รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กระทรวงอุตสาหกรรม มอก.252-2521 มาตรฐานอุตสาหกรรมน้ำซีอิ๊ว .15 หน้า.

กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์. 2541. ข้อมูลนำเข้าและส่งออกผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วในประเทศไทยปี พ.ศ.2539-2540 . 8 หน้า.

นภา โล่ห์ทอง. 2531. ซีอิ๊ว. วารสารวิทยาศาสตร์ .42(4):271-224.

นภา โล่ห์ทอง, พูนพิไล สุวรรณฤทธิ์ ,อมเรศ ภูมิรัตน, Timothy William Flegel. 2530. การพัฒนาอุตสาหกรรมการหมักซีอิ๊วในประเทศไทยโดยใช้กล้าสปอร์เชื้อรา. บทคัดย่อหนังสือรวมบทคัดย่อการประชุมวิชาการเรื่อง วิทยาศาสตร์เทคโนโลยีเพื่อการพัฒนาประเทศ ครั้งที่ 13-62.

เพ็ญศรี ศรีบุรี, ปราณี อ่านเปรื่อง .2536. เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเซลล์ห่อหุ้มแบบแคปซูลเล็กสำหรับการหมักน้ำซีอิ๊ว.อาหาร . 23(1) 22-34.

สมชาย ประภาวัต. 2532. คุณค่าทางอาหารของถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง. อาหาร 19(3):174-179.

สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์.2520.การศึกษาเชื้อบักเตรีในขบวนการหมักซีอิ๊ว.วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ยินดี ลุวีระ. 2535.ปริมาณโปรตีนในซีอิ๊ว.กองวิเคราะห์อาหารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์.38 หน้า.

วันชัย สมชิต .2527. ถั่วเหลืองและการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย.สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. 130 หน้า.

วารุณี ประดิษฐศรีกุล.2533.ซีอิ๊ว.เทคโนโลยี 11(2):10-13.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534.ซีอิ๊ว.โอเดียนสโตร์.190 หน้า.

อมเรศ ภูมิรัตน. 2535. การอภิปรายเรื่อง การประยุกต์เทคโนโลยีชีวภาพสู่อุตสาหกรรมอาหาร.รายงานการสัมมนาระดับชาติเรื่องเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มคุณค่าอุตสาหกรรมอาหารและโภชนาการ . จัดพิมพ์โดยสภาวิจัยแห่งชาติ หน้า 26-30

ภาษาอังกฤษ

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists ,edited by K.Helrich . Virginia :The Association Official Analytical Chemists,Inc.

Aunstrup,K .1979. Proteinases.IN Applied Biochemistry and Biotengineering. (L.B.,Wingard ed.) London:.Academic Press. p30-50.

Bhumiratana,A., Flegel,T.W.,Glinsukon,T.,Somporan, W.1980. Isolation and analysis of molds from soy sauce ***koji*** in Thailand .Appl.Environ.Microbiol.39(2):430-435

Chaloupka, J., Seuerin, A.I., Sastry,K.J., Kucerova, H., Stradova .1982.Differences in the regulation of exocellular proteinase synthesis during growth and sporogenesis of ***Bacillus megaterium*** .Can.J.Microbiol 28:1214-1218

Chin, J.T., Been ,H.C., 1992. Filtration of soy sauce by ceramic membrane. J. Food Sci. 57(3) :740-742

Delange,R.J.,Smith,E.L. 1968.Subtilisin Carlsberg I. Amino acid composition ; isolation and composition of peptides from the tryptic hydrolysate. J. Biol. Chem. 243(9) 2134-2142

Durham,D.R.,Stewart,D.B.,Stellwag,E.J. 1987.Novel alkaline and heat-stable serine protease from alkalophilic ***Bacillus*** sp. strain GX6638.J.Bacteriol.169(6)2762-2768

Hamada,T., Ishiyama, T., Motai,H., 1989. Continuous fermentation of soy sauce by immobilized cells of ***Zygosaccharomyces rouxii*** in air lift reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol . 31:346-350

Hardy, F., Vriend,G., Vaeltman,O.R.,van der Vinne,B., Venema, G., Eijsink, V.G.H. 1993. Stabilization of ***Bacillus stearothermophilus*** neutral protease by introduction of prolines. FEBS. LETT .317:89-92

Hesseltine,C.W. ,Wang , H.L.1967 .Traditional fermented foods . Biotech . Bioeng. 9:275-288

Horikoshi, K. 1971.Production of alkaline enzyme by alkalophilic microorganisms part I. Alkaline protease produced by ***Bacillus*** No.221 . Agric. Biol.Chem. 35:1407-1414

Impoolsup, A., Bhumiratana, A.,Flegel,T.W.1981.Isolation of alkaline and nuutral proteases from *Aspergillus flavus* var *columnaris*, a soy sauce *Koji* mold. Appl. Environ. Microbiol. 42:619-621

Kakudo, S., Kikuchi, N., Kitadokoro, K., Fujiwara, T., Nakamura, E., Okamoto, H., Shin, M., Tamaki, M., Teraoka, H., Tsuzuki, H., Yoshida, N., 1992. Purification, characterization, cloning and expression of a glutamic acid-specific protease from *Bacillus licheniformis* ATCC 14580. J. Biol. Chem . 25:23782-23788

Kalayanamitr,A., Bhumiratana, A., Flegel, T.W., Glinsukon, T., Shinmyo, A. 1987. Occurrence of toxicity among protease, amylase, and color mutants of a nontoxic soy sauce *Koji* mold.Appl.Environ.Microbiol.53(8):1980-1982

Kelebina, T.S., Rudenskaya, G.N., Selyakh, I.O., Khodova, O.M., Chestukhin, G.G., Stepanov, V.M.,Kulaev,I.S. 1988. Serine protease from *Bacillus brevis*: lytic action on intact yeast cells.Appl.Microbiol.Biotechnol.28:531-536

Keay, L.,Wildi, B.S. 1970.Protease of the genus *Bacillus*. I Neutral protease. Biotech.Bioeng. 12:179-212

Khan, M.T., Roufogalis, B.D. 1994. Understanding the role of proteinases through an enzyme complex,the multicatalytic proteinase (MCP).Biochem Ed.22(3):114-120

Kobayashi, K., Hakamada, J.,Koike,K., Ito,S.1996.Purification of alkaline proteases from a *Bacillus* strain and their possible inter-relationship. App.Microbiol Biotechnol .45:67-71

Lebumfacil-Davide,C.S. 1967. Corn and sorghum as possible substitutes for wheat in soy sauce production. Philippine Agriculturist 50:843-860

Leethochawalit ,S. ,Chansa-ngavej, K.1997. Selection of halophilic bacterial protease for use in lab-scale high-protein soy sauce fermentation. Proceedings of Chulalongkorn University 80th Anniversary Research Conference. p 707-715.

Manachini,P.L.,Fortina,M.G.,Parini,C.1988 . Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* a new species of *Bacillus*. Appl.Microbiol.Biotechnal.28:409-413

Matsubara,H.,Kasper,C.B.,Brown,D.M.,Smith,E.L. 1965 .Subtilisin BPN'I. Physical properties and amino acid composition .J.Biol.Chem. 240(3)1125-1134

McConn, J.D., Tsuru, D., Yasunobu, K.T. 1964. ***Bacillus subtilis*** neutral protease I. A zinc enzyme of high specific activity. J. Biol. Chem. 239:3706-3715

Mongkolwai, T., Boonyard, C., Bhumiratana, A. 1997. Development and transfer of solid substrate fermentation technology for small and medium size soy sauce factories in Thailand. Abstracts book.p.76 The 9th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology & The 2nd JSPS-NRCT-DOST-LIPI-VCC Seminar,November 19-22 ,1997 Nakhon Ratchasima ,Thailand.

Norberg, P., Hofsten, D.V.,1969. Proteolytic enzyme from extremely halophilic bacteria. J. Gen. Microbiol. 55:251-256

Ohta,U.,1967. Thermostable protease from thermophilic bacteria I. Studies on the stability of the protease .J.Bacteriol 242(3) 509-513

Ok, T., Matsukura,T.,Ooshiro,Z.,Hayashi, S., Itakura,T.,1982 Protease formation by halophilic bacteria .Nippon Shokukin Kogyo Gakkialshi 29:618-622

Osaki, K., Okamoto, Y., Akao,T., Nagata,S., Takamatsu,H. 1985. Fermentation of soya sauce with immobilized whole cells. J. Food. Sci. 50:1289-1292

Rahman,R.N.Z.A.,Razak,C.N.,Ampon,K.,Basri,M.,Yunus,W.Z.W.,Salleh,A.B.1994. Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from ***Bacillus stearothermophilus*** F1.Appl.Microbiol.Biotechnol 40:822-827

Roitsch, C.A., Hageman, J.H. 1983. Bacillopeptidase F: two forms of a glycoprotein serine protease from ***Bacillus subtilis*** 168. J.Bacteriol. 155:145-152

Seenappa, M.,Kempton, A.G. 1981. A simple key for the identification of ***Bacillus*** species common in food.J. Foods. Sci. Tech. 18:131-132

Sharf, J.M. 1966. Fermented food. :Recommended methods for the microbiological examination of foods, pp84. New York : American Public Health Association Inc.

Sidler,W.,Zuber,H. 1980 Isolation procedures for thermostable neutral proteinase produced by ***Bacillus stearothermophilus*** .European.J.Appl.Microbiol.10:197-209

Snearth,P.H.A.Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology,Volume2, 1st ed., Baltimore : William and Wilkins Co.

Sukthavorn,T. 1996. Role of lactic acid bacteria in soy sauce fermentation .M.Sc. Thesis, Mahidol University

Takami,H.,Akiba,T.,Horikoshi,K. 1989. Production of extremely thermostable alkaline protease from ***Bacillus*** sp.AH101. Appl.Microbiol.Biotechnol 30:120-124

Takekawa,S.,Uozumi,N.,Tsukagoshi,N.,Udaka,S.1991.Protease involved in generation of β- and α - amylases from a large amylase precursor in ***Bacillus polymyxa*** .J.Bacteriol . 173(21)6820-6825

Takii, Y., Kuriyama, N., Suzuki, Y. 1990. Alkaline serine protease produced from citric acid by ***Bacillus alcalophilus*** subsp. ***Halodurans*** KP1239. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34:57-62

Tatsumi,H., Ohsawa, M., Tsuji, R.F., Murakami, S., Nakano, E., Motai, H., Masaki, A., Ishida, Y., Murami, K. 1988. Cloning and sequencing of the alkaline protease cDNA from A***spergillus oryzae***. Agric.Biol.Chem. 52(7):1887-1888

Thatcher,F.S.,Clark,D.S.,1973 Coliform bacteria, Microorganisms in foods : Their significance and methods of enumeration. pp.69-82. Toronto :University of Toronto.

Thatcher,F.S.,Clark,D.S.,1973 Staphylococci , Microorganisms in foods : Their significance and methods of enumeration, pp.115-123. Toronto :University of Toronto.

Ueki, T., Noda, Y., Teramoto, Y., Ohba, R., Ueda, S., 1994. Practical soy sauce production using a mixed *Koji*-making system. J. Ferment. Bioeng.78(3)262-264

Uehara,H.,Yamane,K.,,Maruo,B.,1979.Thermosensitive,extracellular neutral protease in ***Bacillus subtilis***: Isolation,characterization and genetics .J. Bacteriol. 139(2)583-590

Ushijima, S., NaKadai, T., Ushida, K. 1987.Improvement of enzyme productivities through mutation or haploidization of heterozygous diploids obtained by protoplast-fusion of ***Aspergillus sojae***. Agric.Biol.Chem.51(10):2781-2786

Vansantha,N.,Thompson,L.D.,Rhodes,C.,Banner,C.,Nagle,J.Filpula,D. 1984.Genes for alkaline protease and neutral protease from ***Bacillus amyloliquefaciens*** contain a a

large open reading frame between the regions coding for signal sequence and mature protein.J.Bacteriol.159(3)811-819

Watts, B.M.,Ylimaki,G.L, Jeffery,L.E.,Elias,L.G.1989. Basic sensory methods for food evaluation.p.66-78. Ottawa:International Development Resarch Center. p66-69

Wu.,X.C., Lee,W.,Tran,L., Wong,S.L., 1991. Engineering a ***Bacillus subtilis*** expression - secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases .J.Bacteriol.173 (16) 4952-4958

Xu,Y.1990. Aduance in the soy sauce industry in China.J.Ferment.Bioeng.70(6):434-439.

Yokotsuka, T. 1960. Aroma and flavor of Japanese soy sauce.Adv. Food. Res. 10:75-134

Yokotsuka,T.1986.Soy sauce Biochemistry.Adv Food Res.30:195-329

Yong, F.M.,Wood,B.J.B. 1974.Microbiology and biochemistry of soy sauce fermentation. Adv. Appl. Microbiol .17:157-194

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. TRYPTIC SOY BROTH ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปของ Difco ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

Bacto Tryptone	17.0	กรัม
Bacto soytone	3.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
K_2HPO_4	2.5	กรัม
น้ำกรอง	1.0	ลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 $^{\circ}$ ซ เป็นเวลา 15 นาที

2. TRYPTIC SOY AGAR

Tryptic Soy Broth	1.0	ลิตร
Bacto agar	15.0	กรัม

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. มีเดียม 73 (Norberg & Hofsten ,1969)

Yeast extract	1.0	กรัม
Gelatin (Difco)	10.0	กรัม

$MgSO_4.7H_2O$	10.0	กรัม
KCl	5.0	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.2	กรัม
NaCl	ตามต้องการ	
น้ำกรอง	1.0	ลิตร

ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้พีเอช 6.0,7.0,8.0 หรือ 9.0 ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำต้มทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารแข็งมีเดียม 73

อาหารเหลวมีเดียม 73	1.1	ลิตร
ผงวุ้น	15.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำต้ม ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างให้ได้ค่าพีเอช 6.0,7.0,8.0 หรือ 9.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121ที่อุณหภูมิ องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. PHENOL RED BROTH BASE

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco ซึ่งประกอบด้วย

Bacto beef extract	1.0	กรัม
proteose peptone	10.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
phenol red	0.018	กรัม

โดยชั่งผงอาหารสำเร็จรูปมา 16 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร สำหรับบางเชื้อที่ต้องเพิ่มเกลือเติมโซเดียมคลอไรด์ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ ปรับระดับความเป็นกรดด่าง

ที่ 7.4 หลังจากนั้นเติม 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลที่ต้องการทดสอบ นึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำมาแช่น้ำเย็นทันทีเพื่อป้องกันน้ำตาลแตกตัว

6. SIMMONS CITRATE AGAR

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco ซึ่งประกอบด้วย

$NH_4H_2PO_4$	1.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Na-citrate	2.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Bacto agar	15.0	กรัม

โดยชั่งผงอาหารสำเร็จรูป 24.2 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ปรับระดับความเป็นกรดด่างให้ได้เท่ากับ 6.9 นึ่งฆ่าเชื้อตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว

7. อาหารทดสอบการย่อยเจลาติน

ใช้ Nutrient broth ของ Difco ซึ่งประกอบด้วย

Bacto beef extract	3.0	กรัม
Bacto peptone	5.0	กรัม

ละลายผงอาหารสำเร็จรูป 56.7 กรัมต่อน้ำกรอง 1 ลิตร ผสมกับเจลาติน 10.0 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อตามวิธีที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

8. อาหารทดสอบการใช้แป้ง

ใช้ Nutrient broth สำเร็จรูปของ Difco ตามสูตรในข้อ 7. ละลาย ผงอาหารสำเร็จรูป 56.7 กรัมในน้ำกรอง 1 ลิตร ผสมกับ soluble starch 10.0 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว

9. อาหารสูตร MR-VP

ใช้อาหารสำเร็จรูปจาก Difco มีส่วนประกอบดังนี้

Buffered peptone	7.0	กรัม
K_2HPO_4	5.0	กรัม
Bacto dextrose	5.0	กรัม

ชั่งผงอาหารสำเร็จรูป 17.0 กรัม ละลายในน้ำกรอง 1 ลิตร ปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.9 นึ่งฆ่าเชื้อโดยวิธีที่กล่าวมาแล้ว

10. EGG-YOLK AZIDE AGAR

Bacto beef extract	55.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
NaCl	3.0	กรัม
$Na_2(HPO_4)$	0.2	กรัม
Bacto agar	15.0	กรัม
Sodium azide	0.15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดยกเว้น Sodium azide ในน้ำกรอง 1 ลิตร ปรับพีเอช ให้ได้7.6 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นและเติม Sodium azide กวนให้ละลาย นำไปฆ่าเชื้อโดยวิธีที่กล่าวมาแล้วทิ้งให้เย็นถึงอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย egg-yolk saline solution 15 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

การเตรียม egg-yolk saline solution โดยนำไข่ไก่ 1 ฟองมาฆ่าเชื้อบริเวณเปลือกไข่ โดยแช่ใน 95 เปอร์เซ็นต์เอธานอล เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นแยกไข่ขาวออกโดยวิธีปลอดเชื้อ นำไข่แดงที่ได้ใส่ลงในกระบอกตวงวัดปริมาตรและเติมน้ำเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในปริมาตรเท่ากับปริมาตรของไข่แดง

11. MACCONKEY BROTH

ใช้อาหารสำเร็จรูปของ Difco ที่มีส่วนประกอบดังนี้

Bacto peptone	17.0	กรัม
Proteose peptone	3.1	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Bile salts	1.5	กรัม
Brom cresol purple	0.1	กรัม

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 3.5 กรัมต่อลิตรละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกรอง 1ลิตร ต้มจนกระทั่งสารละลายหมด ทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชให้ได้ 7.6 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดดักก๊าซ(durham tube) ลงไปในหลอดทดลองและนำไปฆ่าเชื้อโดยวิธีที่กล่าวมาแล้ว

12.POTATO DEXTROSE AGAR

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม

หั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มจนสุกมันฝรั่งนิ่ม กรองผ่าผ้าขาวบาง เติมน้ำจนปริมาตรครบ 1 ลิตร เติมเดกโตรสและวุ้นผง ฆ่าเชื้อโดยวิธีที่กล่าวมาแล้ว

13. ตารางการตกตะกอนเอนไซม์โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ของสารละลาย ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

Final concentration of ammonium sulfate (% saturation at 0°C)

Initial concentration of ammonium sulfate (% saturation at 0°C)	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	solid ammonium sulfate to add to 100 ml of solution																
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
35				0	2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3
40					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8
45						0	2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3
50							0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.8	30.8	34.8
55								0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3	31.3
60									0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.9	27.9
65										0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4
70											0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9
75												0	3.2	6.6	10.1	13.7	17.4
80													0	3.3	6.7	10.3	13.9
85														0	3.4	6.8	10.5
90															0	3.4	7.0
95																0	3.5
100																	0

Note: The pH of the solution may decrease significantly on addition of ammonium sulfate.

ภาคผนวก ข

สีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลาย 0.1 โมลาร์อะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0

โซเดียมอะซิเตต	8.203	กรัม
น้ำกลั่น	900.0	ลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 6.0 ด้วย กรดอะซิติค จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตรในขวดมาตรฐานสำหรับปรับปริมาตร

2.สารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0

สารละลาย ก : $NaH_2PO_4.2H_2O$ 27.6 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

สารละลาย ข : $Na_2HPO_4.7H_2O$ 28.4 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ผสมสารละลาย ก. 390 มิลลิลิตร สารละลาย ข. 610 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำกลั่น ให้ครบ 1000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

3.สารละลาย 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8

ใช้สารละลาย ก และสารละลาย ข จากข้อ 2 โดยปิเปตต์สารละลาย ก 53 มิลลิลิตร สารละลาย ข 957 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

4. สารละลาย 0.1 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 9.0

ทริสมา-เบส (trisma-base)	12.11	กรัม
น้ำกลั่น	900	ลิตร

ปรับ พีเอชให้เป็น 9.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ในขวดมาตรฐานสำหรับปรับปริมาตร

5. สารละลาย 0.4 โมลาร์ไตรคลอโรอะซิติค

กรดไตรคลอโรอะซิติค	65.356	กรัม
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

ละลายไตรคลอโรอะซิติคในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตรเทใส่ในขวดมาตรฐานสำหรับปรับปริมาตรปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดสีชา

6.สารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณไทโรซีน

6.1สารละลาย 0.4 โมลาร์โซเดียมคาร์บอเนต(Na_2CO_3)

โซเดียมคาร์บอเนต	42.396	กรัม
น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคาร์บอเนตในน้ำ 900 มิลลิลิตร เทใส่ขวดมาตรฐานสำหรับปรับปริมาตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

6.2สารละลาย Folin-Ciocalteu' s Phenol reagent 1 ส่วนน้ำ 3 ส่วน

7. เคซีน 1.0 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0-20 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 โมลาร์ อะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 หรือ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 หรือ 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 8.0 หรือ 0.1 โมลาร์ ทริชบัฟเฟอร์ พีเอช 9.0หรือ 0.1 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0,5,10,15,20 กรัมละลายในบัฟเฟอร์ อย่างละ 90 มิลลิลิตรในบิกเกอร์ เทใส่ในขวดปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น และเติมเคซีน 1.0 กรัม กวนให้ละลายด้วยแท่งแม่เหล็ก

8. สารละลายทดสอบไนไตรท์ (Nitrite test solution)

สารละลาย ก		
salfanilic acid	0.8	กรัม
5 N acetic acid	100.0	มิลลิลิตร
สารละลาย ข		
α - naphthylamine	0.5	กรัม

5 N acetic acid	100.0	มิลลิลิตร

9. Gram'staining solution

9.1 Crystal violet solution

crystral violet	2.0	กรัม
ethanol	20.0	มิลลิลิตร
amoniumoxalate	0.8	กรัม
น้ำกรอง	80.0	มิลลิลิตร

ละลายคริสตอลไวโอเลตกับเอธิลแอลกอฮอล์ ส่วนแอมโมเนียมออกซาเลตละลายในน้ำหลังจากละลายหมดแล้วผสมสารละลายทั้งสองอย่างเข้าด้วยกัน เก็บไว้ 24 ชั่วโมงก่อนใช้

9.2 สารละลายไอโอดีน (Iodine solution)

Iodine	1.0	กรัม
KI	2.0	กรัม
น้ำกรอง	100.0	มิลลิลิตร

ผสมไอโอดีนและโปรแตสเซียมไอโอไดด์เข้าด้วยกัน ใช้ mortar บดให้เข้ากันค่อยๆเติมน้ำทีละน้อยจนสารละลายหมด เทใส่ขวดปรับปริมาตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

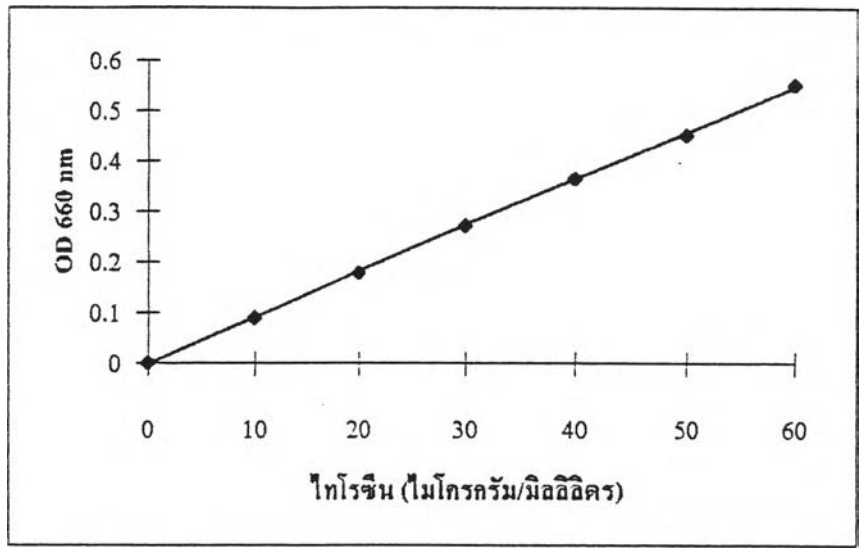
9.3 สารละลาย ซาฟรานิน โอ (Safranin O)

Safranin O	0.25	กรัม
ethanol	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกรอง	100.0	มิลลิลิตร

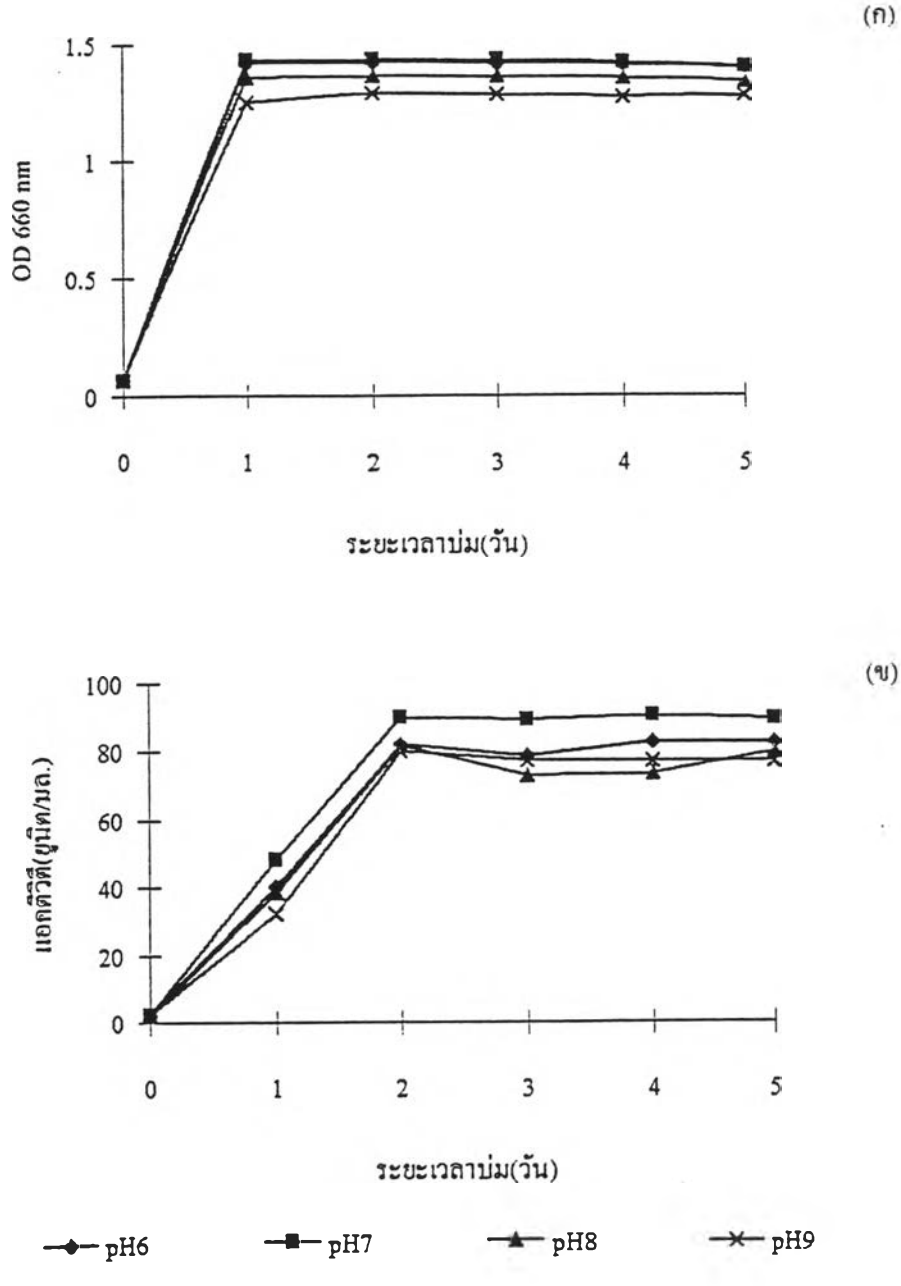
ละลายซาฟรานิน โอ ในเอธิลแอลกอฮอล์ เมื่อละลายหมดเทใส่ขวดปรับปริมาตร เติมน้ำกรองให้เป็น 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

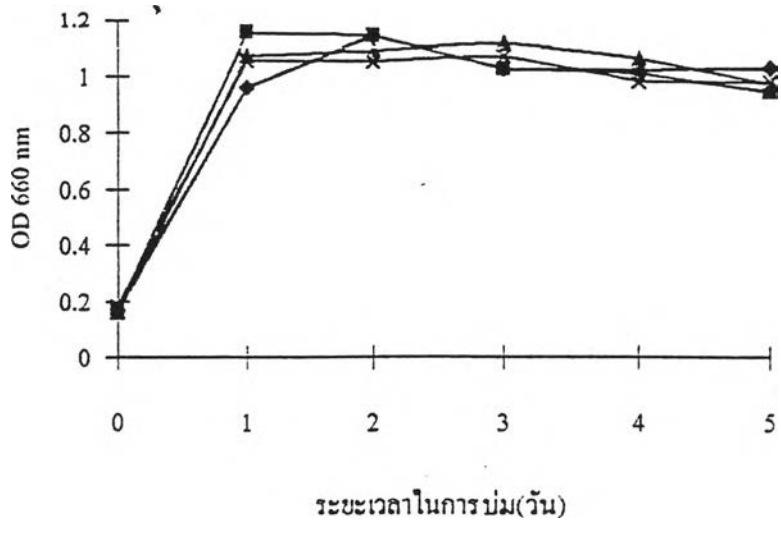


รูปที่ ภ1 กราฟมาตรฐานไทโรซีนแสดงความสัมพันธุระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรกับปริมาณไทโรซีนสำหรับตรวจโปรตีเอสแอคติวิตี

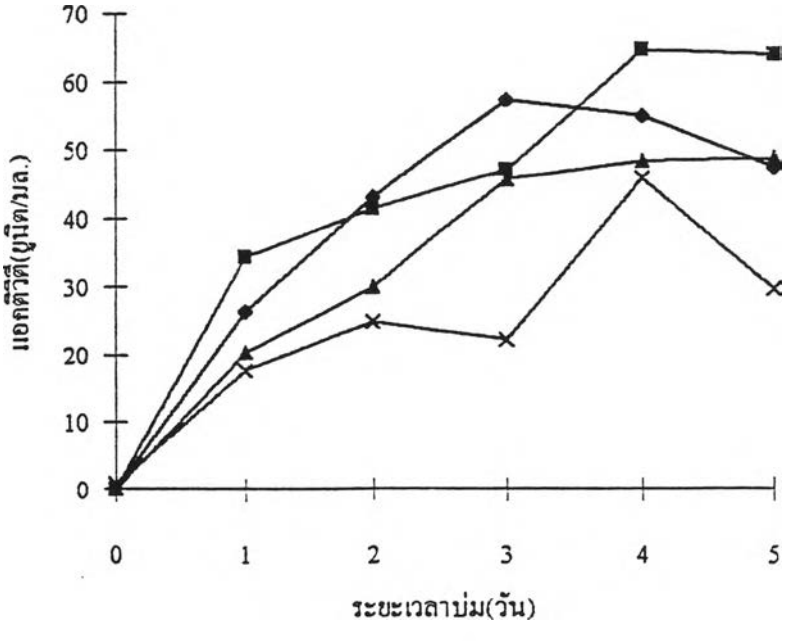


รูปที่ ภ2 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรติเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ B2 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

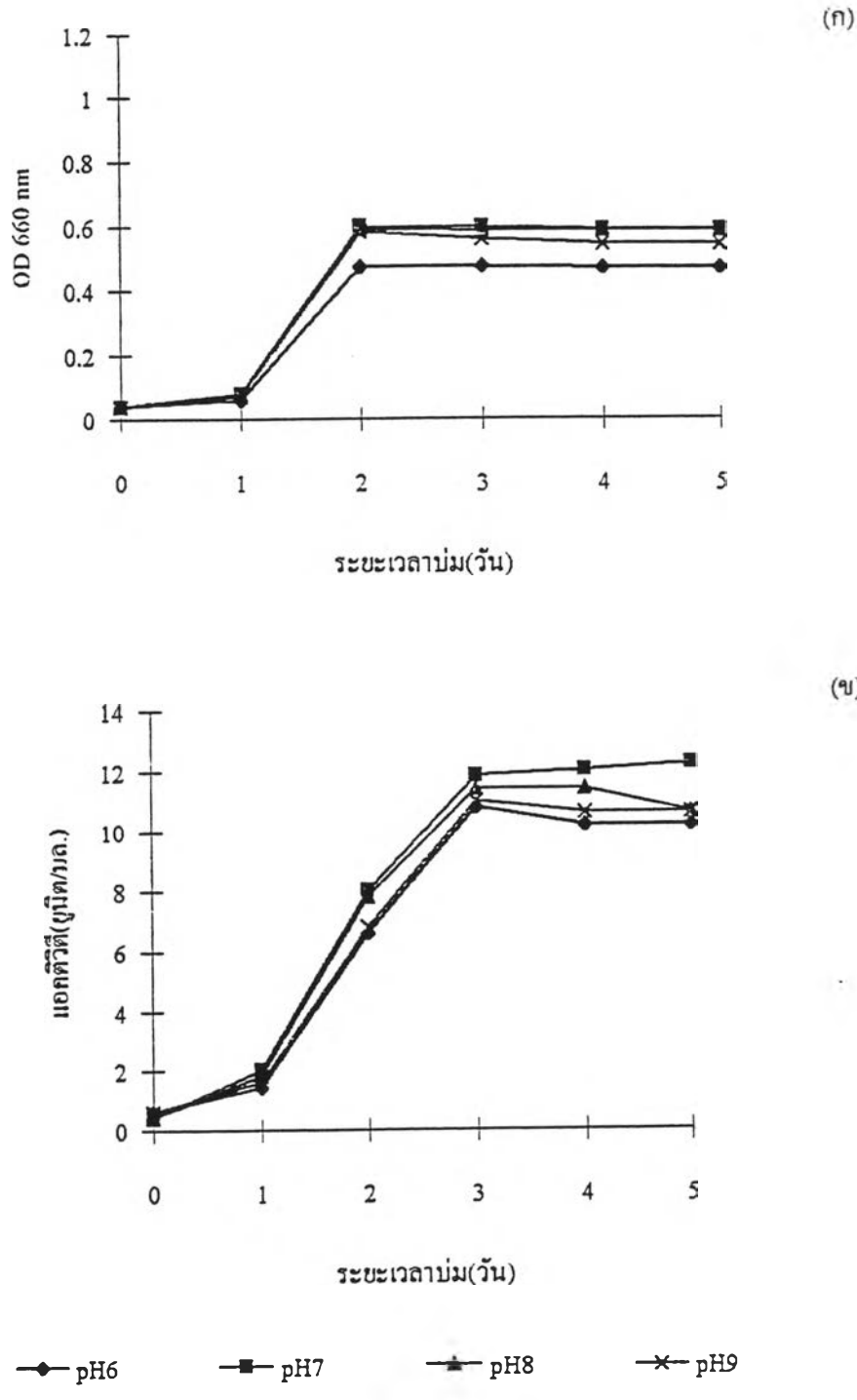
(ก)



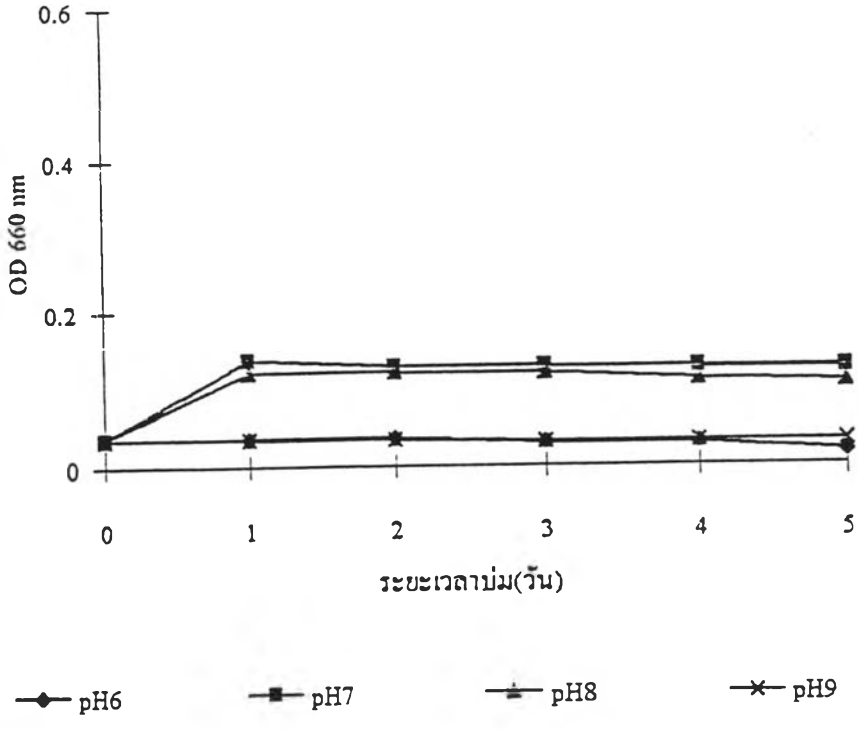
(ข)



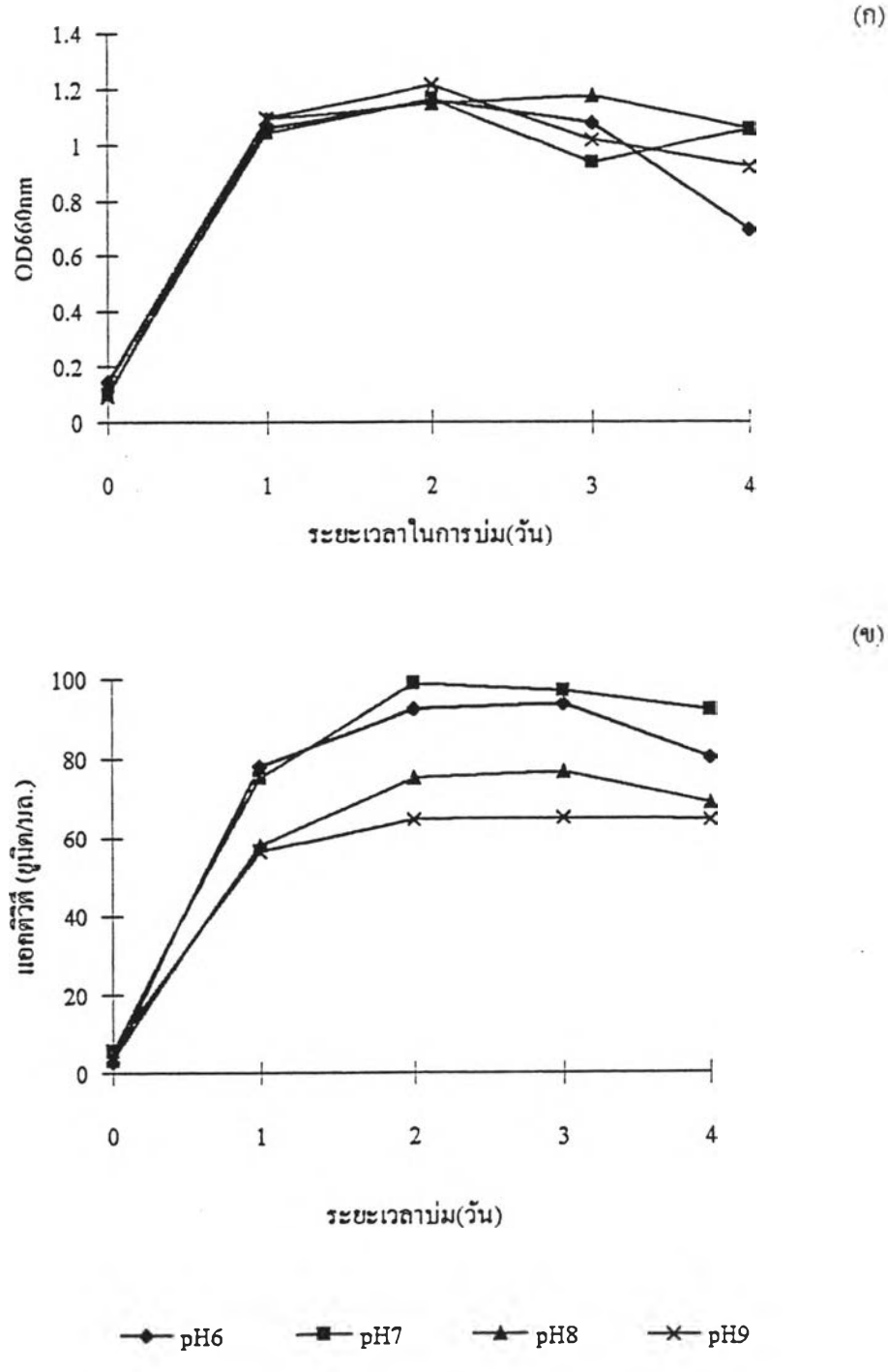
รูปที่ ภ3 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรติเอสแอคติวิตี (ข)*Bacillus* sp สายพันธุ์ WB3 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส



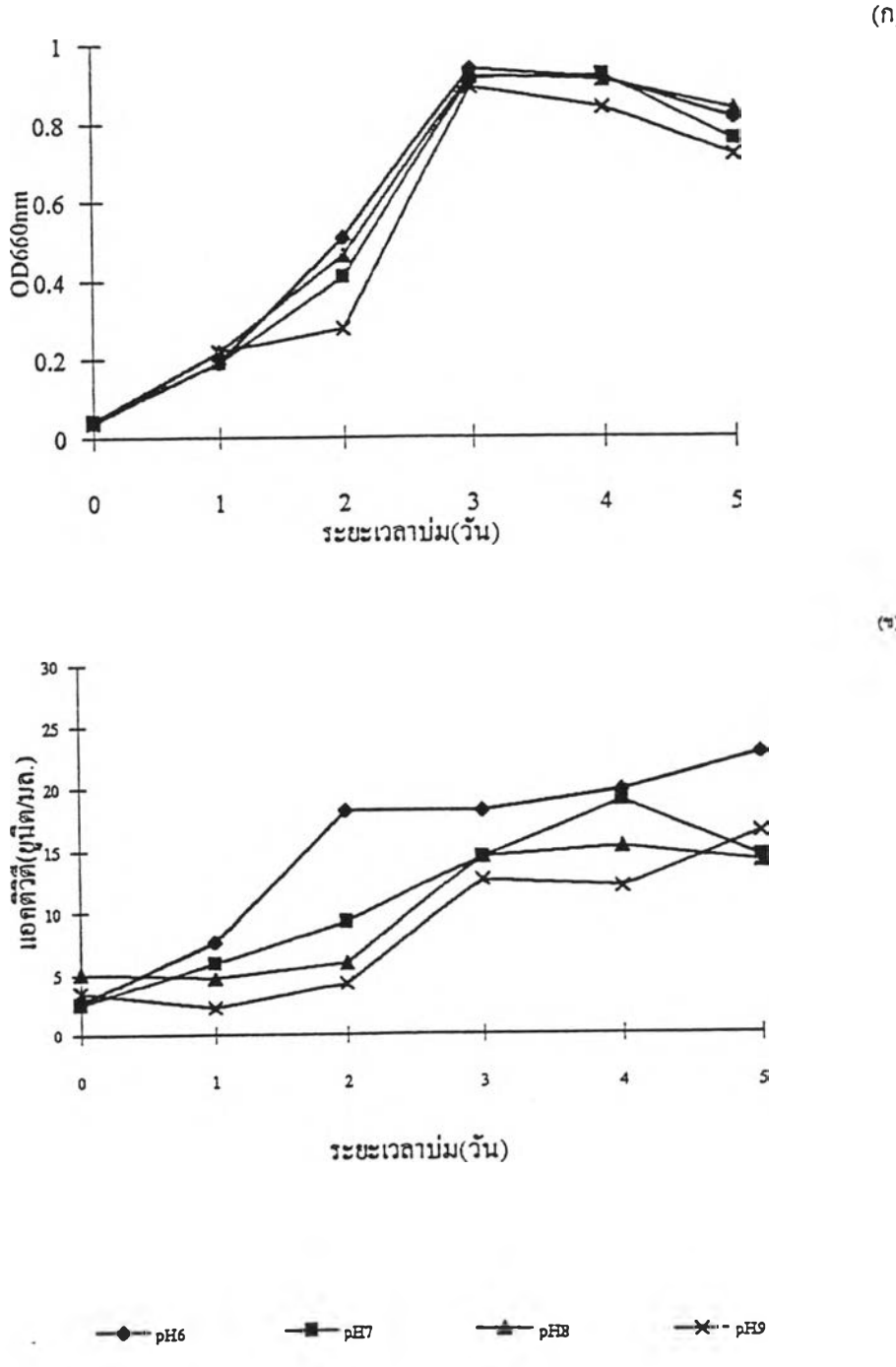
รูปที่ ภ4 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรดิเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ WB3 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 มี 5 % โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส



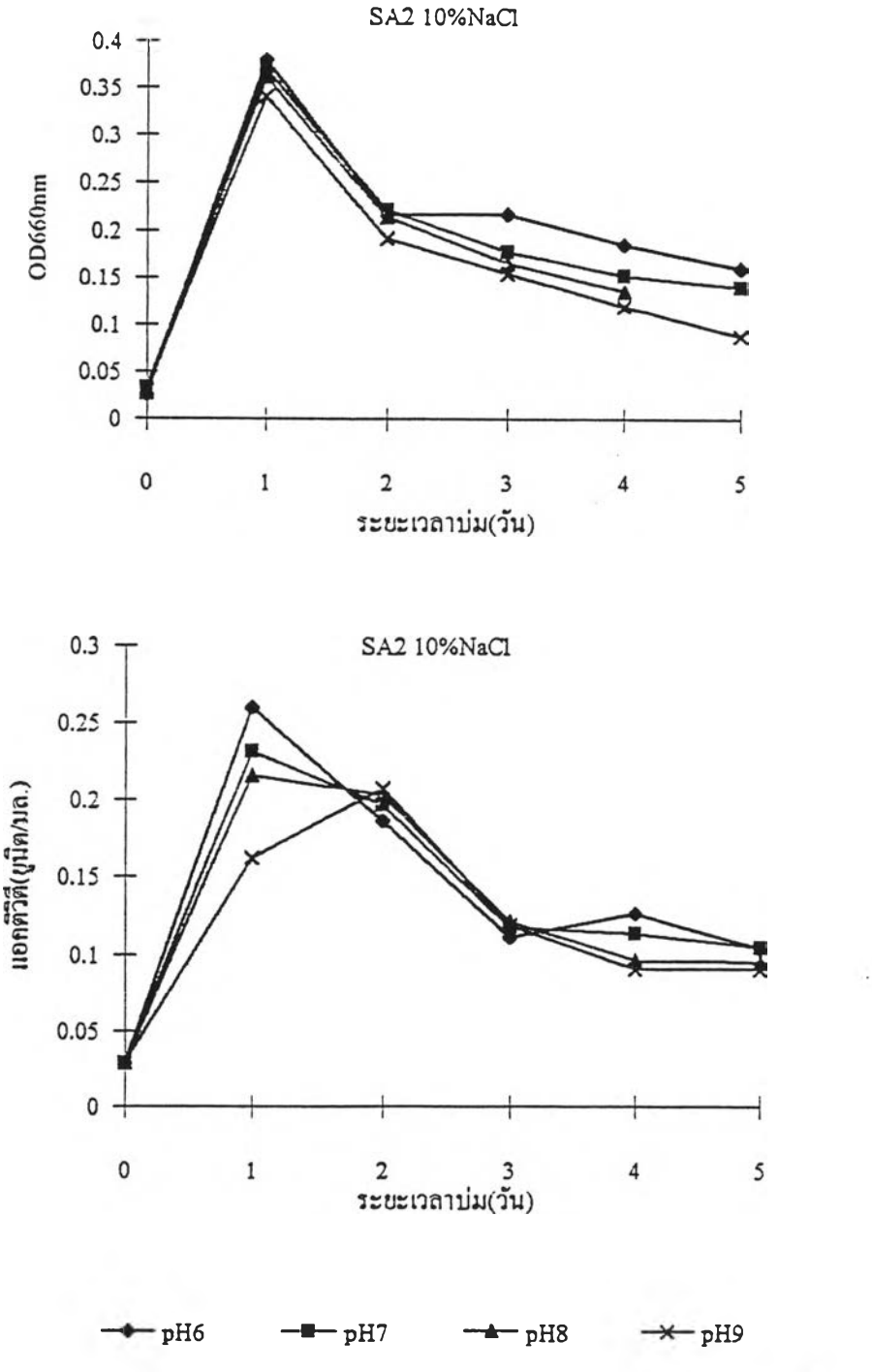
รูปที่ ภ5 การเพิ่มจำนวน (ก) *Bacillus* sp สายพันธุ์ WB3 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 มี 10 % โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส



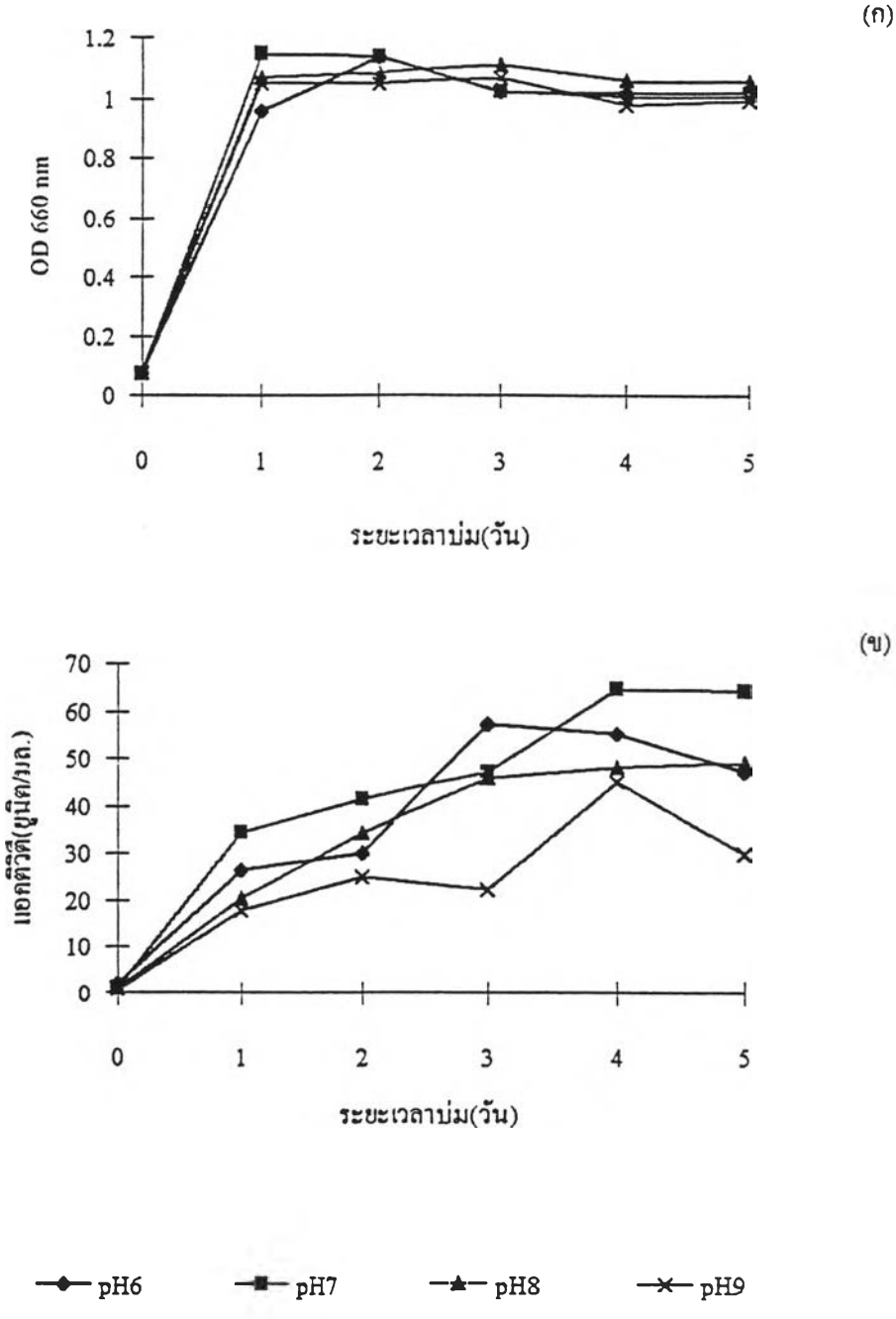
รูปที่ ภ6 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรติเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ SA2 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส



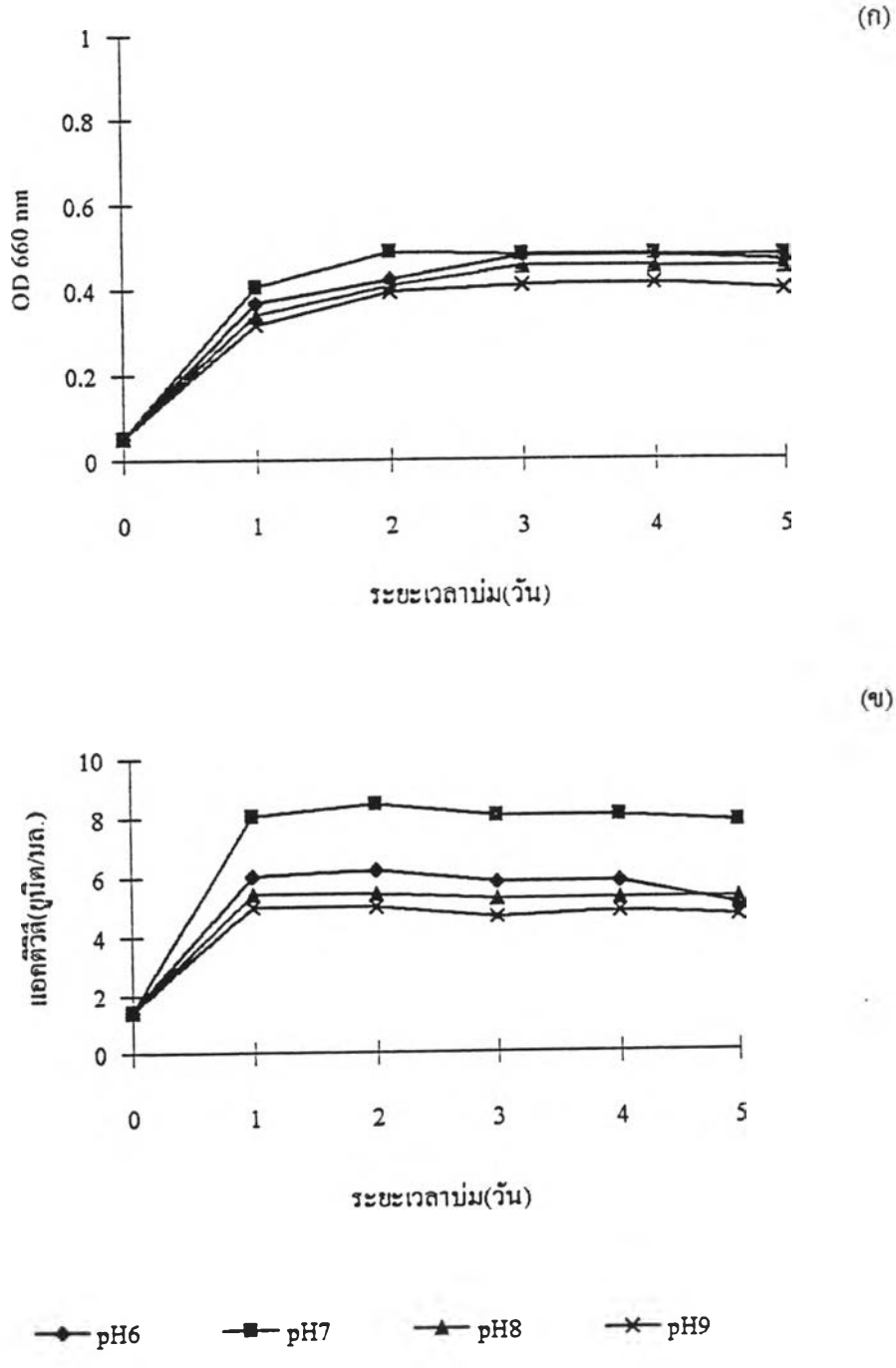
รูปที่ ภ7 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรติเอสแอคติวิตี (ข) ***Bacillus*** sp สายพันธุ์ SA2 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 มี 5 % โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส



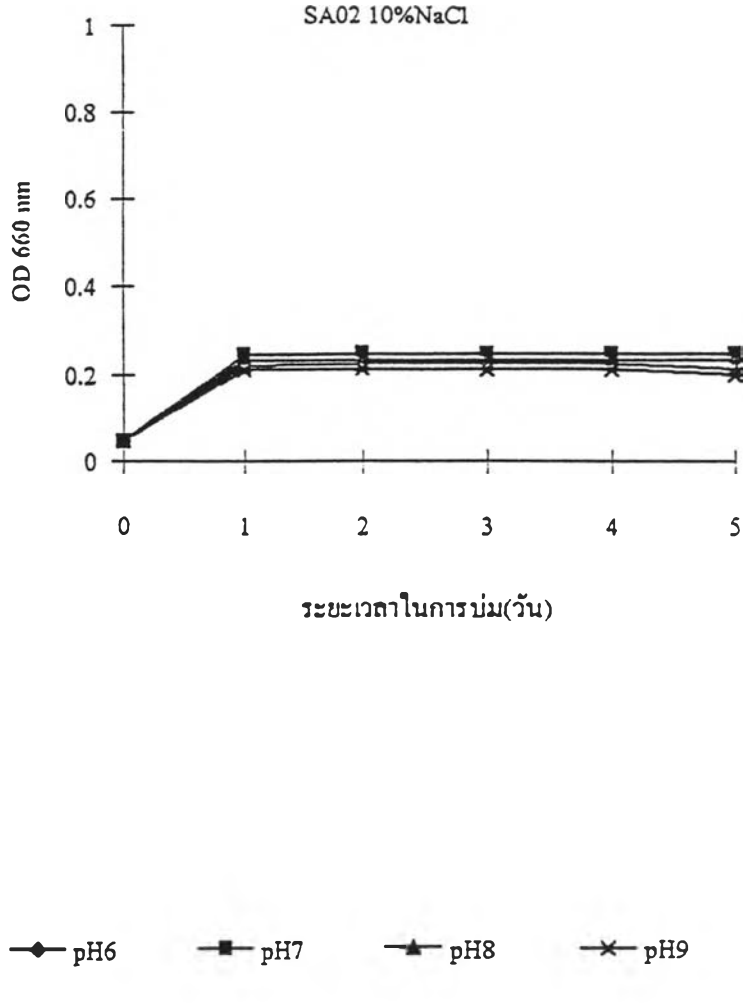
รูปที่ ภ8 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรติเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ SA2 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 มี 10 %โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส



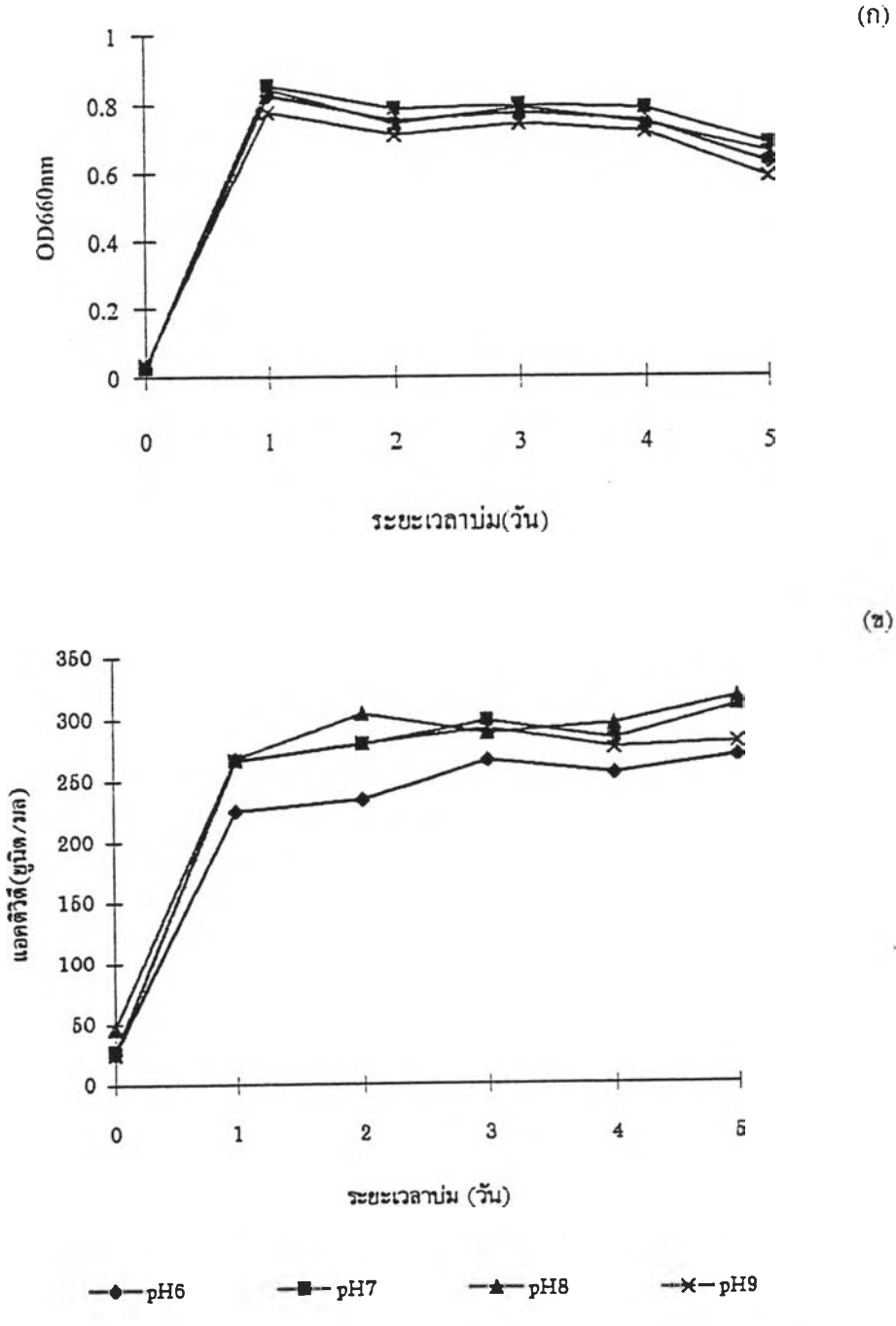
รูปที่ ภ9 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรติเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ SA02 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ ภ10 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรติเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ SA02 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 มี 5 %โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

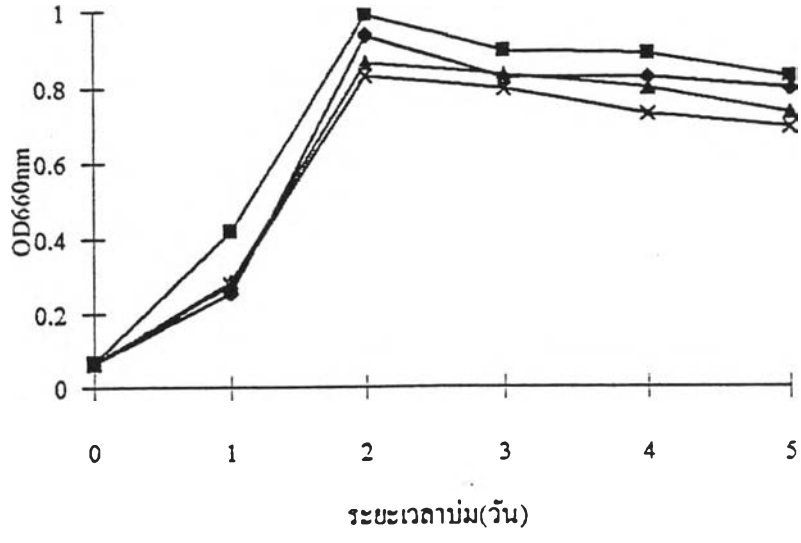


รูปที่ ภ11 การเพิ่มจำนวน (ก) *Bacillus* sp สายพันธุ์ SA02 เมื่อเลี้ยง
ในอาหารสูตรมีเดียม 73 มี 10 % โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่อง
เขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

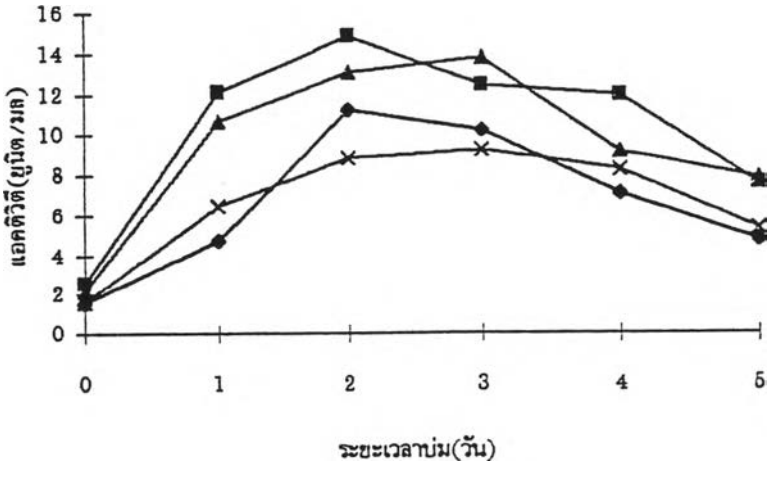


รูปที่ ภ12 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรติเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ K1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

(ก)

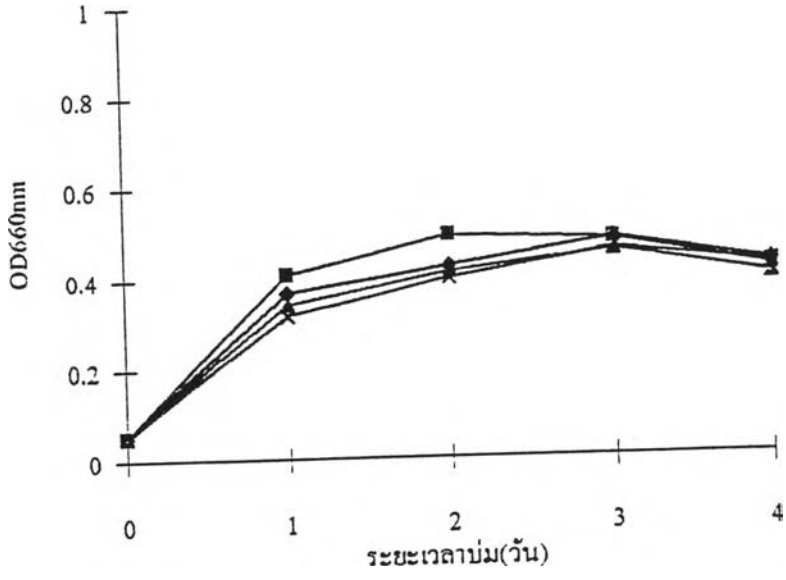


(ข)

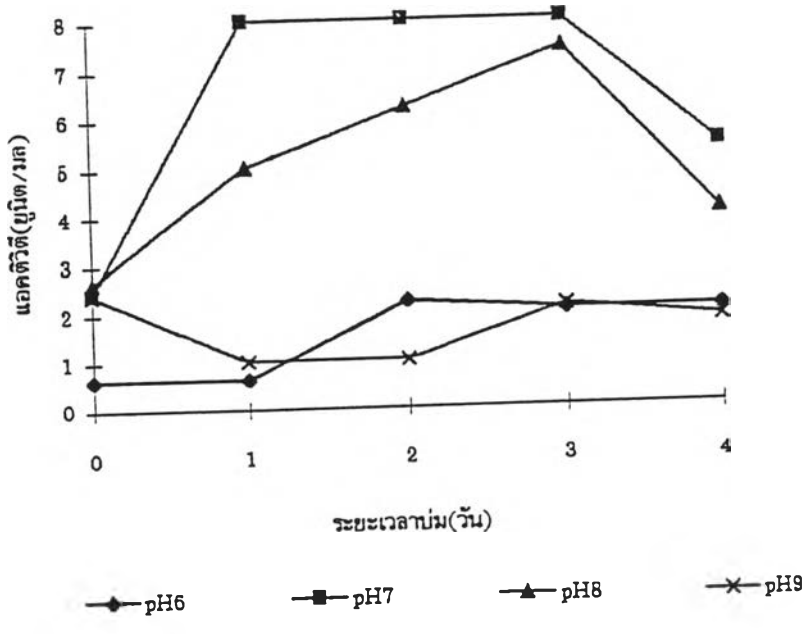


รูปที่ ภ13 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรตีเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ K1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 มี 5% โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

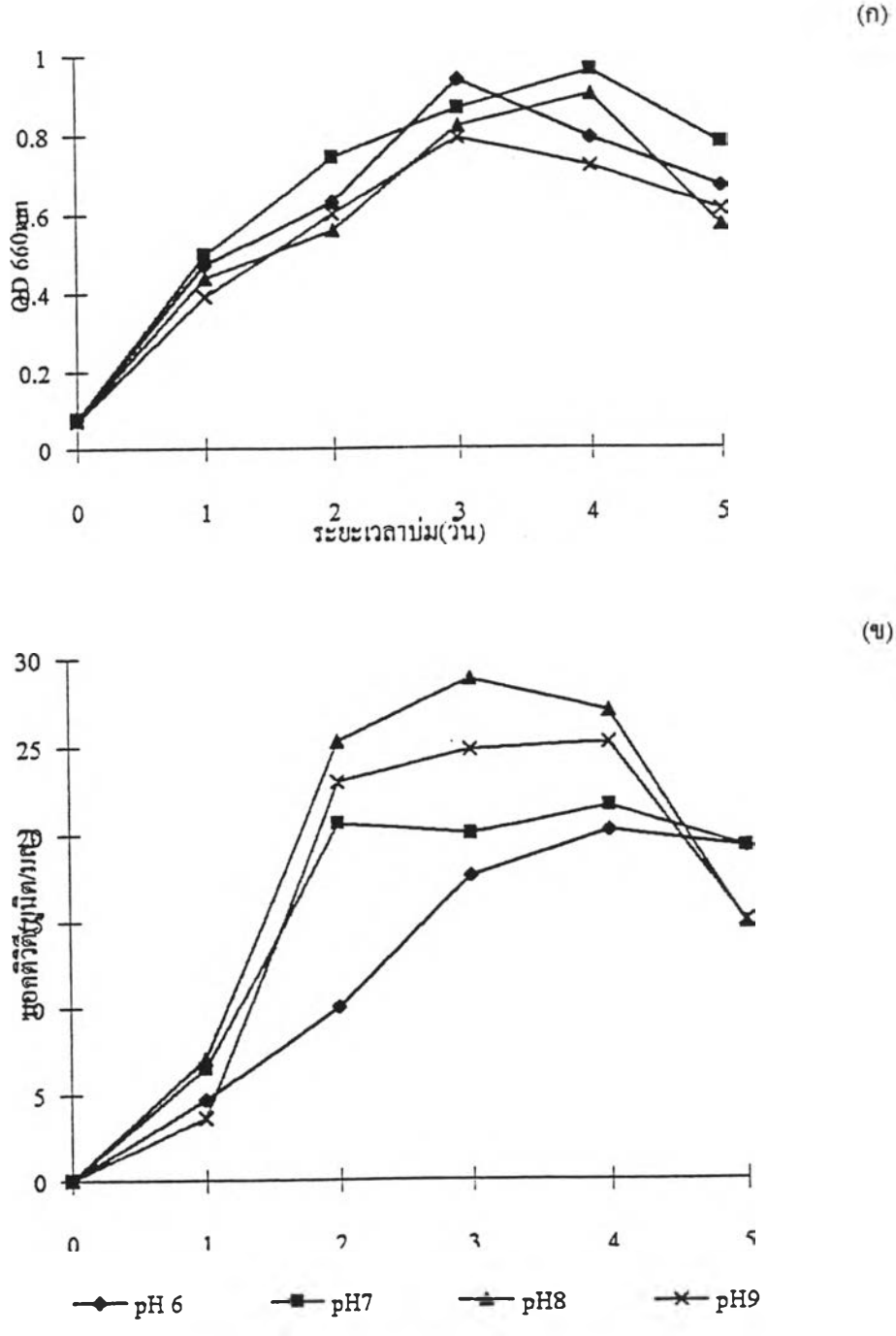
(ก)



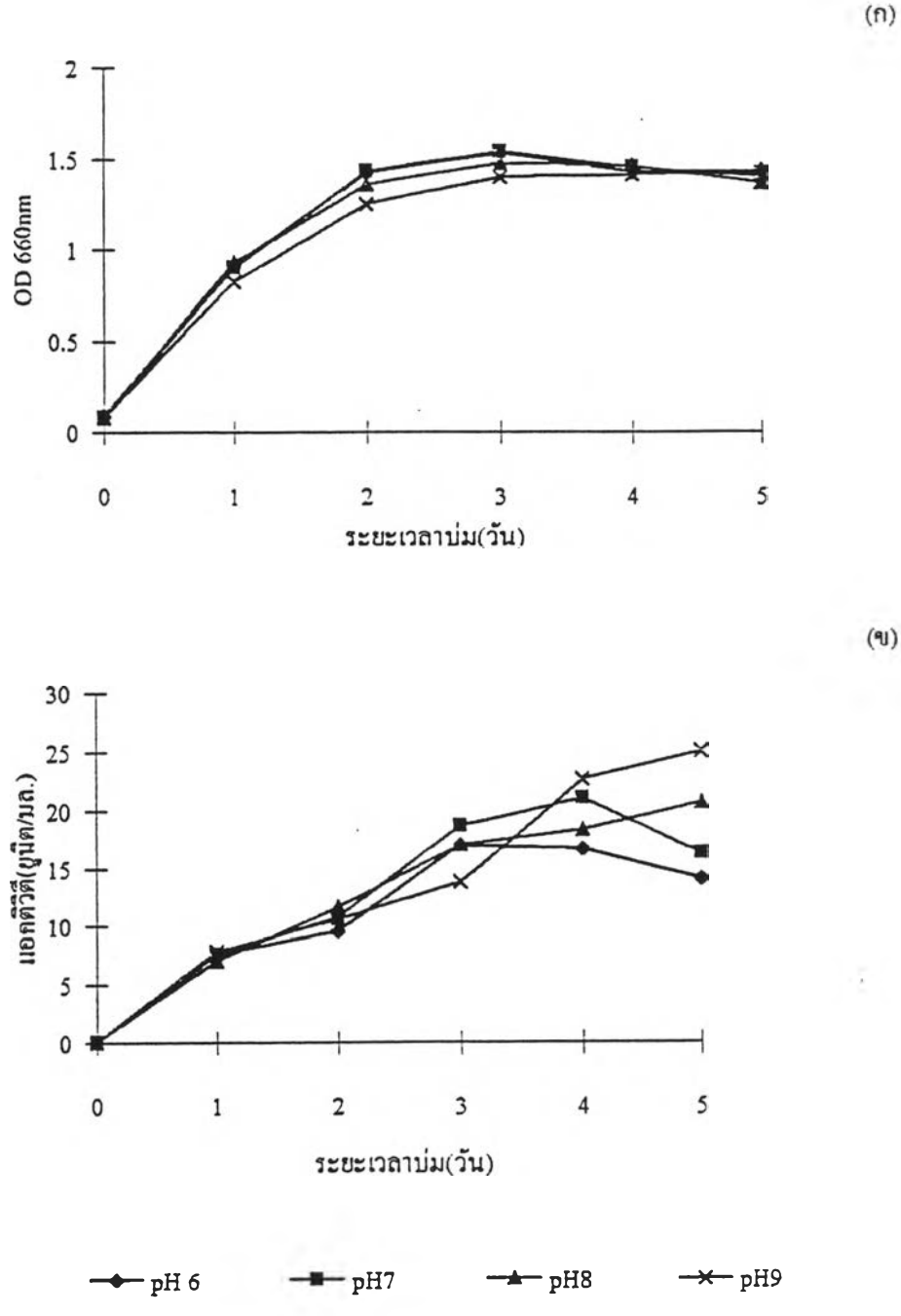
(ข)



รูปที่ ภ14 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรติเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ K1 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 มี 10% โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

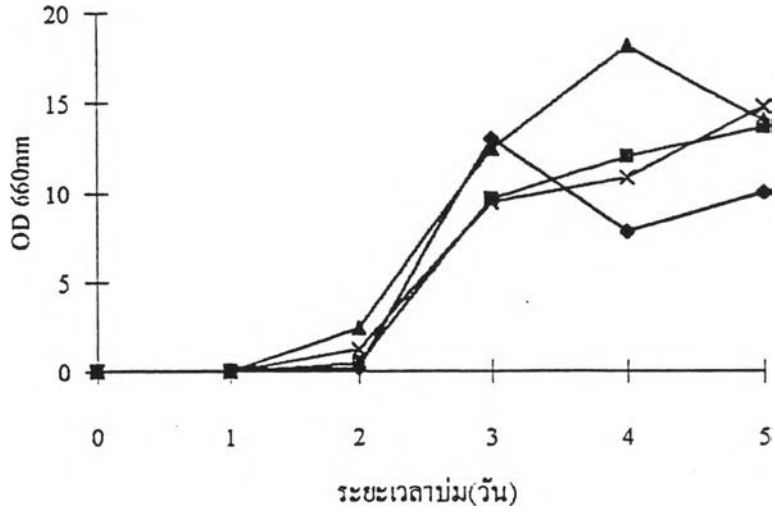


รูปที่ ภ15 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรดิเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ MO13 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

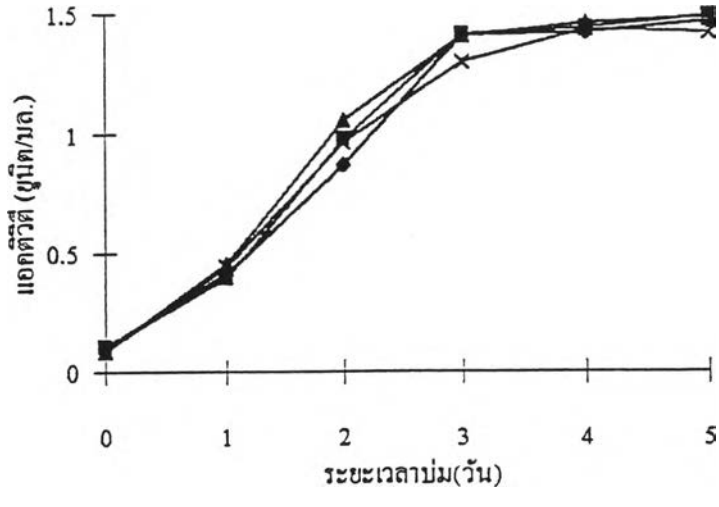


รูปที่ ภ16 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรติเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ MO13 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 มี 5%โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

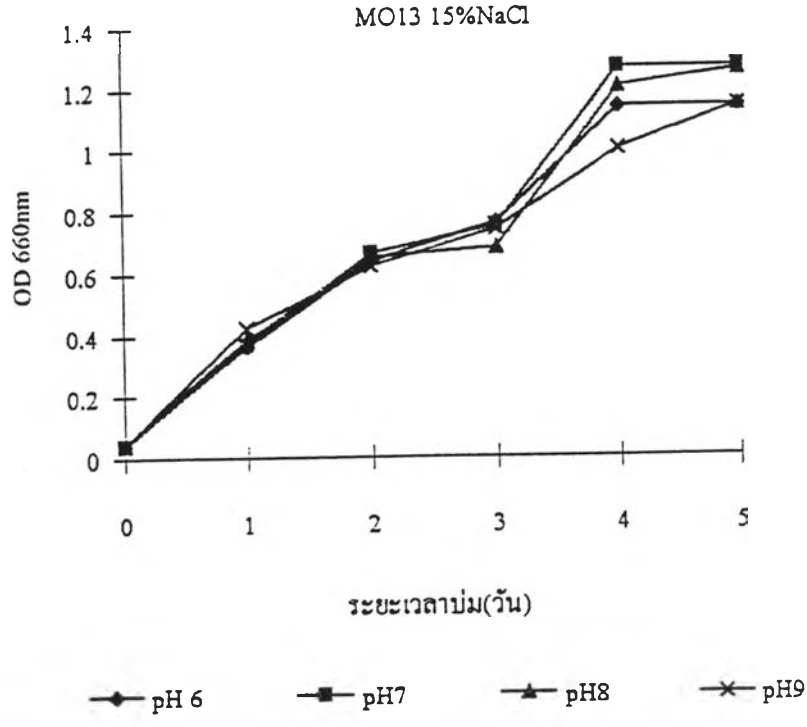
(ก)



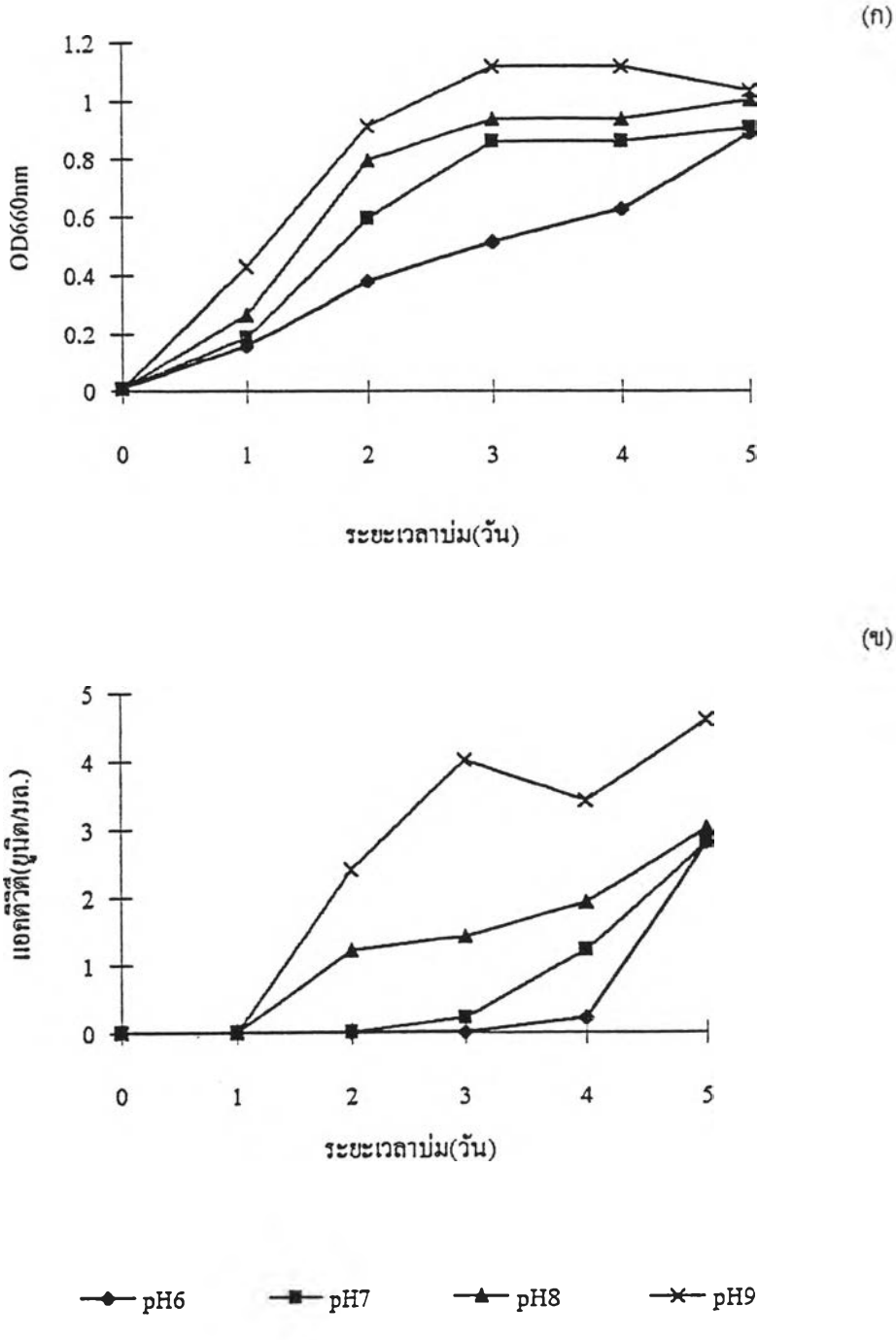
(ข)



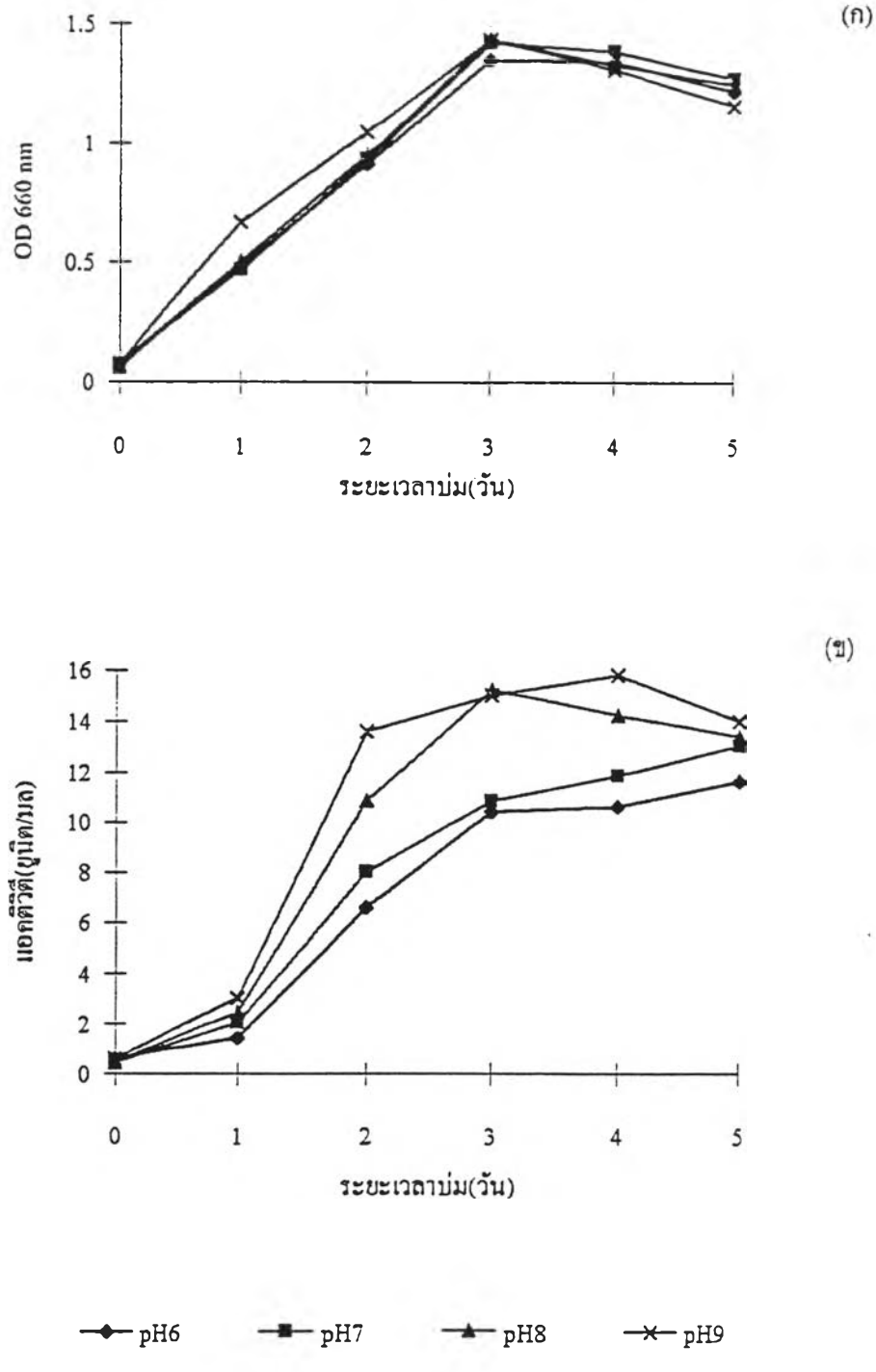
รูปที่ ภ17 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรติเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ MO13 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 มี 10 % โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส



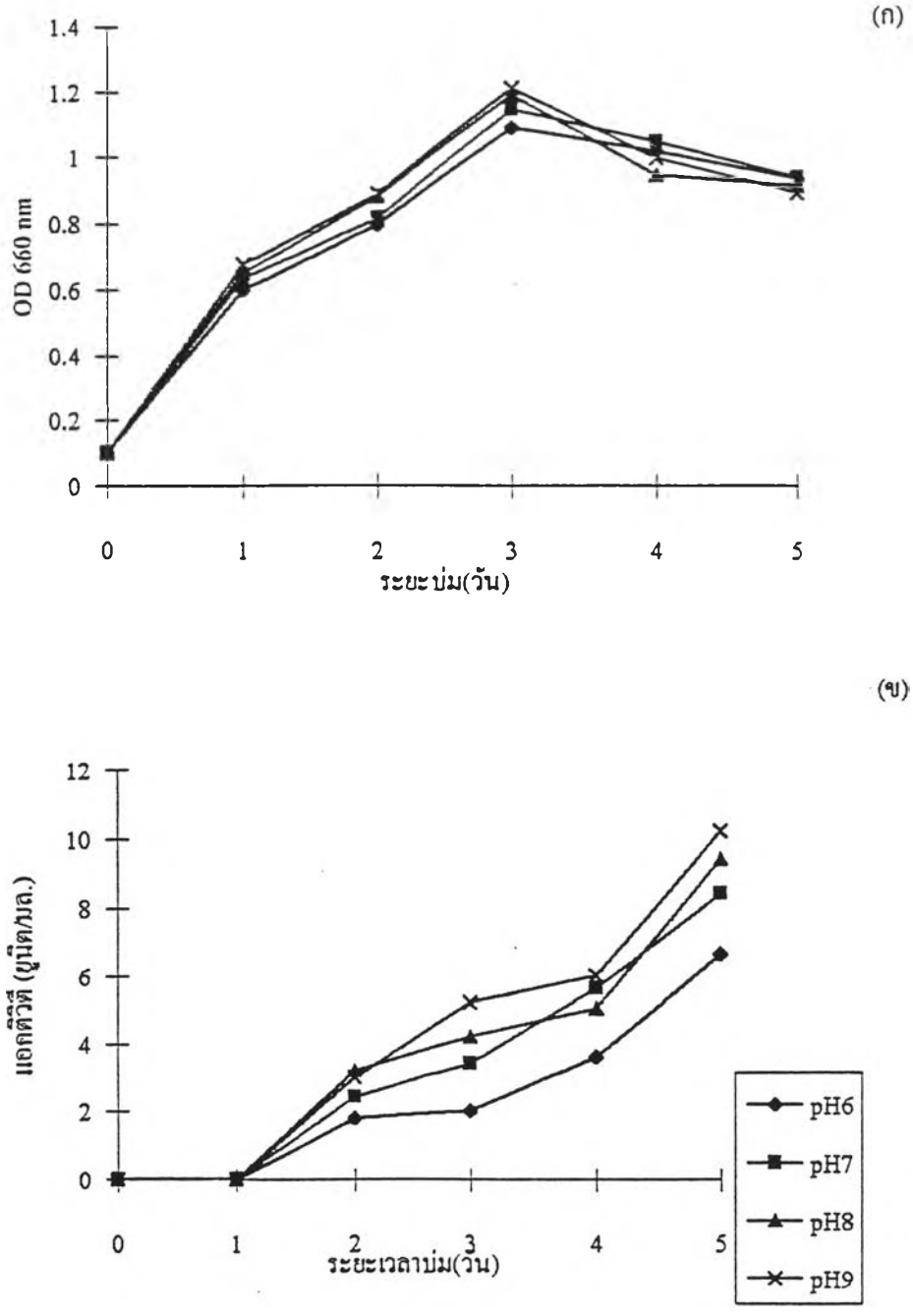
รูปที่ ภ18 การเพิ่มจำนวน (ก) *Bacillus* sp สายพันธุ์ MO13 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 มี 15%โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ ภ19 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรติเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ MO31 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

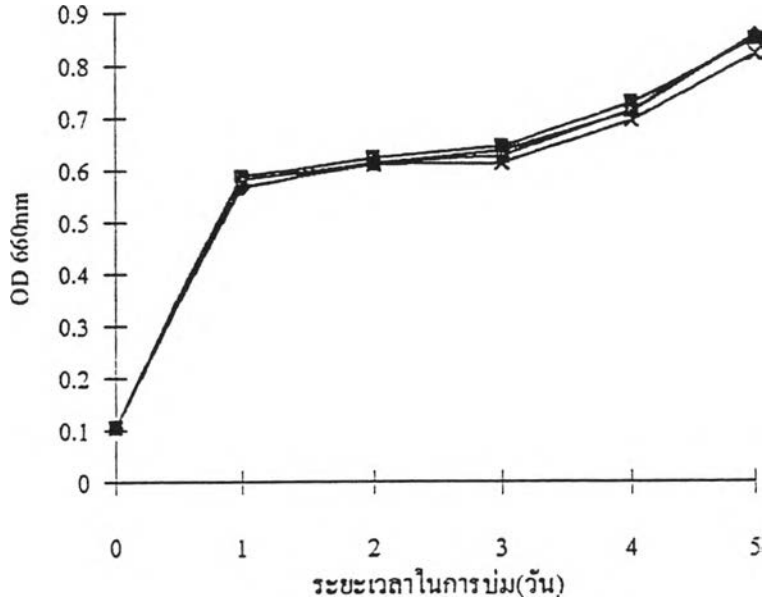


รูปที่ ภ20 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรติเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ MO31 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 มี 5% โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

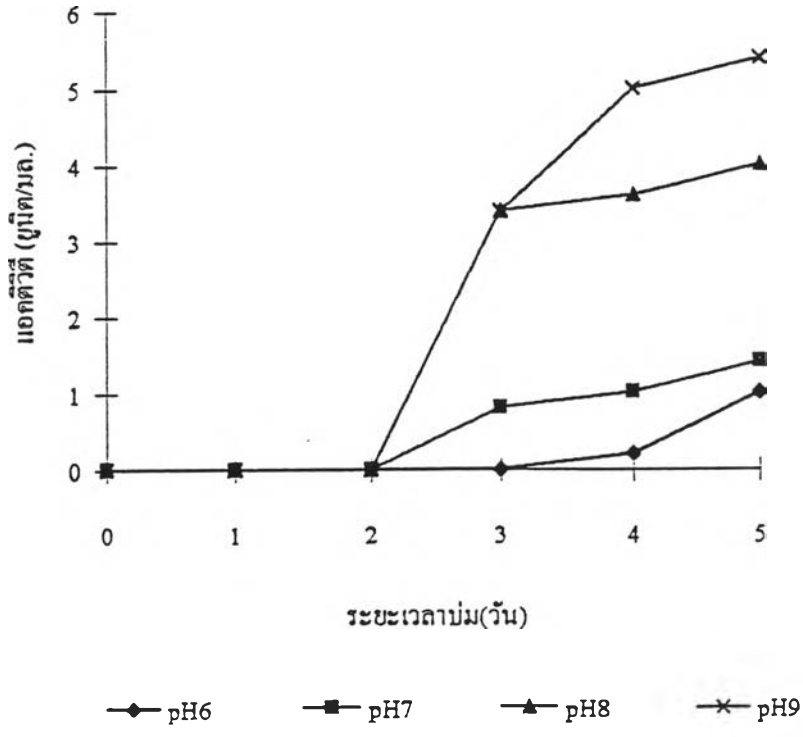


รูปที่ ภ21 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรติเอสแอคติวิตี (ข) ***Bacillus*** sp สายพันธุ์ MO31 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 มี 10% โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

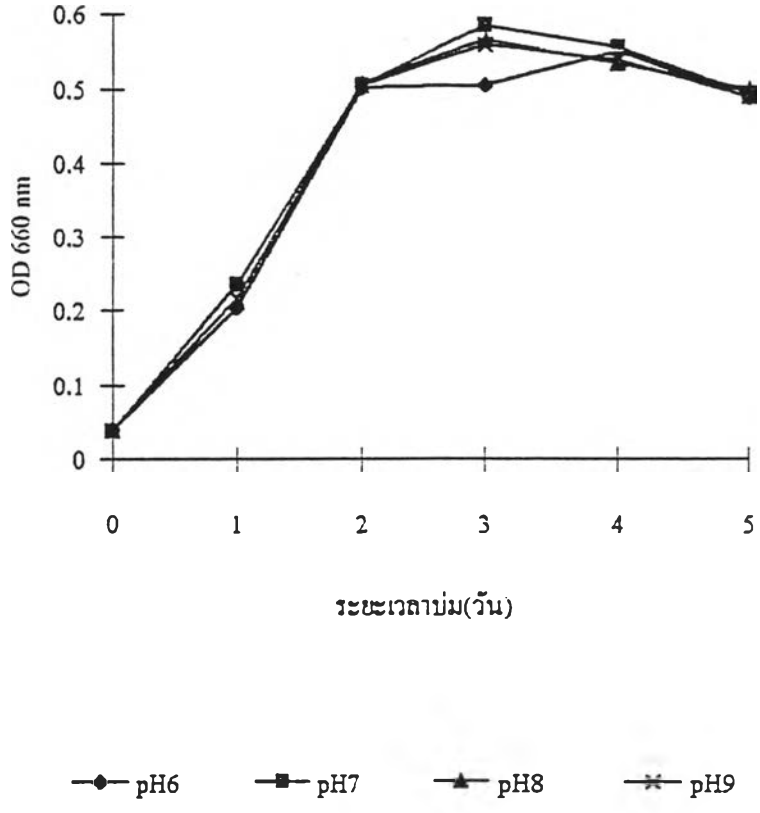
(ก)



(ข)



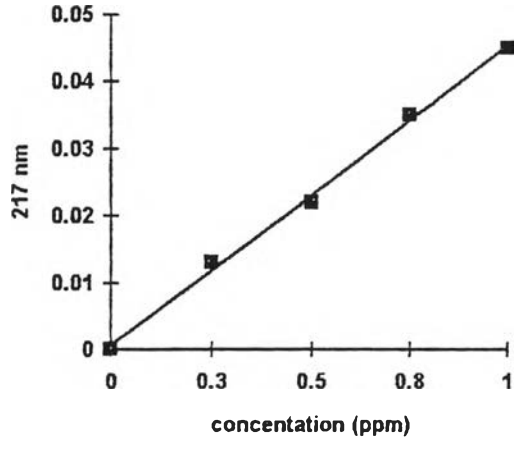
รูปที่ ภ22 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรติเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ MO31 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 มี 15% โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ ภ23 การเพิ่มจำนวน (ก) และโปรดิเอสแอคติวิตี (ข) *Bacillus* sp สายพันธุ์ MO31 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 มี 20%โซเดียมคลอไรด์ โดยมีค่าพีเอชต่างๆ เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

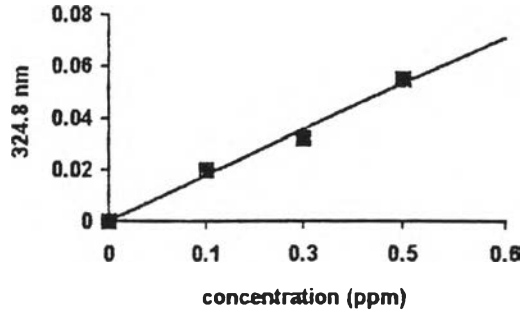
รูปที่ ภ24 กราฟมาตรฐานสำหรับใช้วิเคราะห์ปริมาณตะกั่วโดยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer

Instrument mode	Absorbance
Calibration mode	Concentration
Measurement mode	Integration
Slit width (nm)	1.0
Slit Height	Normal
Wavelength (nm)	217.0
Flame	Air-acetyline
Sample Introduction	Manual
Delay time	6
Time constant	0.05
Measurement time (sec)	2.0
Replicates	3
BlackGround correction	ON
Air flow(L/min)	13.5
Acetylene Flow(L/min)	2.0



รูปที่ ภ25 กราฟมาตรฐานสำหรับใช้วิเคราะห์ปริมาณทองแดงโดยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer

Instrument mode	Absorbance
Calibration mode	Concentration
Measurement mode	Integration
Slit width (nm)	0.5
Slit Height	Normal
Wavelength (nm)	324.8
Flame	Air-acetyline
Sample Introduction	Manual
Delay time	6
Time constant	0.05
Measurement time (sec)	2.0
Replicates	3
BlackGround correction	off
Air flow(L/min)	13.5
Acetylene Flow(L/min)	2.0



ตารางที่ ภ1 การวิเคราะห์ปริมาณตะกั่วในซีอิ๊วที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ โดยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer

ตัวอย่างซีอิ๊ว	$A_{217.0}$			เฉลี่ย	ความเข้มข้นตะกั่ว
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
น้ำหมักจากระยะโมโรมิที่เติมสารละลายโปรตีเอส 100ยูนิต/ลิตร					
-โหลดคอนโทรลที่มีการกวน	0.002	0.002	0.001	0.002	0.042
-โหลดคอนโทรลที่ไม่มีการกวน	0.008	0.001	0.002	0.004	0.087
-โหลทดลองมีการกวน	0.001	0.001	0.001	0.001	0.021
-โหลทดลองไม่มีการกวน	0.001	0.001	0.001	0.001	0.032
น้ำหมักจากระยะโมโรมิที่สารผงโปรตีเอส 100ยูนิต/ลิตร					
-โหลดคอนโทรลที่มีการกวน	0.000	0.001	0.001	0.001	0.014
-โหลดคอนโทรลที่ไม่มีการกวน	0.001	-0.001	0.000	-0.000	-0.001
-โหลทดลองมีการกวน	0.001	0.001	0.001	0.001	0.022
-โหลทดลองไม่มีการกวน	-0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
น้ำหมักจากระยะโมโรมิที่ผงโปรตีเอส 250ยูนิต/ลิตร					
-โหลดคอนโทรลที่มีการกวน	0.001	0.001	0.002	0.001	0.034
-โหลดคอนโทรลที่ไม่มีการกวน	0.001	0.000	-0.001	0.000	0.005
-โหลทดลองมีการกวน	0.001	0.000	0.001	0.001	0.019
-โหลทดลองไม่มีการกวน	0.000	-0.000	-0.000	-0.000	-0.006

ตารางที่ ภ2 การวิเคราะห์ปริมาณทองแดงในซีอิ๊วที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการโดยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer

ตัวอย่างซีอิ๊ว	$A_{324.8}$			เฉลี่ย	ความเข้มข้นทองแดง
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3		
น้ำหมักจากระยะโมโรมิที่เติมสารละลายโปรตีเอส 100ยูนิต/ลิตร					
-โหลดคอนโทรลที่มีการกวน	0.005	0.005	0.005	0.005	0.050
-โหลดคอนโทรลที่ไม่มีการกวน	0.024	0.024	0.023	0.023	0.230
-โหลทดลองมีการกวน	0.029	0.029	0.029	0.029	0.278
-โหลทดลองไม่มีการกวน	0.031	0.032	0.031	0.031	0.295
น้ำหมักจากระยะโมโรมิที่สารผงโปรตีเอส 100ยูนิต/ลิตร					
-โหลดคอนโทรลที่มีการกวน					
-โหลดคอนโทรลที่ไม่มีการกวน	0.005	0.005	0.005	0.005	0.052
-โหลทดลองมีการกวน	0.020	0.021	0.021	0.020	0.205
-โหลทดลองไม่มีการกวน	0.032	0.032	0.032	0.032	0.300
น้ำหมักจากระยะโมโรมิที่ผงโปรตีเอส 250ยูนิต/ลิตร	0.025	0.025	0.026	0.026	0.248
-โหลดคอนโทรลที่มีการกวน					
-โหลดคอนโทรลที่ไม่มีการกวน	0.005	0.005	0.005	0.005	0.056
-โหลทดลองมีการกวน	0.017	0.017	0.017	0.017	0.176
-โหลทดลองไม่มีการกวน	0.024	0.025	0.025	0.025	0.240
	0.018	0.018	0.018	0.018	0.181

ผู้ทดสอบ	ตัวอย่างซีอิ๊ว						
	280	405	569	627	691	728	758
1	6	3	5	5	5	5	5
2	5	3	4	5	4	5	5
3	5	3	4	5	4	5	5
4	2	7	1	6	3	4	5
5	5	4	6	4	4	5	4
6	5	6	7	5	4	5	5
7	5	6	7	5	4	5	5
8	5	3	5	3	4	4	5
9	5	3	5	3	4	4	5
10	5	6	4	6	6	6	6
11	5	3	5	3	4	4	5
12	5	4	7	4	4	4	4
13	3	6	7	4	2	1	5
14	4	5	4	5	5	5	5
15	4	4	7	4	4	4	4
16	4	5	4	5	5	5	5
17	5	4	5	4	4	5	5
18	6	4	6	4	4	5	5
19	5	4	6	4	4	5	4
20	5	3	6	4	4	4	4

ตารางที่ ภ3 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส ความชอบสีของผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วชนิดต่างๆราย ละเอียดของรหัสซีอิ๊วปรากฏในหน้า 33

ผู้ทดลอบ	ตัวอย่างซีอิ๊ว						
	280	405	569	627	691	728	758
1	5	3	5	5	5	5	5
2	5	3	6	4	5	5	5
3	5	3	6	4	3	5	5
4	3	6	7	4	2	1	5
5	5	4	6	4	4	4	4
6	3	7	6	4	4	5	5
7	3	7	6	4	4	5	5
8	3	2	5	3	5	5	4
9	4	4	5	4	3	3	4
10	4	5	4	6	6	6	6
11	4	5	4	6	6	6	6
12	5	4	7	4	4	4	4
13	2	7	1	6	3	4	5
14	4	4	5	5	5	5	5
15	4	4	5	5	5	5	5
16	4	4	5	5	5	5	5
17	5	4	5	4	4	4	4
18	4	3	5	4	4	4	4
19	5	4	6	4	4	4	4
20	5	3	7	4	4	4	4

ตารางที่ ภ4 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส ความชอบกลิ่นของผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วชนิดต่างๆ

รายละเอียดของรหัสซีอิ๊วปรากฏในหน้า 33

ผู้ทดสอบ	ตัวอย่างซีอิ๊ว						
	280	405	569	627	691	728	758
1	5	3	4	5	5	5	5
2	5	5	5	5	5	5	5
3	5	3	4	5	4	5	4
4	1	5	4	7	3	2	6
5	5	4	5	6	5	5	5
6	4	5	6	6	4	5	5
7	4	5	6	6	4	5	5
8	4	4	5	4	3	3	4
9	3	2	5	3	5	5	4
10	4	4	4	6	6	6	6
11	1	5	4	7	3	2	6
12	5	4	4	4	4	4	4
13	1	5	4	7	3	2	6
14	3	4	3	5	4	5	6
15	5	4	6	6	6	6	6
16	3	4	3	5	4	5	6
17	6	3	5	4	4	4	4
18	6	3	5	3	4	3	5
19	5	4	5	6	5	5	5
20	5	3	5	4	4	4	4

ตารางที่ ภ5 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส ความชอบรสของผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วชนิดต่างๆ รายละเอียดของรหัสซีอิ๊วปรากฏในหน้า 33

ผู้ทดลอบ	ตัวอย่างซีอิ๊ว						
	280	405	569	627	691	728	758
1	6	3	7	5	5	5	5
2	5	4	6	6	6	6	6
3	4	3	4	4	4	4	4
4	2	6	1	7	6	4	3
5	5	6	4	6	6	5	6
6	5	7	7	7	6	5	7
7	5	7	7	7	7	6	5
8	5	4	4	4	4	4	5
9	5	3	4	3	4	4	5
10	6	4	4	6	6	6	6
11	2	6	1	7	6	4	3
12	5	4	4	4	4	4	4
13	2	6	3	7	4	4	5
14	4	5	5	5	5	4	4
15	6	6	6	6	6	6	6
16	4	5	5	5	5	4	4
17	7	7	7	7	7	7	7
18	6	4	6	4	4	5	5
19	5	6	4	6	6	6	6
20	5	3	5	4	4	4	4

ตารางที่ ภ6 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส ความชอบความใสของผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วชนิดต่างๆรายละเอียดของรหัสซีอิ๊วปรากฏในหน้า 33

ผู้ทดลอบ	ตัวอย่างซีอิ๊ว						
	280	405	569	627	691	728	758
1	5	3	6	4	4	4	4
2	5	4	5	5	5	5	5
3	5	3	5	5	4	5	5
4	2	6	3	7	4	1	5
5	5	4	5	6	5	5	5
6	4	6	7	6	5	5	4
7	4	6	7	4	4	4	4
8	4	4	4	4	4	4	4
9	4	3	5	3	4	5	4
10	5	4	4	6	6	6	6
11	2	6	3	7	4	1	5
12	5	4	7	4	4	4	4
13	2	6	1	7	6	4	3
14	4	4	4	5	5	5	5
15	4	5	6	6	6	6	6
16	5	5	5	5	5	5	5
17	6	6	6	6	6	6	6
18	6	4	5	4	4	4	5
19	5	4	5	6	5	5	5
20	5	3	5	4	4	4	4

ตารางที่ ภ7 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส ความชอบรวมของผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วชนิดต่างๆ รายละเอียดของรหัสซีอิ๊วปรากฏในหน้า 33

TABLE 7.5
F Distribution
5% Level of Significance

ν_2 \ ν_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	161·45	199·50	215·71	224·58	230·16	233·99	236·77	238·88	240·54
2	18·513	19·000	19·164	19·247	19·296	19·330	19·353	19·371	19·385
3	10·128	9·5521	9·2760	9·1172	9·0135	8·9406	8·8868	8·8452	8·8123
4	7·7086	6·9443	6·5914	6·3883	6·2560	6·1631	6·0942	6·0410	5·9988
5	6·6079	5·7861	5·4095	5·1922	5·0503	4·9503	4·8759	4·8183	4·7725
6	5·9874	5·1433	4·7571	4·5337	4·3874	4·2839	4·2066	4·1468	4·0990
7	5·5914	4·7374	4·3468	4·1203	3·9715	3·8660	3·7870	3·7257	3·6767
8	5·3177	4·4590	4·0662	3·8378	3·6876	3·5806	3·5005	3·4381	3·3881
9	5·1174	4·2565	3·8626	3·6331	3·4817	3·3738	3·2927	3·2296	3·1789
10	4·9646	4·1028	3·7083	3·4780	3·3258	3·2172	3·1355	3·0717	3·0204
11	4·8443	3·9823	3·5874	3·3567	3·2039	3·0946	3·0123	2·9480	2·8962
12	4·7472	3·8853	3·4903	3·2592	3·1059	2·9961	2·9134	2·8486	2·7964
13	4·6672	3·8056	3·4105	3·1791	3·0254	2·9153	2·8321	2·7669	2·7144
14	4·6001	3·7389	3·3439	3·1122	2·9582	2·8477	2·7642	2·6987	2·6458
15	4·5431	3·6823	3·2874	3·0556	2·9013	2·7905	2·7066	2·6408	2·5876
16	4·4940	3·6337	3·2389	3·0069	2·8524	2·7413	2·6572	2·5911	2·5377
17	4·4513	3·5915	3·1968	2·9647	2·8100	2·6987	2·6143	2·5480	2·4943
18	4·4139	3·5546	3·1599	2·9277	2·7729	2·6613	2·5767	2·5102	2·4563
19	4·3808	3·5219	3·1274	2·8951	2·7401	2·6283	2·5435	2·4768	2·4227
20	4·3513	3·4928	3·0984	2·8661	2·7109	2·5990	2·5140	2·4471	2·3928
21	4·3248	3·4668	3·0725	2·8401	2·6848	2·5727	2·4876	2·4205	2·3661
22	4·3009	3·4434	3·0491	2·8167	2·6613	2·5491	2·4638	2·3965	2·3419
23	4·2793	3·4221	3·0280	2·7955	2·6400	2·5277	2·4422	2·3748	2·3201
24	4·2597	3·4028	3·0088	2·7763	2·6207	2·5082	2·4226	2·3551	2·3002
25	4·2417	3·3852	2·9912	2·7587	2·6030	2·4904	2·4047	2·3371	2·2821
26	4·2252	3·3690	2·9751	2·7426	2·5868	2·4741	2·3883	2·3205	2·2655
27	4·2100	3·3541	2·9604	2·7278	2·5719	2·4591	2·3732	2·3053	2·2501
28	4·1960	3·3404	2·9467	2·7141	2·5581	2·4453	2·3593	2·2913	2·2360
29	4·1830	3·3277	2·9340	2·7014	2·5454	2·4324	2·3463	2·2782	2·2229
30	4·1709	3·3158	2·9223	2·6896	2·5336	2·4205	2·3343	2·2662	2·2107
40	4·0848	3·2317	2·8387	2·6060	2·4495	2·3359	2·2490	2·1802	2·1240
60	4·0012	3·1504	2·7581	2·5252	2·3683	2·2540	2·1665	2·0970	2·0401
120	3·9201	3·0718	2·6802	2·4472	2·2900	2·1750	2·0867	2·0164	1·9588
∞	3·8416	2·9957	2·6040	2·3719	2·2141	2·0986	2·0096	1·9384	1·8799

This table gives the values of F for which $I_F(\nu_1, \nu_2) = 0{\cdot}05$.

TABLE 7.5 (cont.)
F Distribution
5% Level of Significance

ν_2 \ ν_1	10	12	15	20	24	30	40	60	120	∞
1	241·88	243·91	245·95	248·01	249·05	250·09	251·14	252·20	253·25	254·32
2	19·396	19·413	19·429	19·446	19·454	19·462	19·471	19·479	19·487	19·496
3	8·7855	8·7446	8·7029	8·6602	8·6385	8·6166	8·5944	8·5720	8·5494	8·5265
4	5·9644	5·9117	5·8578	5·8025	5·7744	5·7459	5·7170	5·6878	5·6581	5·6281
5	4·7351	4·6777	4·6188	4·5581	4·5272	4·4957	4·4638	4·4314	4·3984	4·3650
6	4·0600	3·9999	3·9381	3·8742	3·8415	3·8082	3·7743	3·7398	3·7047	3·6688
7	3·6365	3·5747	3·5108	3·4445	3·4105	3·3758	3·3404	3·3043	3·2674	3·2298
8	3·3472	3·2840	3·2184	3·1503	3·1152	3·0794	3·0428	3·0053	2·9669	2·9276
9	3·1373	3·0729	3·0061	2·9365	2·9005	2·8637	2·8259	2·7872	2·7475	2·7067
10	2·9782	2·9130	2·8450	2·7740	2·7372	2·6996	2·6609	2·6211	2·5801	2·5379
11	2·8536	2·7876	2·7186	2·6464	2·6090	2·5705	2·5309	2·4901	2·4480	2·4045
12	2·7534	2·6866	2·6169	2·5436	2·5055	2·4663	2·4259	2·3842	2·3410	2·2962
13	2·6710	2·6037	2·5331	2·4589	2·4202	2·3803	2·3392	2·2966	2·2524	2·2064
14	2·6021	2·5342	2·4630	2·3879	2·3487	2·3082	2·2664	2·2230	2·1778	2·1307
15	2·5437	2·4753	2·4035	2·3275	2·2878	2·2468	2·2043	2·1601	2·1141	2·0658
16	2·4935	2·4247	2·3522	2·2756	2·2354	2·1938	2·1507	2·1058	2·0589	2·0096
17	2·4499	2·3807	2·3077	2·2304	2·1898	2·1477	2·1040	2·0584	2·0107	1·9604
18	2·4117	2·3421	2·2686	2·1906	2·1497	2·1071	2·0629	2·0166	1·9681	1·9168
19	2·3779	2·3080	2·2341	2·1555	2·1141	2·0712	2·0264	1·9795	1·9302	1·8780
20	2·3479	2·2776	2·2033	2·1242	2·0825	2·0391	1·9938	1·9464	1·8963	1·8432
21	2·3210	2·2504	2·1757	2·0960	2·0540	2·0102	1·9645	1·9165	1·8657	1·8117
22	2·2967	2·2258	2·1508	2·0707	2·0283	1·9842	1·9380	1·8895	1·8380	1·7831
23	2·2747	2·2036	2·1282	2·0476	2·0050	1·9605	1·9139	1·8640	1·8128	1·7570
24	2·2547	2·1834	2·1077	2·0267	1·9838	1·9390	1·8920	1·8424	1·7897	1·7331
25	2·2365	2·1649	2·0889	2·0075	1·9643	1·9192	1·8718	1·8217	1·7684	1·7110
26	2·2197	2·1479	2·0716	1·9898	1·9464	1·9010	1·8533	1·8027	1·7488	1·6900
27	2·2043	2·1323	2·0558	1·9736	1·9299	1·8842	1·8361	1·7851	1·7307	1·6717
28	2·1900	2·1179	2·0411	1·9586	1·9147	1·8687	1·8203	1·7689	1·7138	1·6541
29	2·1768	2·1045	2·0275	1·9446	1·9005	1·8543	1·8055	1·7537	1·6981	1·6377
30	2·1646	2·0921	2·0148	1·9317	1·8874	1·8409	1·7918	1·7396	1·6835	1·6223
40	2·0772	2·0035	1·9245	1·8389	1·7929	1·7444	1·6928	1·6373	1·5766	1·5089
60	1·9926	1·9174	1·8364	1·7480	1·7001	1·6491	1·5943	1·5343	1·4673	1·3893
120	1·9105	1·8337	1·7505	1·6587	1·6084	1·5543	1·4952	1·4290	1·3519	1·2539
∞	1·8307	1·7522	1·6664	1·5705	1·5173	1·4591	1·3940	1·3180	1·2214	1·0000

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} = \frac{\nu_2 S_1}{\nu_1 S_2}.$$

ภาคผนวก ง

1. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl

สารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์

คะตะลิสส์โปแตสเซียมซัลเฟต 95 กรัมผสมกับคอปเปอร์ซัลเฟต 5 กรัม

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์โดยชั่ง โซเดียมคลอไรด์ 40 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลายกรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งกรดบอริก 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรความร้อนช่วยในการละลาย

สารละลายอินดิเคเตอร์ ชั่งเมธิลีนบลู 0.1 กรัมและเมธิลเรด 0.2 กรัม ละลายในเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

ใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมคะตะลิสส์ 7 กรัม และกรดซัลฟุริคเข้มข้น 15 มิลลิลิตร ลงไป นำไปอุ่นบนเตาหลุมจนได้สารละลายสีเขียวใส ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นโดยเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำขวดรูปชมพู่ที่บรรจุ 4 เปอร์เซ็นต์กรดบอริค 100 มิลลิลิตร ซึ่งเติมสารละลายอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด มารองรับสารละลายที่กลั่นได้จนกระทั่งปริมาตรรวม 200 มิลลิลิตร หรือสีของสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วง นำไปไตรเตรดกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริคที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนจนสารละลายเป็นสีเขียวใส คำนวณปริมาณไนโตรเจนจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{(A-B) \times C \times 1.4}{V}$$

A = ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง

B = ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริคที่ใช้ไตเตรตแบลงค์

C = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก

V = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้

2. การจำแนกแบคทีเรียตามวิธีมาตรฐานที่ระบุใน Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology และจำแนกชนิด *Bacillus* spp. ตามวิธีที่ระบุโดย Seenappa and Kempton (1981)

2.1 การติดสีแกรม นำแบคทีเรียผสมน้ำกรองเขี่ยให้กระจายบนกระจกสไลด์ ทิ้งให้แห้ง ผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง ย้อมด้วยคริสตอลไวโอเลต 1 นาที ล้างน้ำ หยดสารละลายแกรมไอโอดีน 1 นาที ล้างน้ำ ล้างด้วย 95% เอธานอล ล้างน้ำทันที ย้อมด้วยแกรมซาฟรานิน (safranin)1 นาที ล้างน้ำ ซับให้แห้ง ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

2.2 การสร้างเอนไซม์คาตาเลส ใช้ลูปเขี่ยเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA + 5% โซเดียมคลอไรด์ กระจายบนกระจกสไลด์ หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่ามีเอนไซม์คาตาเลส

2.3 การรีดิวส์ไนเตรต เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลวไนเตรตที่ 0 และ 5% โซเดียมคลอไรด์ บ่ม 24-48 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ตรวจผลโดยใช้น้ำยาทดสอบซึ่งประกอบด้วย สารละลายกรดซัลฟานิลิค (Sulfanilic acid) และสารละลายอัลฟาเนพธาลามายน์ (alpha-naphthylamine) อย่างละ 5 หยด ถ้าสารละลายในหลอดทดลองกลายเป็นสีแดง แสดงว่าไนเตรตถูกรีดิวส์เป็นไนไตรต์ ถ้าสารละลายในหลอดไม่เปลี่ยนเป็นสีแดงนำไปทดสอบต่อโดยเติมผงสังกะสีลงไปเล็กน้อย ถ้าเกิดเป็นสีแดงแสดงว่าไนเตรตถูกรีดิวส์โดยสังกะสี ดังนั้นแบคทีเรียไม่ได้ใช้ไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน ถ้าสารละลายในหลอดทดลองไม่เปลี่ยนเป็นสีแดงแสดงว่าไนเตรทถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรต์

2.4 ความสามารถในการใช้น้ำตาล เลี้ยงเชื้อลงในอาหาร phenol red broth base ที่มี 0 และ 5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ น้ำตาลที่ทดสอบได้แก่0.1 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส อราบิโนส ไซโลส แมนโนส กาแลคโตรท เมนนิทอล แลคโตส สังเกตการสร้างกรด ถ้าแบคทีเรียใช้น้ำตาลจะสร้างกรดซึ่งจะเปลี่ยนสีฟีนอลเรดจากแดงเป็นเหลือง

2.5 ความสามารถในการใช้ซิเตรต เลี้ยงเชื้อเขี่ยและปักตรงในอาหารแข็ง Simmons Citrate Agar บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ถ้าเชื้อใช้ซิเตรตได้จะเปลี่ยนสีบรอมไธมอลบลู จากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน และเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Koser Citrate Medium 0,5% โซเดียมคลอไรด์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมงแบคทีเรียที่สามารถใช้ซิเตรทได้จะเจริญทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น

2.6 การเจริญในสภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic agar) เลี้ยงเชื้อในอาหาร TSA ที่มี 5 % โซเดียมคลอไรด์ วางจานเพาะเชื้อในโหลบ่มเชื้อแบบไร้อากาศ (anaerobic jar) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง แบคทีเรียที่สามารถเจริญได้คือแบคทีเรียพวก anaerobe

2.7 การย่อยเจลาติน เลี้ยงเชื้อใน Nutrient Broth ที่มีเจลาติน 1% บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมงนำหลอดเลี้ยงเชื้อไป แช่ตู้เย็นช่องแช่แข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ้าแบคทีเรียย่อยเจลาตินได้อาหารจะไม่แข็ง

2.8 การใช้แป้งของแบคทีเรีย เลี้ยงโดยจุดเชื้อในอาหาร Nutrient- agar ที่มีแป้ง 1% เป็นส่วนประกอบ บ่มที่ 24-48 ชั่วโมง เททับด้วยสารละลายไอโอดีน 15 นาที ถ้าแบคทีเรียสามารถใช้แป้งได้จะเกิดวงใสรอบโคโลนี

2.9 การทดสอบ MR-VP

การทดสอบเมธิลเรด เลี้ยงเชื้อในอาหาร MR-VP เป็นเวลา 5 วัน ที่ 37 องศาเซลเซียส หยดสารละลายเมธิลเรด 5 หยด สารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดง แสดงว่าเป็นผลบวก

การทดสอบVoges Proskauer เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร MR-VP ที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24-48 ชั่วโมง หยด 10% โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 5หยด เขย่าตั้งทิ้งไว้ ถ้าเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแสดงว่าเป็นผล VP บวก

3.แบบสอบถามความชอบผลิตภัณฑ์ชีอิ๊ว

แบบสอบถาม Hedonic 7-Point Scale

ชื่อผู้ทดสอบ .....
วันที่ .....

ให้ผู้ทดสอบชิมตัวอย่าง ชีอิ๊ว ที่จัดไว้แล้วให้คะแนนตามระดับความชอบที่มีต่อผลิตภัณฑ์ ตามคุณลักษณะต่าง ๆ ในตารางโดยให้ระดับคะแนนเป็นดังนี้

ระดับคะแนน 7 ชอบมากที่สุด
6 ชอบมาก
5 ชอบ
4 เฉย ๆ
3 ไม่ชอบ
2 ไม่ชอบมาก
1 ไม่ชอบมากที่สุด

ตัวอย่าง	สี	กลิ่น	รสชาติ	ความใส	ความชอบรวม
280					
405					
569					
627					
691					
728					
758					

เมื่อพิจารณาแล้ว ถ้าระดับการให้คะแนนในตัวอย่างที่ท่านให้มีค่าต่ำกว่า 4 กรุณาให้เหตุผลด้วยว่าเพราะเหตุใด หรือมีข้อเสนอแนะอย่างไร ในแต่ละตัวอย่าง

ข้อเสนอแนะ.....
.....
.....
.....

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุดาวดี ลีโทชวลิต เกิดเมื่อวันที่ 13 กุมภาพันธ์ 2516 จบการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต วท.บ. (จุลชีววิทยา) จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ปีการศึกษา 2537

1.ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่

1.1. Leethochawalit ,S. ,Chansa-ngavej, K.1997. Selection of halophilic bacterial protease for use in lab-scale high-protein soy sauce fermentation. Proceedings of Chulalongkorn University 80th Anniversary Research Conference. p 707-715.

2.ผลงานวิจัยที่เสนอในที่ประชุม

2.1.Leethochawalit ,S., Niyomrit, S., Chansa-ngvej, K. 1996. Growth and protease activity of halotolerant bacteria isolated from lab scale soy sauce ***koji***. Abstract book p50. The 8th Annual Meeting of National Center for Genetic Engineering and Biotechnology: Prospects for the Future.14-15 November 1996. Prachuap khiri khan .Thailand.

2.2.Leethochawalit ,S.,Chansa-ngavej, K. 1997.Preliminary results on protein content of lab-scale soy sauce after adding halotolerant ***Bacillus megaterium*** protease at ***moromi*** stage . Abstract Book. p80 . The 9th Annual Meeting of the Thai society for Biotechnology & The 2nd JSPS-NRCT-DOST-LIPI-VCC Seminar on Biotechnology :An Essential Tool for Future Development?.19-21 November 1997.Nakhon Ratchasima .Thailand.

2.3.สุดาวดี ลีโทชวลิต,กาญจนา ชาญสง่าเวช 2540 การเพิ่มปริมาณโปรตีนในซีอิ๊วโดยเติมโปรติเอส ที่เสถียรต่อความเค็มในระยะโมโรมิ เสนอต่อที่ประชุมวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 27-28 มีนาคม 2540. หนังสือรวมบทคัดย่อหน้า 16.