รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ดวงพร คันธโชติ. 2537. กรดอินทรีย์จากจุลินทรีย์. จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม: ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ . กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.

นิมล กิจขันธ์.2532. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวในอาหารเหลวโดย *Aspergillus niger*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย. 2538. สัมมนาเรื่องการใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลัง. กรุงเทพมหานคร: โรงแรมอิมพีเรียล.

วราวุฒิ ครูส่ง และ รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. การผลิตกรดซิตริก. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.

สมใจ ศิริโภค. 2537. การปรับปรุงจุลินทรีย์โดยวิธีการทางพันธุศาสตร์. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

ศรสดมภ์ ขัติยะวรา. 2539. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptomyces kanamyceticus* K1 โดยวิธีการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตคานามัยซิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศยามล นองบุญนาก. 2534. การผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังโดย แอสเปอร์จิลัส ไนเจอร์ สายพันธุ์ A 185 ด้วยวิธีการหมักในอาหารเหลว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุวรรณา นพพรพันธุ์. 2538. การปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อผลิตเอนไซม์เดกซ์แทรนเนสของ *Penicillium* sp. สายพันธุ์ 61. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อรพิณ อุดมพงศ์อนันต์. 2533. การผลิตกรดซิตริกโดยยีสต์ด้วยวิธี Submerged Culture Fermentation รายงานผลการวิจัยปริญญาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abe, J., Bergmann, F.W., Obata, K., and Hizukuri, S. 1988. Production of the raw-starch digestion amylase of *Aspergilius* sp. Appl.Microbiol.Biotechol. 27: 447-450

Andrew, J.M. 1952. Effect of alcohols on the mycological production of citric acid in surface and submerged culture. II. Fermentation of crude carbohydrates. Appl. Microbiol. 1: 7-13.

Atlas., R.M. 1995. Principles of microbiology. Missouri: Mosby -Year Book.

Aver, C.J. 1984. Genetics. 2 nd ed. Boston: Willard Grant Press.

Bernfeld, F. 1955. Amylase α and β. In S.P.Colowich and N.O.Kepain(eds.) Method in enzymology. 149. New York: Academic Press.

Bigelis. R., and Arora, D.K. 1992. Organic acids of fungi. Handbook of Applied Mycology volume 4: Fungal Biotechnology. New York: Marcel Dekker.

Brich, G.G., and Blankebrough, N., (eds.) 1981. Enzyme and Food Processing. London: Applied Science.

Calam, C. T.. 1970. Improvement of microorganisms by mutation, hybridization and selection. Method on Microbiology. Vol.3 A. New York: Academic Press.

Casida, L.E. 1964. Industrial Microbiology. New York: John Wiley and Sons.

Cladwell, D.R. 1995. Genetics. Microbial Physiology and Metabolism. USA: Brown Communications.

Clark, D.S., Ito, K., and Horitsu, H. 1966. Effect of managaneses and other heavy metals on submerged citric acid fermentation of molasses. Biotech.Bioeng. 8: 456-471.

Craddock, V.M. 1969. Study of the methylation and lack of determination of deoxyribonucleic acid by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. J. Biochem. 111: 615-620.

Crueger, W., and Crueger, A. 1982. Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology. Sunderland, Mass: Sinauer Associates.

Das, A., and Nandi, P. 1969. Improved production of citric acid from *Aspergillus niger* mutagenic treatment. Indian. J. Exp. Biol. 7: 275-276.

Douglas, M. 1974. Citric acid. Van Nostrand's Scientific Encyclopedia. Van nostrand reinhold company.

Drake, J.W. 1970. The Molecular Basis of Mutation. New York: Holden -Day.

Fantini, A. A. 1975. Strain development. Method in Enzymology. Vol.43. New York: Academic Press.

Fukuda, K., Teramoto, Y., and Kayashida, S. 1992. The hyperdigestion of raw starch by a carbohydrate-rich glucoamylase from a protease and glucoamylase-negative mutant of *Aspergillus awamori* var *kawachi* F-2035. J.Biosci. Biotech.Biochem. 56: 8-12.

Gaden, E. L. 1955. Fermentation kinetics and productivity. Chem. Ind. 12: 154-165.

Gardner, J. F., James, L. V., and Rubbo, S. D. 1956. Production of citric acid by mutants of *A. niger*. J. Gen. Microbiol. 14: 228-237.

Goodenough, U. 1984. Genetics. USA: CBS College Publishing.

Hannan, M. A., Rabbi, F., Rahman, A. T. M. S., and Choudhury, N. 1973. Analysis of some mutant of *Aspergillus niger* for citric acid production. J. Ferment. Technol. 50: 606-608.

Hayashida, S., and Flor, P.Q. 1981. Raw starch digestive glucoamylase productivity of protease-less mutant from *Aspergillus awamori* var *kawachi*. Agric. Biol.Chem. 45: 2672-2681.

Hayashida, S., and Teramoto, Y. 1986. Production and characteristics of raw-starch-digesting α-amylase from a protease-negative *Aspergillus ficum* mutant. Appl. Envi. Microbiol. 52: 1068-1073.

Hopwood, D.A., Wright, H.M., Bibb, M.J., and Cohen, S.N. 1977. Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*. Nature. 268: 171-174.

Hopwood, D.A.1970. The Isolation of mutant. Method in Microbiology. USA: Academic Press.

James, L.V., Rubbo, S.D., and Gardener, J.F. 1956. Isolation of high acid-yielding mutant of *A. niger* by a paper culture selection technique. J. Gen Microbiol. 14: 223-228.

Jernejc, K., Cimerman, A., and Perdih, A. 1982. Citric acid production in chemical defined media by *Aspergillus niger*. Eur. J. Appl. Micro. Biotech. 14: 29-33.

Johdo, O., Ishikura, T., and Yoshimoto, A. 1991. Anthracycline metabolism from *Streptomyces violaceus* A262 : Isolation of antibiotic- blocked mutant from *Streptomyces violaceus* A262. J. Antibiotics. 44: 1110-1120.

Kirimura, K., Nakajima, I., Pyo Lee, S., Kawabe, S., and Usami, S. 1988. Citric acid production by the diploid strains of *Aspergillus niger* obtained by protoplast fusion. Appl. Micro. Biotech. 27: 504-506.

Kirk, O. 1964. Encyclopedia of chemical, citric acid. 2^{ad} ed. New York: John Wiley and Sons.

Kubicek, C.P., and Rohr, M. 1984. Citric acid fermentation. CRC Critical Reviews in Biotechnology. 3: 331-373

Lefuji, H., Limura, Y., and Obata, T. 1987. Isolation and characterization of yeast *Cryptococcus* sp. S-2 that produce raw starch digesting α-amylase, xylanase, and polygalacturonase. Biosci. Biotech. Biochem. 58: 2261-2262.

Legisa, M., Cimerman A., and Sterle, M. 1981. Germination of *Aspergillus niger* in a high citric acid yielding medium. FEMS Microbiol Lett.11: 149-152.

Lovrien, R. E., Gusek, T., and Hart, B. 1985. Cellulase and protease specific activities of commercially available cellulase preparation. J. Appl. Biochem. 7: 258-272.

Mc Dermott, E.E. 1980. The rapid non-enzymic determination of damaged starch in flour J. Sci. Food Agric. 31: 405-413.

Mckay, A.F., and Wright, G.F. 1947. Preparation and properties of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. J. Am. Chem. Soc. 69: 3028-3030.

Menlo,P. 1981. Citric Acid. Chemical Economics Handbook. USA: California.

Michael , J., Pelzar, Jr.,Chan, E.C.S., and Krieg, N.R. 1993. Microbiology Concept and Applications. USA: Mc.Graw-Hill.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.

Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. USA: Cold Spring Harbour Lab.

Milsom, P.E. and Meer, J.L. 1985. Citric acid. In M. Moo-young(ed.). Comprehensive Biotechnology: The Practice of Biotechnology: New York: Peramon Press.

Moyer, A.J. 1953. Effect of alcohols on the mycological production of citric acid in surface and submerged culture fermentation of crude carbohydrate. Appl. Microbiol. 1: 8-13.

Murase, L. M. T., Astolfi, S., and Oliver, S. G. 1995. Development of yeast strains for the efficient utilization of starch, evaluation of constructs the express α-amylase and glucoamylase separately or as bifunctional fusion proteins. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 1067-1076.

Musikova, M., Fencel, Z., Ujcova, E., and Setchert, L. 1978. Variability of *Aspergillus niger* after treatment with N-methyl-N′-nitro-N′-nitrosoguanidine. Folia. Microbiol. 23: 103-107.

Nishio, N., and Kamikubo, T. 1971. Utilization of hydrocarbon by microorganisms. Agri. Biol. Chem. 35: 485-490.

Osman, E.M. 1965. Starch in Food Industry. In R.L., Whistler and E.F., Paschal.(ed.), Starch: Chemistry and Technology. Vol. 2, pp. 163-215. New York:Academic Press.

Peat, S. 1954. The biologocal Function of Starch. In J. A., Radley(ed.), Starch and Its Derivative, pp. 5-24. New York:John Willey&Son.

Perlman, D., and Sih., C.F. 1960. Fungal synthesis of citric, fumaric, itaconic acids. Progress in Industrial Microbiology. New York: Interpublishers.

Perlman, D., Dorrell, W.W., and Johnson, M.J. 1946b. Effect of metallic ions on the production of citric acid by *A. niger*. Arch. Biochem. 1: 131-143.

Prescott, S. C., and Dunn, C. G. 1959. The citric acid fermentation. Industrial Microbiology. 3rd ed. New York: Mc Graw Hill.

Redei, E.G. 1982. Genetics. New York: Macmillan.

Rohr, M., and Kubicek, C.P. 1980. Citric acid. A comprehensive treatise in biotechnology. 3: 420-454

Rohr, M., Kubicek, C.P., and Kominek, J. 1983. Citric acid. Biotechnology. 3. Basel: Verlag Chemie.

Ronald , M.A. 1995. Principles of Microbiology. Missouri: Mosby-Year Book.

Rugsaseel, S., Korimura, K., and Usami, S. 1993. Selection of mutants of *Aspergillus niger* showing enhanced productivity of citric acid from starch in shaking culture. J. Ferment and Bioeng. 75: 226-228.

Rugsaseel, S., Morikawa, S., Kirimura, K., and Usami, S. 1995. Stimulation of citric acid production in *Aspergillus niger* by addition of viscous substances in shake culture. Appl. Micro. Biotech. 42: 839-843.

Saha, B. C., Mitsue, T., and Ueda, S. 1979. Glucoamylase produced by submerged culture of *Aspergillus oryzae*. Starch. Starke. 31: 307-314.

Sarangbin, S., Morikawa, S., Kirimura, K., and Usami, S. 1994. Formation of autodiploid in *Aspergillus niger* and their application to citric acid production from starch strain. J. Ferment. Bioeng. 75: 474-478.

Shu, P., and Johnson, M.J. 1948. Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger* . Ind. Eng. Chem. 40: 1202-1205.

Sikyta, B. 1983. Culture equipment. Method in Industrial Microbiology. England: Ellis Horwood.

Singleton, P., and Sainbury, D. 1988. Dictionary of microbiology and molecular biology. 2nd ed. Singapore: John Wiley & Son.

Sinha, U., and Chattoo, B.B. 1975. Biological effect of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. J. of Scientific & Industrial Research. 34: 499-505.

Smith, P., and Keary, P. 1991. Molecular genetic. New York: Macmillan.

Sodeck, G., Modl, J, Kominek, J., and Salzburnn, W. 1981. Production of citric acid according to the submerged fermentation process. Process Biochem. 16: 9-11.

Strickberger, M.W. 1985. Genetics. 3nd ed. New York: Macmillan.

Swinkles, J.J.M. 1983. Differences Between Commercial Native Starch. Arebe b.a. International Marketing and Sales, Foxhol.

Tomonaga, G. 1968. Effect of nystatin on the formation of extracellular protease by *Aspergillus niger*. J. Gen Appl. Microbiol. 14: 163-170.

Ujcova', E., Fencl, Z., Musi'lkova', M., and Seichert, L. 1980. Dependence of release of nucleotides from fungi on fermentor turbine speed. Biotechnol. Bioeng. 22: 237-241.

Usami, S. 1978. Production of citric acid by submerged culture. Memoirs of the school of science & engineering waseda univ. 42: 17-26.

Usami, S., and Taketomi, N. 1960. Production of citric acid by submerged fermentation of acid hydrolysate of sweet potato starch. Kogyo Kagaku Zasshi (in Japanese) 63: 1602-1605.

Voraputhaporn, W., Yoshida, T., and Tagechi, H. 1985. The Production of citric acid from starch in submerged culture of *Aspergillus niger*. Annual Reports of IC Biotech. 8: 269-278.

Wagner, R.P., Judd, B.H., Sanders, B.G., and Richardson, R.H. 1980. Introduction to Modern Genetics. New York: John Wiley & Sons.

Wehmer, C. 1903. Chemische Wirkung der Aspergillaceae. Fisher: Verlag Gustav.

Whitaker, J.R. 1972. Principles of Enzymology for Food Science. New York: Academic Press.

Wold, W.S.M., and Suzuki, I. 1976. The citric acid fermentation by *A. niger* regulation by zinc of growth and acidogenesis. Can. J. Microbiol. 22: 1083-1100.

Wongwicharn, A., Yohida, T., and Tagochi, H. 1987. 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.

Wurzburg, O.B. 1972. Starch in Food Industry. In T.E.,Furia(ed.) CRC Hanbook of Food Additives, pp. 361-365. New York: CRC press.

Yamada, K., and Yogo, M. 1970. Studies on the utilization of hydrocarbons by microorganisms. Agri. Biol. Chem. 34: 296-301.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1 Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

นำมันฝรั่งมาปลอกเปลือก แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆรูปลูกบาศก์ ชั่งน้ำหนัก 200 กรัม แล้วนำไปต้มในน้ำกรอง ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ให้เดือดนาน 10 นาที กรองเอาเฉพาะส่วนน้ำ เติมส่วนผสมอื่นๆแล้วเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2 อาหารสูตร SL

กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)	120	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	3	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(KH_2PO_4)	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต($MgSO_4.7H_2O$)	500	มิลลิกรัม
เฟอริกคลอไรด์($FeCl_3$).$6H_2O$	10	มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟต($MnSO_4$)	14	มิลลิกรัม

เติมน้ำกลั่นจนปริมาตร 1 ลิตร แล้วปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 4.25 จากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน

3 อาหาร SLST

ใช้สูตรอาหารเช่นเดียวกับอาหารสูตร SL แต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากกลูโคส เป็นแป้งมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร ที่เตรียมตามวิธี ของ Lefuji และคณะ (1987) จากนั้นนำไปผสมกับอาหารสูตร SL ที่มีวุ้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดเชื้อ โดยขณะผสมอุณหภูมิของอาหารควรอยู่ประมาณ 45 องศาเซลเซียส เมื่อผสมเป็นเนื้อเดียวกับแล้วตวงอาหารลงบนจานให้มีปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อจาน

4 อาหาร SLBG

ใช้สูตรอาหารเช่นเดียวกับอาหารสูตร SL แต่เปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากเดิมใช้กลูโคส 120 กรัมต่อลิตร เป็นใช้กลูโคส 140 กรัมต่อลิตรแทนและเติมวุ้น 2 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งเติม 0.4 เปอร์เซ็นต์โบรโมคลีซอลกรีน (bromocresal green) เป็นอินดิเคเตอร์ หลังจากฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทอาหารโดยการตวง ให้ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อจาน

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1 ฟีนอล์ฟทาลีน

ฟีนอล์ฟทาลีน	1 กรัม
95 เปอร์เซ็นต์ เอธิลแอลกอฮอล์	75 มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายผงฟีนอล์ฟทาลีน 1 กรัม ใน 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร โดยการเติมน้ำกลั่น

2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล

โซเดียมไฮดรอกไซด์	4.0 กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1000 มิลลิลิตร

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหาค่าความเข้มข้นที่แท้จริงโดยใช้สารละลายมาตรฐานปฐมภูมิโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท ($HKC_8H_4O_4$) โดยนำไปอบ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งให้มีน้ำหนักที่แน่นอน ระหว่าง 2.0-2.4 กรัม นำมาละลายในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปไตรเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียมไว้โดยใช้ โพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลท 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร และมีฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เตรียม

3 อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.9

นำสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 4.8 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 45.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 40 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 5.9 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มิลลิลิตร

4 อะซิเตทบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5

ผสมสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 8.8 มิลลิลิตร กับ สารละลายโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 41.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 5.5 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มิลลิลิตร

5 ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 5.5

นำสารละลายของกรดซิตริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 21 มิลลิลิตร ผสมกับ สารละลายไดเบสิกโซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 29 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 40 มิลลิลิตร จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.5 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6 สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA)

กรดไดไนโตรซาลิไซลิก	1	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	2	โมลาร์
โปแตสเซียมโซเดียมตาร์เตรท	30	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย 1 กรัม ของกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโพแทสเซียมตาร์เตรต 30 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บรักษาในขวดสีชา

ภาคผนวก ค

การเตรียมและป้องกันอันตรายจากสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

1 รังสีอัลตราไวโอเลต (UV light)

รังสี UV เป็นรังสีที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์ ซึ่งอาจทำให้เกิดมะเร็งที่ผิวหนังได้ ขณะที่ปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับรังสี UV ควรมีการสวมแว่นเพื่อป้องกัน ห้ามมองหลอด UV โดยตรงเพราะเป็นรังสีที่อันตรายต่อสายตา ควรมีการสวมแว่นเพื่อป้องกัน หรือใช้รังสี UV ที่อยู่ภายในตู้เขี่ยเชื้อที่มีกระจกกั้น หากจำเป็นต้องทำงานภายใต้รังสี UV ควรสวมถุงมือป้องกัน เนื่องจากรังสี UV ผ่านกระจกได้ไม่ดี ดังนั้น เชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการฉายรังสี UV เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ จะต้องเปิดฝาจานเพาะเลี้ยงเชื้อไว้ขณะที่ฉายรังสี

2 สารเคมี NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)

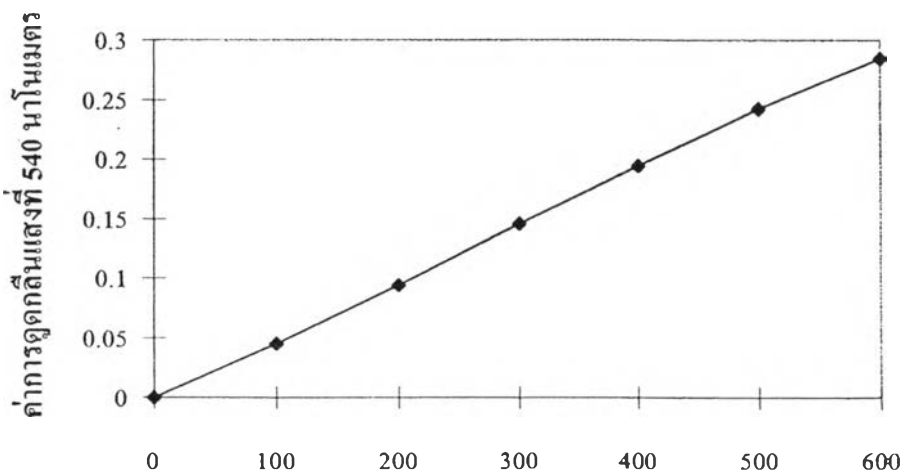
สาร NTG เป็นสารอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต และเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ดังนั้นในการทดลอง ผู้ทำการทดลองจึงต้องทำด้วยความระมัดระวัง NTG เป็นสารที่อันตรายต่อการสัมผัส การสูดดม การทดลองเกี่ยวกับ NTG ทั้งที่เป็นผลึกของแข็งหรือที่เป็นสารละลาย ควรสวมถุงมือยางป้องกันตลอดเวลา ควรสวมผ้าปิดปากเพื่อป้องกันละอองหรือ ไอระเหย การชั่ง NTG ควรทำในที่ไม่มีลมพัด ไม่ควรชั่งบนกระดาษ เพราะอาจทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ทดลองหรือผู้อื่นที่อยู่บริเวณใกล้เคียง ห้ามเปิดขวดที่ใส่ NTG ทิ้งไว้ ควรใช้หลอดปลอดเชื้อที่แห้งและมีฝาปิด ชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าก่อน แล้วจึงตัก NTG ลงในหลอด ปิดฝาหลอดแล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง ซึ่งจะทำให้ทราบน้ำหนักของ NTG ในการทดลองควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง

อุปกรณ์ทุกชนิดที่สัมผัสกับสาร NTG นำไปแช่ใน 1 นอร์มัล โซเดียมไฮดรอกไซด์ในตู้ควัน เปิดเครื่องให้ดูดควันออก ทิ้งไว้ 24 ชั่งโมง จึงนำมาล้างและควรสวมถุงมือในการล้างด้วย ควรแยกเครื่องแก้วเพื่อใช้ทดลองเฉพาะกับสาร NTG เท่านั้น

ภาคผนวก ง

1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีกรดไดไนโตซาลิไซลิก ของ Miller (1959)

โดยนำสารละลายที่ต้องการวิเคราะห์ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบ เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นในอ่างน้ำเย็น เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากันนำส่วนผสมนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กราฟมาตรฐานใช้น้ำตาลกลูโคส ที่ความเข้มข้น 100-600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 33

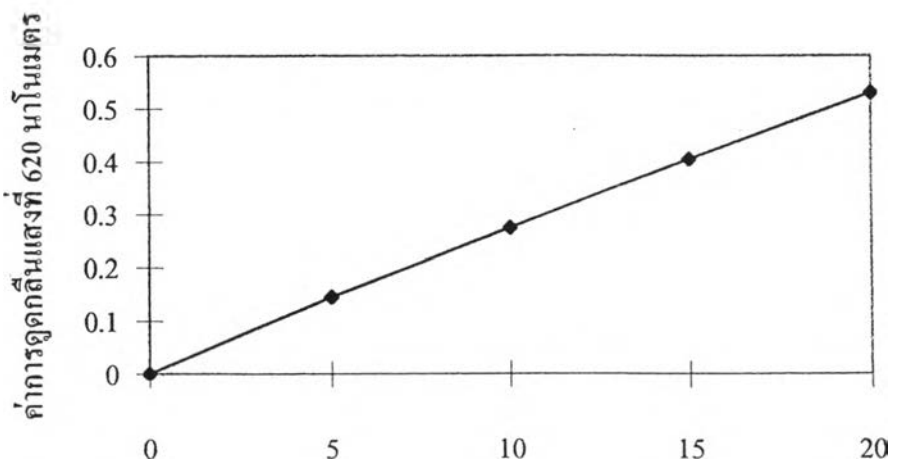


ความชัน = 4.83×10^{-4}

รูปที่ 33 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์

2 กราฟมาตรฐานปริมาณแป้งโดยวิธีของ Murase (1995)

เตรียมสารละลายแป้งให้มีความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร ละลายในโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ นำน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายแป้งที่เตรียมไว้ดังกล่าวข้างต้น 1 มิลลิลิตร แล้วนำส่วนผสมที่ได้ข้างต้นปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายไอโอดีน 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 34

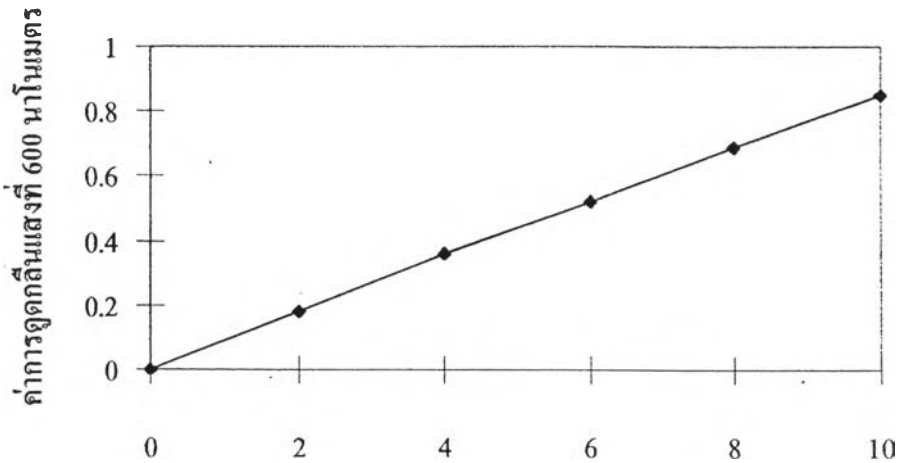


ความชัน = 2.817

รูปที่ 34 กราฟมาตรฐานของแป้ง

3 กราฟมาตรฐานอะไมโลสโดยวิธีการของ Mc.Dermott (1980)

เตรียมสารละลายอะไมโลส ให้มีความเข้มข้น 1-8 กรัมต่อลิตร แล้วใช้สารละลายอะไมโลสที่เตรียมได้แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาเติมน้ำ 7.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายไอโอดีน 0.5 มิลลิลิตร (0.2 เปอร์เซ็นต์ ไอโอดีน และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ โปตัสเซียมไอโอไดด์ ละลายในน้ำกลั่น) บ่มที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส อีกครั้งนาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร นำผลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 35

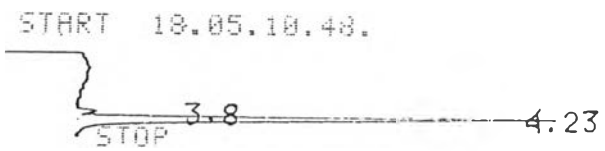


ความชัน = 0.085

รูปที่ 35 กราฟมาตรฐานปริมาณอะไมโลส

4 กราฟมาตรฐานปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากวิธี HPLC

นำกรดมะนาวมาตรฐาน ละลายในน้ำปลอดประจุ ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดมะนาว ด้วยเครื่อง HPLC ตามภาวะในวิธีการทดลองข้อ 7 นำพบว่าโครมาโตแกรมของกรดมะนาวมาตรฐานเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 36-40) จะปรากฏแท่งกราฟที่เด่นชัด ณ เวลา 4.23 4.23 4.21 4.21 และ 4.19 นาที โดยมีพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 34,839 68,731 99,552 132,694 และ 166,142 ตามลำดับ นำผลที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน ได้ผลดังรูปที่ 41

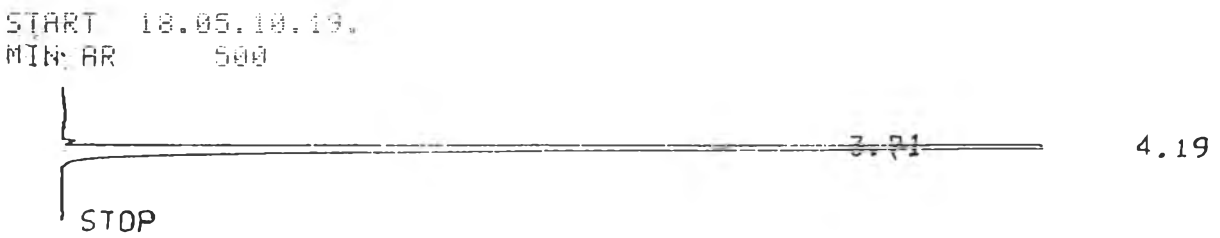


รูปที่ 36 ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดมะนาวมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร

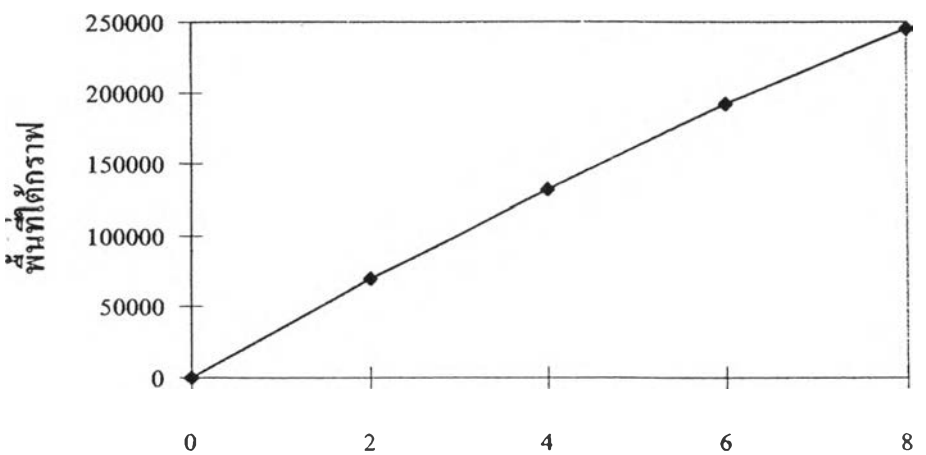
รูปที่ 37 ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดมะนาวมาตรฐานที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร

รูปที่ 38 ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดมะนาวมาตรฐานที่ความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร

รูปที่ 39 ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดมะนาวมาตรฐานที่ความเข้มข้น 8 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 40 ลักษณะโครมาโตแกรมของกรดมะนาวมาตรฐานที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร



ความชัน = 1.6×10^4

รูปที่ 41 กราฟมาตรฐานของปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากวิธี HPLC

$$\text{ปริมาณกรดมะนาว} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟ}}{\text{ความชัน}}$$

ประวัติ

นางสาว สุกัลยา ทาโบราณ เกิดวันที่ 9 พฤษภาคม 2513 ที่จังหวัดเลย ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2532 จากนั้นเข้ารับราชการที่ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นเวลา 2 ปี และเข้าทำการศึกษาต่อที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้เคยไปแสดงผลงานในการประชุมวิชาการ ของสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทยในหัวข้อเรื่อง **เทคโนโลยีชีวภาพ : กลไกเพื่อการพัฒนา?** ณ. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ระหว่างวันที่ 19-22 พฤศจิกายน 2540