รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เชาวรีย์ เรืองวิไลทรัพย์. 2539. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* NN-39. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประเสริฐ หาญเมืองใจ. 2537. การผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยยีสต์ *Candida oleophila* C-73. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พระราชบัญญัติมาตรฐานอุตสาหกรรม (กรดซิตริก) พ.ศ. 2535. ราชกิจจานุเบกษา 109 (15 ธันวาคม 2535): 2.

เรวดี เลิศไตรลักษณ์. 2535. กรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟินส์โดยการหมักในอาหาร ด้วยยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ. 2539. การกลายพันธุ์และคัดเลือกสายพันธุ์ *Candida oleophila* NNU-48 สำหรับผลิตกรดมะนาวที่อุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมศักดิ์ นาคซื่อตรง. 2537. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Candida oleophila* C-73 เพื่อผลิตกรดมะนาว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. 2534. "กรดซิตริก" วารสารคณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์ ปีที่ 5 ฉบับที่ 3 (ตุลาคม): 405-423

ภาษาอังกฤษ

Abou-Zeid, A.A., and Ashy, M.A. 1984. Production of citric acid : A review. Agricultural Waste 9(1): 51-76.

Bernfeld, P. 1955. Amylase, α and β. In S.P. Colowick, and O.N. Kaplan(eds.), Method in Enzymology, Vol. 3, pp. 149-150. New York: Academic Press.

Bouchard, E.F., and Merritt, E.G. 1979. Citric acid. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 6: 150-177.

Cartledge, T.G. 1987. Substrate Utilization, Non-carbohydrate Substrate. In Berry, D.R., Russel, I. and Stewart, G.G.(eds), Yeast Biotechnology, 331-342. London: Allen and Unwin.

Cote, R. 1989. Media Formulation. Cataloque of Bacteria & Bacteriophage. (17th. ed.) 312. Rockville, Maryland: American Type Culture Collection.

Ermakova, I.T., Shishkanova, N.V., Melnikova, O.F., and Finogenova, T.V. 1986. Properties of *Candida lipolytica* mutants with the modified glyoxylate cycle and thier ability to produce citric and isocitric acid I. Physiological, biochemical and cytological characteristics of mutants grown on glucose and hexadecane. Applied Microbiology and Biotechnology 23(5): 372-377.

Finogenova, T.V., Shishkanova, N.V., Ermakova, I.T., and Kataeva, I.A. 1986. Properties of *Candida lipolytica* mutants with the modified glyoxylate cycle and thier ability to produce citric acid and isocitric acid. Applied Microbiology and Biotechnology 23: 378-383.

Fukuda, H., Suzuki, T., Akiyama, S., and Sumino, Y.1972. Method for producing citric acid. US Patent 3,689,359.

Furukawa, T., Matsuyoshi, T., Minoda, Y., and Yamada, K. 1977. Fermentative production of citric acid from n-paraffins by yeast. Journal of Fermentation Technology 55(4): 356-363.

Goldberg, I., Peleg, Y., and Rokem, J.S. 1991. Citric, fumaric and malic acids. In I. Goldberg and R. Williams (eds.), Biotechnology and Food Ingredients, pp. 349-358. New York: Van Nostrand Reinhold.

Grewal, H.S., and Kalra, K.L. 1995. Fungal production of citric acid. Biotechnology Advances 13(2): 209-234.

Huggett, A.G., and Nixon, D.A. 1957. Enzymatic determination of blood glucose. Biochemical Journal 66(1): 12.

Ikeno, Y., Masuda, M., Tanno, K., Oomori, I., and Akahashi, N. 1975. Citric acid production from various raw materials by yeasts. Journal of Fermentation Technology 53(10): 752-756.

Kamzolova, S.V., Shishkanova, N.V., Il' chenko, A.P., Dedyukhina, E.G., and Finogenova, T.V. 1996. Effect of iron ions on biosynthesis of citric and isocitric acids by mutant *Yarrowia lipolytica* N1 under conditions of continuous cultivation. Applied Biochemistry and Microbiology 32(1): 35-38.

Kimura, K. and Nakanishi, T. 1975. Production of citric acid, isocitric acid and microbial cells by fermentation. US Patent 3,873,424.

Kubicek, C.P., and Rohr, M. 1986. Citric acid fermentation. Critical Reviews in Biotechnology 3(4): 331-373.

Marison, W. 1988. Citric acid production. In A.H. Scragg (ed.), Biotechnology for Engineer: Biological Systems in Technological Process, pp. 322-336. New York: John Wiley & Sons.

Maldonado, P., Charpenter, M., and Glikmans, G. 1976. Chemical Process. US Patent 3,996,106.

Mattey, M. 1992. The production of organic acids. Critical Reviews in Biotechnology 12(1/2): 87-132.

Mckay, I.A., Maddox, I.S., and Brooks, J.D. 1994. High specific growth rate of glucose utilisation under conditions of restricted growth are required for citric acid accumulation by *Yarrowia lipolytica* IMK2. Applied Microbiology and Biotechnology 41: 73-78.

Miall, L.M. 1978. Citric acid. In M. Moo-Young(ed.), Comprehensive Biotechnology, Vol. 3, pp. 665-681. London: Pergamon Press.

Miller, G.L. 1958. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 30: 426-428.

Milsom, P.E., and Meers, J.R. 1985. Citric acid. In Moo-Young, M.(ed). Comprehensive Biotechnology. vol 3. pp. 665-681. London. Pergamon press.

Moresi, M., Cimarelli, D., Gasparrini, G., Liuzzo, G., and Marinelli, R. 1980. Kinetics of citric acid fermentation from n-paraffins by yeasts. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 30: 266-277.

Nakanishi, T., Yamamoto, H., Kimura, K., and Tanaka, K. 1972. Fermentative production of citric acid from n-paraffins by yeasts. Journal of Fermentation Technology 50(12): 855-867.

Nubel, R.C., and Wantagh, N.Y. 1977. Production of citric acid in slack wax media. US Patent 4,014,742

Oomori, I., and Suzue, K., 1973. Process for producing citric acid. US Patent 3,732,145

Prescott, S.C., and Dunn, C.G. 1983. The citric acid fermentation. Industrial Microbiology. 3rd ed. New York: McGraw-Hill.

Rane, K.D., and Sims, K.A.1993. Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y1095: Effect of glucose concentration on yield and productivity. Enzyme Microbiology & Technology. 15: 646-651.

Sardinas, J.L., and Conn, F.G. 1973. Fermentation process for the production of citric acid. US Patent 3,708,399.

Shah, D.N., Chatto, `B.B., Kothari, R.M., and Hegde, M.V. 1993. Starch hydrolysate, an optimal and economical source of carbon for the secretion of citric acid by Yarrowia lipolytica (DS-1). Starch/Starke 45(3): 104-109.

Sikyta, B., 1983. Method in industrial Microbiology. Chichester : Ellis Horwood Limited.

Singleton, P., and Sainsbury, D. 1988. Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2 nd ed. Singapore: John Wiley & Sons.

Sokolov, D.M., Solodovnikova, N.Y., Sharyshev, A.A., and Finogenova, T.V. 1996. The role of phosphofructokinase in the regulation of citric acid biosynthesis by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Applied Biochemistry and Microbiology 32(3): 286-290.

Stern, R.J. 1957. Assay of tricarboxylic acids. In S.P. Colowick, and O.N. Kaplan (eds.), Method in Enzymology, Vol. 3, pp. 425-428. New York: Academic Press.

Suzuki, T., Sumino, Y., Akiyama, S., and Fukuda, H. 1974. Method for producing citric acid. US Patent 3,801,455.

Takayama, K., Adachi, T., Kohata, M., Hattori, K. and Tomiyama, T. 1975. Process for the production of citric acid. US Patent 3,926,724

Tanaka, K., Kimura, K., and Yamaguchi, K. 1968. Production of Citric Acid. Chemical Abstract vol. 69 No. 95103x.

Wojtatowicz, M., Marchin, G.L., and Erickson, L.E. 1993. Attempts to improve strain A-101 of *Yarrowia lipolytica* for citric acid production from n-paraffins. Process Biochemistry 28: 453-460.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (Brain Heart infusion : BHI) (Difco)

1.1 อาหารเหลว BHI

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

Calf Brains	200.00	กรัม
Beef Heart	250.00	กรัม
Proteose Peptone, Difco	10.00	กรัม
Bacto Dextrose	2.00	กรัม
Sodium Chloride	5.00	กรัม
Sodium Phosphate, Dibasic	2.50	กรัม
p-Aminobenzoic Acid	0.05	กรัม

เตรียมโดย ละลายอาหาร BHI สำเร็จรูป 37 กรัมในน้ำ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ใส่อาหารเหลว BHI ปริมาตร 50 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.2 อาหารวุ้นแข็งลาดเอียง BHI

เติมวุ้นผง ปริมาณ 15 กรัม ลงในสูตรอาหารเหลวข้อ 1.1 ปริมาตร 1ลิตร ต้มให้วุ้นละลาย ปิเปตต์อาหารลงในหลอดทดลองขนาด 16x150 ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ปิดจุก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองมาวางเอียง ผิวหน้าของอาหารจะมีความยาวประมาณ 12 เซ็นติเมตร เมื่ออาหารแข็งตัว ตั้งทิ้งไว้ 2 วันก่อนนำไปใช้

1.3 อาหารเหลว Nutrient Broth (NB)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

Beef Extract	3.00	กรัม
เพปโทน	5.00	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 7 ด้วย 1 N HCl และ 1 N NaOH

1.4 อาหารวุ้นแข็งลาดเอียง Nutrient Agar (NA)

เติมวุ้นผง ปริมาณ 15 กรัม ลงในสูตรอาหารเหลวข้อ 1.3 ปริมาตร 1 ลิตรต้มให้วุ้นละลาย ปิเปตต์อาหารลงในหลอดทดลองขนาด 16x150 ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ปิดจุก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองมาวางเอียง ผิวหน้าของอาหารจะมีความยาวประมาณ 12 เซ็นติเมตร เมื่ออาหารแข็งตัว ตั้งทิ้งไว้ 2 วันก่อนนำไปใช้

1.5 อาหารเหลว NB ที่ได้รับการปรับปรุงแล้ว

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

Beef Extract	3.00	กรัม
เพปโทน	5.00	กรัม
กลูโคส	5.00	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 7 ด้วย 1 N HCl และ 1 N NaOH

1.6 อาหารเหลวสูตร Bacillus Medium (BM)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต	1.30	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.37	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.25	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.07	กรัม
เฟร์ริกคลอไรด์	0.02	กรัม
กลูโคส	1.00	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.00	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็น 7 ด้วย 1 N HCl และ 1 N NaOH

1.7 อาหารเหลวสูตร BM ที่ได้รับการปรับปรุงเพื่อใช้เตรียมหัวเชื้อ

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต	1.30	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.37	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.25	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.07	กรัม
เฟร์ริกคลอไรด์	0.02	กรัม
กลูโคส	5.00	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	4.00	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7 ด้วย 1 N HCl และ 1 N NaOH

1.8 อาหารวุ้นแข็งลาดเอียงสูตร Bacillus medium(BM)

เติมวุ้นผง ปริมาณ 15 กรัมลงในสูตรอาหารเหลวข้อ 1.7 ปริมาตร 1 ลิตร ต้มวุ้นให้ละลาย ปิเปตต์อาหารลงในหลอดทดลองขนาด 16x150 ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ปิดจุก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองมาวางเอียง ผิวหน้าของอาหารจะมีความยาวประมาณ 12 เซ็นติเมตร เมื่ออาหารแข็งตัว ตั้งทิ้งไว้ 2 วันก่อนนำไปใช้

2. <u>อาหารสูตรสำหรับการผลิตกรดมะนาว</u>

อาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวที่กล่าวไว้ข้างล่างนี้ จะเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยที่ต้องการศึกษา โดยเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่อาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดันไอ 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

2.1 อาหารพื้นฐานสำหรับการผลิตกรดมะนาวสูตร BM

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต	1.30	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.37	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.25	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.07	กรัม
เฟร์ริกคลอไรด์	0.02	กรัม
กลูโคส	100.00	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	4.00	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	50.00	กรัม

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับศึกษาการผลิตกรดมะนาวเมื่อมีน้ำตาลที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต	1.30	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.37	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.25	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.07	กรัม
เฟร์ริกคลอไรด์	0.02	กรัม
แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย		
ด้วยเอนไซม์แล้ว มีน้ำตาลกลูโคส	100.00	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	4.00	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	50.00	กรัม

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสม

ในอาหาร 1 ลิตรมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 2.2 ยกเว้นปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ มีการแปรผันตามการทดลอง

2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาปริมาณของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสม

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 2.2 ยกเว้นไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ และแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตตั้งแต่ 1.00-5.00 กรัม

2.5 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาปริมาณเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 2.2 ยกเว้นปริมาณสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย		
ด้วยเอนไซม์แล้ว มีน้ำตาลกลูโคส	75.00 - 100.00	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.00	กรัม
ไม่มีสารสกัดจากยีสต์		

2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตที่เหมาะสม

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 2.2 ยกเว้นสารต่างๆดังต่อไปนี้

แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย		
ด้วยเอนไซม์แล้ว มีน้ำตาลกลูโคส	100.00	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.00	กรัม
ไม่มีสารสกัดจากยีสต์		
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.00-1.00	กรัม

2.7 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษา ปริมาณโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสม

ในอาหาร 1 ลิตรมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 2.2 ยกเว้นสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย		
ด้วยเอนไซม์แล้ว มีน้ำตาลกลูโคส	100.00	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.00	กรัม
ไม่มีสารสกัดจากยีสต์		
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.25	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.00-0.40	กรัม

2.8 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษา ปริมาณเฟร์ริกคลอไรด์ที่เหมาะสม

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 2.2 ยกเว้นสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย	100.00	กรัม
ด้วยเอนไซม์แล้ว มีน้ำตาลกลูโคส		
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.00	กรัม
ไม่มีสารสกัดจากยีสต์		
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.25	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.30	กรัม
เฟร์ริกคลอไรด์	0.00-0.04	กรัม

2.9 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษา ปริมาณแคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรตที่เหมาะสม

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 2.2 ยกเว้นสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย		
ด้วยเอนไซม์แล้ว มีน้ำตาลกลูโคส	100.00	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.00	กรัม
ไม่มีสารสกัดจากยีสต์		
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.25	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.30	กรัม
เฟร์ริกคลอไรด์	0.02	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.00-0.11	กรัม

2.10 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษา ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 2.2 ยกเว้นสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย		
ด้วยเอนไซม์แล้ว มีน้ำตาลกลูโคส	100.00	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.00	กรัม
ไม่มีสารสกัดจากยีสต์		
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.25	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.30	กรัม
เฟร์ริกคลอไรด์	0.02	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.07	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	30.00-50.00	กรัม

2.11 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบ ดังต่อไปนี้

แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อย		
ด้วยเอนไซม์แล้ว มีน้ำตาลกลูโคส	100.00	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.00	กรัม
ไม่มีสารสกัดจากยีสต์		
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.25	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.30	กรัม
เฟร์ริกคลอไรด์	0.02	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.07	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	50.00	กรัม

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารละลายกรดไดไนโทรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid: DNSA reagent)

ชั่งไดไนโทรซาลิไซลิก 1.0 กรัมละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมน้ำขจัดไอออน ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร แล้วเติมโพแทสเซียมโซเดียมทาเทรต ($KNaC_4H_4O_6 . 4H_2O$) 30.0 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100.0 มิลลิลิตรด้วยน้ำขจัดไอออนแล้วเก็บในขวดสีชา

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 195 มิลลิลิตร

โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 305 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน เติมน้ำขจัดไอออนแล้ว 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. สารละลายเอนไซม์ พี.จี.โอ

ละลายเอนไซม์ พี.จี.โอ. 1 แคปซูล ซึ่งประกอบด้วย กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) 500 หน่วยและเพอร์ออกซิเดส (peroxidase) 100 หน่วย ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ปริมาตรประมาณ 60.0 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายออร์โท-ไดอะนิซิดีน (*o*-dianisidine) ความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในเอทานอลลงไป 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลายไทโอยูเรีย

ชั่งโซเดียมเททระบอเรต (sodium tetraborate) 0.2 กรัม ละลายลงในสารละลายไทโอยูเรีย ความเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) กรองสารละลายที่ได้ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 9.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เก็บในขวดสีชา

5. สารละลายตัวพา (mobile phase) ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.0 สำหรับวิเคราะห์ด้วย HPLC

ชั่งไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 5.0 กรัม ละลายลงในน้ำขจัดไอออน (double deionized water) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 2.0 ด้วยกรดฟอสฟอริก กรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสแอซีเทตแล้วนำไปกำจัดก๊าซด้วยเครื่องกำเนิดคลื่นอัลทราโซนิกส์ (sonicator) เป็นเวลา 30 นาที

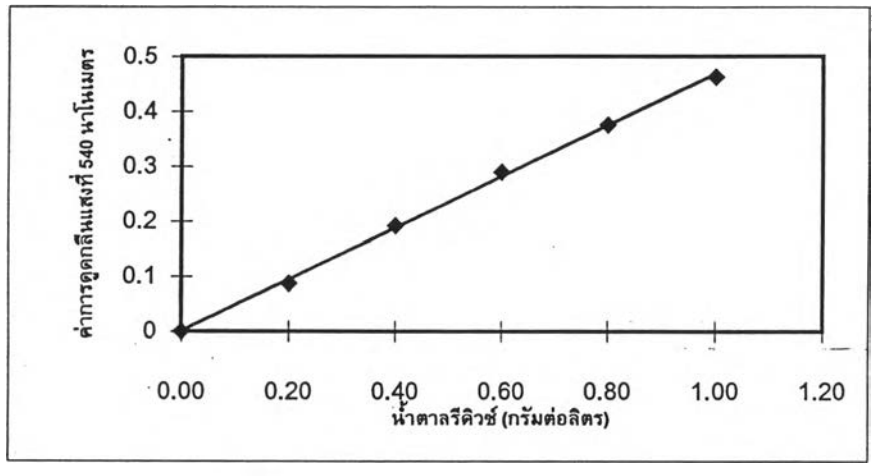
6. สารละลาย 5% โพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต (5% $KMnO_4$)

ชั่งโพแทสเซียมเพอร์แมงกาเนต 5 กรัม ละลายในน้ำขจัดไอออนปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

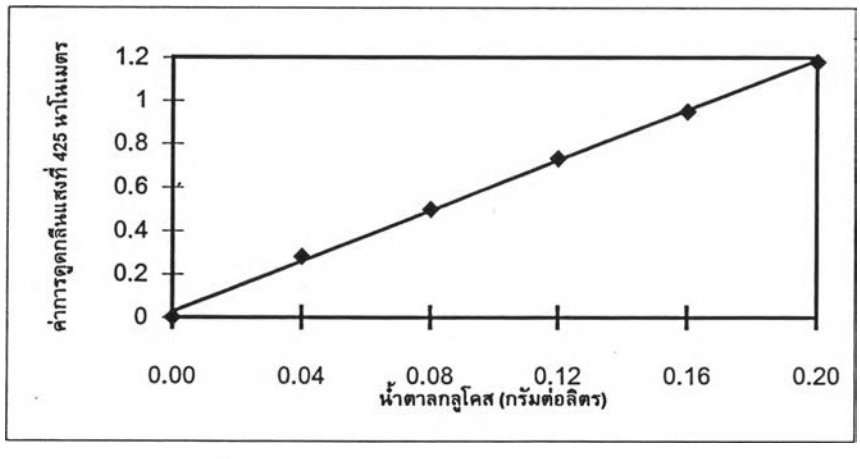
1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้กรดไดไนโทรซาลิไซลิก



<u>รูปที่ ค-1</u> กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร

น้ำตาลรีดิวซ์ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร X 1/ความชัน X ความเจือจาง (กรัมต่อลิตร)

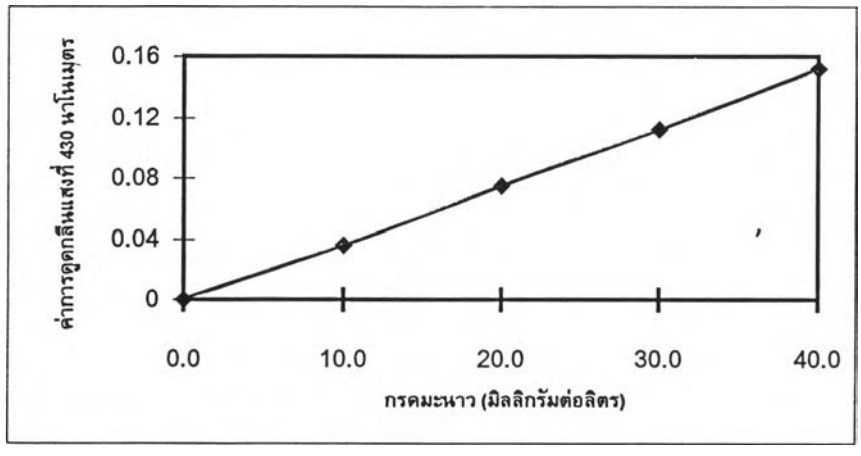
2.กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสโดยใช้เอนไซม์ พี.จี.โอ



<u>รูปที่ ค-2</u> กราฟมาตรฐานของน้ำตาลในช่วงความเข้มข้น 0.0-0.20 กรัมต่อลิตร

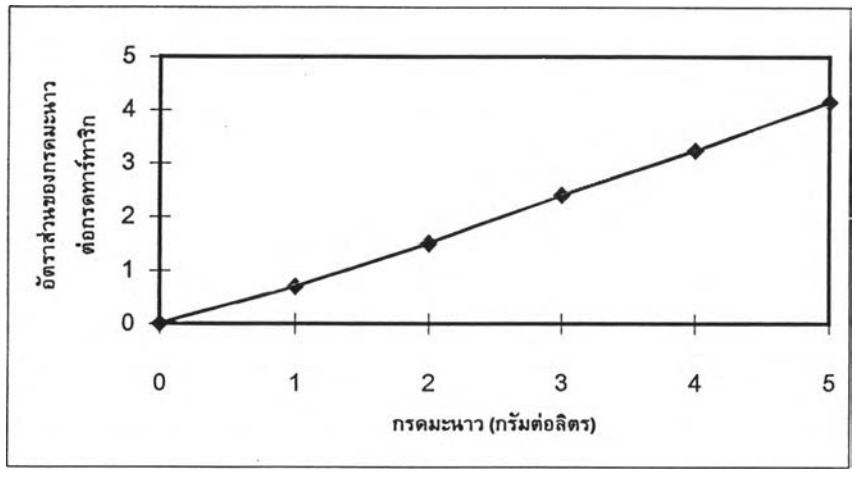
น้ำตาลกลูโคส = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 425 นาโนเมตร X 1/ความชัน X ความเจือจาง (กรัมต่อลิตร)

3. กราฟมาตรฐานของกรดมะนาว โดยวิธีเพนทะโบรโมแอซีโทน



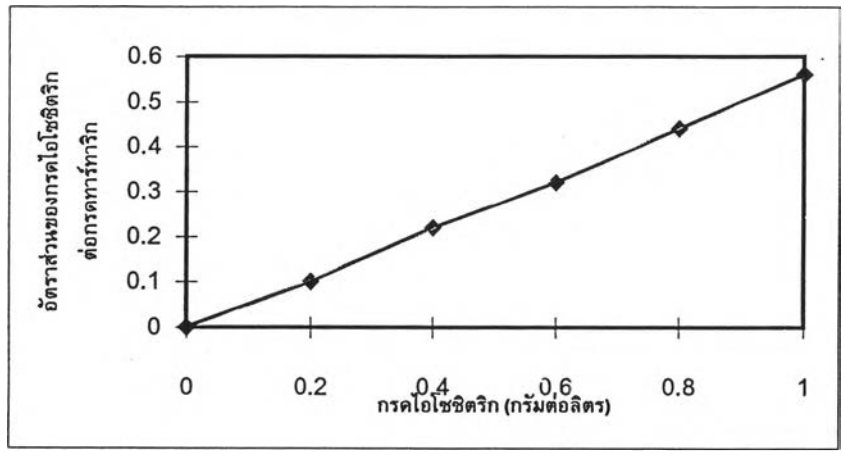
รูปที่ ค-3 กราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.00-40.00 มิลลิกรัมต่อลิตร
กรดมะนาว = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 430 นาโนเมตร X 1/ความชัน X ความเจือจาง X 1/1000
(กรัมต่อลิตร)

4. กราฟมาตรฐานของกรดมะนาว โดยวิธี HPLC



รูปที่ ค-4 กราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.00-5.00 กรัมต่อลิตร
กรดมะนาว = อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของกรดมะนาวต่อกรดทาร์ทาริก
(กรัมต่อลิตร) X1/ ความชัน X ความเจือจาง

5. กราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิตริก โดยวิธี HPLC



รูปที่ ค-5 กราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิตริกในช่วงความเข้มข้น 0.00-1.00 กรัมต่อลิตร

กรดไอโซซิตริก = อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของกรดไอโซซิตริกต่อกรดทาร์ทาริก (กรัมต่อลิตร) X 1/ความชัน Xความเจือจาง

ภาคผนวก ง

สูตรการคำนวณ

สูตรการคำนวณ

การวิเคราะห์ปริมาณผลผลิต

1. Biomass yield ($Y_{X/S}$)

$dx/dt = - Y_{X/S}\, ds/dt$

$Y_{X/S} = (X-X_0)/(S_0-S)$

เมื่อ $Y_{X/S}$ = น้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้นต่อสารอาหารที่ใช้ไป (g cell/ g substrate)

s = ความเข้มข้นของสารอาหาร (g/l)

2. Product yield ($Y_{P/S}$)

$dp/dt = - Y_{P/S}\, ds/dt$

$Y_{P/S} = (P-P_0)/(S_0-S)$

เมื่อ $Y_{P/S}$ = ปริมาณผลผลิตต่อสารอาหารที่ใช้ไป (g product/g substrate)

p = ปริมาณผลผลิต (g/l)

3. Specific product yield ($Y_{P/X}$)

$dp/dt = Y_{P/X}\, dx/dt$

$Y_{P/X} = (P-P_0)/(X-X_0)$

เมื่อ $Y_{P/X}$ = ปริมาณผลผลิตต่อปริมาณเซลล์ (g product/g cell)

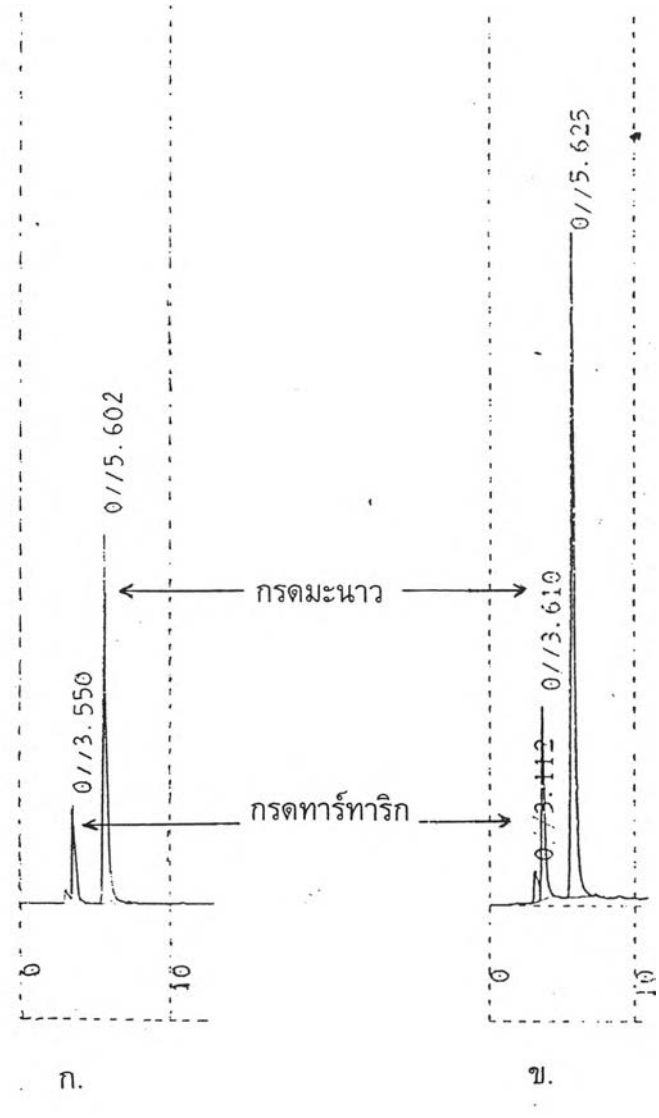
x = ปริมาณเซลล์ (g/l)

4. ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) = [(P1-P0)/(S0-S1)]x100

คือ $\frac{\text{กรดมะนาวที่ได้ (กรัมต่อลิตร)} \times 100}{\text{น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป(กรัมต่อลิตร)}}$

ภาคผนวก จ

โครมาโทแกรมของกรดมะนาวเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC



รูปที่ จ-1 ลักษณะโครมาโทแกรมของกรดมะนาว เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC

ก. ลักษณะโครมาโทแกรมของกรดมะนาวมาตรฐาน

ข. ลักษณะโครมาโทแกรมของกรดมะนาวในน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ATCC 21610

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสรัญญา ดิลกกัลยากุล เกิดวันที่ 15 สิงหาคม พ.ศ. 2516 ที่อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2537 และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2538