รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กำเนิด สุภัณวงษ์ 2534. กรดซิตริก. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์,256-278

จิราภรณ์ โล่ห์วงศ์วัฒน์ 2525. การผลิตกรดซิตริกจากการย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Aspergillus niger* An12. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

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

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

สาวิตร ตระกูลน่าเลื่อมใส. 2530. การเลี้ยง *Rhodopseudomonas gelatinosa*จากกากมันสำปะหลังเพื่อเป็นอาหารปลาและการเพิ่มประสิทธิภาพการเลี้ยงและคุณค่าทางโภชนาการโดยเลี้ยงผสมกับเชื้อ *Rhodopseudomonas sphaeroides* P 47. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สินีนาถ เจียมอนุกูลกิจ. 2539. การผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* NN-39 จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อัจฉริยา จารุจินดา. 2529. การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดมะนาวจากเศษวัสดุเหลือทิ้งและวัตถุดิบราคาถูกบางชนิดโดยเชื้อ *Aspergillus niger*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Abou - Zeid, A.A., and Ashy, M.A. 1984. Production of Citric Acid: A review. Agricultural Wastes. 9(1): 51-76.

Aiba , S. and Matsuoka. N. 1979. Identification of Metabolic Model: Citrate Production from Glucose by *Candida lipolytica*. Biotechnogy and Bioengineering 21: 1373-1386.

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

Bor-Cle. 1992. Citric acid. McGraw-Hill Encyclopedia of Science & Technology. Vol. 3, 7th ed., pp.667-669. New York: McGraw Hill.

Bouchard, E. F., and Merritt, E. F. 1979. Kirk-Other Encyclopedia of Chemical Technology Vol.6,pp. 150-179. New York: John Wiley & Sons.

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

Cassio, F. and Leao, C. 1991. Low-and High-affinity Transport Systems for Citric Acid in the Yeast *Candida utilis*. Applied and Environmental Microbiology 57 (12): 3623-3628.

Centro International de Agricultural Tropical (CIAT). 1992. Cassava Breeding, Agronomy and Utilization Research in Asia. Proc. 3rd. Regional Workshop in Malang, Indonesia.

Fired, J. H. 1972. Method of Producing Citric Acid by Fermentation. US patent 3,632,476.

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 Acid. Biotechnology and Food Ingredients. pp.349-358. New York: Van Nostand Reinhold.

Good, D. W., Droniuk, R., Lawford, G. R., and Fein, J. E. 1985. Isolation and Characterization of a *Saccharomycopsis lipolytica* Mutant Showing Incresed Production of Citric Acid from Canolaloil. Canadian Journal of Microbiology 31: 436-440.

Grace, M. R. 1977. Cassava Processing. Rome: FAO.

Grewal, H. S., and Kalra, K. L. 1995. Fungal Production of Citric Acid. Biotechnology Advance. 13(2): 209-234.

Huggett, A.G., and Nixon, D.A. 1957. Enzymatic Determination of Blood Glucose. Biochemical Journal. 66(1): 12.

Iizuka, H., Shimizu, J., Ishii, K., and Nakajima, Y.1971. Process for the Production of Citric Acid Fermentation. US patent 3,622,455.

Ikeno, Y., Masuda, M., Tanno, K.,Oomari, I. And Akahashi, N.1975. Citric Acid Production from Various Raw Materials by Yeast. Journal of Fermentation Technology 53 (10): 752-756.

Jaleel, S. A., Srikanta, S., Ghildyal, N. P., and Lonsane, B. K. 1988. Simultaneous Solid Phase Fermenteation and Saccharification of Cassava Fibrous Residue for Production of Ethanol. Starch/Starke 40(2): 55-58.

Kim, E. K., and Roberts, R. S. 1991. Rate Equations for the Vigorous Stationary Phase Fermentation of Citric Acid by *Saccharomycopsis lipolytica*. Biothehnology Bioengineering 37: 985-988.

Klasson, T. K., Clausen, E. C. and Gaddy, J. L. 1989. Continuous Fermentation for the Production of Citric Acid from Glucose. Applied Biochemistry and Biotechnology 20(21): 491-509.

Kubicek, C. P., and Rohr, M. 1986. Citric Acid Fermentation. Critical Reviews In Biotechnology. 3: 331-373.

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

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 Rate of Glucose Utilisation under Condition of Restricted Growth Are Required for Citric Acid Accumulation by *Yarrowia lipolytica* IMK 2. Applied Microbiology and Biotechnology 41: 73-78.

Miall, L. M. 1978. Organic Acid. In A. H. Rose (ed.), Primary Production of Metabolism pp. 48- 76. London: Academic Press.

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. 1994. Effect of Glucose Concentration on Citric Acid Production by *Yarrowia lipolytica*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 60: 387-395.

Nakanishi, T., Yamamoto, M., Kimura, K., and Tanaka, K. 1972. Fermentative Production of Citric Acid from n-Paraffin by Yeast. Journal of Fermentation Technology 50 (12): pp. 855-867.

Okoshi, H., Sato, S., Mukataka, S., and Takahashi, S. 1987. Citric Acid Production by *Candida tropicalis* under High Dissolved Oxygen Concentrations. Agricultural and Biological Chemistry 51(1): 257-258.

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.

Rane,K.D., and Sims, K. A. 1994. Oxygen Uptake and Citric Acid Production by *Candida lipolytica* Y1095. Biotechnology and Bioengineering 43: 131-137.

Rane,K.D., and Sims, K. A. 1995. Citric Acid Production by *Candida lipolytica* Y1095 in Cell Recycle and Fed-Batch Fermentations. Biotechnology and Bioengineering 46: 325-332.

Rohr, M., and Kubicek, C. P. 1980. Citric Acid. In Rehm, H. J., and Reed, G. (eds.), A Comprehensive Treatise in Biotechnology Vol. 3 pp. 420-454.

Rymowicz, W., Kautola, H., Wojtatowicz, M., Linko, Y., and Linko, P. 1993. Study on Citric Acid Production with Immobilized *Yarrowia lipolytica* in Repeated Batch and Continuous Ir-Lift Bioreactors. Applied Microbiology and Biotechnology 39: 1-4.

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

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

Srikanta, S., Jaleel, S. A., Ghildyal, N. P., Lonesane, B. K., and Karanth, N. G. 1987. Novel Technique for Saccharification of Cassava Fibrous Waste for Alcohol Production. Starch/Starke 39(7). 234-237

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1 อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (Yeast Malt Extract Medium)

ใส่อาหารเหลว ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.1 อาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

ในอาหารเหลว 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3.0	กรัม
เพปโตน	5.0	กรัม

1.2 อาหารแข็งลาดเอียง (YM Slant)

เตรียมได้โดยเติมวุ้นผง 20.0 กรัม ลงในสูตรอาหารเหลวข้อ 1.1 ต้มให้วุ้นละลายปิเปตต์ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 6.0 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2 อาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่จะกล่าวต่อไปนี้จะเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยที่ต้องการศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่อาหารปริมาตร 25.0 มิลลิลิตร ต่อขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 7.2 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาว (เชาวรีย์, 2539)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์และกำจัดกากออกแล้ว มีน้ำตาลกลูโคส	220.0	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	2.00	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.20	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปทาไฮเดรต	0.20	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.25	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.00	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	120.0	กรัม

ชั่งแคลเซียมคาร์บอเนตใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 3.0 กรัมต่อขวด ใส่อาหารปริมาตร 25.0 มิลลิลิตรต่อขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวซึ่งมีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง ด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอน สูตรเดิม (สินีนาถ, 2539) ในระดับขวดเขย่า ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบดังนี้

กากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก

มีน้ำตาลกลูโคส	220.0	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	2.00	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.20	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปทาไฮเดรต	0.20	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.25	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.00	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	120.0	กรัม

2.3 อาหารสำหรับศึกษาปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังสด ที่ผ่านการล้างและไม่ล้างน้ำ ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.2 ยกเว้นมีการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างและไม่ล้างน้ำ

2.4 อาหารสำหรับศึกษาปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังแห้ง ที่ผ่านการล้างและไม่ล้างน้ำ ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.2 ยกเว้นมีการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังแห้งที่ผ่านการล้างและไม่ล้างน้ำ

2.5 อาหารสำหรับศึกษาผลของปริมาณกลูโคส สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว

ในอาหาร 1 ลิตรมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.2 ยกเว้นมีการใช้ สารละลายน้ำตาลจากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำ สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต และแมงกานีสซัลเฟต แปรผันตามปริมาณเริ่มต้นตามการทดลอง

2.6 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม(สูตรปรับปรุง)สำหรับผลิตกรดมะนาวโดย *Candida oleophila* UNN33-3 ในระดับขวดเขย่า ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วน ประกอบดังนี้

กากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำและย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก มีน้ำตาลกลูโคส	220.0	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	1.15	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.40	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปทาไฮเดรต	0.40	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.45	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	120.0	กรัม

2.7 อาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 2.6 แยกสารอาหารออกเป็น 4 ส่วนคือ

1. สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำและย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก
2. แอมโมเนียมคลอไรด์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปทาไฮเดรต และแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต
3. สารสกัดจากยีสต์
4. แคลเซียมคาร์บอเนต

ส่วนที่ 1-3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 30 นาที ส่วนแคลเซียมคาร์บอเนตนำไปนึ่งฆ่าเชื้อพร้อมถังหมักและสารกำจัดฟองที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.8 อาหารสำหรับศึกษาผลการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในถังหมัก

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับในข้อ 2.7 ยกเว้นจะใช้ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3.0 ลิตร ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และเตรียมสารละลายเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสจากการย่อยกากมันสำปะหลังสดสำหรับใช้เติม โดยใช้กากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำและย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสประมาณ 283 กรัมต่อลิตร ใช้ปริมาตร 1655 มิลลิลิตร ทำให้เข้มข้นจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ (evaporator) ซึ่งสารละลายที่ได้จะมีน้ำตาลกลูโคสประมาณ 942 กรัมต่อลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 7.2 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ส่วนแคลเซียมคาร์บอเนตจะเตรียมเช่นเดียวกับในข้อ 2.7

ภาคผนวก ข

1. การย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

วัตถุดิบและเอนไซม์ที่ใช้

1. แป้งมันสำปะหลังตรากุหลาบ ของบริษัทไทยวา จำกัด
2. เอนไซม์ BAN 240 L ของบริษัท NOVO NORDISK ประเทศเดนมาร์ก
3. เอนไซม์ Dextrozyme 225/75L ของบริษัท NOVO NORDISK ประเทศเดนมาร์ก

ขั้นตอนการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

1. ชั่งแป้งมันสำปะหลัง 14 กิโลกรัม
2. เติมน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว ปริมาตร 30 ลิตร ปั่นกวนให้เข้ากัน
3. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล
4. เติมเอนไซม์ BAN 240 L ปริมาตร 8 มิลลิลิตร
5. ปรับอุณหภูมิเป็น 70 องศาเซลเซียส แล้วปั่นกวนเป็นเวลา 5 นาที
6. เพิ่มอุณหภูมิเป็น 90 องศาเซลเซียส แล้วปรับลดอุณหภูมิลงเป็น 60 องศาเซลเซียส ทันที
7. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.3-4.5 ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์
8. เติมเอนไซม์ Dextrozyme 225/75L ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
9. ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง
10. เมื่อครบ 30 ชั่วโมงแล้ว เพิ่มอุณหภูมิเป็น 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์
11. แยกตะกอนกากแข็งออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง(centrifuge)
12. เก็บสารละลายน้ำตาลที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สมบัติของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

ปริมาณของแข็งทั้งหมด	368.52	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	332.44	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	320.24	กรัมต่อลิตร
สมมูลเดกซ์โทรส	90.20	

2. การย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำและไม่ล้างน้ำ ด้วยกรดซัลฟิวริก

วัตถุดิบที่ใช้

1.กากมันสำปะหลังสด

2.กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.0 โมลต่อลิตร

ขั้นตอนการย่อยกากมันสำปะหลังสดด้วยกรดซัลฟิวริก

1. หาเปอร์เซ็นต์ความชื้นในกากมันสำปะหลังสดที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ
2. ในการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำ ทำการล้างกากมันสำปะหลังสดด้วยน้ำประปา อัตราส่วน 1ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน 2 ครั้ง จึงหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นในกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำแล้ว
3. ชั่งกากมันสำปะหลังสดให้ได้น้ำหนักเท่ากับกากมันสำปะหลังแห้ง 300 กรัม
4. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
5. นำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที
6. ปั่นแยกสารละลายน้ำตาลซึ่งเป็นส่วนใสนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ประมาณ 7.00 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต
7. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 6. ไปปั่นแยกตะกอนแคลเซียมซัลเฟตออก
8. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 7. ซึ่งมีสีน้ำตาลคล้ำไปผ่านผงถ่านกัมมันต์ (activated carbon) 10% (น้ำหนักผงถ่านกัมมันต์ต่อน้ำหนักของแข็งทั้งหมดของสารละลายน้ำตาล) แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 60 นาที
9. ปั่นแยกเอาเฉพาะสารละลายน้ำตาลที่เป็นส่วนใสไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ผลการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำ

สมบัติของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำก่อนนำไปผ่านผงถ่านกัมมันต์

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น	420 นาโนเมตร	เท่ากับ 0.86
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	164.42	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	164.38	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	144.38	กรัมต่อลิตร
สมมูลเดกซ์โทรส	99.97	

สมบัติของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ผ่านการล้างน้ำหลังจากผ่านผงถ่านกัมมันต์

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น	420 นาโนเมตร	เท่ากับ 0.02
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	159.86	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	164.17	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	131.50	กรัมต่อลิตร
สมมูลเดกซ์โทรส	102.70	

ผลการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ

สมบัติของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ไม่ผ่านการล้างน้ำก่อนนำไปผ่านผงถ่านกัมมันต์

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น	420 นาโนเมตร เท่ากับ 0.95	
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	183.50	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	178.90	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	160.11	กรัมต่อลิตร
สมมูลเดกซ์โทรส	97.49	

สมบัติของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ไม่ผ่านการล้างน้ำหลังจากผ่านผงถ่านกัมมันต์

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น	420 นาโนเมตร เท่ากับ 0.06	
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	178.71	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	140.55	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	158.05	กรัมต่อลิตร
สมมูลเดกซ์โทรส	78.65	

3. การย่อยกากมันสำปะหลังแห้งที่ผ่านการล้างน้ำและไม่ล้างน้ำ ด้วยกรดซัลฟิวริก

วัตถุดิบที่ใช้

1.กากมันสำปะหลังตากแห้ง

2.กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.0 โมลต่อลิตร

ขั้นตอนการย่อยกากมันสำปะหลังแห้งด้วยกรดซัลฟิวริก

1. หาเปอร์เซ็นต์ความชื้นในกากมันสำปะหลังแห้งที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ
2. ในการย่อยกากมันสำปะหลังแห้งที่ผ่านการล้างน้ำ ทำการแช่น้ำนาน 6 ชั่วโมง แล้วจึงล้างกากมันสำปะหลังแห้งด้วยน้ำประปา อัตราส่วน 1ต่อ 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จำนวน 2 ครั้ง จึงหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นในกากมันสำปะหลังแห้งที่ผ่านการล้างน้ำแล้ว
3. ชั่งกากมันสำปะหลังแห้งที่ผ่านการล้างน้ำหรือไม่ผ่านการล้างน้ำให้ได้น้ำหนักเท่ากับน้ำหนักแห้ง 300 กรัม
4. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 1.0 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
5. นำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที
6. ปั่นแยกสารละลายน้ำตาลซึ่งเป็นส่วนใสนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้ประมาณ 7.00 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต
7. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 6. ไปปั่นแยกตะกอนแคลเซียมซัลเฟตออก
8. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 7. ซึ่งมีสีน้ำตาลคล้ำไปผ่านผงถ่านกัมมันต์ (activated carbon) 10% (น้ำหนักผงถ่านกัมมันต์ต่อน้ำหนักของแข็งทั้งหมดของสารละลายน้ำตาล) แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 60 นาที
9. ปั่นแยกเอาเฉพาะสารละลายน้ำตาลที่เป็นส่วนใสไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ผลการย่อยกากมันสำปะหลังแห้งที่ผ่านการล้างน้ำ

สมบัติของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังแห้งที่ผ่านการล้างน้ำก่อนนำไปผ่านผงถ่านกัมมันต์

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น	420 นาโนเมตร เท่ากับ 0.58	
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	193.77	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	180.61	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	168.72	กรัมต่อลิตร
สมมูลเดกซ์โทรส	93.21	

สมบัติของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังแห้งที่ผ่านการล้างน้ำหลังจากผ่านผงถ่านกัมมันต์

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น	420 นาโนเมตร เท่ากับ 0.04	
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	187.95	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	179.35	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	160.70	กรัมต่อลิตร
สมมูลเดกซ์โทรส	95.42	

ผลการย่อยกากมันสำปะหลังแห้งที่ไม่ผ่านการล้างน้ำ

สมบัติของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังแห้งที่ไม่ผ่านการล้างน้ำก่อนนำไปผ่านผงถ่านกัมมันต์

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น	420 นาโนเมตร เท่ากับ 0.63	
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	185.58	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	173.79	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	158.90	กรัมต่อลิตร
สมมูลเดกซ์โทรส	93.65	

สมบัติของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังแห้งที่ไม่ผ่านการล้างน้ำหลังจากผ่านผงถ่านกัมมันต์

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น	420 นาโนเมตร เท่ากับ 0.12	
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	180.47	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	172.60	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	151.98	กรัมต่อลิตร
สมมูลเดกซ์โทรส	95.64	

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมสารละลายตัวพา (mobile phase) สำหรับการวิเคราะห์กรดมะนาวโดย HPLC

ละลายไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร ในน้ำที่กำจัดไอออนแล้วอย่างดี ปริมาตร 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 2.00 ด้วยกรดฟอสฟอริก แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสแอซีเทตที่มีขนาดรูกรอง 0.45 ไมครอน จากนั้นไปกำจัดก๊าซโดยใช้เครื่องกำเนิดคลื่นอัลทราโซนิค (sonicator) เป็นเวลา 20 นาที

2. การเตรียมสารละลายกรดไดไนโทรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

ละลาย 10 กรัมของกรดไดไนโทรซาลิไซลิกในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต 30.0 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว เก็บในขวดสีชา

3. การเตรียมสารละลาย พีจีโอเอ็นไซม์

ละลายพีจีโอ เอ็นไซม์ 1 แคปซูล ซึ่งประกอบด้วย กลูโคสออกซิเดส 500 หน่วย และเปอร์ออกซิเดส 100 หน่วย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เติมสารละลายออโธ-ไดอะนิซิดีน เข้มข้นร้อยละ 1 ในเอธานอล ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100.0 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บในขวดสีชาและแช่เย็น

4. การเตียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตรประกอบด้วย

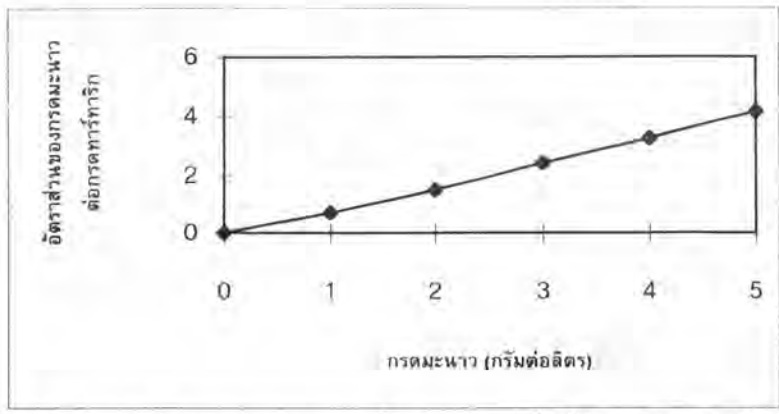
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 195 มิลลิลิตร

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 305 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน เติมน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว 500 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น

ภาคผนวก ง

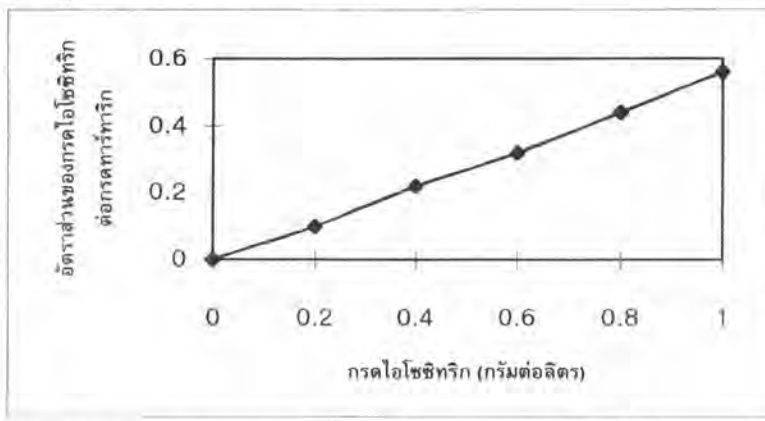
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของกรดมะนาว โดยวิธี HPLC



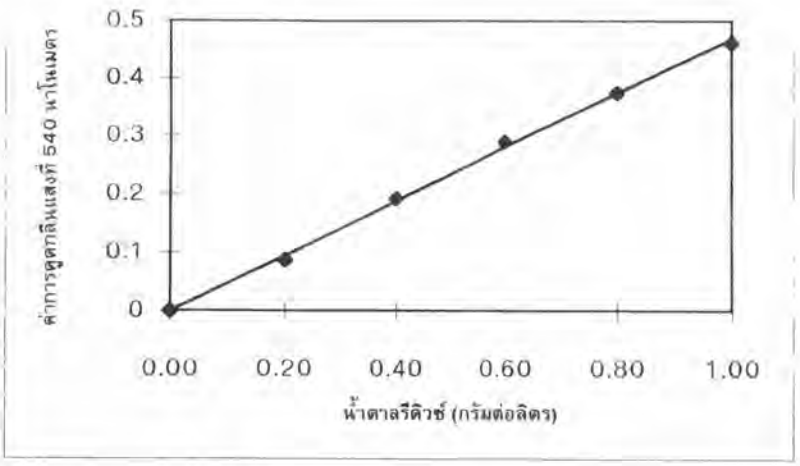
รูปที่ ง-1 กราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.00-5.00 กรัมต่อลิตร
กรดมะนาว = พื้นที่ใต้กราฟของกรดมะนาวต่อกรดทาร์ทาริก X1/ ความชัน X ความเจือจาง (กรัมต่อลิตร)

2. กราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิทริก โดยวิธี HPLC



รูปที่ ง-2 กราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิทริกในช่วงความเข้มข้น 0.00-1.00 กรัมต่อลิตร
กรดไอโซซิทริก = พื้นที่ใต้กราฟของกรดไอโซซิทริกต่อกรดทาร์ทาริก X 1/ความชัน Xความเจือจาง (กรัมต่อลิตร)

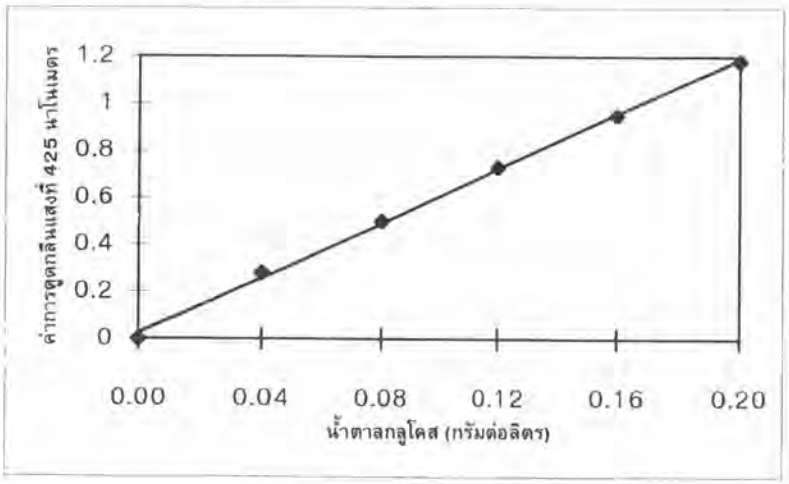
3. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้กรดไดไนโทรซาลิไซลิก



รูปที่ ง-3 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร

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

4 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสโดยใช้เอนไซม์ พี จี โอ



รูปที่ ง-4 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0.0-0.20 กรัมต่อลิตร

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

ภาคผนวก จ

สูตรการคำนวณ

การวิเคราะห์ผลผลิต

1. $Y_{P/S}$ = $(P-P_o) / (S-S_o)$

   = กรดมะนาวที่ได้ (กรัมต่อลิตร) / น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)

2. $Y_{X/S}$ = $(X-X_o) / (S-S_o)$

   = น้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อลิตร) / น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)

3. $Y_{P/X}$ = $(P-P_o) / (X-X_o)$

   = กรดมะนาวที่ได้ (กรัมต่อลิตร) / น้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อลิตร)

4. ผลผลิตกรดมะนาว (ร้อยละ) = $[(P_1-P_0) / (S_0-S_1)] \times 100$

   คือ (กรดมะนาวที่ได้(กรัมต่อลิตร) / น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป(กรัมต่อลิตร)) x 100

สมมูลเดกซ์โทรส (dextrose equivalent ; DE)

$$\text{สมมูลเดกซ์โทรส} = \frac{\text{น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} \times 100}{\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)}}$$

ประวัติผู้เขียน

นายคงศักดิ์ ตั้งปนิธานดี เกิดวันที่ 14 กันยายน พ.ศ 2516 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร ในปีการศึกษา 2537 และได้เข้าศึกษาต่อวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2538