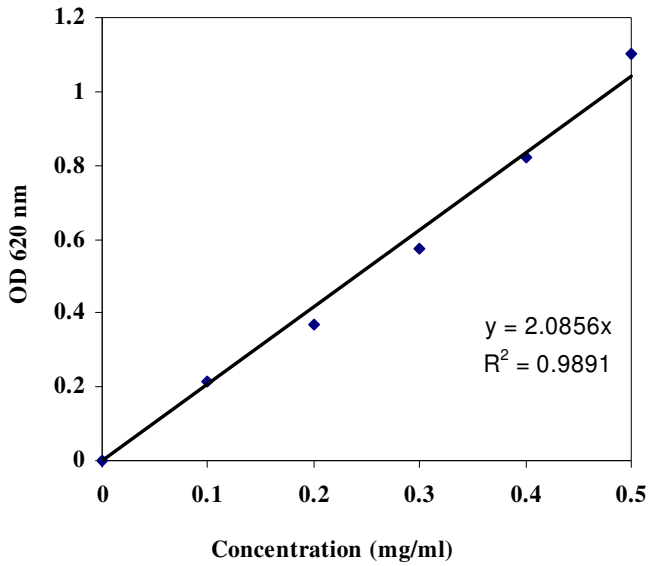
2. การวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรันด้วยสารละลายแอนโทรน รีเอเจนต์

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (95% v/v) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร
2. แอนโทรนรีเอเจนต์ 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ค่อยๆ เติมกรดซัลฟิวริกที่เตรียมไว้ลงในสารละลายแอนโทรนรีเอเจนต์ ขณะเติมกรดซัลฟิวริกควรมีการหล่อเย็นเนื่องจากมีความร้อนเกิดขึ้นและเมื่อไม่ใช้งานควรเก็บไว้ในตู้เย็น

วิธีการ

1. เตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลแลคโตสเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น
2. ปิเปตสารละลายแอนโทรน บรรจุลงหลอดทดลอง หลอดละ 2 มิลลิลิตร เติมน้ำตาลแลคโตสมาตรฐานความเข้มข้นละ 0.2 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปแช่ในน้ำเย็นทันที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร
3. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ตัวอย่างที่เจือจางได้เหมาะสม 0.2 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ตามวิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของน้ำตาลแลคโตส



ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแลคโตส