เอกสารอ้างอิง

1. Prescott , S.C. and C.G. Dunn, "The Citric Acid Fermentation", in Industrial Microbiology , 3 rd ed. , McGraw Hill , New York , 533-577,1959.

2. Kubicek , C.P. and M. Rohr, "Citric Acid Fermentation" , CRC Critical Review in Biotechnology, 3(4), 331-373 , 1984.

3. Milsom , P.E. and J.L. Meers, "Citric Acid", Comprehensive Biotechnology , 3 , 665-680 , 1983.

4. Rohr , M., C.P.Kubicek and J.Kominek,"Citric Acid",In:Rehm HJ, Reed G(eds)", Biotechnology , 3 , Verlag Chemie , Weinheim, 1983.

5. Murray , R.K. , D.K. Granner , P.A. Mayes and V.W. Rodwell , "The Citric Acid Cycle : The Catabolism of Acetyl-CoA", Biochemistry , 22 th ed. , Prentice-Hall International Inc., 155-170 , 1990.

6.Stryer , L.,"Citric Acid Cycle", Biochemistry , W.H. Freeman and company , San Francisco , 283-304 , 1981.

7. Rohr ,M. and C.P. Kubicek,"Regulatory Aspects of Citirc Acid Fermentation by Aspergillus niger", Process.Biochem., 16 , 34-37 , 1981.

8.วราวุฒิ ครูส่ง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต , "การผลิตกรดซิตริค" , เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม , สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ , 84-108 , 2532.

9. ดวงพร คันธโชติ , "กรดอินทรีย์จากจุลินทรีย์" , จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ , สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ , 164-177 , 2530.

10. Shu ,P. and M.J.Johnson ,"Citric Acid Production by Submerged Fermentation with Aspergillus niger", Ind.Eng.Chem. ,

40, 1202-1205 , 1948.

11. Martin ,S.M. and W.R. Waters ,"Production of Citric Acid by Submerged Fermentation" , Ind.Eng.Chem., 44(9) , 2229-2233 , 1952.

12. Cleland, W.W. and M.J. Johnson ,"Tracer Experiments on the Mechanism of Ctiric Acid Formation by Aspergillus niger" , J.Biol.Chem. , 208 , 679-689 , 1954.

13. Noguchi, Y. and M.J. Johnson ,"Citric Acid Fermentation of Sugars Purified with Chelating Resin", J.Bact. , 82 , 538-541 , 1961.

14. Kiel ,H. , R.Guvrin and Y.Henis ,"Citric Acid Fermentation by Aspergillus niger on Low Sugar Concentrations and Cotton Waste",Appl.Envir.Microbiol., 42 , 1-4 , 1981.

15. Maddox , I.S., K. Spencer , J.M. Greenwood , M.W. Dawson and J.D. Brooks , "Production of Citric Acid from Sugar present in Wood Hemicellulose using Aspergillus niger and Saccharomycopsis lipolytica" , Biotechnol. Lett., 7(11) , 815-818 , 1985.

16. Roukas ,T. and P.Kotzekidou ,"Influence of some Trace Metals and stimulants on Citric Acid Production from Brewery Wastes by Aspergillus niger", Enz.Microb.Technol., 9 , 291-249 , 1987.

17. Crueger, W. and A. Crueger ,"Organic acids", Biotechnology : A Textbiik of Industrial Microbiology (T.D.Brock,ed.), Science Tech , Inc., 112 , 1984.

18. Habison ,A. , C.P.Kubicek and M.Rohr ,"Partial Purification and Regulatory Properties of Phosphofructokinase

from Aspergillus niger", Biochem.J., 209 , 669-676 , 1983.

19. Hossain , M. , J.D. Brooks and I.S. Maddox ,"The effect of the Sugar Source on Citric Acid Production by Aspergillus niger", Appl.Microbiol.Biotechnol., 19 , 393-397 , 1984.

20. Voraputhaporn ,W. , T.Yoshida and H.Taguchi ,"The Production of Citric Acid from Starch in Submerged Culture of Aspergillus niger" , Annual Reports of IC Biotech , 8 , 269-278 , 1985.

21. Marroguin ,A.S., R.Carreno and Medezma ,"Effect of Trace Elements on Citric Fermentation by Aspergillus niger", Appl.Microbiol., 20(6) , 888-892 , 1970.

22. Wiley, J. and Sons.,"A Solid State Fermentation method for Citric Acid Production using Sugar Cane Bagasse", Biotechnol.Bioeng., 17 , 291-292 , 1975.

23. Garraway,M.O. and R.C.Evans, Fungal Nutrition and Physiology, A Wiley-Interscience Publication , 1984.

24. Shepard, M.W., "Method of Production Citric Acid by Fermentation", US Pat.3,083,144 ; 1963.

25. Wongwicharn, A., T.Yoshida and H.Taguchi,"Effect of N-Source on Citric Acid Production from Cassava Starch in Submerged Culture by A . niger", Annual Report of IC Biotech, 10 , 332-335 , 1987.

26. Bernfeld, P., Amylase , in Methods in Enzymology (Colowick, P.S. and O.N.Kaplan eds.) vol.1, Academic Press Inc., Publishers , N.Y. , 1955.

27. Clark, D.S., K.Ito and H.Horitsu,"Effect of Managaneses and other Heavy Metals on Submerged Citric Acid Fermentation of Molasses", Biotech.Bioeng., 8 , 456-471 , 1966.

28. Berry, D.R., A.Chmiel and Z.AL obaidi,"Citric Acid Production by Aspergillus niger ", Genetics and Physiology of ASPERGILLI ,(Smith, J.E. and J.A. Pateman eds.) , Academic Press , 1977.

29. Kubicek, C.P. and M. Rohr , "Aconitase and Citric Acid Fermentation by Aspergillus niger", Appl.Envir.Microbiol., 50(5) , 1336-1338 , 1985.

30. Steel, R. , C.P. Lentz and S.M. Martin , "Submerged Citric Acid Fermentation of Sugar Beet Molasses .Increase in Scale", Can.Jour.Microbiol., 1 , 299-311 , 1955.

31. Foster , J.W. and H. Devis , "Detection and Occurance of Acid Producing Fungi", Bulletin of the Torrey Botanical Club , 76(3) ,147-176 , 1949.

32. Kubicek, C.P. and M. Rohr , "Novel Trends in Physiology and Technology of Citric Acid Production",Overproduction of Microbiol Products (Krumphanzl, U., B.Sikyta and Z. Vanhek,eds.) , Academic Press , 1982.

33. Harmon, M.A. and H.W.Doelle,"Gas Chromatographic Seperation and Determination of Microquantities of the Esters of the Tricarboxylic Acid Cylce Acids and Related Compounds", J.Chromatog., 42 , 157-169 , 1969.

34. จิราภรณ์ โล่ห์วงศ์วัฒน , "การผลิตกรดซิตริกจากกากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ Aspergillus niger", วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , 2525.

35. Marier, J.R. and M. Boulet, "Pyridine - Acetic Anhydride Method", Journal of Diary Science , 1985.

36. Ashoor, S.H. and M.J. Knox,"Determination of Organic Acids in Foods by High-performance Liguid Chromatograhy" , J.Chromatog., 299 , 288-292 , 1984.

37. Stern, J.R., "Assay of Tricarboxylic Acids " , Method in Enzymology Volume 3 (Colowick, S.P. and N.O. Kaplan , eds.) , Academic Press , New York , 1957.

38. พิเชฐ อิฐกอ, "การผลิตแอลฟาอะไมเลสจาก Bacillus amyloliquefaciens KA 63", วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิตหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิต-วิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย , 2528.

ภาคผนวก

1. สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย

1.1 สูตรอาหารที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อราและเพิ่มจำนวนสปอร์

ได้แก่ โพเตโตเด็กซ์โตรสอการ์ (potato dextrose agar, PDA) ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

มันฝรั่ง	300 กรัม
(ต้มในน้ำเดือดแล้วกรองเฉพาะส่วนใส)	
เด็กซ์โตรส	20 กรัม
วุ้นผง	20 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แป้งที่ย่อยแล้ว	200 กรัม
(Dextrose equivalent 86 %)	
แอมโมเนียมซัลเฟต	3.5 กรัม
โปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.3 กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.3 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตาไฮเดรท	0.3 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 สูตรอาหารเพื่อหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แหล่งคาร์บอน	
แอมโมเนียมซัลเฟต	3.5 กรัม
โปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.3 กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.3 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตาไฮเดรท	0.3 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 <u>สูตรอาหารเพื่อหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม</u> ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แป้งที่ย่อยแล้ว (Dextrose equivalent 86 %)	450 กรัม
แหล่งไนโตรเจน	
โปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.3 กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.3 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตาไฮเดรท	0.3 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.5 <u>สูตรอาหารเพื่อหาแหล่งฟอสเฟตที่เหมาะสม</u> ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แป้งที่ย่อยแล้ว (Dextrose equivalent 86 %)	450 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.5 กรัม
แหล่งฟอสเฟต	
แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตาไฮเดรท	0.3 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.6 <u>สูตรอาหารเพื่อหาปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต</u> ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แป้งที่ย่อยแล้ว (Dextrose equivalent 86 %)	450 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.5 กรัม
โปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.4 กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.4 กรัม
แมกเนเซียมซัลเฟต เฮปตาไฮเดรท	

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

เป็นเวลา 15 นาที

1.7 สูตรอาหารเพื่อการผลิตกรดมะนาว ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แป้งที่ย่อยแล้ว (Dextrose equivalent 86 %)	450 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.5 กรัม
โปตัสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.4 กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.4 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตาไฮเดรท	0.3 กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

2.1 สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

2.1.1 นำโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) มาอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 105 °ซ. นาน 3 ชม. ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (dessicator) แล้วจึงนำมาเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ (คำนวนนอร์มอลที่แน่นอนจากน้ำหนักโซเดียมคาร์บอเนตที่ใช้จริง)

2.2.2 เตรียมกรดเกลือเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ใส่บิวเรตขนาด 50 มล. ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตจากข้อ 2.2.1 ปริมาตร 25 มล.ใส่ขวดรูปทดลองขนาด 250 มล. เติมเมธิลออเรนจ์ (methyl orange) 2-3 หยด เพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์ นำไปติเตรทกับกรดเกลือที่เตรียมไว้ คำนวนความเข้มข้นของกรดเกลือเพื่อเก็บไว้เป็นสารละลายสำหรับเตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน

2.2.3 เตรียมโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่จะใช้เป็นสารละลายมาตรฐานในการติเตรทกับกรดมะนาวเข้มข้น 0.1 นอร์มอล นำไปใส่บิวเรตขนาด 50 มล. ดูดสารละลายกรดเกลือที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนปริมาตร 30 มล.ใส่ขวดทดลองขนาด 250 มล. เติมฟีนอลฟธาลีน 2-3 หยดเพื่อใช้เป็นอินดิเคเตอร์ นำไปติเตรทกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมไว้ คำนวนความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

2.2 การเตรียมสารละลายไทโอยูเรีย

2.2.1 ชั่งไทโอยูเรีย 4 กรัม เติมน้ำปริมาตร 100 มล. (ไทโอยูเรียเข้มข้นร้อยละ 4) ผสมให้เข้ากัน ได้สารละลายใส

2.2.2 ชั่งโซเดียมบอเรท 2 กรัม เติมลงในสารละลายในข้อ 2.2.1 ผสมให้ละลายทั่วกัน ในกรณีที่เกิดตะกอนขาวให้กรอง แล้วนำส่วนใสไปใช้

2.3 การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิค (DNSA reagent)

ละลาย 1 กรัมของกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ปริมาตร 20 มล. เติมน้ำกลั่น 50 มล. เติมโปตัสเซียมตาเตรท ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) 30 กรัม ทำปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มล. ด้วยน้ำกลั่น

3. แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

3.1 ปริมาณไนโตรเจนในสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)
คอร์นสตีปลิเคอร์	2.61 น้ำหนัก ต่อ น้ำหนัก
ผงยีสต์สกัด	11.0 น้ำหนัก ต่อ น้ำหนัก
ผงเนื้อสกัด	12.5 น้ำหนัก ต่อ น้ำหนัก
กากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว	7.94 น้ำหนัก ต่อ น้ำหนัก
สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว	0.43 น้ำหนัก ต่อ ปริมาตร
สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากรำข้าวที่สกัดไขมันแล้ว	0.27 น้ำหนัก ต่อ ปริมาตร

3.2 การเตรียมสารละลายของแหล่งไนโตรเจนย่อยด้วยกรดกำมะถัน

ชั่งกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว ขนาด 0.84 มม. (20 mesh) หรือกากรำข้าวที่สกัดไขมันแล้ว ขนาด 0.42 มม. (40 mesh) หนัก 12 กรัม เติมกรดกำมะถันเข้มข้น 1.0 นอร์มอล ปริมาตร 40 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ. เป็นเวลา 40 นาที สกัด 2 ครั้งด้วยน้ำปริมาตร 50 และ 30 มล. ตามลำดับ ทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 โมลาร์

ตั้งทิ้งไว้จนตกตะกอน กรองและนำส่วนใสไปใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. การเตรียมแป้งมันสำปะหลัง

4.1 การย่อยแป้ง

4.1.1 ชั่งแป้งมันสำปะหลัง 16 กก. เติมน้ำ (deionized water) 30 ลิตร ใส่ถังหมักขนาด 60 ลิตร โดยใช้ใบพัดเฉียง 2 ใบ กวนให้เข้ากัน ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.9 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล

4.1.2 เติมเอนไซม์เทอร์มามิล (termamyl 120 L) ปริมาตร 5.8 มล. กวนด้วยความเร็ว 400 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 90 °ซ. นาน 1 ชม.

4.1.3 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. นาน 15 นาที ทิ้งให้อุณหภูมิเย็นลงถึง 60 °ซ. ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 4.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 4 นอร์มอล

4.1.4 เติมเอนไซม์เอเอ็มจี (AMG 300L) ปริมาตร 10.58 มล. และโปรโมไซม์ (promozyme 200L) ปริมาตร 7.5 มล. กวนด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 60 °ซ. นาน 30 ชม.

4.1.5 ต้มให้เดือดที่อุณหภูมิ 100 °ซ. นาน 10 นาที จากนั้นจึงนำไปกรองผ่านเครื่องกรอง นำเอาส่วนใสไปใช้

4.1.6 ตรวจสอบคุณสมบัติของส่วนใสที่กรองได้จากข้อ 4.1.5 ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid) ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธีพีจีโอเอนไซม์

4.2.1 การเตรียมสารละลายพีจีโอ

นำพีจีโอเอนไซม์ 1 แคปซูล ซึ่งประกอบด้วย กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) 100 หน่วย และบัฟเฟอร์มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 60 มล. เติมสารละลายโอ-ไดอะนิซิดีน (o-dianisidine) เข้มข้นร้อยละ 1 ซึ่งละลายในเอธานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 0.5 มล. เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มล. นำไปใส่ขวดสีชา เก็บไว้ในตู้เย็น

4.2.2 การหาปริมาณกลูโคส

นำสารตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณกลูโคส ปริมาตร 0.25 มล. มาปรับอุณหภูมิให้เป็น 37 °ซ. ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เติมสารละลายพีจีโอเอนไซม์ที่

เตรียมได้จากข้อ 4.2.1 ปริมาตร 2.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. นาน 30 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตร

เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานโดยใช้กลูโคสที่ปราศจากน้ำ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคส และค่าดูดกลืนแสง

4.3 การหาปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid)

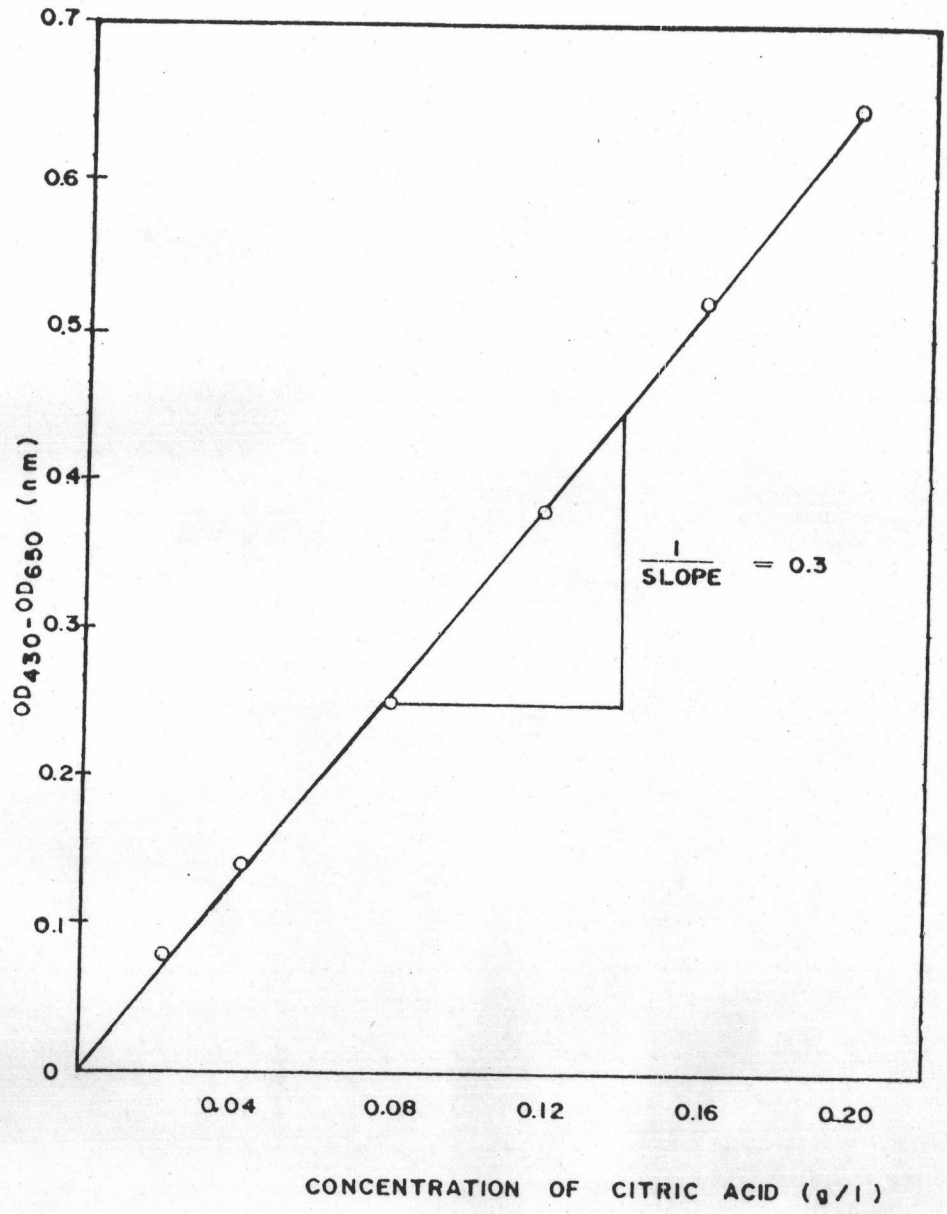
4.3.1 เตรียมอลูมิเนียมฟลอยด์เป็นรูปถ้วย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม. นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 °ซ.จนน้ำหนักคงที่

4.3.2 นำสารตัวอย่างปริมาตร 1.0 มล. ใส่ลงในอลูมิเนียมฟลอยด์ที่ได้จากข้อ 4.3.1 นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 °ซ. เป็นเวลา 12 ชม. นำไปใส่ภาชนะดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักของแข็งทั้งหมด

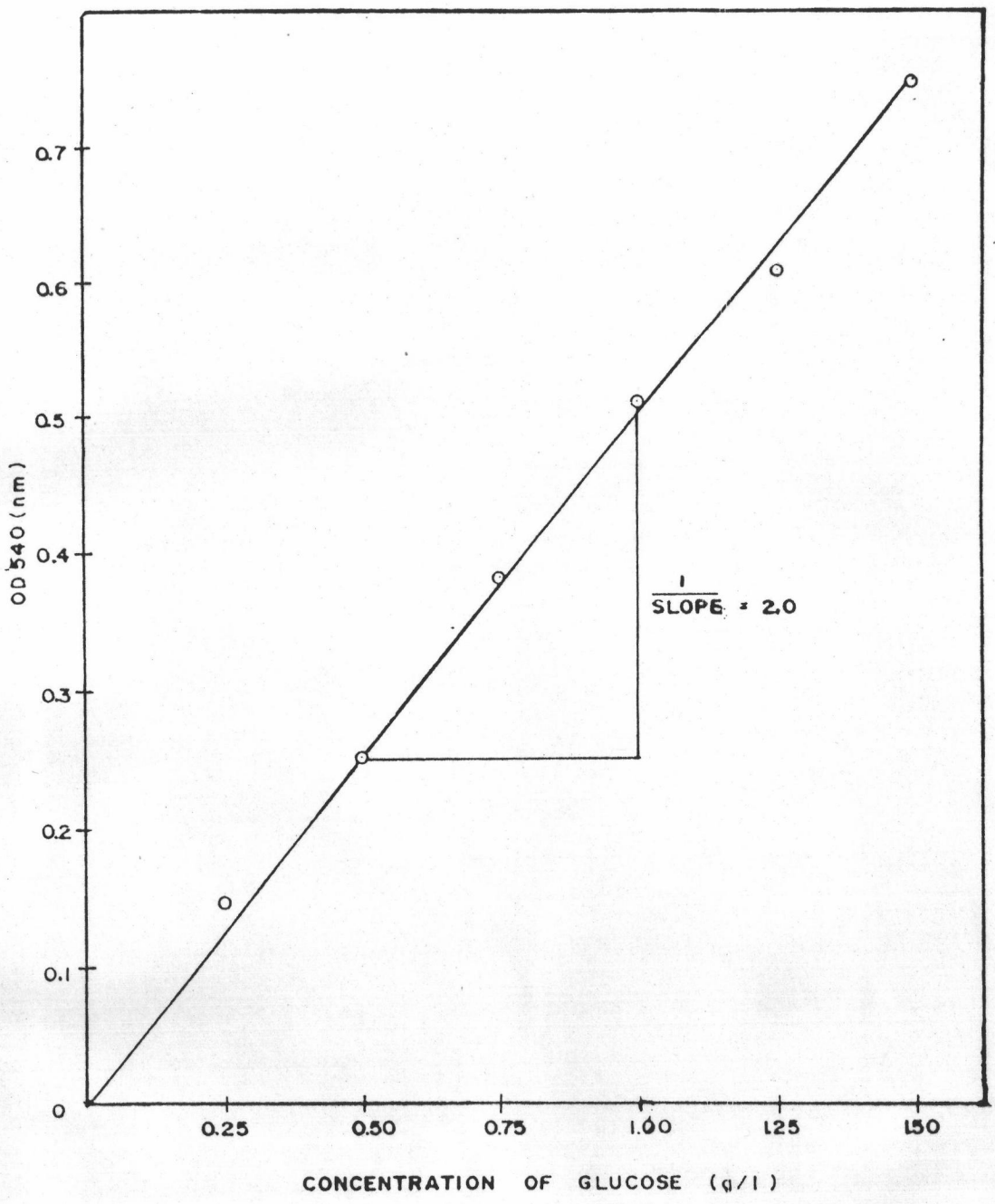
4.4 การคำนวนเด็กซ์โตรสอิควิวาเลนท์

$$\text{เด็กซ์โตรสอิควิวาเลนท์ (Dextrose equivalent)} = \frac{\text{น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)}}{\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (กรัม/ลิตร)}} \times 100$$

5. กราฟมาตรฐานของกรดมะนาวโดยวิธีเพนตาโบรโมอะซิโตน



6. กราฟมาตรฐานของกลูโคสจากการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Bernfeld (26)



ประวัติ

นางสาว ศยามล นองบุญนาก เกิดวันที่ 11 เมษายน พ.ศ. 2507 ได้รับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา จาก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ในปีการศึกษา 2528