

ภาคผนวก ก

การให้รหัสตัวอย่างลูกแบ่งเหล่าจากอำเภอต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่

ตารางที่ 15 รหัสตัวอย่างลูกแบ่งเหล่าที่เก็บตัวอย่าง

ลำดับที่	รหัส	สถานที่เก็บตัวอย่าง
1	FA 1	โรงกลั่นสุรา อ.ฝาง
2	FA 2	โรงกลั่นสุรา อ. ฝาง
3	MA 1	ตลาดแม่อาว อ. แม่อาว
4	MA 2	ตลาดสด อ. แม่อาว
5	MA 3	อ. แม่อาว
6	CHP 1	โรงกลั่นสุราชุมชน อ. ไชยปราการ
7	CHP 2	ตลาดสด อ. ไชยปราการ
8	CHP 3	โรงกลั่นสุรา อ.ไชยปราการ
9	CHD 1	โรงกลั่นสุรบ้านเมืองคอง อ. เชียงดาว
10	CHD 2	โรงกลั่นสุราเมืองงาย อ. เชียงดาว
11	MR 1	ตลาดสด อ. แม่ริม
12	M 1	ตลาดวโรรส อ.เมือง
13	SS 1	ร้านขายของ อ.สันทราย
14	SPT 1	อ. สันป่าตอง
15	SPT 2	อ.สันป่าตอง
16	HD 1	อ.หางดง
17	HD 2	อ.หางดง
18	JT 1	โรงกลั่นสุรา อ.จอมทอง
19	DT 1	โรงกลั่นสุรา อ.ดอยเต่า
20	MV 1	โรงกลั่นสุรา กิ่ง อ. แม่วาง
21	MJ 1	ตลาดบ้านแม่แจ่ม อ. แม่แจ่ม
22	SP1	อ. สารภี
23	SP 2	อ. สารภี
24	SP 3	อ.สารภี
25	SP 4	อ. สารภี
26	SP 5	อ. สารภี

ภาคผนวก ข
แบบสอบถาม “ลูกแป้ง”

1. Code :
2. ชนิดลูกแป้ง : ☐ ลูกแป้งข้าวหมาก ☐ ลูกแป้งเหล้า ☐ ลูกแป้งน้ำส้ม
3. แหล่งที่เก็บ :
4. ลูกแป้งได้มาอย่างไร :
 - 4.1 ☐ ซื้อต่อมา จากที่ไหน.....
 - 4.2 ☐ ผลิตเอง ถ้าผลิตเองสูตรได้มาอย่างไร ☐ ถ่ายทอดจากบรรพบุรุษ
☐ ได้มาจากที่อื่น
☐ ดัดแปลงสูตรเอง
☐ อื่นๆ.....
 - 4.3 สูตรลูกแป้งประกอบด้วย
 - 1) แป้ง.....
 - 2) พืชสมุนไพร.....
 - 3) กล้าเชื้อ.....
5. ราคาลูกแป้ง.....
6. อายุลูกแป้ง.....
7. อัตราส่วนลูกแป้งที่ใช้ในการหมัก.....
8. ลักษณะทั่วไปของลูกแป้ง
 - 8.1 สี.....
 - 8.2 ขนาด.....
 - 8.3 รูปร่าง.....
 - 8.4 กลิ่น.....
 - 8.5 ลักษณะภายนอกของลูกแป้ง.....

ภาคผนวก ค

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast extract – malt extract broth (YM broth)

Yeast extract	3	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Glucose	10	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ปรับค่าความเป็นกรด – ด่าง เท่ากับ 3.5 – 3.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Glucose	20	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ปอกเปลือกมันฝรั่งแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปชั่งจนครบ 200 กรัม แล้วนำมาต้มกับน้ำ กลั่น 1,000 มิลลิลิตร นาน 15 – 20 นาที กรองเอาส่วนที่เป็นกากออก เติมส่วนประกอบที่เหลือ แล้วนำไปต้มจนละลาย นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Starch agar

Potassium dihydrogen phosphate	1.4	กรัม
Ammonium nitrate	10	กรัม
Potassium chloride	0.5	กรัม
Magnesium sulphate	0.1	กรัม
Ferus sulphate	0.01	กรัม

Soluble starch	20	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ปรับค่าความเป็นกรด – ด่าง เท่ากับ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Starch Broth

Potassium dihydrogen phosphate	1.4	กรัม
Ammonium nitrate	10	กรัม
Potassium chloride	0.5	กรัม
Magnesium sulphate	0.1	กรัม
Ferus sulphate	0.01	กรัม
Soluble starch	20	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ปรับค่าความเป็นกรด – ด่าง เท่ากับ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Yeast extract – Malt extract Agar (YM agar)

Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ผสมส่วนต่าง ๆ เข้ากัน ปรับ pH เป็น 3.5-3.8 ด้วย HCl 0.1 N นำไป นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วย autoclave

6. Yeast extract Peptone dextrose broth (YPD broth)

Yeast extract	10.0	กรัม
Peptone	20.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ผสมส่วนต่าง ๆ เข้ากัน นำไป นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วย autoclave

7. Yeast extract Peptone dextrose broth (YPD broth) + Glucose 20 %

Yeast extract	10.0	กรัม
Peptone	20.0	กรัม
Glucose	40.0	กรัม

วิธีการเตรียม

ผสมส่วนต่าง ๆ เข้ากัน นำไป นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วย autoclave

8. Yeast extract Peptone dextrose agar (YPD agar)

Yeast extract	10.0	กรัม
Peptone	20.0	กรัม
Glucose	40.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม

วิธีการเตรียม

ผสมส่วนต่าง ๆ เข้ากัน นำไป นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ด้วย autoclave

ภาคผนวก ง

การเตรียมสารเคมี

1. Iodine solution

Iodine	2	กรัม
Potassium iodide	2	กรัม
Distilled water	300	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ละลาย Iodine และ Potassium iodide ในน้ำกลั่น คนให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วเก็บไว้ในขวดสีชา

2. สารละลายกรด Dinotrosalicylic acid (DNS)

3,5- dinotrosalicylic acid	1	กรัม
NaOH 2.0 นอร์มอล	20	มิลลิลิตร
Sodium-potassium trtrate	30	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งกรดไดโนโตรซาลิสิก 1 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นลงไปอีก 50 มิลลิลิตร คนให้ละลายจากนั้นโซเดียมโพแทสเซียมทราเทรต 30 กรัม ค่อยๆละลายหมด ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. Phosphate buffer

เตรียมสารละลาย A และ B ดังนี้

สารละลาย A เป็นสารละลาย monobasic sodium phosphate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่ง monobasic sodium phosphate 27.8 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร คนให้ละลาย

สารละลาย B เป็นสารละลาย dibasic sodium phosphate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่ง dibasic sodium phosphate 71.7 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร คนให้ละลาย นำสารละลาย A และ B มาผสมกันได้ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงปริมาณของสารละลาย A และ B ในการเตรียม phosphate buffer

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	pH	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	pH
93.5	6.5	5.7	54.0	55.0	6.9
92.2	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

ภาคผนวก จ

ตัวอย่างลูกแป้งจากอำเภอต่าง ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 4 ตัวอย่างลูกแป้งที่เก็บมาจาก อำเภอสันทราย



ภาพที่ 5 ตัวอย่างลูกแป้งที่เก็บมาจาก อำเภอดอยเต่า



ภาพที่ 6 ตัวอย่างลูกแป้งที่เก็บมาจาก อำเภอฝาง



ภาพที่ 7 ตัวอย่างที่เก็บมาจาก อำเภอสันป่าตอง



ภาพที่ 8 ตัวอย่างที่เก็บมาจาก อำเภอจอมทอง



ภาพที่ 9 ตัวอย่างที่เก็บมาจาก อำเภอเชียงดาว



ภาพที่ 10 ตัวอย่างที่เก็บมาจาก อำเภอสาร์ภี



ภาพที่ 11 ตัวอย่างที่เก็บมาจาก อำเภแม่แจ่ม

ภาคผนวก จ
เทคนิคการแยกเชื้อยีสต์จากลูกแป้งเหล้า

1. เทคนิค การ streak plate

- นำเชื้อตัวอย่าง มาหนึ่ง loop เปิดฝา plate แล้วแตะเชื้อตัวอย่างลงบนผิวหน้าของวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ ใกล้เคียงขอบใดขอบหนึ่งของจานเพาะเชื้อ ลาก loop เบาๆ ไปมาบนจานเพาะเชื้อ ในลักษณะเป็นเส้นขนานถี่ๆ โดยใช้พื้นที่ประมาณ $\frac{1}{4}$ ของผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในการ streak ครั้งที่หนึ่ง เสร็จแล้วเผา loop แล้วปล่อยให้เย็น
- หมุนจานเพาะเชื้อเล็กน้อยเพื่อการ Streak ครั้งที่ 2 โดยลาก loop ผ่านเชื้อที่ Streak ไว้ครั้งแรก ลากไป – มา 5-6 เส้นให้ถี่หรือใกล้กันที่สุด
- ทำต่อเนื่องไปจนครบ 3 หรือ 4 ส่วน แล้วปิดฝา plate ต้องเผา loop ทุกครั้ง หลังจากเสร็จสิ้นการ streak นำเข้าปมเพาะเชื้อตามอุณหภูมิที่เหมาะสมในลักษณะที่คว่ำ plate 24-48 ชม.

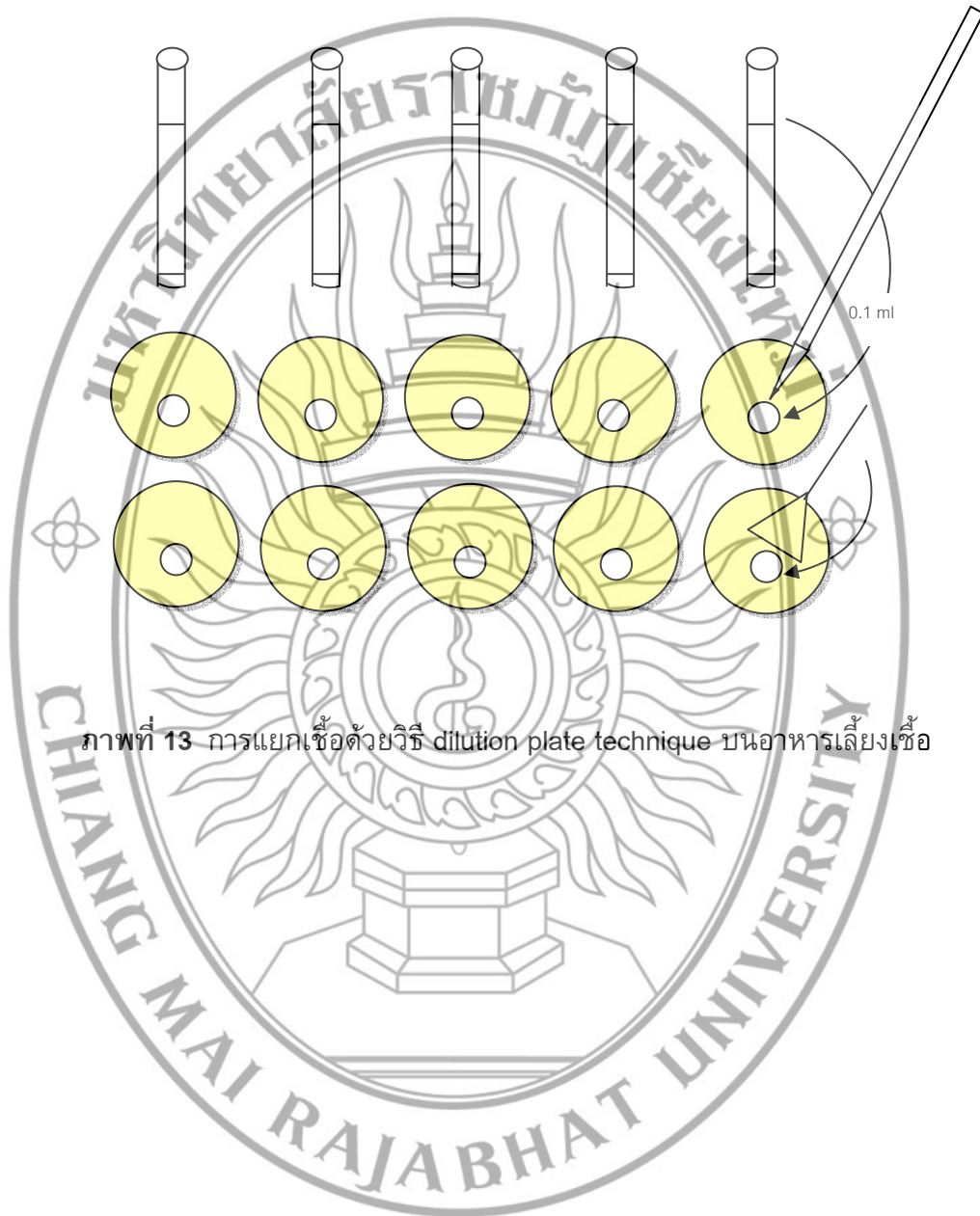


ภาพที่ 12 แสดงการ streak เชื้อบน อาหารเลี้ยงเชื้อ

2. วิธีการ spread plate

- เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA plate ที่ผิวหน้าอาหารแห้ง จำนวน dilution ละ 2 plate
- เตรียม dilution ของเชื้อที่ต้องการ
- ทำการ pipette เชื้อตัวอย่าง 0.1 ml (หรือตามที่กำหนดของแต่ละวิธีทดสอบ) เชื้อลงผิวหน้าของ agar

- ใช้ triangle loop เกลี่ยเชื้อ (spread) ให้ทั่วบริเวณผิวหน้า agar โดยหมุนจานเพาะเชื้อไปรอบๆจนเชื้อตัวอย่างซึมลงไป ใน agar นำเข้าปั๊มเพาะเชื้อตามอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยคว่ำ plate ลง



ภาพที่ 13 การแยกเชื้อด้วยวิธี dilution plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ช
เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้า



ภาพที่ 14 เชื้อรา SPT2-01 ที่แยกได้จากลูกแป้งอำเภอสันป่าตอง

ภาพที่ 15 เชื้อรา FA2-01 ที่แยกได้จากลูกแป้งอำเภอฝาง



ภาพที่ 17 เชื้อยีสต์ SP1-03 ที่แยกได้จากลูกแป้งอำเภอสันป่าตอง

ภาคผนวก ซ

วิธีการวัดขนาดของวงใส

วิธีการ

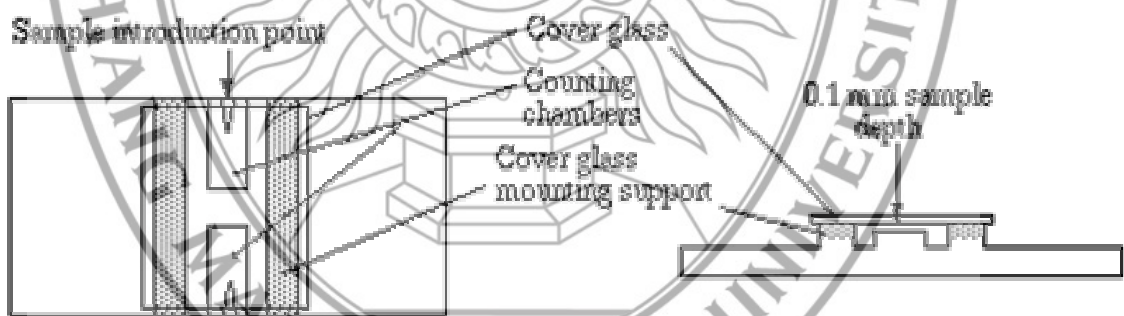
สังเกตขนาดของวงใส ในแต่ละ plate แล้ววัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางด้วยไม้บรรทัด โดยวัดจากขอบด้านหนึ่งไปยังขอบอีกด้านหนึ่ง ทำการวัด 2 ด้านแล้วหาค่าเฉลี่ยก็จะไดขนาดของวงใส



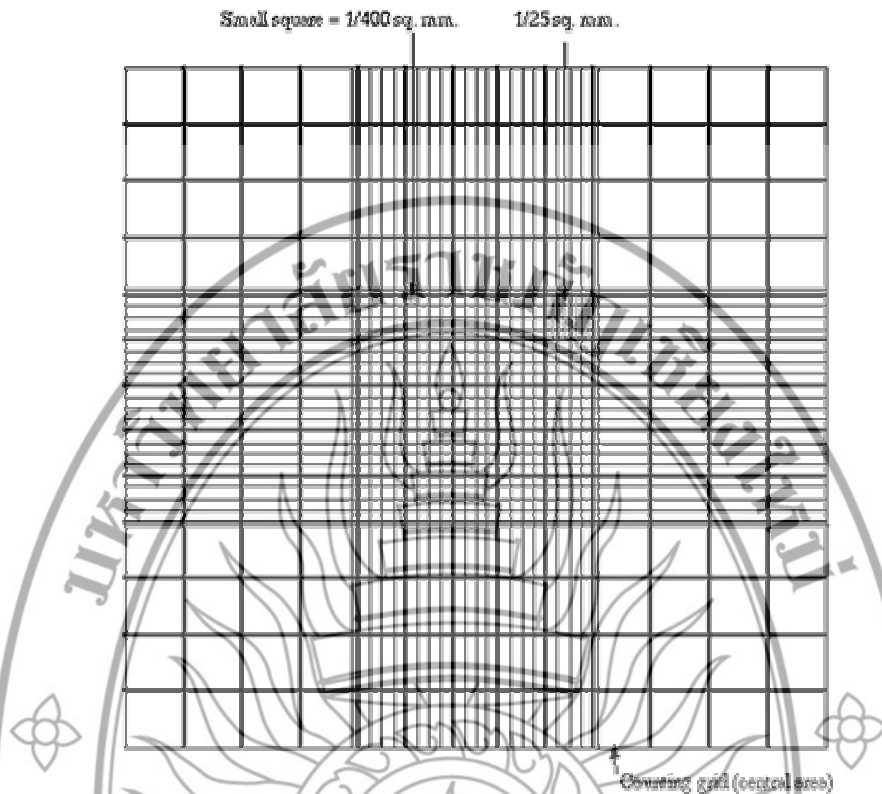
ภาคผนวก ก

การนับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemacytometer

Haemocytometer เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการนับเม็ดเลือด แต่นำมาประยุกต์ใช้ในการนับจำนวนเซลล์และสปอร์ของเชื้อรา เมื่อนำ haemocytometer มาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด compound microscope และให้ปรับโฟกัสลงบนช่องที่ทำไว้เป็นตาราง (gride lines) ด้วยกำลังขยายต่ำ พบว่า เป็นสไลด์ที่มีช่องแบ่งไว้แน่นอนและมีขอบยกสูงจากบริเวณขีด เวลาใช้ต้องปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่เฉพาะ ขอบของ chamber จะรองรับกระจกปิดสไลด์ไว้ทำให้เกิดระยะห่างจากกระจกสไลด์ในบริเวณที่มีขีดติดเป็นความลึกได้ 0.1 หรือ 0.2 มิลลิเมตร แล้วแต่บริษัทผู้ผลิต ขีดแบ่งที่กำหนดไว้จะประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ตรงกลางที่ประกอบด้วย 25 ช่องจัตุรัส แต่ละช่องมีขนาด 0.2×0.2 ตารางมิลลิเมตร และในแต่ละช่องนี้จะแบ่งเป็นช่องสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ อีก 16 ช่อง แต่ละช่องมีเนื้อที่ 0.05×0.05 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นของเหลวที่บรรจุอยู่ในแต่ละช่องสี่เหลี่ยมเล็ก ๆ นี้จะมีปริมาตร $= 0.05 \times 0.05 \times 0.1 = 0.00025$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร (ถ้า chamber มีความลึก 0.1 มิลลิเมตร) กระจกปิดสไลด์ที่ใช้มีความจำเพาะไม่ควรใช้กระจกปิดสไลด์อื่น เนื่องจากน้ำหนักของกระจกจะมีผลทำให้ปริมาตรภายในช่องระหว่างสไลด์ กับ chamber ผิดไป



ภาพที่ 18 แสดงลักษณะ chamber ของ hemacytometer ด้านข้างและด้านตรง



ภาพที่ 19 ตัวอย่างช่องสี่เหลี่ยมภายในสไลด์ บน hematocytometer

การคำนวณปริมาณจุลินทรีย์

รวมจำนวนที่นับได้จากแต่ละช่องเล็ก หารด้วยจำนวนช่องที่นับทั้งหมด จะได้ค่าเฉลี่ยของจำนวนจุลินทรีย์ต่อหนึ่งช่องเล็ก เช่นได้ X เซลล์ต่อช่อง คำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อหนึ่งมิลลิลิตรได้ ดังนี้

จุลินทรีย์ตัวอย่าง 0.00025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (ไมโครลิตร) มีจุลินทรีย์ = X เซลล์
(ปริมาตรของแต่ละช่องเล็ก)

$$\begin{aligned} \text{จุลินทรีย์ตัวอย่าง 1 มิลลิเมตร (1,000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร) มีจุลินทรีย์} &= \frac{(X) (10^3)}{0.00025} \text{ เซลล์} \\ &= 4(X) \times 10^6 \text{ เซลล์} \end{aligned}$$

เช่น นับเซลล์ทั้งหมด 10 ช่องเล็ก รวมได้ 50 เซลล์ หารด้วย 10 จะได้ ค่าเฉลี่ย = $50/10$
= 5 เซลล์ต่อช่องเล็ก

ดังนั้น ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์ = $4 \times 5 \times 10^6$ เซลล์ หรือ 2×10^7 เซลล์

ภาคผนวก ญ
วงใสการย่อยแป้ง



ภาพที่ 20 วงใสที่เกิดจากเอนไซม์ของเชื้อรามาย่อยแป้งบนอาหาร starch agar

ภาคผนวก ก
การวัดค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส
โดยวิธีของ Alli และคณะ. (1998)

ตารางที่ 17 ส่วนผสมของปฏิกิริยาในหลอดทดลอง

ปฏิกิริยา	สาร		
	crude enzyme	1% soluble starch	phosphate buffer
Blank	-	-	2 ml
Enzyme substrate	1 ml	1 ml	-
Enzyme control	1 ml	-	1 ml
Substrate control	-	1 ml	1 ml

นำส่วนผสมในตารางไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม DNS 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ในน้ำเย็น 15 นาที แล้วจึงเติมน้ำกลั่นอีกหลอดละ 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปหาปริมาณน้ำตาลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

การคำนวณหาปริมาณเอนไซม์อะไมเลส คิดเป็นมิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามหลักการของ International Union of Biochemistry (Teacher and Wood, 1982)

$$\begin{aligned}
 1 \text{ enzyme Unit} &= 1 \text{ ไมโครโมล ของสับสเตรตที่ถูกไฮโดรไลส์ 1 นาที} \\
 &= 1 \text{ ไมโครโมล ของกลูโคสที่ปล่อยออกมาใน 1 นาที} \\
 &= 0.180 \text{ มิลลิกรัมกลูโคสที่ปล่อยออกมาใน 1 นาที}
 \end{aligned}$$

ถ้า 0.180 มิลลิกรัมกลูโคสที่ปล่อยออกมาใน 1 นาที มีค่า 1 หน่วย

$$1.000 \text{ มิลลิกรัมกลูโคสที่ปล่อยออกมาใน 30 นาที มีค่า } \frac{1}{0.180 \times 30} \text{ หน่วย}$$

$$\text{ถ้าปลดปล่อยกลูโคส x มิลลิกรัม ใน 30 นาที มีค่า } (0.180)(x) \text{ หน่วย}$$

$$\text{จากการทดลองใช้เอนไซม์ 1 มิลลิลิตร} = \frac{(0.180)(\text{มิลลิกรัมกลูโคส})}{\text{มิลลิลิตรเอนไซม์}}$$

$$= \frac{(0.180)(\text{มิลลิกรัมกลูโคส})}{1}$$

ภาคผนวก ก
กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสตามวิธีของ Alli และคณะ (1998)

1. ปิเปตสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.0006M ปริมาตร 2-8 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองขนาดกลาง
2. เติมสารละลายกลูโคส 2M ปริมาตร 0.2-1 มิลลิลิตร
3. บ่มหลอดทดลองในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
4. นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ในน้ำเย็น 15 นาที
5. นำไปหาปริมาณน้ำตาลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า OD กับปริมาณกลูโคส

สารที่ใช้	หลอดที่					
	Blank	1	2	3	4	5
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.0006 M	2.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
สารละลายกลูโคส 2M	-	0.8	0.6	0.4	0.2	-
สารละลาย DNS (มล.)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
น้ำกลั่น (มล.)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0