รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

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

ภาวิณี คชาสวัสดิ์. 2531. การตรึงเอนไซม์และเซลล์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เรวดี เลิศไตรรักษ์. 2535. กรดมะนาวจากนอร์มัลพาราฟฟินส์โดยวิธีการหมักในอาหารเหลวด้วยยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2530. การผลิตกรดซิตริค. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม หน้า 84-108 สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ 10330

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2524. การใช้เอนไซม์ไม่ละลายน้ำและเซลล์ที่ถูกตรึงในอุตสาหกรรม.ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Abou-Zeid,A.A. and Ashy,M.A. 1984. Production of citric acid : a review. Agric. Wastes 9: 51-79.

Bernfeld,P. 1957. Amylase, α and β . In Colowick,S.P. and Kaplan, N.O.(eds.), Method in Enzymology, vol 3, pp. 149-150. New York: Acadamic Press.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Briffaud,J. and Engasser,M. 1979. Citric acid production from glucose. II Growth and excretion kinetics in a trickle-flow fermentor. Biotechnol. Bioeng. 21: 2093-2111.

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

Bucke,C. 1987. Cell immobilization in calcium alginate. In Mosbach,K.(ed.), Method in Enzymology,vol 35, pp.175-189. New York: Acadamic Press.

Burden,D.W. and Eveleigh,D.E. 1990. Yeast-Diverse substrates and product. In Spencer,J.F.T. and Spencer,D.M. (eds.), Yeast Technology, pp. 204-206. Germany.

Champagne,C-P.,Girard,F. and Gardner,N. 1989. Growth of yeast contaminates in an immobilized lactic acid bacteria system. Lett. Appl. Microbiol. 8(6): 207-210.

Cheetham,P.S.J.,Blunt,K.W. and Bucke,C. 1979. Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. Biotech. and Bioeng. 21: 2155-2168.

_____. 1980. Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology. vol 4. New York: Acadamic Press.

Chibata,I., Tosa,T. and Sato,T. 1974. Immobilized aspartase-containing microbial cells : preparation and enzymatic properties. Appl. Microbiol. 27: 878-885.

_____.,Tosa,T.,Sato,T. and Mori,T. 1978. Immobilized Enzymes pp. 1-147. New York: Halsted Press.

_____. and Wingard,Jr.L.B. 1983. Immobilized Microbial Cells. Applied Biochemistry and Bioengineering, vol 9, pp. 1-4,

54-99. NewYork: Acadamic Press.

_____.,Tosa,T.,Sato,T. and Takata,I. 1987. Immobilization of cells in carragenan. In Mosbach,K. (ed.), Method in Enzymology,vol 135,pp. 189-198. New York: Acadamic Press.

Fukui,S. and Tanaka,A. 1982. Immobilized microbial cells. Ann. Rev. Microbiol. 36: 143-170.

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

Garg,K. and Sharma,C-B. 1992. Continuous production of citric acid by immobilized whole cells of *Aspergillus niger*. J. Gen. Appl. Microbiol. 38: 605-615.

Hamada,T., Sugishita,M. and Motai,H. 1990. Continuous of immobilized and free cells of salt-tolerant *Zygosaccharomyces rouxii* and *Candida vertilis* to the production of ethanol and 4-ethylguaiacal. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 624-628.

Hamamci,H. and Hang,Y.D. 1989. Production of citric acid by immobilized dried reactivated *Aspergillus niger*. Biotech. Tech. 3(1): 51-54.

Hecker,D.,Bisping,B. and Rehm,H-J. 1990. Continuous glycerol production by the sulphite process with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol. Biotechnol. 32(6): 627-632.

Horitsu,H.,Takahashi,Y.,Adachi,S.,Xioa,R.,Hayashi,T. and Kawai,K. 1988. Production of organic acids by immobilized cells of fungi. In Moo-Young,M.(ed.), Bioreactor immobilized

enzymes and cells: fundamentals and application. pp. 287-300. New York : Elsevier Applied Science Publishes.

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

Klasson,T.K., Clausen,E.C. and Gaddy,J.1. 1989. Continuous fermentation for the production of citric acid from glucose. Appl. Biochem. Biotech. 20/21: 491-509.

Klein,J.,Stock,J. and Vorlop,K-D. 1983. Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18: 86-91.

Koshcheenko,K.A. 1981. Living immobilized cells as biocatalysts of transformation and biosysthesis of organic compounds. Appl. Biochem. Microbiol. 17: 351-365.

Lockwood,L.B. and Schweiger,L.B. 1967. Citric acid aconitic acid production. In Pepplee, H.J. (ed.) Microbial Technology, pp. 183-199. New York : Reinholed.

Maddox,I. and Kingston,P. 1983. Use of immobilized cells of the yeast, *Saccharomycopsis lipolytica*, for the production of citric acid. Biotechnol. Lett. 5: 795-798.

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

Mattey,M. 1992. The production of organic acids. Crit. Rev. Biotechnol. 12(1/2): 87-132.

Miall,L.M. 1978. Organic acids. In Rose,A.H. (ed.), Economic Microbiology, vol 2, pp. 47-76. London : Acadamic 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.

Nakanishi,T.,Yamamoto,M.,Kimura,K.and Tanaka,K.1972. Fermentative production of citric acid from n-parraffin by yeasts. J.Ferment. Technol. 50(12): 855-867.

Nguyen,V.T. and Shieh,W.K. 1992. Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast in a fluidized bed reactor. J. Chem. Tech. Biotechnol. 55: 329-346.

Okashi,H.,Sato,S.,Mukataka,S and Takahashi,J. 1987. Citric acid production by *Candida tropicalis* under high dissolved oxygen concentrations. Agri. Biol. Chem. 1 : 257-258.

Rymowicz,W., Kautola,H., Wojtatowicz,M., Linko,Y-Y and Linko,P. 1993. Studies on citric acid production with immobilized *Yarrowia lipolytica* in repeated batch and continuous air-lift bioreactors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39 : 1-4.

Scardi,V. 1987. Immobilization of enzymes and microbial cells in gelatin. In Mosbach,K.(ed.), Method in Enzymology, vol 135. pp.293-299. New York: Acadamic Press.

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

ภาคผนวก ก

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญเติบโต (Yeast Malt Extract Medium)

1. อาหารเหลว

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ประกอบด้วย

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

ใส่อาหารเหลวสำหรับการเจริญเติบโต ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารแข็งลาดเอียง

เตรียมได้โดยการเติมวุ้นผง 20.0 กรัม ลงในอาหารเหลวสำหรับการเจริญเติบโต ปิเปตใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 6.0 มิลลิลิตร ปิดจุกด้วยสำลี แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาว</u> (ประเสริฐ,2537)

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส	200.0	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	2.0	กรัม
โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.5	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	100.0	กรัม

ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

<u>สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กรดมะนาว</u>

สารละลายไทโอยูเรีย

ละลายโซเดียมเตตราบอเรต 2.0 กรัม ในสารละลายไทโอยูเรียความเข้มข้นร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 9.2 เก็บไว้ในขวดสีชา

<u>สารเคมีสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์</u>

สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิค (3,5-dinitrosalicylic acid)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิค 1.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเติมโปตัสเซียมโซเดียมตาร์เตรท 30.0 กรัม นำไปอุ่นจนละลายหมด เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรรวมเป็น 100.0 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

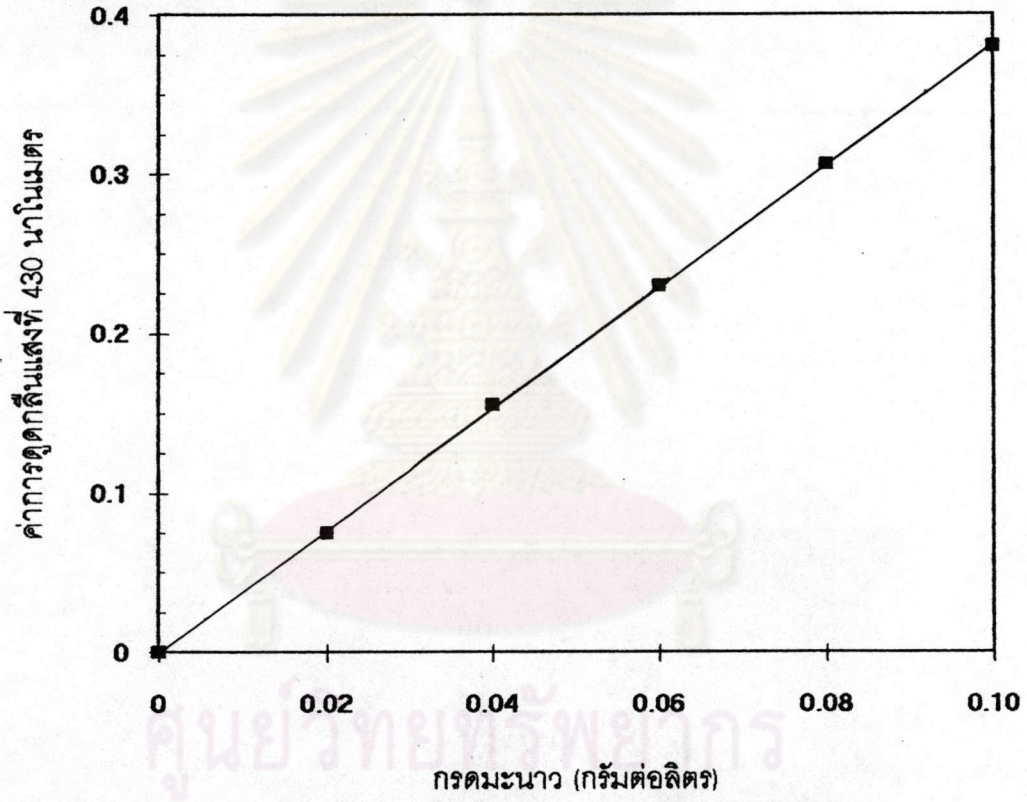
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟมาตรฐานของกรดมะนาว โดยวิธีเพนตะโบรโมอะซิโตน



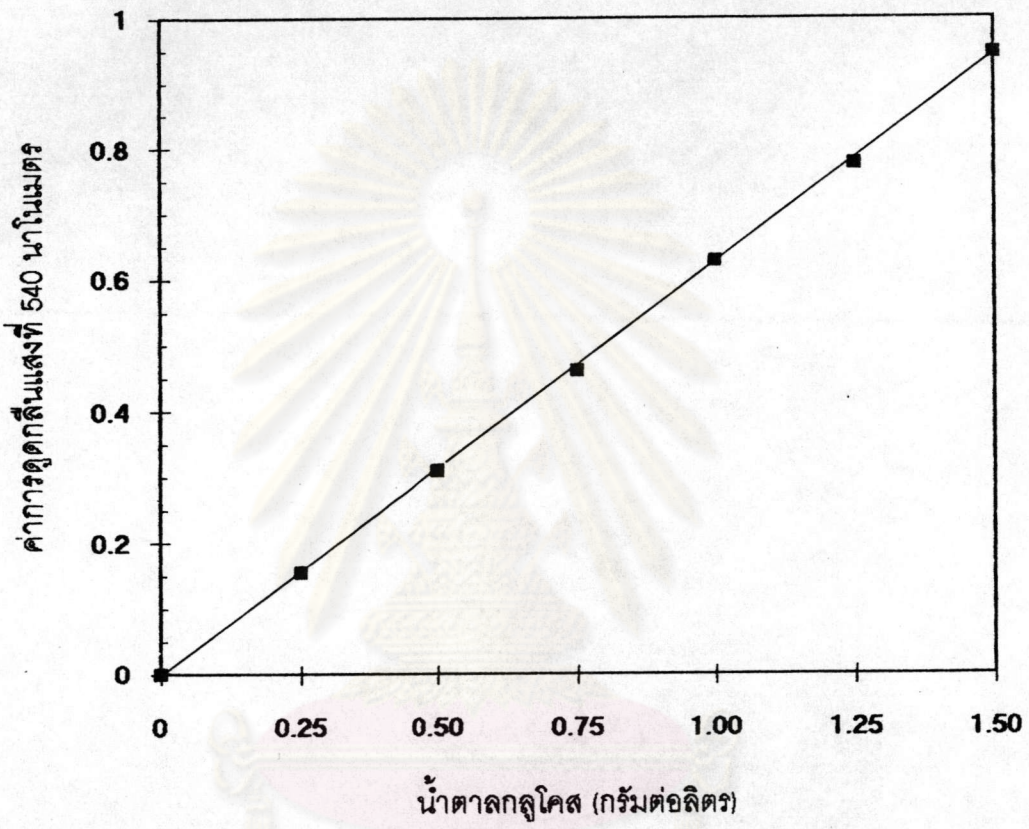
รูปที่ 17 กราฟมาตรฐานของกรดมะนาว

การคำนวณ

$$\text{กรดมะนาว (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 430 นาโนเมตร} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชัน}}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์



รูปที่ 18 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวส์

การคำนวณ

$$\text{น้ำตาลรีดิวส์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชัน}}$$

ภาคผนวก ง

ข้อมูลการทดลอง

ขนาดของเซลล์ตรึง

ตารางที่ 18 ข้อมูลการทดลองจากการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของเซลล์ตรึง 3 ขนาด

ขนาดของเซลล์ตรึง	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)							
S	0.335	0.370	0.395	0.395	0.380	0.370	0.365	0.380
	0.365	0.355	0.380	0.375	0.380	0.375	0.370	0.365
	0.380	0.380	0.380	0.355	0.365	0.370	0.390	0.375
	0.385	0.355	0.355	0.385	0.365	0.400	0.380	0.385
	0.345	0.375	0.370	0.345	0.380	0.380	0.355	0.380
	0.380	0.380	0.390	0.345	0.375	0.400	0.405	0.360
	0.380	0.400	0.390	0.365	0.370	0.375	0.375	0.390
	0.350	0.400	0.390	0.370	0.345	0.360	0.320	0.355
	0.340	0.365	0.400	0.385	0.385	0.390	0.380	0.365
	0.340	0.340	0.370	0.360	0.365	0.390	0.355	0.335
	0.320	0.365	0.350	0.360	0.350	0.365	0.355	0.370
	0.350	0.380	0.355	0.385	0.370	0.370	0.345	0.350
	0.395	0.365	0.340	0.335			ค่าเฉลี่ย =	0.369

มีต่อ..

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ขนาดของเซลล์ตรึง	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)							
M	0.435	0.460	0.450	0.430	0.435	0.435	0.440	0.450
	0.460	0.400	0.425	0.460	0.465	0.415	0.420	0.435
	0.400	0.400	0.390	0.435	0.440	0.400	0.435	0.440
	0.415	0.445	0.400	0.380	0.455	0.410	0.400	0.475
	0.435	0.460	0.460	0.455	0.440	0.415	0.445	0.475
	0.465	0.480	0.440	0.425	0.480	0.445	0.445	0.420
	0.430	0.410	0.440	0.445	0.415	0.465	0.475	0.400
	0.420	0.450	0.425	0.440	0.445	0.435	0.410	0.405
	0.460	0.465	0.450	0.430	0.425	0.435	0.415	0.425
	0.420	0.475	0.470	0.485	0.465	0.460	0.450	0.440
	0.455	0.435	0.470	0.475	0.460	0.450	0.455	0.450
	0.445	0.415	0.480	0.435	0.455	0.450	0.465	0.460
	0.445	0.465	0.460	0.455			ค่าเฉลี่ย = 0.441	
L	0.615	0.600	0.610	0.535	0.585	0.650	0.600	0.610
	0.570	0.515	0.605	0.515	0.590	0.530	0.560	0.565
	0.525	0.535	0.530	0.515	0.565	0.615	0.545	0.550
	0.565	0.645	0.495	0.525	0.610	0.545	0.600	0.530
	0.510	0.515	0.500	0.600	0.625	0.550	0.545	0.635
	0.615	0.605	0.595	0.585	0.575	0.565	0.645	0.525
	0.530	0.515	0.565	0.605	0.615	0.555	0.615	0.605

มีต่อ..

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ขนาดของเซลล์ตรึง	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)							
	0.575	0.560	0.530	0.545	0.600	0.480	0.545	0.595
	0.585	0.645	0.655	0.585	0.535	0.510	0.580	0.575
	0.595	0.600	0.605	0.595	0.525	0.540	0.530	0.555
	0.615	0.605	0.545	0.555	0.610	0.570	0.535	0.510
	0.610	0.575	0.580	0.575	0.545	0.550	0.590	0.540
	0.535	0.588	0.605	0.595			ค่าเฉลี่ย =	0.570

รายละเอียดของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 19 รายละเอียดของแคลเซียมคาร์บอเนตเกรดระดับห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรม

แคลเซียมคาร์บอเนต	เกรดระดับห้องปฏิบัติการ (lab grade)	เกรดระดับอุตสาหกรรม (industrial grade)
บริษัทผู้ผลิต	Fluka	Assist
ราคา (บาทต่อกิโลกรัม)	370	10

มีต่อ..

ตารางที่ 19 (ต่อ)

	เกรดระดับห้องปฏิบัติการ (lab grade)		เกรดระดับอุตสาหกรรม (industrial grade)	
ความบริสุทธิ์ (เปอร์เซนต์)	99.00		98.21	
ส่วนประกอบ (เปอร์เซนต์)	Cl	0.03	CO_2	43.3
	SO_4	0.05	$Ca(OH)_2$	55.0
	Cd	0.005	Fe_2O_3	0.2
	Co	0.005	MgO	traces
	Cu	0.005		
	Fe	0.005		
	K	0.01		
	Na	0.2		
	Ni	0.005		
	Pb	0.005		
	Zn	0.005		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

สูตรการคำนวน

ผลผลิต (yield)

$$\text{ผลผลิต (ร้อยละ)} = \frac{\text{กรดมะนาวที่ได้ (กรัมต่อลิตร)} \times 100}{\text{น้ำตาลรีดิวส์ที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)}}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวภรณี ลิมปิสุต เกิดวันที่ 15 ตุลาคม 2512 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2533 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี 2535

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย