การปรับปรุงสายพันธุ์ *Aspergillus niger* WU-2223L โดยการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังโดยวิธีการหมักในอาหารเหลว

นางสาว สุกัลยา ทาโบราณ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-331-207-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 19245217X

STRAIN IMPROVEMENT OF *Aspergillus niger* WU-2223L BY MUTATION TO ENHANCE CITRIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH IN SUBMERGED CULTURE

Miss Sukanlaya Taboran

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974-331-207-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงสายพันธุ์ *Aspergillus niger* WU-2223L โดยการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังโดยวิธีการหมักในอาหารเหลว
โดย	นางสาว สุกัลยา ทาโบราณ
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. สุจิมา รักษาศีล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร. สุจิมา รักษาศีล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สุกัลยา ทาโบราณ : การปรับปรุงสายพันธุ์ *Aspergillus niger* WU-2223L โดยการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังโดยวิธีการหมักในอาหารเหลว. STRAIN IMPROVEMENT OF *Aspergillus niger* WU-2223L BY MUTATION TO ENHANCE CITRIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH IN SUBMERGED CULTURE. อ. ที่ปรึกษา : อ. ดร. สุจิมา รักษาศีล, 119 หน้า. ISBN 974-331-207-2

การปรับปรุงสายพันธุ์ *Aspergillus niger* WU-2223L เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ในระดับขวดเขย่า โดยการกลายพันธุ์อย่างต่อเนื่องระหว่างแสงอัลตราไวโอเลตสลับกับสาร เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (NTG) แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสลดลง แต่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งและกรดเพิ่มขึ้น เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L พบว่าสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกทั้ง 11 สายพันธุ์สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2.7-4.6 เท่า ผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลสได้สูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 1.9-2.7 เท่า แต่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสลดลง 1.3-80 เท่า สายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L สามารถผลิตกรดมะนาวได้ 11.33 กรัมต่อลิตร และมีแอคติวิตีของเอนไซม์กลูโคอะมิเลสและเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเป็น 5.18 และ 0.24 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

จากสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกทั้ง 11 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ MUNU-22 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดเป็น 52.57 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 4.6 เท่า มีแอคติวิตีของเอนไซม์ กลูโคอะมิเลสสูงสุดเป็น 10.99 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2.3 เท่า แต่มีแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสเพียง 0.12 หน่วยต่อมิลลิลิตร ต่ำกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น 2 เท่า เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสายพันธุ์ MUNU-22 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากสายพันธุ์ตั้งต้นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเลี้ยงบนจานอาหาร PDA และในอาหารสูตร SL ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C 826607 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEY WORD: *Aspergillus niger* / CITRIC ACID / GLUCOAMYLASE / CASSAVA STARCH / PROTEASE / MUTATION.

SUKANLAYA TABORAN : STRAIN IMPROVEMENT OF *Aspergillus niger* WU-2223L BY MUTATION TO ENHANCE CITRIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH IN SUBMERGED CULTURE. THESIS ADVISOR: SUGIMA RUGSASEEL, Ph.D. 119 pp. ISBN 974-331-207-2

For enhancement of citric acid production by *Aspergillus niger* from cassava starch in shaking culture, mutation experiments were performed using ultraviolet light and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG). The aimed mutants were induced from *A. niger* WU-2223L, a hyper-producer of citric acid in shaking culture, and selected base on the presumption that they exhibited decrease in protease activity concomitant with enhance in amylolytic activity and acidiogenesis on selective medium plates. Eleven mutants clearly produced higher amounts of citric acid in shake culture containing 70 g cassava/l as a sole carbon source, than did WU-2223L, approximately about 2.7-4.6 times. The mutants exhibited increase in glucoamylase activity but remarkable decrease in protease activity, about 1.9-2.7 and 1.3-80 times as those of WU-2223L, respectively.

A representative mutant MUNU-22 produced 52.57 g citric/l from 70 g cassava/l after 8 days of cultivation in shaking culture, this amount being approximately 4.6 times the amount produced by WU-2223L (11.33 g citric acid/l). Maximum glucoamylase activity in the culture filtrates of strains MUNU-22 and WU-2223L were 10.99 U/ml and 5.18 U/ml, respectively, whereas protease activities were 0.12 U/ml and 0.24, respectively. Different mycelial morphology of MUNU-22 was observed when cultivations were done on both PDA and SL medium, containing cassava as a sole carbon source.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ อ.ดร.สุจิมา รักษาศีล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็น เพื่อแก้ไขปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้น ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ. ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล ที่กรุณารับเป็นประธาน รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบ ให้คำแนะนำ รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สวทช.) ที่ ให้ทุนบัณฑิตศึกษาภายในประเทศและมูลนิธิกระจกอาซาฮีที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2539

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา ทุกๆท่าน ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนที่มีส่วนช่วยเหลือ และให้กำลังใจด้วยดีมาตลอด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณอรอนงค์ พริ้งศุลกะ คุณฉัตรฤดี สุวรรณชาติ คุณจารุรัตน์ เอี่ยมศิริ และคุณอดิศักดิ์ หิรัญรัตนากร

ขอกราบขอบพระคุณ คุณสุนันท์ รังสีกาญจน์ส่อง ที่ช่วยเหลือในด้านการวิเคราะห์ด้วย HPLC

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา พี่สาว รวมทั้ง คุณนัฐพงษ์ พรหมเมตตา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน ทั้งทางด้านกำลังใจและกำลังทรัพย์ แก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ด้วยดีมาโดยตลอดจนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญรูป ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ 1
2. อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย 36
3. ผลการวิจัย 47
4. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย 98

รายการอ้างอิง 101
ภาคผนวก 108
ประวัติผู้เขียน 119

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความสามารถในการละลายน้ำของกรดมะนาว.....	2
2	วัตถุดิบที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตกรดมะนาว.....	13
3	เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์กลูโคอะมิเลส และกรดของ *A. niger* WU2223L เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเมื่อมีการเติมและไม่มีการเติมเพ็บสแตติน.....	51
4	ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของ *A. niger* WU-2223L บนจานอาหารแข็ง.....	54
5	อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสของการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง และกรด ต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี บนอาหารวุ้น SLST และ SLBG ของสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L และสายพันธุ์กลายที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ.....	58
6	เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส กลูโคอะมิเลส อัลฟาอะมิเลสและกรด จากแป้งมันสำปะหลังด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลวของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV กับสายพันธุ์ตั้งต้น *A. niger* WU-2223L.....	60
7	การทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการฉายรังสี UV.....	61
8	อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสของการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง และกรดบนอาหารวุ้น SLST และ SLBG ต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ของสายพันธุ์ WU-2223L กับสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG ที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ.....	63
9	เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส กลูโคอะมิเลส อัลฟาอะมิเลสและกรด จากแป้งมันสำปะหลังด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลวของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำสายพันธุ์ MU-97 และ MU-76 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG กับ *A. niger* WU-22223L	66

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	การทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำให้เกิดกลายพันธุ์ซ้ำด้วย NTG รอบที่ 1.....	69
11	อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง และกรด บนอาหารวุ้น SLST และ SLBG ของบริเวณใส ต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี ของสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำสายพันธุ์ MUN1-5 และ MUN2-61 ให้เกิดการกลายพันธุ์ ด้วย NTG รอบที่ 2 ที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ *A. niger* WU-2223L.....	72
12	เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส กลูโคอะมิเลส อัลฟาอะมิเลส และกรดจากแป้งมันสำปะหลังด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลวของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำสายพันธุ์ MUN1-5 และ MUN2-61 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบ 2 กับ *A. niger* WU-22223L	74
13	การทดสอบความเสถียรของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้เกิดกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 2.....	75
14	อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสของการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง และกรด ต่อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี บนอาหารวุ้น SLST และ SLBG ของสายพันธุ์ *A. niger* WU-2223L กับสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสายพันธุ์ MUN2-61 ด้วยรังสี UV รอบที่ 2 ที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ.....	77
15	เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส กลูโคอะมิเลส อัลฟาอะมิเลส และกรดจากแป้งมันสำปะหลังด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลวของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำสายพันธุ์ MUN2-61 ให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV รอบที่ 2 กับสายพันธุ์ *A. niger* WU-2223L.....	78

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	การทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ MUN2-61 ด้วยรังสี UV.....	79
17	ตารางแสดงสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกและขั้นตอนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์	81
18	แสดงความสัมพันธ์ของขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์กลายจนกระทั่งได้สายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติตามต้องการ.....	82
19	เปรียบเทียบคุณสมบัติเบื้องต้นของสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกกับสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน.....	84
20	เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดจากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันของสายพันธุ์กลายกับสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L	86
21	ผลการเปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่วิเคราะห์โดยวิธีไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัลกับวิธี HPLC	89

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของกรดมะนาว.....	1
2	แสดงวิถีไกลโคไลซีส Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) Pathway.....	6
3	วัฏจักรเครป.....	7
4	แสดงการย่อยภายในโมเลกุลของแป้งด้วยการใช้เอนไซม์อัลฟาอะมิเลส.....	16
5	การเกิด ไทมีน ไดเมอร์ จากการฉายรังสี UV.....	19
6	การซ่อมแซมสายดีเอ็นเอที่ผิดปกติเนื่องจากการฉายรังสี UV ด้วยกระบวนการโฟโตรีแอคติเวชั่น	20
7	การซ่อมแซมสายดีเอ็นเอแบบเอ็กซิชั่น (Excision).....	21
8	การซ่อมแซมสายดีเอ็นเอแบบโพสต์เร็ปพิเคชั่น	22
9	กระบวนการ SOS repair	23
10	ตัวอย่างสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายเบสในดีเอ็นเอ	24
11	คุณสมบัติการแทนที่ดีเอ็นเอเบสของ 5-โบรโมยูราซิล (a) การเกิดพันธะระหว่างโมเลกุล 5-โบรโมยูราซิลในรูปคีโตนกับอะดีนีน (b) การเกิดพันธะระหว่างโมเลกุล 5-โบรโมยูราซิลในรูปอีนอลกับกัวนีน	25
12	การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยกรดไนตรัส (a) การเกิดปฏิกิริยาระหว่างอะดีนีนกับกรดไนตริกได้ไฮโปแซนทีนและการเกิดพันธะระหว่างไฮโปแซนทีนกับไซโตซีน (b) การเกิดพันธะระหว่างไซโตซีนกับกรดไนตริก ได้ยูราซิลและการเกิดพันธะระหว่างยูราซิลกับอะดีนีน	26
13	โครงสร้างทางเคมีของ NTG	27
14	โครงสร้างโมเลกุลของดีเอ็นเอเบสเมื่อทำปฏิกิริยากับ NTG	28
15	แผนภาพแสดงขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งเป็นกรดมะนาวรวมทั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง.....	33

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
16	แสดงบริเวณกรดที่สร้างโดย *A. niger* WU-2223L บนจานอาหารสูตร SL ที่มีกลูโคสเข้มข้น 140 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้โบรโมคลีซอลกรีนเป็นอินดิเคเตอร์	43
17	ปริมาณกรดที่ผลิตโดย *A. niger* WU-2223L เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดต่างๆกัน โดยเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	47
18	แสดงคุณสมัติเบื้องต้นของ *A. niger* WU-2223L เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน	49
19	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ *A. niger* WU-2223L เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL ที่มีเคซีนเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งพลังงานอาหารสูตร SL และในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ที่เวลาต่างๆกัน	52
20	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *A. niger* WU-2223L เมื่อถูกฉายรังสีUV ที่ระยะเวลาต่างๆกันโดยใช้ความหนาแน่นของสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร	55
21	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *A. niger* WU-2223L เมื่อถูกชักนำด้วย NTG ที่ระยะเวลาต่างๆกัน โดยใช้ความหนาแน่นของสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร	56
22	แผนภาพแสดงขั้นตอนในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ต่อสายพันธุ์ตั้งต้น *A. niger* WU-2223L ด้วยรังสี UV และ NTG เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตกรดและเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูงแต่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่ำโดยวิธีการหมักในอาหารเหลวเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด	80
23	ลักษณะโครมาโตรแกรมของกรดมะนาวมาตรฐานที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	88
24	ลักษณะโครมาโตรแกรมของกรดอินทรีย์ที่ได้จากสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L	88

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
25	ลักษณะโครมาโตรแกรมของกรดอินทรีย์ที่ได้จากสายพันธุ์กลายรหัส MUNU-22	88
26	แผนภูมิเปรียบเทียบคุณสมบัติของสายพันธุ์กลาย MUNU-22 กับสายพันธุ์ตั้งต้น WU-2223L เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร SL	91
27	ลักษณะการเจริญของ *A. niger* WU-2223L อายุ 6 วัน บนอาหารวุ้น PDA.....	93
28	ลักษณะการเจริญของ *A. niger* MUNU-22 อายุ 6 วัน บนอาหารวุ้น PDA	94
29	ลักษณะเส้นใยของสายพันธุ์ตั้งต้น *A. niger* WU-2223L เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว นาน 72ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไลต์ไมโครสโคป กำลังขยาย 100 เท่า.....	94
30	ลักษณะเส้นใยของสายพันธุ์กลาย *A. niger* MUNU-22 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิต กรดมะนาว นาน 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไลต์ไมโครสโคป กำลังขยาย100 เท่า.....	95
31	ลักษะเส้นใยของสายพันธุ์ตั้งต้น *A. niger* WU-2223L เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว นาน 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไลต์ไมโครสโคป กำลังขยาย 400 เท่า	95
32	ลักษณะเส้นใยของสายพันธุ์ *A. niger* MUNU-22 เมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว นาน 72 ชั่วโมง ภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ไลต์ไมโครสโคป กำลังขยาย400 เท่า	96
33	กราฟมาตรฐานของปริมาณน้ำตาลรีดิวส์.....	114
34	กราฟมาตรฐานปริมาณแป้ง.....	115
35	กราฟมาตรฐานปริมาณอะไมโลส	116
36	ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดมะนาวมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร...	117
37	ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดมะนาวมาตรฐานที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร...	117
38	ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดมะนาวมาตรฐานที่ความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร...	117
39	ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดมะนาวมาตรฐานที่ความเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร...	117

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
40	ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดมะนาวมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร..	118
41	กราฟมาตรฐานของปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากวิธี HPLC.....	118