เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

เรวดี เลิศไตรรักษ์. 2535. กรดมะนาวจากกนอร์มัล พาราฟฟินส์โดยวิธีการหมักในอาหารเหลวด้วยยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

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

Akiyama,S. , Suzuki,T. , Sumino,Y., Nakao,Y., and Fukuda,H. 1973. Induction and Citric Acid Production of Fluoroacetate-sensitiive Mutant Strains of *Candida lipolytica*. Agricultural and Biological Chemistry. 37:879-884.

Baltz, R. 1986. Strain Improvement. In Demain,A.L., and Solomon, N. A. (eds.) , Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, pp. 154-169.

Banno,I.,Hasegawa,T., and Iizuka,H.1971.A Taxonomic Investigation of Acid Producing Yeasts. Journal of Fermentation Technology. 49:165-179.

Bautz, E., and Freese, E. 1960. On The Mutagenic Effect of Alkylating Agents.Processdings of The National of Science of The United States of America. 46:1585-1594.

Bernfeld,P.1955. Amylase, α and β .In P.S.Colowick and O.N.Kaplan (eds.), Methods in Enzymology, vol.1 pp.149-150.New York. Academic Press.

Beutler, H.O. 1985. d-Isocitrate.In H.U. Bergmeyer (ed.), Methods of Enzymatic Analysis, vol.7. pp.1-12.Weinheim:Verlagsgesellschaft.

Bevilacqua,A.E., and Califano,A.N. 1989. Determination of Organic Acids in Dairy Products by High Performance Liguid Chromatography.Journal of Food Science. 54:1076-1079.

Bouchard, E.F. and Merritt, E.G. 1979. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology ,vol 6, pp.150-179. New york: John Wiley & Sons.

Bradley, S.G. 1966. Genetic in Applied Microbiology. Advances in Applied Microbiology. 8:29-59.

Briffaud, J. and Engasser, J.M. 1979. Citric Acid Production from Glucose. I. Growth and Excretion Kinetics in a Stirred Fermentor. Biotechnology And Bioengineering.21:2083-2092.

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

Drake, J.W., and Abrahamson, S. 1977. Comparative Mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and ICR-170. In De Serres, F.J., and Shelby, M.D. (eds.), Comparative Chemical Mutagenesis, pp. 883-889. New York:Plenum Press.

Fantini, A.A. 1975. Strain Developement. Methods in Enzymology. vol. 43. pp. 24-41. New York:Academic Press.

Hammissa, F.A., Abou-Zeid,A.A., and Radwan,A.A. 1982. Induction and Selection of Improved Yeast Mutants for Citric Acid Production. Agricultural Wastes. 4:17-23.

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

Foster, J.W., and Davis, H. 1949. Detection And Occurrence of Acid-producing Fungi. Bulletin of The Torrey Botanical Club. 76 : 174-176.

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: 356-363.

Gertz, C. 1990. HPLC Tips and Tricks. p.233. Oxford: Alden Press.

Good,D.W.,Droniuk,R.,Lawford,G.R., and Fein, J.E. 1985. Isolation And Characterization of A *Saccharomysis lipolytica* Mutant Showing Increased Production of Citric Acid from Canola Oil. Canadian Journal of Microbiology. 31:436-440.

Hopwood, D.A. 1970. The Isolation of Mutants. In Norris,J.R., and Ribbons, D.W. (eds.), Method in Microbiology, vol.3A. pp. 36-430. New York : Academic Press.

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

Ikeno, Y., Masuda, M., Tanno, K., Oomori, I., and Takahashi, N. 1975. Ctric Acid Production from Various Raw Materials by Yeasts. Journal of Fermentation Technology. 53:752-756.

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.

Lawley, P.D., and Brookes, P. 1961. Acidic Dissociation of 7:9-Dialkylguanines and Its Possible Relation to Mutagenic

Properties of Alkylation Agents. Nature.192:1081-1082.

Lvova, E.B., Movchan, Y.R., Shcherbakova, E.Y., and Smirnov, V.A. 1980. A Method for Primary Selection of Microorganism Producing Organic Acid. Microbiologiya. 49: 323-325.

Mandell, J.D., and Greenberg, J. 1960. A New Chemical Mutagen for Bacteria, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine.Biochemical And Biophysical Research Communications. 3:575-577.

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

Matsuoka,M.,Ueda,Y.,and Aiba,S.1980.Role and Control of Iso-citrate Lyase in *Candida lipolytica*. Journal of Bacteriology.144: 692-697.

Mattey, M. 1992. The Production of Organic Acids. Critical Reviews In Biotechnology. 12: 87-132.

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

Mollering, H. 1985. Citrate. In H.U. Bergmeyer (ed.), Methods of Enzymatic Analysis, vol.7. pp.1-12. Weinheim : Verlagsgesellschaft.

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.

Nout,M.J.R. 1972. A Screening Method for Citric Acid Production by Yeasts,Using Glucose- and Hydrocarbon-containing Media as Substrates, and *Candida* Strains as Test Organism.

Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology. 38:633-636.

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

Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1959. The Citric Acid Fermentation Industrial Microbiology (3rd. ed.). pp. 533-577. McGraw-Hill : New York.

Rane, K.D. and Sims, K.A. 1994. Oxygen Uptake and Citric Acid Production by *Candida lipolytica* Y-1095.Biotechnology and Bioengineering. 43: 131-137.

_____.1993. Production of Citric Acid by *Candida oleophila* Y1095: Effect of Glucose Concentration on Yield Productivity. Enzyme and Microbial Technology. 15:646-651.

Rottigni, C. and Cardini, G. 1981. Process for Preparing Citric Acid by Fermentation of Carbohydrates. US Patent 4,278,764.

Shah, D.N., Chattoo, 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 45:104-109.

Stanbury, P.F., and Whitaker, A. 1984. The Isolation,Preservation and Improvement of Industrial Microorganism.Principles of Fermentation Technology.pp.26-73.Exeter:BPPC Wheatons Ltd.

Stern,R.J. 1957. Assay of Tricarboxylic Acids. In S.P. Colowick, and N.O. Kaplan (eds.), Methods 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.

Wojtatowicz,M., Rymowicz,W., and Kautola,H. 1991. Comparison of Different Strains of the Yeast *Yarrowia lipolytica* for Citric Acid Production from Glucose Hydrol. Applied Biochemistry and Biotechnology. 31:165-174.

_____, 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 ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารเหลว YM (Yeast-Malt Extract Medium)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	3.0 กรัม
สารสกัดจากมอลต์	3.0 กรัม
เปปโตน	5.0 กรัม
กลูโคส	10.0 กรัม

ส่วนในอาหารแข็ง YM (YM agar) เตรียมได้จากการเติมวุ้นผงปริมาณ 20 กรัม ลงในอาหารเหลวสูตรดังกล่าวข้างต้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตาราง-นิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. สูตรอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว

สูตรอาหาร PM1 ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส	200 กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	2.0 กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.2 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2 กรัม
แมงกานีสซัลเฟต	0.25 กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0 กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	100 กรัม

สูตรอาหาร PM2 ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แป้งที่ย่อยแล้ว คิดเป็นกลูโคส	200 กรัม

ส่วนประกอบอื่นๆ เหมือนกับสูตรอาหาร PM1

สูตรอาหาร PM3 ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แป้งที่ย่อยแล้ว คิดเป็นกลูโคส	220	กรัม
แคลเซี่ยมคาร์บอเนต	120	กรัม

ส่วนประกอบอื่นๆ เหมือนกับสูตรอาหาร PM1

ชั่งแคลเซี่ยมคาร์บอเนต ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอาหาร จำนวน 25 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3. สูตรอาหารแข็งสำหรับคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่สามารผลิตกรดได้สูง

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย องค์ประกอบเช่นเดียวกับสูตรอาหาร PM1 ในข้อ 2 ยกเว้นน้ำตาลลกลูโคสใช้ 100 กรัม จากนั้นเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาณร้อยละ 0.3 น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วเติมวุ้นผงปริมาณ 12 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมสารละลายไทโอยูเรีย

ละลาย 2.0 กรัม ของโซเดียมเตตระโบรเรต (sodium tetraborate) ในสารละลายไทโอยูเรีย ที่เตรียมได้จากการละลายไทโอยูเรีย 4.0 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 9.2

2. การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

ละลาย 1.0 กรัมของกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมโปตัสเซียมตาเตรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) 30 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100.0 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา

3. การเตรียมสารละลาย ทริส-กรดมาลิอิก บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

Tris[hydroxymethyl]aminomethane	12.1 กรัม
Maleic acid	11.6 กรัม

ปรับความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ 8 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

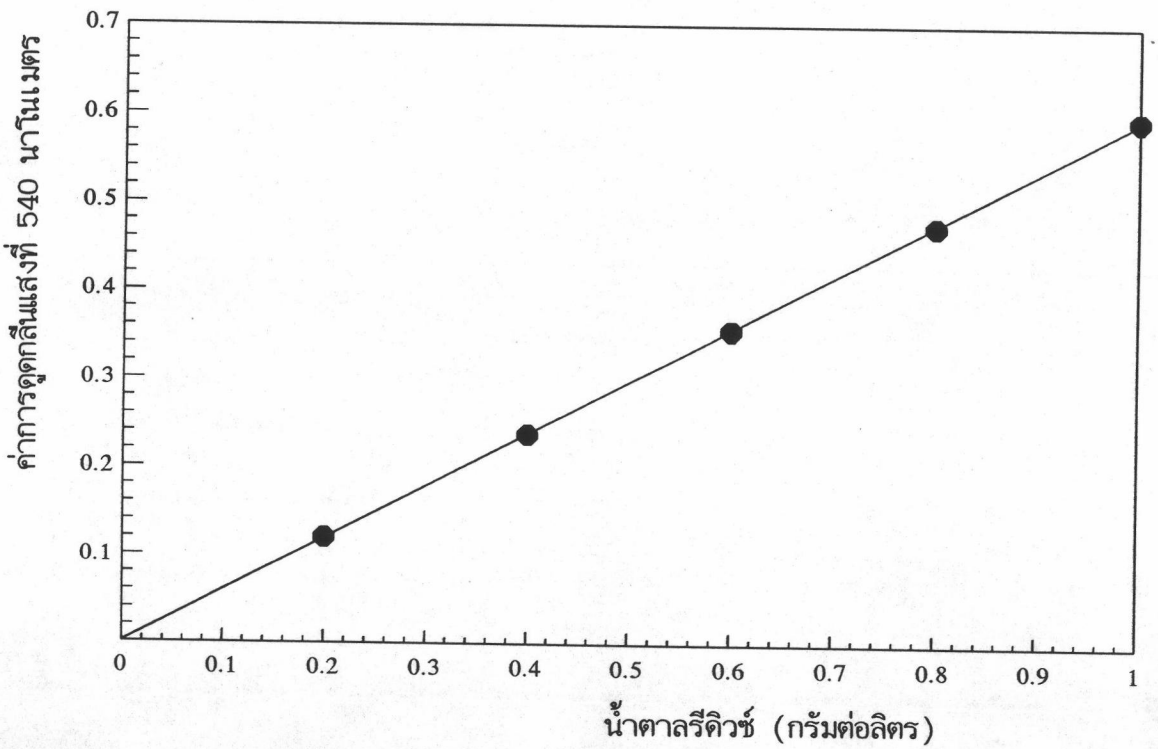
4. การเตรียมสารละลาย พี.จี.โอ.เอนไซม์

ละลาย พี.จี.โอ.เอนไซม์ 1 แคปซูล ซึ่งประกอบด้วย กลูโคสออกซิเดส (glucoseoxidase) 500 หน่วย และเปอร์ออกซิเดส(peroxidase) 100 หน่วย ในสารละลายโพแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เติม 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายออโธ-ไดอะนิซิดีน(o-dianisidine) เข้มข้นร้อยละ 1 ในเอธานอล ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายโพแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

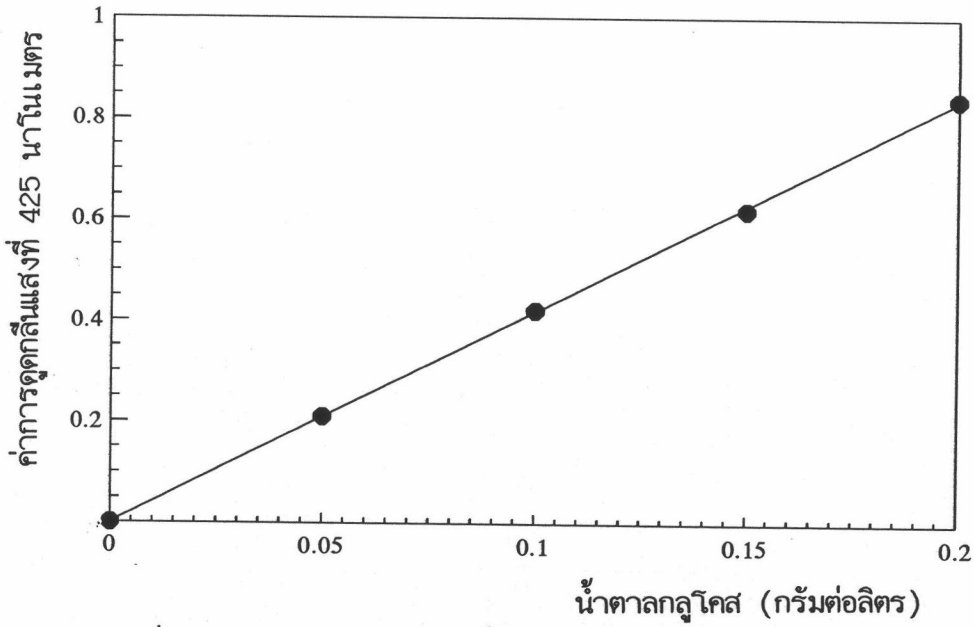
1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีกรดไนโตรซาลิไซลิค ของ Bernfeld



รูปที่ 24 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์

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

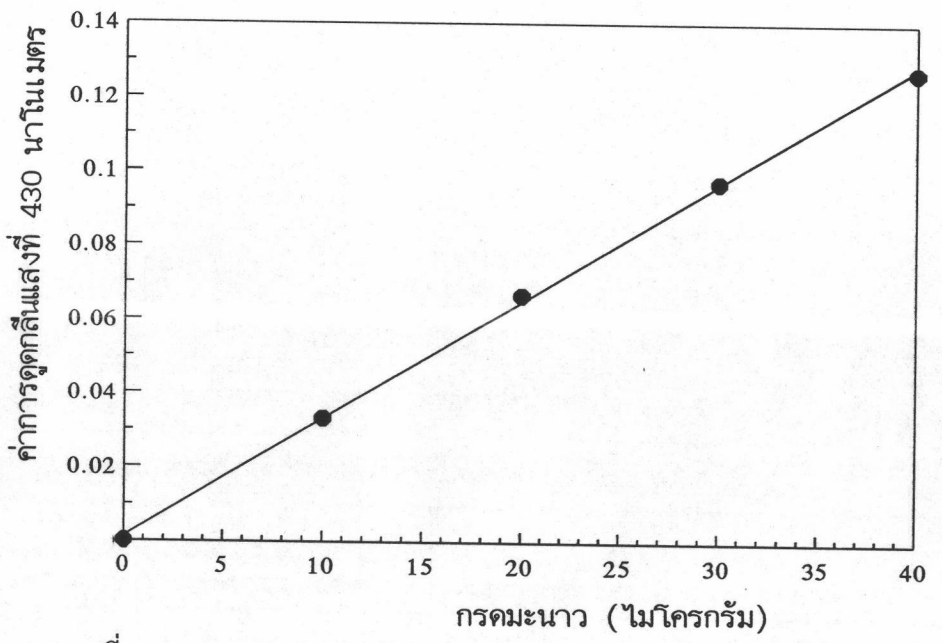
2. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส โดยวิธี พี.จี.โอ.เอนไซม์



รูปที่ 25 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

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

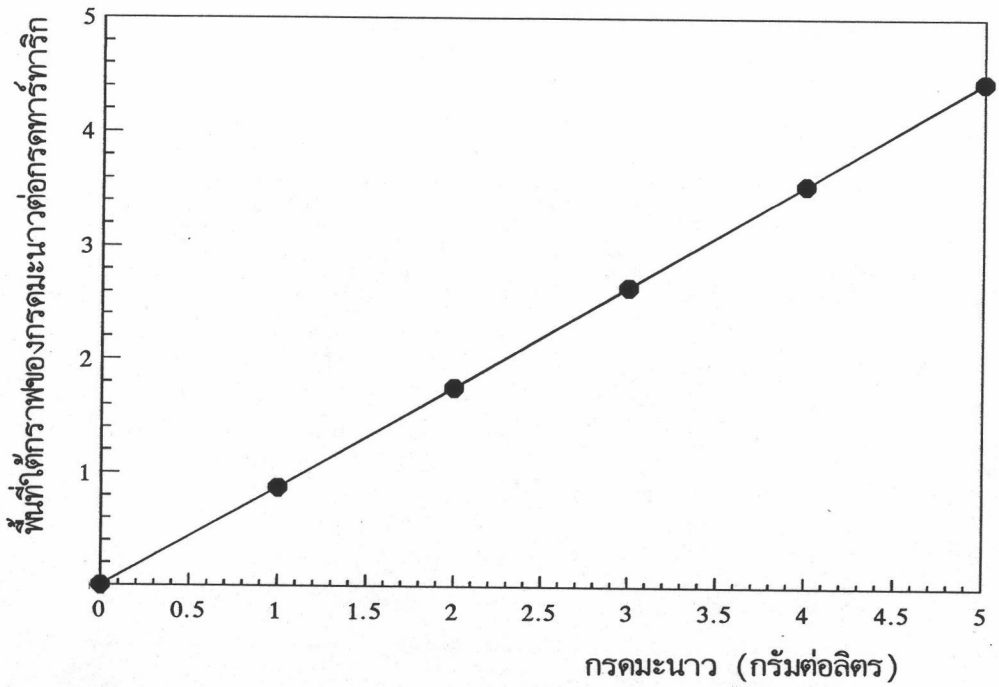
3. กราฟมาตรฐานของกรดมะนาว โดยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน ของ Stern



รูปที่ 26 กราฟมาตรฐานของกรดมะนาว

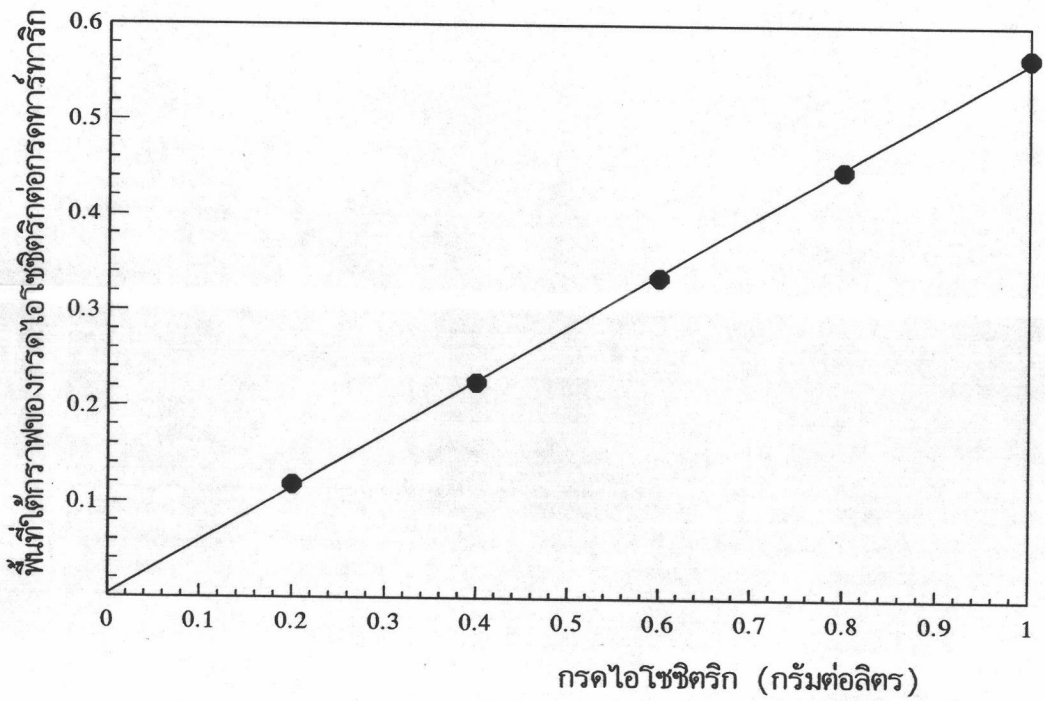
กรดมะนาว = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 430 นาโนเมตร X 1/ความชัน X ความเจือจาง (กรัมต่อลิตร)

4. กราฟมาตรฐานของกรดมะนาว โดยวิธี HPLC



รูปที่ 27 กราฟมาตรฐานของกรดมะนาว

5. กราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิตริก



รูปที่ 28 กราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิตริก

ภาคผนวก ง

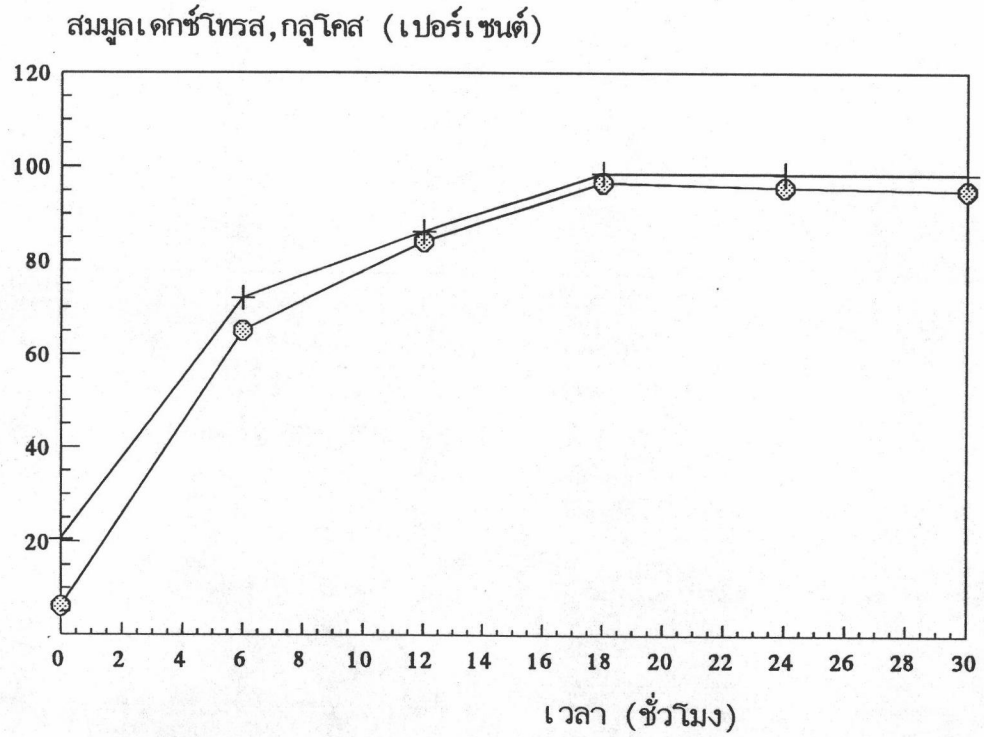
การย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

วัตถุดิบและเอนไซม์ที่ใช้

1. แป้งมันสำปะหลัง ตรากุหลาบ ของบริษัท ไทยวา จำกัด
2. เอนไซม์ BAN 240 L ของบริษัท Novo Nordisk ประเทศเดนมาร์ก
3. เอนไซม์ Dextrozyme 225/75 L ของบริษัท Novo Nordisk ประเทศเดนมาร์ก

การย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์

1. ชั่งแป้งมันสำปะหลัง 14 กิโลกรัม ผสมกับน้ำปราศจากอิออนปริมาตร 30 ลิตร
2. ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล
3. เติมเอนไซม์ BAN ปริมาตร 8.50 มิลลิลิตร
4. เพิ่มอุณหภูมิเป็น 90 องศาเซลเซียส แล้วลดอุณหภูมิลงทันที ควบคุมไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส
5. ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.3-4.5 ด้วยสารละลายกรดซัลฟุริกเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์
6. เติมเอนไซม์ Dextrozyme ปริมาตร 15 มิลลิลิตร
7. ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง
8. เพิ่มอุณหภูมิเป็น 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
9. กรองผ่านเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
10. เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



รูปที่ 29 เปอร์เซนต์สมมูลเดกซ์โทรส และกลูโคส ของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ที่เวลาต่างๆ

+ สมมูลเดกซ์โทรส

⊗ กลูโคส

ภาคผนวก จ

สูตรการคำนวณ

1. โพเทนซี อินเดกซ์ (potency index)

$$\text{โพเทนซี อินเดกซ์} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส(มิลลิเมตร)}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี(มิลลิเมตร)}}$$

2. ผลผลิต ($\%Y_{p/s}$)

$$\text{ผลผลิต} = \frac{\text{กรดมะนาว(กรัมต่อลิตร)} \times 100}{\text{น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น-น้ำตาลกลูโคสที่เหลือ(กรัมต่อลิตร)}}$$

3. สัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient ; r)

ค่า r นี้มีค่าอยู่ระหว่าง -1 ถึง +1 เป็นค่าที่ไม่มีหน่วย จะบอกระดับความสัมพันธ์ของ X และ Y ว่ามีมากน้อยเพียงใด กล่างคือ ถ้าค่า r เข้าใกล้ +1 หรือ -1 มากเท่าใด แสดงว่า X และ Y มีความสัมพันธ์กันมากเท่านั้น โดยอาจเป็นไปในทางตามกันถ้าเข้าใกล้ +1 และเป็นไปในทางกลับกันถ้าเข้าใกล้ -1 และถ้าค่า r เข้าใกล้ 0 มากเท่าใด แสดงว่า X และ Y มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงต่อกันน้อยลงเท่านั้น

$$\text{สัมประสิทธ์สหสัมพันธ์(r)} = \frac{\sum_{i=1}^{N}(X_i-\mu_X)(Y_i-\mu_Y)}{\sqrt{\sum_{i=1}^{N}(X_i-\mu_X)^2 \sum_{i=1}^{N}(Y_i-\mu_Y)^2}}$$

โดย N = จำนวนข้อมูลทั้งหมดในประชากรของ X และของ Y

μ = ค่าเฉลี่ย (mean)

4. ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation)

$$\text{ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (s)} = \sqrt{\sum_{i=1}^{n}\frac{(X_i-\bar{X})^2}{n-1}}$$

n = จำนวนข้อมูลทั้งหมด

พระมหากรุณาธิคุณ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นายสมศักดิ์ นาคซื่อตรง เกิดวันจันทร์ที่ 13 มกราคม พ.ศ.2512 ที่จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ในปีการศึกษา 2533 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ.2534