รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

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

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

เรวดี เลิศไตรรักษ์. 2535. กรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟฟินส์โดยวิธีการหมักในอาหารเหลวด้วยยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

ภาษาอังกฤษ

Abou-Zeid, A.A.,Baghlaf, A.O.,Khan, J.A. and Makhashin, S.S. 1983. Uilization of date seeds and cheese whey in production of citric acid by *Candida lipolyttica.* Agricultural Wastes 8:131-142.

_____, and Ashy, M.A. 1984. Producion of citric acid : a review. Agriculural Wastes 9: 51-76.

Aiba, S. and Matsuoka, M. 1979. Identification of metabolic model: citrate production from glucose by *Candida lipolytica.* Biotechnology and Bioengineering 21:1373-1386.

Akiyama, S., Suzuki, T., Sumino, Y., Nakao, Y. and Fukuda, H. 1973. Relationship between aconitate hydratase activity and citric acid productivity in Fluoroacetate-sensitive mutant strain of *Candida lipolytica.* Agricultural and Biological Chemistry 37 (4): 885-888.

Asenjo, J.A., Szuhay, J. and Chiu, D. 1982. Growth and citric acid production by *Candida guilliermondii* using a cellulose substrate. Biotechnology and Bioengineering Symp. 12: 111-120.

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

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

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. Substrates utilization, non-carbohydrate substrate. In Berry, D.R., Russell, I. and Stewart, G.G.(eds.), Yeast Biotechnology. pp.331-342. London: Allen 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.

Enzminger, J.D. and Asenjo, J.A. 1986. Use of cell recycle in the aerobic fermentative production of citric acid by yeast. Biotechnology Letters 8 (1) :7-12.

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 their ability to produce citric and isocitric acid. Applied Microbiology and Biotechnology 23: 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 their ability to produce citric and isocitric acid. Applied Microbiology and Biotechnology 23: 378-383.

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.

Gledhill, W.E., Hill, I.D. and Hodson, P.H. 1973. Citrate production from hydrocarbons by use of a nonsterile, semicontinuous cell recycle system. Biotechnology and Bioengineering15: 963-972.

Goldberg, I., Peleg, Y. and Rokem, J. S. 1991. Citric, Fumaric and Malic Acids. Biotechnology and Food Ingredients. pp.349-358. New York : Van Nostrand Reinhold

Hattori, K., Yokoo, S. and Imada, O. 1974. Effect of ammonium ion on the ratio of citric acid to d-isocitric acid formed from n-paraffin. Journal of Fermentation Technology 52:542-550.

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.

Kautola, H.,Rymowicz, W., Linko, Y. and Linko, P. 1991. Production of citric acid with immobilized *Yarrowia lipolytica*. Applied Microbiology and Biotechnology 35: 447-449.

Kim, E.K. and Roberts, R.S. 1991. Rate equations for the vigorous stationary phase fermentation of citric acid by *Saccharomycopsis lipolytica*. Biotechnology and Bioengineering 37: 985-988.

Klasson, T.K., Clausen, E.C. and Gaddy, J.L. 1989. Coninuons 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.

Maddox, I.S., Spencer, K., Greenwood, J.M.,Dawson, M.W. and Brooks, J.D. 1985. Production of citric acid from sugars present in wood hemicellulose using *Aspergillus niger* and *Saccharomycopsis lipolytica*. Biotechnology letters 7: 815-818.

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 producion 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 conditions of restricted growth are required for citric acid accumulation by *Yarrowia lipolytica* IMK 2. Applied Microbiology and Biotechnology 41:73-78.

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 ciric 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): 855-867.

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 organisms. Antonie van Leeuwenhoek 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 (1): 257-258.

Omar, S.H. and Rehm, H.J. 1980. Physiology and metabolism of two alkane oxidizing and citric acid producing strains of *Candida parapsilosis*. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 11: 35-41.

Phaff, H.J., Miller, M.W. and Mrak, E.M. 1978. The life of yeasts. 2nd ed. USA: the President and Fellows of Harvard College.

Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1959. The citric acid fermentation . Industrial Microbiology. (3rd. ed.). pp.533-577. 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 Microb. Technol. 15: 646-651.

_____. 1994. Oxygen uptake and citric acid production by *Candida lipolytica* Y1095. Biotechnology and Bioengineering 43:131-137.

_____. 1995. Citric acid production by *Candida lipolytica* Y 1095 in cell recycle and fed-batch fermentors. 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.Y. and Linko, P. 1993. Study on citric acid production with immobilized *Yarrowia lipolytica* in repeated batch and continuous air-lift bioreactors. Applied Microbiology and Biotechnology 39: 1-4.

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.

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

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

Stanbury, P.F. and Whitaker, A. 1984. Principles of Fermentation Technology. Oxford: Pergamon Press.

Tabuchi, T. and Igoshi, K. 1978. Regulation of enzyme synthesis of the glyoxylate , the citric acid, and the methylcitric acid cycles in *Candida lipolytica*. Agricultural and Biological Chemistry 42 (12) : 2381-2386.

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

Tani, Y., Sakai, Y. and Chou, S.G. 1990. Production of citric acid from methanol by a fluoroacetate-resistant mutant of *Candida* sp. Y-1. Applied Microbiology and Biotechnology 34: 5-9.

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.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (Yeast Malt Extract Medium)

อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อจะเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยที่ต้องการศึกษา โดยใส่อาหารในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตรต่อขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งไว้ 2 วัน จึงนำไปใช้

1.1 อาหารเหลวพื้นฐานสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส	10.0 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (DIFCO)	3.0 กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (DIFCO)	3.0 กรัม
เปปโตน	5.0 กรัม

1.2 อาหารเหลวสำหรับศึกษาชนิดของสารสกัดจากมอลต์

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 1.1 ยกเว้นชนิดของสารสกัดจากมอลต์มีการแปรผันตามการทดลอง

1.3 อาหารเหลวสำหรับศึกษาชนิด และปริมาณของสารสกัดจากยีสต์

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 1.1 ยกเว้นสารสกัดจากมอลต์จะใช้เกรดทางการค้าชนิดของเหลวข้นของ FIS และสารสกัดจากยีสต์จะแปรผันทั้งชนิดและปริมาณตามการทดลอง

1.4 อาหารเหลวที่เหมาะสมสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส	10.0 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (IBGE)	3.0 กรัม
สารสกัดจากมอลต์เกรดทางการค้าชนิดของเหลวข้น (paste) ของ FIS คิดเป็นน้ำหนักแห้ง	3.0 กรัม
เปปโตน	5.0 กรัม

1.5 อาหารแข็งลาดเอียง (YM Slant)

เตรียมได้โดยเติมวุ้นผง 20.0 กรัม ลงในสูตรอาหารเหลวข้อ 1.1 หรือ 1.4 ทำให้วุ้นละลาย ปิเปตใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 6.0 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. <u>อาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว</u>

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่จะกล่าวต่อไปนี้จะเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยที่ต้องการศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่อาหารปริมาตร 25.0 มิลลิลิตรต่อขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ตั้งไว้ 2 วัน จึงนำไปใช้

2.1 อาหารพื้นฐานสำหรับการผลิตกรดมะนาว

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์และกำจัดกากออกแล้ว (ภาคผนวก ง) มีน้ำตาลกลูโคส	220.00 กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	2.00 กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส	0.20 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟสเฮปตาไฮเดรต	0.20 กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.25 กรัม
สารสกัดจากยีสต์(DIFCO)	1.00 กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต(OMEGA)	120.00 กรัม

2.2 อาหารสำหรับศึกษาชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ยกเว้นชนิดของแคลเซียม-คาร์บอเนตมีการแปรผันตามการทดลอง

2.3 อาหารสำหรับศึกษาผลของกากที่เหลือจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ต่อการผลิตกรดมะนาว

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 2.1 ยกเว้นแหล่งของคาร์บอนจะใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยใช้เฉพาะส่วนใสเปรียบเทียบกับการใช้ทั้งกาก

2.4 อาหารสำหรับศึกษาผลของการไหม้ของน้ำตาลต่อการผลิตกรดมะนาว

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 2.1 ยกเว้นแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์และกำจัดกากแล้วนั้นจะถูกทำให้ไหม้ระดับต่าง ๆ เปรียบเทียบกับแบบธรรมดา

2.5 อาหารสำหรับศึกษาปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตที่เหมาะสม

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ยกเว้นมีการแปรผันปริมาณเริ่มต้นของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตเป็น 0.0-0.5 กรัม

2.6 อาหารสำหรับศึกษาผลของสารสกัดจากยีสต์

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ยกเว้นสารต่าง ๆ ดังนี้

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.4 กรัม

แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.3 กรัม

สารสกัดจากยีสต์ (DIFCO,IBGE) 0.0-2.0 กรัม

2.7 อาหารสำหรับศึกษาปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสม

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ยกเว้นสารต่าง ๆ ดังนี้

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.4 กรัม

แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.3 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (IBGE) 1.0 กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1-0.5 กรัม

2.8 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า
ในอาหาร 1 ลิตร มี ส่วนประกอบดังนี้

แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ มีน้ำตาลกลูโคส	220.0 กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	2.0 กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส	0.2 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟสเฮปตาไฮเดรต	0.4 กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.3 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (IBGE)	1.0 กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต (OMEGA)	120.0 กรัม

2.9 อาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร
ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 2.8 แยกสารอาหารออกเป็น 4 ส่วน คือ

1. แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์และกำจัดกากออกแล้ว
2. แอมโมเนียมคลอไรด์ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตาไฮเดรต และแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต
3. สารสกัดจากยีสต์
4. แคลเซียมคาร์บอเนต

ส่วนที่ 1-3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที ส่วนแคลเซียมคาร์บอเนตนึ่งฆ่าเชื้อพร้อมถังหมักและสารกำจัดฟองที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

2.10 อาหารสำหรับศึกษาผลการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างโดยแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต

เตรียมอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว 3.5 ลิตรโดยมีสูตรอาหารและวิธีเตรียมเช่นเดียวกับในข้อ 2.9 ยกเว้นแคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งจะแบ่งใส่ในถังหมักตั้งแต่เริ่มต้นรวม 45 กรัม (คิดเป็นปริมาณ 12.86 กรัมต่อลิตร) ส่วนแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหลือ 375 กรัม จะแบ่งเติมเป็น 6 ครั้งๆละ 60 กรัม และครั้งสุดท้าย 75 กรัม โดยเตรียมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ผสมน้ำปราศจากไอออนขวดละ 40 มิลลิลิตร และเตรียมน้ำสำหรับกลั้วอีกขวดละ 32 มิลลิลิตร ดังนั้น ปริมาตรน้ำทั้งหมดที่ใช้ในการเตรียมแคลเซียมคาร์บอเนตสำหรับเติมคือ 432 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.11 อาหารสำหรับศึกษาผลการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในถังหมัก

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับในข้อ 2.9 ยกเว้นจะใช้ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3.0 ลิตร ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และเตรียมสารละลายเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสำหรับใช้เติม โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์และกำจัดกากออกแล้วซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสประมาณ 325 กรัมต่อลิตร ใช้ปริมาตร 1450 มิลลิลิตร ทำให้เข้มข้นขึ้นจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องทำให้ระเหยเป็นไอ (evaporator) ซึ่งสารละลายที่ได้จะมีน้ำตาลกลูโคสประมาณ 942 กรัมต่อลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ส่วนแคลเซียมคาร์บอเนตจะเตรียมเช่นเดียวกับในข้อ 2.10

2.12 อาหารสำหรับศึกษาผลการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างด้วยแคลเซียมออกไซด์

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับในข้อ 2.11 ยกเว้นสารควบคุมค่าความเป็นกรดด่างจะใช้แคลเซียมออกไซด์ซึ่งเตรียมในรูปสารแขวนลอยในน้ำปริมาณร้อยละ 30. น้ำหนักต่อปริมาตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1.การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

ละลาย 1.0 กรัมของกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมโปแตสเซียมโซเดียมตาร์เตรต 30.0 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100.0 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา

2.การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 195 มิลลิลิตร

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 305 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน เติมน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว 500 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น

3.การเตรียมสารละลาย พีจีโอ. เอนไซม์

ละลาย พีจีโอ. เอนไซม์ 1 แคปซูล ซึ่งประกอบด้วย กลูโคสออกซิเดส 500 หน่วย และเปอร์ออกซิเดส 100 หน่วย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เติมสารละลายออโธ-ไดอะนิซิดีน เข้มข้นร้อยละ 1 ในเอธานอล ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 100.0 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บในขวดสีชาและแช่ตู้เย็น

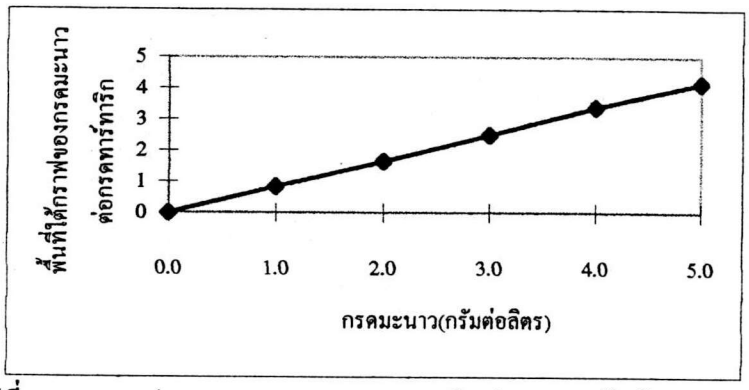
4.การเตรียมสารละลายตัวพา (mobile phase) สำหรับการวิเคราะห์กรดมะนาวโดย HPLC

ละลายไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร ในน้ำที่กำจัดไอออนแล้วอย่างดี ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.00 ด้วยกรดฟอสฟอริก แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตต จากนั้นนำไปกำจัดก๊าซโดยใช้เครื่องกำเนิดคลื่นอุลตราโซนิค (sonicator) เป็นเวลา 22 นาที

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

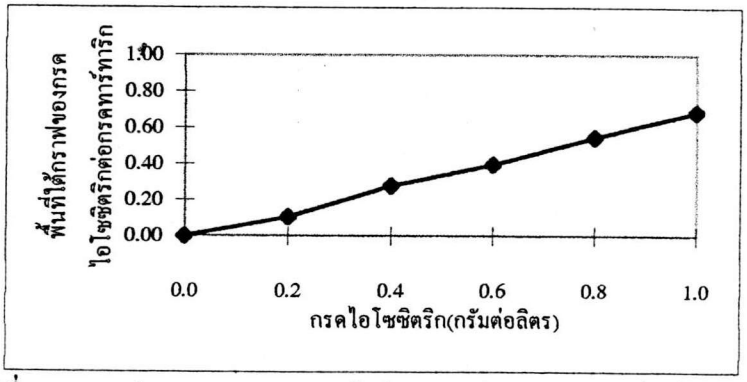
1. กราฟมาตรฐานของกรดมะนาว โดยวิธี HPLC



รูปที่ 41 กราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.0 - 5.0 กรัมต่อลิตร

กรดมะนาว = พื้นที่ใต้กราฟของกรดมะนาวต่อกรดทาร์ทาริก X 1/ความชัน X ความเจือจาง (กรัมต่อลิตร)

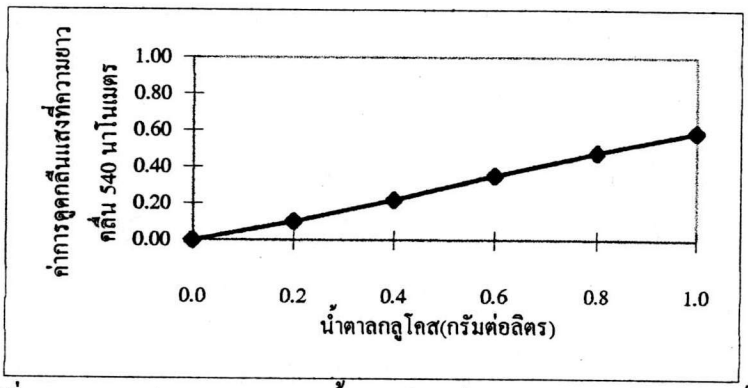
2. กราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิตริก โดยใช้วิธี HPLC



รูปที่ 42 กราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิตริกในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร

กรดไอโซซิตริก (กรัมต่อลิตร) = พื้นที่ใต้กราฟของกรดไอโซซิตริกต่อกรดทาร์ทาริก X 1/ความชัน X ความเจือจาง

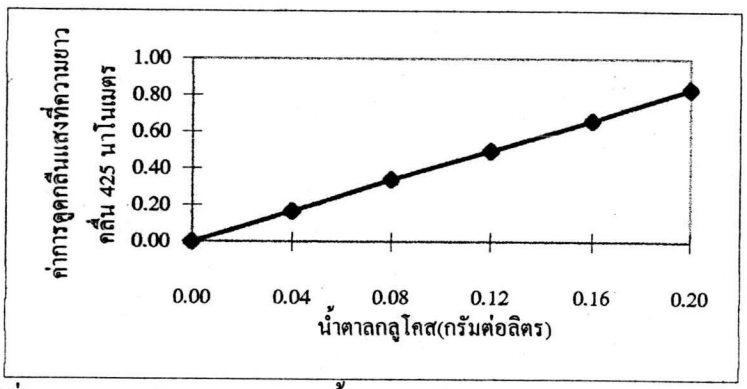
3. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีใช้กรดไดไนโตรซาลิไซลิก



รูปที่ 43 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร

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

4. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส โดยวิธีพีจีโอ. เอนไซม์



รูปที่ 44 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสในช่วงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.0-0.2 กรัมต่อลิตร

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

ภาคผนวก ง

การย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

<u>วัตถุดิบและเอนไซม์ที่ใช้</u>

1.แป้งมันสำปะหลังตรากุหลาบ ของบริษัท ไทยวา จำกัด

2.เอนไซม์ BAN 240 L ของบริษัท Novo Nordisk ประเทศเดนมาร์ก

3.เอนไซม์ Dextrozyme 225/75 L ของบริษัท Novo Nordisk ประเทศเดนมาร์ก

<u>ขั้นตอนการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์</u>

1.ชั่งแป้งมันสำปะหลัง 14 กิโลกรัม ผสมกับน้ำทีกำจัดไอออนแล้ว 30 ลิตร

2.ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล

3.เติมเอนไซม์ BAN ปริมาตร 8.50 มิลลิลิตร

4.เพิ่มอุณหภูมิเป็น 70 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วเพิ่มเป็น 90 องศาเซลเซียส จากนั้นลดอุณหภูมิลงทันที ควบคุมไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส

5.ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.3-4.5 ด้วยสารละลายกรดซัลฟุริกเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์

6.เติมเอนไซม์ Dextrozyme ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

7.ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

8.เมื่อเสร็จขั้นตอนการย่อยแป้งแล้ว เพิ่มอุณหภูมิเป็น 110 องศาเซลเซียส 15 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์

9.แยกกากออกโดยการตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

10.เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สมบัติของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว

ปริมาณของแข็งทั้งหมด	351.09	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	339.21	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	325.92	กรัมต่อลิตร
สมมูลเดกซ์โตรส	96.62	
น้ำตาลกลูโคสร้อยละ	92.83	

ภาคผนวก จ

สูตรการคำนวณ

<u>การวิเคราะห์ผลผลิต</u>

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

   = กรดมะนาวที่ได้ (กรัมต่อลิตร) / น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)

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

   = น้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อลิตร) / น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)

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

   = กรดมะนาวที่ได้ (กรัมต่อลิตร) / น้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อลิตร)

<u>การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ</u>

1. ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely random design หรือ CRD)

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$SST = \sum_{i=1}^{k}\sum_{j=1}^{n} X_{ij}^2 - \frac{X_{..}^2}{kn}$$

$$SSA = \sum_{i=1}^{k} \frac{X_{i.}^2}{n} - \frac{X_{..}^2}{kn}$$

$$SSE = SST - SSA$$

โดยที่ SST = Total sum of squares

SSA = sum squares of treatments

SSE = sum squares of error

X = ค่าสังเกตที่ได้

n = จำนวนซ้ำ

k = จำนวนชุดทดลอง

แล้วนำผลต่าง ๆ ที่ได้มาเขียนลงในตาราง ซึ่งเรียกว่า ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ดังนี้

ตารางที่ 30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

Source of Variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean Squares	F
Treatments	k-1	SSA	MSA=SSA/(k-1)	MSA/MSE
Error	k(n-1)	SSE	MSE=SSE/k(n-1)	
Total	nk-1	SST		

เปรียบเทียบค่า F ที่ได้กับค่า F ในตารางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01

2. ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ที่เป็นแฟคตอเรียล แบบ 2 ปัจจัย (ใช้ในการทดลองที่ 3.7 ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว)

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$SST = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{n} X_{ijk}^2 - \frac{X_{...}^2}{abn}$$

$$SSA = \sum_{i=1}^{a}\frac{X_{i..}^2}{bn} - \frac{X_{...}^2}{abn}$$

$$SSB = \sum_{j=1}^{b}\frac{X_{.j.}^2}{an} - \frac{X_{...}^2}{abn}$$

$$SS(AB) = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\frac{X_{ij.}^2}{n} - \frac{X_{...}^2}{abn} - SSA - SSB$$

$$SSE = SST - SSA - SSB - SS(AB)$$

โดย SSA และ SSB คือค่าผลบวกของกำลังสอง(sum of squares) สำหรับปัจจัยหลัก (main effect) A และ B ตามลำดับ

SS(AB) คือ interaction sum of squares ของ A และ B

a = จำนวนระดับของปัจจัย A (คือปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ซึ่งมี 6 ระดับ)

b = จำนวนระดับของปัจจัย B (คือปริมาณแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว ซึ่งมี 6 ระดับ)

n = จำนวนซ้ำในแต่ละ a_ib_j (คือ 3 เนื่องจากทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

X = ค่าสังเกตที่ได้

นำค่าต่าง ๆ ที่ได้มาเขียนในตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน ดังนี้

ตารางที่ 31 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดที่เป็นแฟคตอเรียลแบบ 2 ปัจจัย

Source of Variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean Squares	F
Treatments	ab-1			
A	a-1	SSA	MSA	MSA/MSE
B	b-1	SSB	MSB	MSB/MSE
AB	(a-1)(b-1)	SS(AB)	MS(AB)	MS(AB)/MSE
Error	ab(n-1)	SSE	MSE	
Total	abn-1	SST		

เปรียบเทียบค่า F ที่ได้กับค่า F ในตารางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01

3. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย 2 ค่า โดยใช้ t-test

ในกรณีที่ไม่ทราบความแปรปรวนของประชากร แต่ทราบว่าความแปรปรวนของประชากรทั้ง 2 กลุ่ม ไม่แตกต่างกัน

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{S_p\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

degree of freedom = $n_1 + n_2 - 2$

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

เปรียบเทียบค่า t ที่ได้กับค่า t ในตารางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01

สมมูลเดกซ์โตรส (dextrose equivalent ; DE)

สมมูลเดรกโตรส = $\frac{\text{น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) x 100}}{\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)}}$

ประวัติผู้เขียน

นางสาวเชาวรีย์ เรืองวิไลทรัพย์ เกิดวันที่ 18 พฤศจิกายน พ.ศ. 2513 ที่จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2535 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2536