เอกสารอ้างอิง

1. Kubicek P.Christian, "Citric Acid Fermentation," CRC Critical Reviews in Biotechnology, 3, 331-336, 1984.
2. P.E. Milsom and Meers, "Citric Acid," Comprehensive Biotechnology(Murray Moo-Young, eds.), Vol.3, p.665-680, Peramon Press, 1984.
3. ดวงพร คันธโชติ, "กรดอินทรีย์," จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม :ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์, หน้า 164-176, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ 10330, 2530.
4. วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, "การผลิตกรดซิตริค," เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม, หน้า 84-108, สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ 10330, 2532.
5. Considine M.Douglas, "Citric Acid," Van Nostrand's Scientific Encyclopedia, p.555, Van Nostrand Reinhold Company, 5th ed., 1974.
6. จิราภรณ์ โล่ห์วงศ์วัฒนา, "การผลิตกรดซิตริกจากกากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ A. niger,"วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,2525.
7. Presscott and Dunn, "The Citric Acid Fermentation,"Industrial Microbiology, p.533-573, Mc.Graw-Hill, New York, 3rd., 1959.
8. Rohr Max and Kubicek P.Christian, "Citric Acid," A Comprehensive Treatise in Biotechnology (H.J.Rehm and G.Reed, eds.), Vol.3, p.420-454, 1980.
9. Schwartz D.Robert and Leathen W.William, "Petroleum Microbiology," Industrial Microbiology (Brinton M.Miller and Warren Litsky, eds.), Mc Graw-Hill Book Company,1976.

10. Tsugawa R., Nakase T., Kobayashi T.and Okumura S., "Fermentation of n-Paraffins by Yeast," Agri. Biol. Chem., 33(2), 158-167, 1969.

11. Tsugawa R., Nakase T., Kobayashi T. and Okumura S.,"Fermentation of n-Paraffins by Yeast, " Agri. Biol. Chem., 33(6),929-938, 1969.

12. Nishio N. and Kamikubo T., "Utilization of Hydrocarbon by Microorganisms," Agri. Biol. Chem., 35(4), 485-490, 1971.

13. Uchio R., and Shiio I., "Production of Dicarboxylic Acids by *C.cloacae* Mutant Unable to Assimilate n-Alkane,"Agri Biol.Chem., 36(7), 1169-1175, 1972.

14. Sato M., Nakahara T. and Yamada K., "Fermentative Production of Succinic Acid from n-Paraffin by *Candida brumptii* IFO 0731,"Agri. Biol. Chem., 36(11), p.1969-1974, 1972.

15. Suzuki R. and Sumino Y.,"Production of Citric Acid,Isocitric Acid and Microbial Cells by Fermentation, "U.S.Pat 3,801,455, April 2, 1971.

16. Kimura et al., "Production of Citric Acid,Isocitric Acid and Microbial Cells by Fermentation," U.S.Pat 3,873,424, March 25, 1975.

17. Kimura et al., " Process for Producing Citric Acid,Isocitric Acid and Microbial Cells by Fermentation," U.S. Pat 3,773,620, November 20, 1973.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

18. Fukuda H., Suzuki T. and Sumino Y., "Method for Producing Citric Acid," U.S.Pat 3,689,359, September 5, 1972.

19. Aiba S.and Matsuoka M., "Citrate Production from n-Alkane by Candida lipolytica in Reference to Carbon Flux in vivo," European J. Appl Microbiol Biotechol, Vol.5, p.247- 261, 1978.

20. Akiyama S., SuzukiT., Sumino Y., Nakao Y. and Fukuda H., "Production of Citric Acid from n-Paraffins by Fluo roacetate Sensitive Mutant Strains of Candida lipo lytica," Agri.Biol. Chem.,36(2), 339-341, 1972.

21. Akiyama S., Suzuki T., Sumino Y., and Fukuda H., " Induction and Citric Acid Productivity of Fluoroacetate Sensit ive Mutant Strains of Candida lipolytica,"Agri. Biol Chem., 37(4), 879-884, 1973.

22. Kenzie C.R.Mac, Davids S.J., Lawford G.R.and Lawford H.G., " Citric and Isocitric Acid Production from Hydrocar bons by Yeast Fermentation," Advances in Biotechnolo gy (Murray and Robinson, eds.), Vol.2, p.57-62, Perg amon Press, 1981.

23. Maldonado P. et al.,"Fermentation Process for the Production of Citric Acid and Isocitric Acid,"U.S.Pat 3,997,399 December 14, 1976.

24. Hustede H. and Siebert D., "Production of Citric Acid from Hydrocarbon," U.S.Pat 3,622,455, November 23, 1971.

25. Hustede H. and Siebert D., " Production of Citric Acid from Hydrocarbon," U.S.Pat 3,843,465, October22, 1974.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

26. Takayama et al., "Process for the Production of Citric Acid," U.S.Pat 3,926,724, December 16, 1975.

27. Nakanishi T. et al., "Fermentative Production of Citric Acid from n-Paraffins by Yeasts," J.Ferment.Technol., 50 (12), p.855-867, 1972.

28. Hattari, Yakoo and Imada, "Effect of Ammonium Ion on the Ratio Citric Acid and d-Isocitric Acid Formed from n-Paraffins," J. Ferment. Technol., 52(8), p.542-550, 1974.

29. Furukawa T. et al., "Fermentative Production of Citric Acid from n-Paraffins by Yeast," J. Ferment. Technol., 55 (4), p.356-363, 1977.

30. Lawrence A.A., " Food Acid Munufacture ," p.2-74, Noyes Data Corporation, England, 1974.

31. Suzuki T. and Sumino Y., "Method for Producing Citric Acid," U.S.Pat 3,733,253, May 15, 1973.

32. Tanaka et al., " Process for Preparing Citric Acid by Fermentation," U.S.Pat 3,652,396, March 28, 1972.

33. Marison I.W.,"Citric Acid Production," Biotechnology for Engineers (A.H.Scragg eds), p.322-336, Ellis Horwood Limited, England, 1988.

34. Stryer,L., "Citric Acid Cycle," Biochemistry,W.H.Freeman and Company, San Francisco, p.283-304, 1981.

35. Gadd G.M., "Carbon Nutrition and Metabolism ," Physiology of Industrial Fungi (D.R.Berry eds), Blackwell Scientific Publications, London, p.21-57, 1988.

36. Fukui S. and Tanaka A., "Peroxisomes of Alkane- and Methanol Grown Yeasts,Metabolic Functions and Practical Appli cations," J. Appl. Biochem., Vol.1, p.171-201, 1979.

37. Tabuchi T., Serizawa N.and Uchiyama H., "A Novel Pathway for the Partial Oxidation of Propionyl Co-A to Pyruvate via Seven-Carbon Tricarboxylic Acids in Yeast," Agri Biol. Chem., Vol.38, p.2571-2572, 1974.

38. Chemical Economics Handbook., "Citric Acid," Menlo Park,Cali fornia, U.S.A., 1981.

39. Morrison R.T.and Boyd R.N., "Hydrocarbon,"Organic Chemistry, p.34,Prentice Hall of India Private Limited, New Delhi, 1971.

40. RNDr. Bohumil Sikyta DrSc., "Culture Equipment," Method in Industrial Microbiology , p.38-42, Ellis Horwood Limited, England, 1983.

41. Fukuda et al., " Method for Producing Citric Acid," U.S.Pat 3,726,763, April 10, 1973.

42. Marchal R., Chaude O.,and Metche M.,"Production of Citric Acid from n-paraffins by Saccharomycopsis lipolytica ," European J. Appl. Microbiol., 4, p.111, 1977.

43. Tabuchi T., and Hara, "Production of Citric Acid from n-Para ffins by Yeasts,"J. Agri. Chem. Soc. Jpn., 44,p.562, 1970.

44. Yamada K. and Yogo M., "Studies on the Utilization of Hydro carbons by Microorganisms,"Agri. Biol. Chem. ,34(2), p. 296-301, 1970.

45. Ikeno Y., Masuda M., Tanno K., Oomori I. and Takahashi N.," Citric Acid Production from Various Raw Materials by Yeasts," J. Ferment. Technol., 53(10), p.752-756, 1975.

46. Tabuchi T. and Abe M., "Method for Producing Citric Acids," U.S Pat 4,391,908, July 5, 1983.

47. Stern R.Joseph , "Assay of Tricarboxylic Acids," Methods in Enzymology(S.P.Colowick and N.C.Kaplan eds.) Vol.3, p.425-428, Academic Press, New York, 1957.

48. Mollering Han,"Citrate," Methods of Enzymatic analysis,"Vol. 3, p.2-12, 1985.

49. Nordmann J., and Nordmann R.,"Chromatographic and electropho retic technique,"Chromatography(Smith I., ed.), Wil liam Heinemann Medical Book, Vol.1, 1969.

50. Suvachittanont O., " A Study of the Oxalic Acid Content of Some Vegetables in Thailand," Master's thesis, Gradu ate School, Kasetsart University, 1971.

51. Harvey W.R., Half R.W. and Ikeda R.M., "The Determination of Organic Acids in Plants and Food Products," Tobacco Science, p.141-144, 1969.

52. Ashoor H.Samy and Knox M.J.," Determination of Organic Acids in Foods by High-Performance Liquid Chromotography," Journal of Chromatography, 299, p.288-292, 1984.

53. Marier J.R. and Boulet M. , " Direct Determination of Citric Acid in Milk with Improved Pyridine-Acetic Anhy dride Method," J. Dairy Sci., Vol.41, p.1683-1688, 1958.

54. Taylor T.G,"A Modified Procedure for the Microdertermination of Citric Acid," Biochemical Journal, Vol.54, p.48-49, 1953.

55. Well- Malherbe H. and Bone A.D, " The Micro-estimation of Citric Acid,"Biochemical Journal, Vol.45, p.377-381, 1949.

56. Taussky , H.H. and Shorr , E., " The determination of Citric Acid," J. Biol. Chem., Vol.169, p.103, 1947.

57. Bernfeld, P., "Amylase,α and β ," Method in Enzymology (Colowick, P.S. and Kaplan, O.N.,eds), Vol 1, p.149, Academic Press Inc., Publishers, N.Y.,1955.

58. Foster J.W. and Henry Davis,"Detection and Occurence of Acid Producing Fungi,"Bullentin of the Torrey Botanical Club, 76(3), p.174-176, 1949.

59. Huggett , A. St. G. and Nixon D.A., "Enzymatic determination of Blood Glucose," Biochem. J., 66(1), p.12, 1957.

60. มนตรี จุฬาวัฒนทล และคณะ, "คาร์โบไฮเดรต," ชีวเคมี , หน้า 39-62, ศ.ส. การพิมพ์, 2530.

61. Hayaishi,O., "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation," Academic Press, New York, 1974.

62. Charpentier et al., " Process for Producing Citric Acid by Fermentation," U.S.Patent 3,966,553, June 29, 1976.

63. Maldonano et al., " Chemical Process," U.S. Patent 3,996,106 Dec.7, 1976.

ภาคผนวก

1. สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย

อาหารทุกประเภทที่กล่าวข้างล่างนี้ ต้องนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ. ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาใช้ทุกครั้ง

1.1 สูตรอาหารเหลว YM (Yeast-Malt Extract Medium)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม
สารสกัดจากมอลต์(malt extract)	3.0	กรัม
เปบโตน	5.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม

ส่วนในอาหารแข็ง YM (YM-agar) เตรียมได้จากการเติมวุ้นผงปริมาณ 20 กรัม ลงในอาหารเหลวสูตรดังกล่าวข้างต้น

1.2 สูตรอาหารพื้นฐาน

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

นอร์มัล พาราฟฟินส์	30.0-100.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต	4.0	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.0	กรัม
แมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.5	กรัม
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.01	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.01	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรต	0.005	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.005	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
ไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์	0.001	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	0.0-100.0	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 สูตรอาหารแข็งสำหรับคัดเลือกยีสต์ สายพันธุ์ที่สามารถใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย องค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารในข้อ 1.2 ยกเว้น สารต่างๆต่อไปนี้

นอร์มัล พาราฟฟินส์	30.0	กรัม
หรือกลูโคส	30.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	0.0	กรัม
วุ้นผง	20.0	กรัม

1.4 สูตรอาหารแข็งสำหรับคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดได้

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย องค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารในข้อ 1.3 ยกเว้น ต้องเติมสารละลายของโบรโมคลีซอลกรีนที่เตรียมตามวิธีในภาคผนวกที่ 2.1 ปริมาตร 67 มล.ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.5 สูตรอาหารเหลวสำหรับคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่เหมาะสมในการผลิตกรดมะนาว

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย องค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารในข้อ 1.2 ยกเว้นสารต่างๆต่อไปนี้

นอร์มัล พาราฟฟินส์	60.0	กรัม
หรือกลูโคส	60.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	100.0	กรัม

1.6 สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย องค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารในข้อ 1.2 ยกเว้นสารต่างๆต่อไปนี้

นอร์มัล พาราฟฟินส์	30.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	10.0	กรัม

1.7 สูตรอาหารเพื่อหาชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของนอร์มัล พาราฟฟินส์

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย องค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารในข้อ 1.2 ยกเว้นสารต่างๆต่อไปนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอร์มัล พาราฟฟินส์	40.0-120.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	100.0	กรัม

1.8 สูตรอาหารเปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาวโดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

สารแหล่งคาร์บอน	100.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	100.0	กรัม

1.9 สูตรอาหารเพื่อหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย องค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารในข้อ 1.2 ยกเว้นสารต่างๆต่อไปนี้

นอร์มัล พาราฟฟินส์	100.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	100.0	กรัม
สารแหล่งไนโตรเจนที่มีปริมาณ		
ไนโตรเจน	0.3-2.0	กรัม

1.10 สูตรอาหารเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย องค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารในข้อ 1.2 ยกเว้นสารต่างๆต่อไปนี้

นอร์มัล พาราฟฟินส์	100.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต	2.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	100.0	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.05-2.0	กรัม

1.11 สูตรอาหารเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของแมกเนเซียมซัลเฟต

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย องค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารในข้อ 1.2 ยกเว้นสารต่างๆต่อไปนี้

นอร์มัล พาราฟฟินส์	100.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต	2.0	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	100.0	กรัม
แมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0-2.0	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.12 สูตรอาหารเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของแร่ธาตุ 4 ชนิด

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย องค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารในข้อ 1.2 ยกเว้นสารต่างๆต่อไปนี้

นอร์มัล พาราฟฟินส์	100.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต	2.0	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	กรัม
แมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.5	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	100.0	กรัม

เกลือซัลเฟตของทองแดง แมงกานีส สังกะสี และเหล็ก

1.13 สูตรอาหารเพื่อศึกษาผลของไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ และสารสกัดจากยีสต์

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย องค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารในข้อ 1.2 ยกเว้นสารต่างๆต่อไปนี้

นอร์มัล พาราฟฟินส์	100.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต	2.0	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	กรัม
แมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.5	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.2	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	100.0	กรัม

ไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ และ/หรือสารสกัดจากยีสต์

1.14 สูตรอาหารเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของแคลเซียมคาร์บอเนต

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วยองค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารในข้อ 1.2 ยกเว้นสารต่างๆต่อไปนี้

นอร์มัล พาราฟฟินส์	100.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต	2.0	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	กรัม
แมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.5	กรัม

แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	0-140	กรัม

1.15 สูตรอาหารเพื่อศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิว

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วยองค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารในข้อ 1.2 ยกเว้นสารต่างๆต่อไปนี้

นอร์มัล พาราฟฟินส์	100.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต	2.0	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	กรัม
แมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.5	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	100.0	กรัม
สารลดแรงตึงผิว	0.01-0.2	กรัม

1.16 สูตรอาหารเพื่อศึกษาผลของ 2,4-ไดไนโตรฟีนอล

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วยองค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหารในข้อ 1.2 ยกเว้นสารต่างๆ ต่อไปนี้

นอร์มัล พาราฟฟินส์	100.0	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต	2.0	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	กรัม
แมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.5	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	100.0	กรัม
2,4-ไดไนโตรฟีนอล	0.005-0.02	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. <u>การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย</u>

2.1 การเตรียมสารละลายของโบรโมคลีซอลกรีน

ละลาย 1.0 กรัมของโบรโมคลีซอลกรีน ที่บดละเอียดแล้วในสารละลายของโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ปริมาตร 14.3 มล.เมื่อละลายจนหมดแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 250 มล.ด้วยน้ำกลั่น เติมสารละลายของอินดิเคเตอร์นี้ปริมาตร 6.7 มล.ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มล. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ. ความดัน 1.5 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2 การเตรียมสารละลายไทโอยูเรีย

ละลาย 2.0 กรัม ของโซเดียมเตตระโบรเรต(sodium tetraborate)ในสารละลายไทโอยูเรียที่เตรียมได้จากการละลายไทโอยูเรีย 4.0 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 100.0 มล. กรองสารละลายที่ได้ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 9.2

2.3 การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

ละลาย 1.0 กรัมของกรดไดไนโตรซาลิไซลิกในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20.0 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มล. เติมโปตัสเซียมตาเตรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) 30 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100.0 มล.ด้วยน้ำกลั่น

3. <u>การเตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว(hydrolyzed starch)</u>

3.1 การย่อยแป้งมันสำปะหลัง

3.1.1 ชั่งแป้งมันสำปะหลัง 16 กก. เติมน้ำที่ปราศจากอิออนของโลหะหนัก deionized water) ปริมาตร 30 ลิตร ใส่ในถังหมักขนาด 60 ลิตรที่มีใบพัดเฉียง 2 ใบสำหรับกวนสารละลายแป้ง ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6.9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์

3.1.2 เติมเอ็นไซม์เทอร์มามิล (termamyl 120 L) ปริมาตร 5.8 มล. กวนด้วยความเร็ว 400 รอบ/นาที อุณหภูมิ 90° ซ. นาน 1 ชั่วโมง

3.1.3 หยุดการทำงานของเอ็นไซม์เทอร์มามิล ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น

121° ซ. เป็นเวลานาน 15 นาที หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นลงจนอุณหภูมิเท่ากับ 60° ซ. ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4.0 โมลาร์

3.1.4 เติมเอ็นไซม์เอเอ็มจี (AMG 300L) ปริมาตร 10.58 มล. และโปรโมไซม์(promozyme 200L) ปริมาตร 7.5 มล. กวนด้วยความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 60° ซ. นาน 30 ชั่วโมง

3.1.5 เพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 100° ซ.เป็นเวลานาน 10 นาทีกรองผ่านเครื่องกรอง นำส่วนใสไปใช้

3.1.6 ตรวจสอบคุณสมบัติของส่วนใสที่กรองได้จากข้อ 3.1.5 ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด(total sugars) ปริมาณของแข็งทั้งหมด(total solid) ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยพีจีโอเอ็นไซม์ ของ Huggett และ Nixon[50]

3.2.1 การเตรียมสารละลายพีจีโอ

ละลายพีจีโอเอ็นไซม์ 1 แคปซูล ซึ่งประกอบด้วยกลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) เปอร์ออกซิเดส(peroxidase) 100 หน่วย และบัฟเฟอร์ ในน้ำกลั่นปริมาตร 60 มล. เติมสารละลายของโอ-ไดอะนิซิดีน (o-dianisidine)ความเข้มข้นร้อยละ 1 น้ำหนักต่อปริมาตร (ซึ่งเตรียมได้จากการละลายโอ-ไดอะนิซิดีนในเอทธานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาตร 0.5 มล.) ปรับปริมาตรเป็น 100 มล.ด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายดังกล่าวไว้ในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4° ซ.

3.2.2 การหาปริมาณกลูโคส

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณกลูโคสปริมาตร 0.25 มล. ปรับอุณหภูมิเป็น 37° ซ. ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เติมสารละลายพีจีโอเอ็นไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.1 ปริมาตร 2.5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลานาน 30 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 425 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานโดยใช้กลูโคสที่ปราศจากน้ำ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณกลูโคส และค่าการดูดกลืนแสง

3.3 การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอลซัลฟูริก(Phenol-Sulfuric acid)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาตร 1 มล. เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 1 มล.เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นทันทีและให้โดนสารละลายโดยตรงปริมาตร 5 มล. ตั้งหลอดของสารละลายดังกล่าวไว้นาน 10 นาที หลังจากนั้นเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าและนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 30° ซ. เป็นเวลานาน 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.4 การหาปริมาณของแข็งทั้งหมด

3.4.1 เตรียมอลูมิเนียมฟลอยด์เป็นรูปถ้วยขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.0 ซม. นำไปอบที่อุณหภูมิ 80° ซ.จนน้ำหนักคงที่

3.4.2 นำสารตัวอย่างปริมาตร 1.0 มล.ใส่ลงในอลูมิเนียมฟลอยด์ที่ได้จากข้อ 3.4.1 นำไปอบที่อุณหภูมิ 100° ซ. เป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่แล้วชั่งหาน้ำหนักของแข็งทั้งหมด

3.5 การคำนวณหาค่าเด็กซ์โตรสอิควิวาเลนท์

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

3.6 คุณสมบัติของแป้งที่ย่อยแล้วตามวิธีดังกล่าวในภาคผนวกที่ 5.1

ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์	=	378.0	กรัมต่อลิตร
ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส	=	312.0	กรัมต่อลิตร
ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด	=	587.5	กรัมต่อลิตร
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	=	402.1	กรัมต่อลิตร
เด็กซ์โตรสอิควิวาเลนท์	=	94.0	

4. <u>การเตรียมสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน</u>

4.1 วิธีการเตรียมสารละลายของแหล่งไนโตรเจนย่อยด้วยกรดกำมะถัน

ชั่งกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว ขนาด 0.84 มม.(20 mesh)หนัก 12 กรัม

เติมกรดกำมะถันความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ปริมาตร 40 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที สกัด 2 ครั้งด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 50 มล. และ 30 มล. ตามลำดับ ปรับให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ ตั้งทิ้งไว้จนตกตะกอน กรองและนำส่วนใสไปใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.2 ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

สารแหล่งไนโตรเจน	ปริมาณไนโตรเจน(ร้อยละ)
คอร์นสตีปลิเคอร์	2.61 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)
สารสกัดจากยีสต์	11.0 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)
สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองที่สกัดไขมันแล้ว (จากบริษัท ธนากรน้ำมันพืช จำกัด)	0.43 (น้ำหนักต่อปริมาตร)

5. องค์ประกอบของนอร์มัล พาราฟฟินส์

5.1 นอร์มัล พาราฟฟินส์ชนิด Exxpar 25-D ประกอบด้วย

อัลเคนส์ที่มีคาร์บอน 10 อะตอม(C_{10}) ร้อยละ = 12 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

อัลเคนส์ที่มีคาร์บอน 11 อะตอม(C_{11}) ร้อยละ = 36 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

อัลเคนส์ที่มีคาร์บอน 12 อะตอม(C_{12}) ร้อยละ = 45 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

อัลเคนส์ที่มีคาร์บอน 13 อะตอม(C_{13}) ร้อยละ = 5 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

5.2 นอร์มัล พาราฟฟินส์ชนิด Exxpar 35-D ประกอบด้วย

อัลเคนส์ที่มีคาร์บอน 12 อะตอม(C_{12}) ร้อยละ = 11 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

อัลเคนส์ที่มีคาร์บอน 13 อะตอม(C_{13}) ร้อยละ = 60 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

อัลเคนส์ที่มีคาร์บอน 14 อะตอม(C_{14}) ร้อยละ = 27 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

5.3 นอร์มัล พาราฟฟินส์ชนิด Exxpar-451 ประกอบด้วย

อัลเคนส์ที่มีคาร์บอน 14 อะตอม(C_{14}) ร้อยละ = 33 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

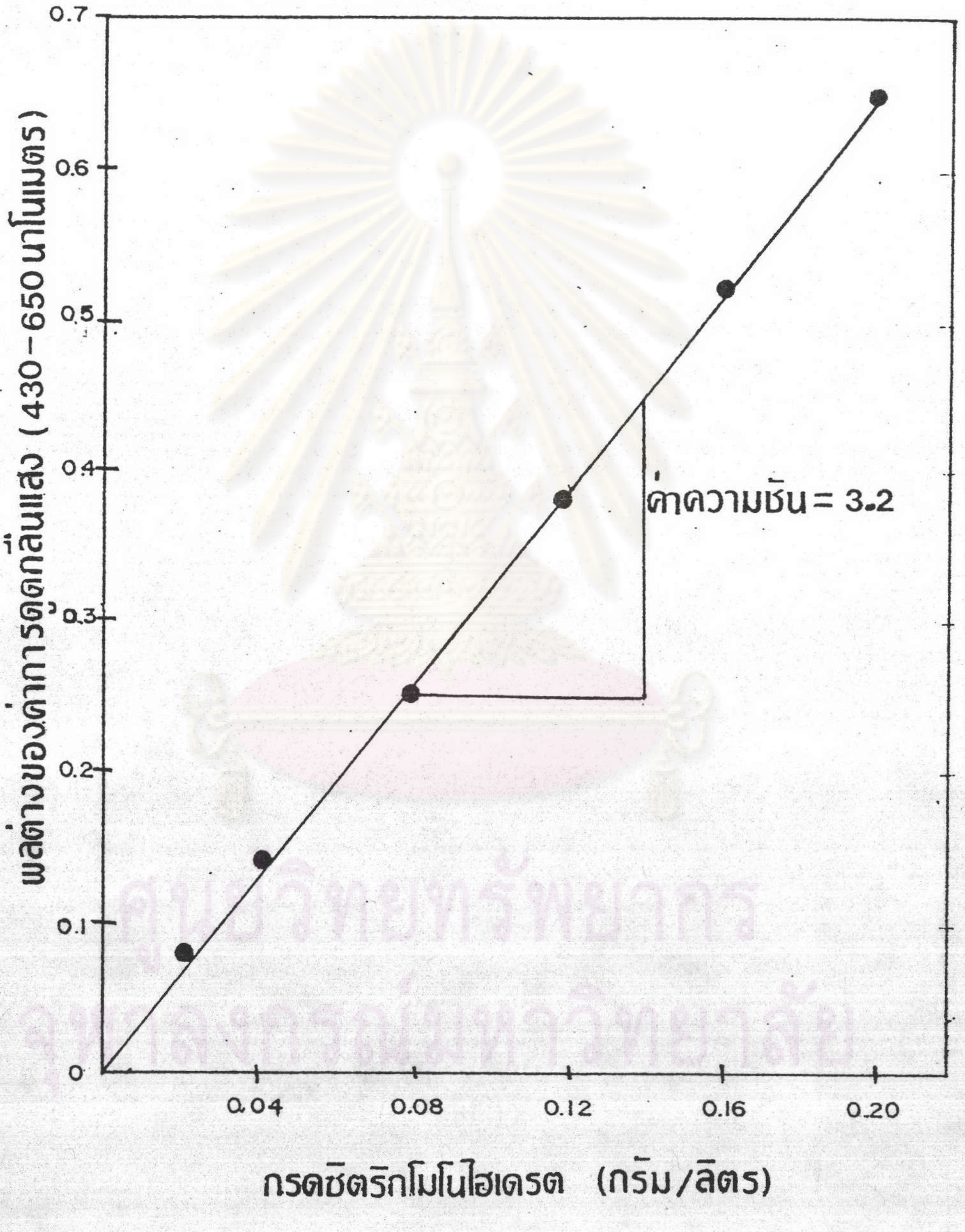
อัลเคนส์ที่มีคาร์บอน 15 อะตอม(C_{15}) ร้อยละ = 44 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

อัลเคนส์ที่มีคาร์บอน 16 อะตอม(C_{16}) ร้อยละ = 17 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

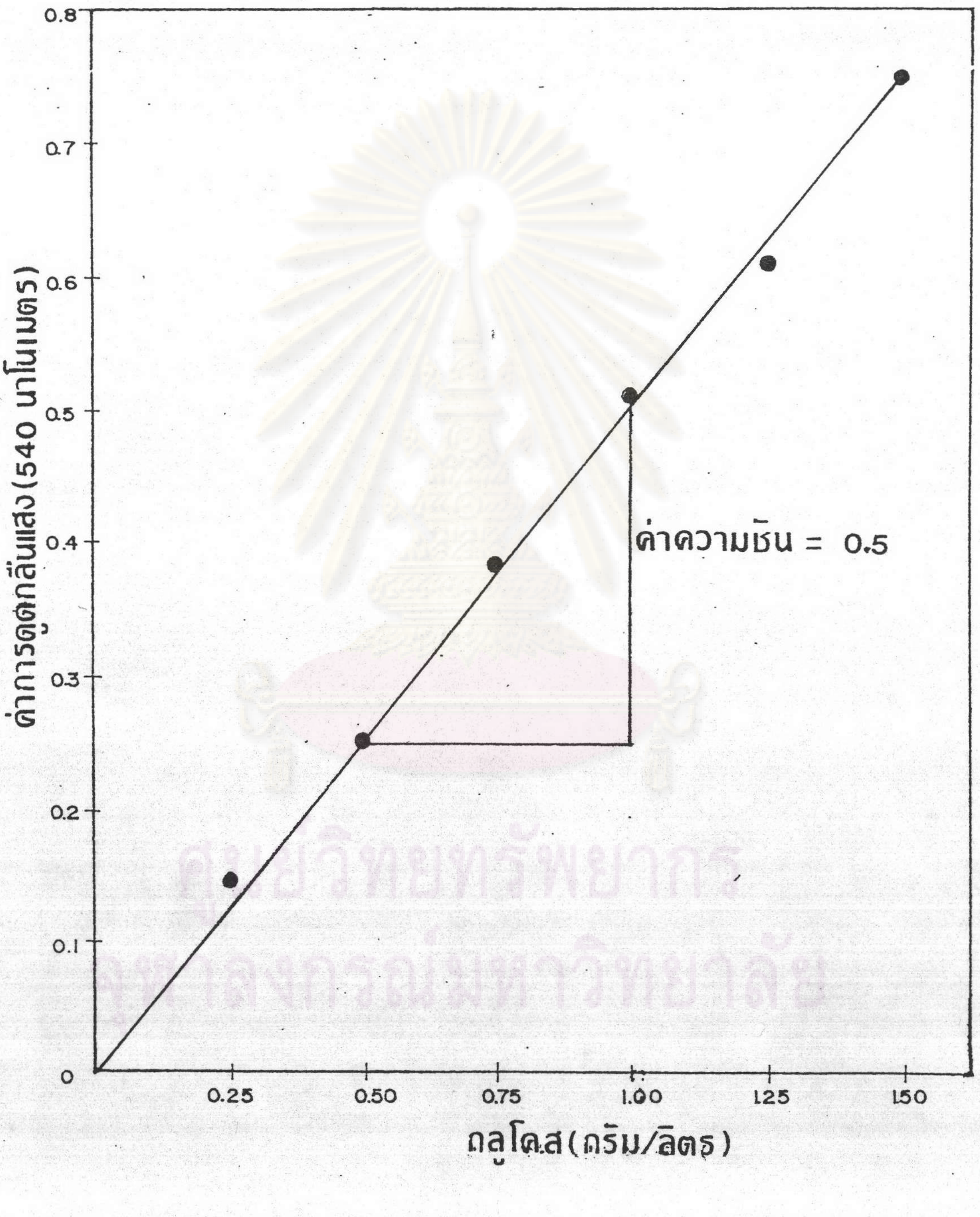
อัลเคนส์ที่มีคาร์บอน 17 อะตอม(C_{17}) ร้อยละ = 4 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. กราฟมาตรฐานของกรดมะนาวที่เตรียมโดยวิธีเพนตาโบรโมอะซีโตน

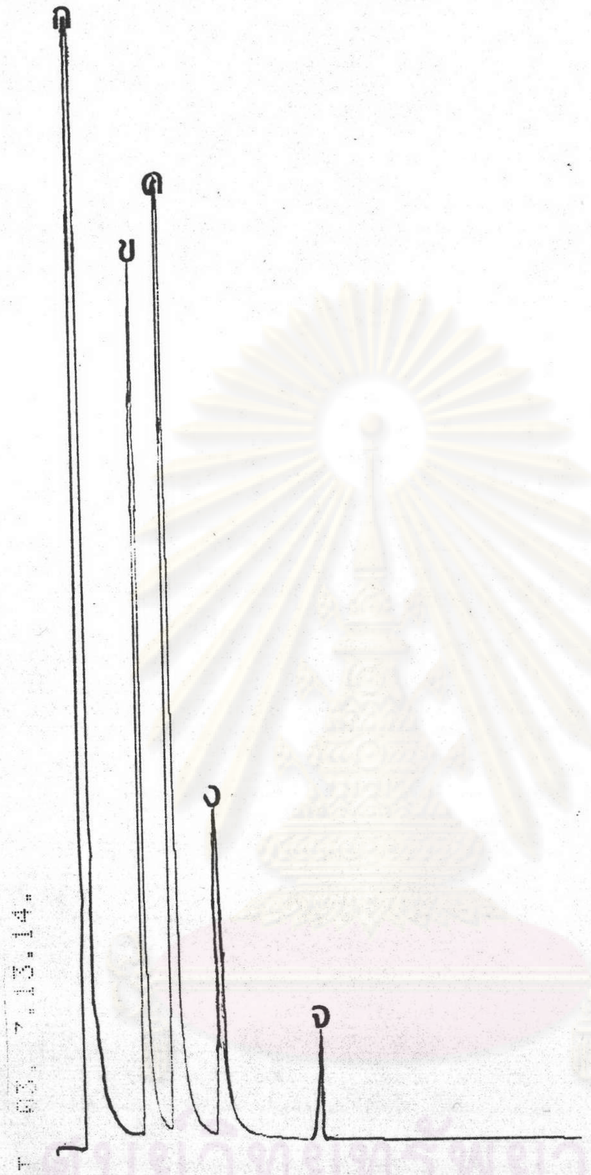


7. กราฟมาตรฐานของกลูโคสที่เตรียมโดยวิธี Bernfeld



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. <u>โครมาโตแกรมของนอร์มัลพาราฟฟินส์โดยวิธีกาซโครมาโตกราฟฟี</u>



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก = คลอโรฟอร์ม

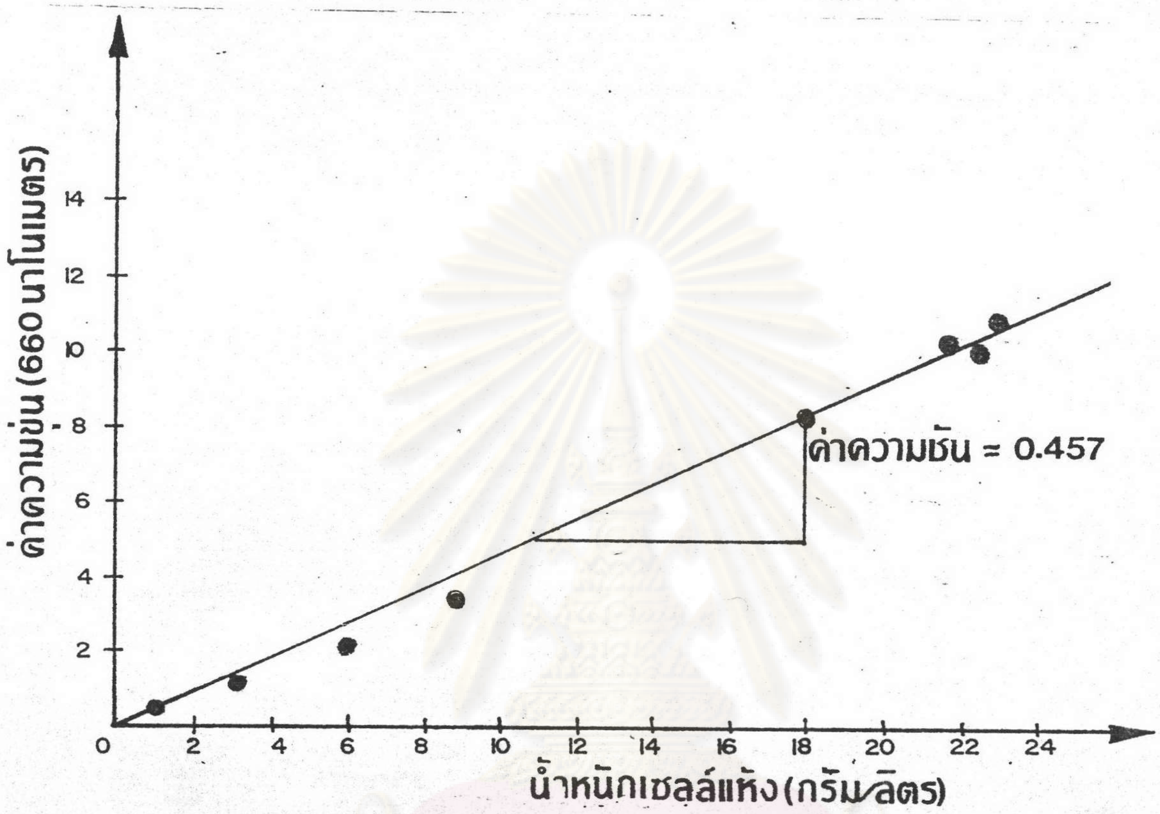
ข = นอร์มัล พาราฟฟินส์ที่มีจำนวนคาร์บอน 14 อะตอม

ค = นอร์มัล พาราฟฟินส์ที่มีจำนวนคาร์บอน 15 อะตอม

ง = นอร์มัล พาราฟฟินส์ที่มีจำนวนคาร์บอน 16 อะตอม

จ = นอร์มัล พาราฟฟินส์ที่มีจำนวนคาร์บอน 17 อะตอม

9. <u>ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับน้ำหนักเซลล์แห้งของ</u> <u>Candida</u> <u>oleophila</u> C-73



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติ

นางสาว เรวดี เลิศไตรรักษ์ เกิดวันที่ 28 ตุลาคม พ.ศ.2507 ได้รับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีวเคมี จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2529

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย