รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จิราภรณ์ โล่ห์วงศ์วัฒน์. 2525. การผลิตกรดซิตริกจากกากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Aspergillus niger* วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

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

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

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

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

ภาษาอังกฤษ

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

Abou-Zeid, A.A. and Ashy,M.A. 1984. Production of citric acid: a review. Agricultural Wastes. 9: 51-76.

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

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

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.

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

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.

Grace, M.R. 1977. Cassava Processing. FAO. Rome, Italy. p.66.

Grewal, H.S. and Kalra, K.L. 1995. Fungal production of citric acid. Biotechnology Advances. 13(2). pp.209-234.

Good, D.W., Dronick, R., Lavford, G.R. and Fen, J.F. 1985. Isolation and characterization of *Saccharomycopsis lipolytica* mutant Showing increased production of citric acid from canola oil. Canadian Journal Of microbiology 31: 436-440.

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

Huggett, A.G. and Nixon, D.A. 1957. Enzymatic determination of blood glucose. Biochemical Journal. 66(1): 12.

Ikeno, Y., Masada, 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.

Iizuka, H., Shimizu, J., Ishii, K. and Nakajima, Y. 1971. Process for the Production of Citric Acid by Fermentation. US Patent . 36,22,455.

Kubicek, C.P. and Rohr, M. 1986. Citric acid fermentation. Critical Reviews in Biotechnology. 3: 331-373.

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.

Mattey, M. 1992. The production of organic acids. Critical Reviews in Biotechnology. 12(112): 87-132.

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

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

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.

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.

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., Wojtatawicz, 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.

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.

Rane, K.D. and Sims, K.A. 1994. Oxygen uptake and citric acid by *Candida lipolytica* Y1095. Biotechnology and Bioengineering. 43: 131-137.

Shah, D.N., Chattoo, B.B., Kothari, R.M. and Hegde, M.V. 1993. Strach hydrolysate, an optimal and economical source of carbon for the secretion of citric acid by *Yarrowia lipolytica* (DS-1). Strach/Starke. 45: 104-109.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (Yeast Malt Extract Medium)

1.1 อาหารเหลว

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์(yeast extract)	3.0	กรัม
สารสกัดจากมอลต์(malt extract)	3.0	กรัม
เปปโตน	5.0	กรัม

ใส่อาหารในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารแข็งลาดเอียง (YM slant)

เตรียมได้โดยเติมวุ้นผง 20.0 กรัม ลงในอาหารสูตรอาหารเหลวข้อ 1.1 ทำให้วุ้นละลาย ปิเปตต์ใส่หลอดทดลองหลอดละ 6.0 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาว

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดมะนาวที่จะกล่าวต่อไปนี้จะเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยที่ต้องการศึกษา โดยเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่อาหารปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสำหรับผลิตกรดมะนาว

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์(ภาคผนวก ข 1.)		
มีน้ำตาลกลูโคส	220	กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	2.00	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.20	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.20	กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.25	กรัม
สารสกัดจากยีสต์(IBGE)	1.00	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต(OMEGA)	120	กรัม

2.2 อาหารสำหรับศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 และเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ แปรผันตามปริมาณเริ่มต้นตามการทดลอง

2.3 อาหารสำหรับศึกษาผลของเกลือโซเดียมซัลเฟตต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 และเติมเกลือโซเดียมซัลเฟตแปรผันตามปริมาณเริ่มต้นตามการทดลอง

2.4 อาหารสำหรับศึกษาผลของเกลือแคลเซียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 และเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์แปรผันปริมาณเริ่มต้นตามการทดลอง

2.5 อาหารสำหรับศึกษาผลของเกลือแคลเซียมซัลเฟตต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 และเติมเกลือแคลเซียมซัลเฟตแปรผันปริมาณเริ่มต้นตามการทดลอง

2.6 อาหารสำหรับศึกษาผลของสารสีคล้ำ(Browning)ในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ยกเว้นแหล่งคาร์บอนใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก (ภาคผนวก ข 2.) แต่ยังไม่ผ่านขั้นตอนการกำจัดสารสีคล้ำออก มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรเท่ากับ 9.120 (ความเข้มข้นกลูโคสเท่ากับ 220 กรัมต่อลิตร) ทำการแปรผันความเข้มของสารสีคล้ำโดยเจือจางด้วยสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังและผ่านการกำจัดสารสีคล้ำโดยนำสารละลายน้ำตาลไปเติมผงถ่านกัมมันต์ 10 % (น้ำหนักแห้งของผงถ่านกัมมันต์ต่อน้ำหนักของแข็งทั้งหมดในสารละลายน้ำตาล) แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 60 นาที จากนั้นปั่นแยกเอาเฉพาะสารละลายน้ำตาลส่วนใส แล้วนำสารละลายส่วนใสนี้ไปผ่านขั้นตอนการกำจัดสีคล้ำดังข้างต้นอีก 2 ครั้ง แล้วนำสารละลายน้ำตาลไปปรับความเข้มข้นโดยการระเหยน้ำออกจนได้ความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลเท่ากับ 220 กรัมต่อลิตร จะได้สารละลายน้ำตาลที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรเท่ากับ 0.130 ทำการเจือจางด้วยอัตราส่วนต่างๆ จนได้ค่าความเข้มของสารสีคล้ำแปรผันตามค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ตามการทดลอง อาหาร

สำหรับเลี้ยงเชื้อนี้กำจัดเชื้อปนเปื้อนโดยการกรองผ่านชุดกรองกำจัดแบคทีเรีย (millipore filter ซึ่งมี pore size ขนาด 0.45 ไมครอน)

2.7 อาหารสำหรับศึกษาผลของการลดปริมาณสารที่มีอิทธิพลต่อการผลิตกรดมะนาวในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกต่อการผลิตกรดมะนาว

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ยกเว้นแหล่งคาร์บอนใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกและผ่านการกำจัดสารสีคล้ำออกแล้ว (ตามภาคผนวก ข 2.) ซึ่งทำการปรับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 220 กรัมต่อลิตรแล้ว และเจือจางด้วยแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์(ภาคผนวก ข 1.) ให้ได้สัดส่วนตามการทดลอง

2.8 อาหารสำหรับศึกษาผลของการลดปริมาณสารตกค้างในกากมันสำปะหลังสดโดยการล้างน้ำก่อนการย่อย

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ยกเว้นแหล่งคาร์บอนใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกโดยกากมันสำปะหลังสดที่นำมาย่อยผ่านการล้างน้ำก่อน และเปรียบเทียบกับการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังสดที่ไม่ผ่านการล้างน้ำซึ่งผ่านกระบวนการย่อยเหมือนกันตามภาคผนวก ข 2.

2.9 อาหารสำหรับศึกษาผลของการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ยกเว้น แหล่งคาร์บอนใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์(ภาคผนวก ข3.)เปรียบเทียบกับการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกและผ่านการกำจัดสารสีคล้ำแล้วด้วยผงถ่านกัมมันต์ (ภาคผนวก ข 2.)

2.10 อาหารสำหรับศึกษาผลของกรดซัลฟิวรัสที่ตกค้างในกากมันสำปะหลังต่อการผลิตกรดมะนาว

ในอาหาร1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1และมีการเติมกรดซัลฟิวรัสแปรผันปริมาณตามการทดลอง เปรียบเทียบกับการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกและผ่านการกำจัดสารสีคล้ำออกด้วยผงถ่านกัมมันต์แล้ว(ภาคผนวก ข 2.)เป็นแหล่งคาร์บอนแทนแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยเอนไซม์ และมีการเติมกรดซัลฟิวรัสแปรผันตามการทดลอง โดยทุกชุดทดลองควบคุมปริมาณกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 220 กรัมต่อลิตร

2.11 อาหารสำหรับศึกษาผลของการนำสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเมื่อผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดต่างๆ มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดมะนาว

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 2.1 ยกเว้นแหล่งคาร์บอนใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังตามภาคผนวก ข2. และนำไปผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดต่างๆ ได้แก่ บวก (Amberlite IRA_{93}) ลบ (Amberlite IRA_{120}) และผสม (Amberlite IRA_{900} : Amberlite IRA_{120}เท่ากับ 2.5:1) โดยปริมาตรของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคแต่ละชนิดที่ใช้เท่ากับ 50 มิลลิลิตรและอัตราการไหลเท่ากับ 10 มิลลิลิตรต่อนาที ซึ่งสารละลายน้ำตาลภายหลังผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดบวกได้ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2.20 จึงทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตจนได้ค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 6 และสารละลายน้ำตาลภายหลังผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดลบ ได้ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 10.75 จึงทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยกรดซัลฟิวริก จนได้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 6 ส่วนสารละลายน้ำตาลภายหลังผ่านตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุภาคชนิดผสม ได้ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.30 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อในทุกชุดทดลองมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 220 กรัมต่อลิตร

2.12 อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า

ในอาหาร 1 ลิตร มี ส่วนประกอบ ดังนี้

สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังตามภาคผนวก ข2. ซึ่งมีกลูโคส	220.00 กรัม
แอมโมเนียมคลอไรด์	2.00 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.20 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	0.20 กรัม
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	0.25 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (IBGE)	1.00 กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต (OMEGA)	120.00 กรัม

2.13 อาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับข้อ 3.2 แต่แยกสารอาหารออกเป็น 4 ส่วนดังนี้

1. สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก
2. สารสกัดจากยีสต์

3. แอมโมเนียมคลอไรด์ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต และแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต
4. แคลเซียมคาร์บอเนต

ส่วนที่ 1-3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ส่วนแคลเซียมคาร์บอเนตนึ่งฆ่าเชื้อพร้อมถังหมักและสารกำจัดฟองที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2.14 อาหารสำหรับศึกษาผลการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ในอาหาร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกันกับข้อ 3.3 ยกเว้นใช้ปริมาณอาหารเริ่มต้น 2.5 ลิตร ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และเตรียมสารละลายเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกสำหรับใช้เติมโดยนำสารละลายน้ำตาลที่ได้จากกากย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริกไปทำให้เข้มข้นขึ้นจนได้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสประมาณ 820 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 7.2 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข.

1. การย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

วัตถุดิบและเอนไซม์ที่ใช้

1. แป้งมันสำปะหลังตรากุหลาบ ของบริษัท ไทยวา 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-ด่าง เท่ากับ 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล
4. เติมเอนไซม์ BAN 240 L ปริมาตร 8 มิลลิลิตร
5. ปรับอุณหภูมิเป็น 70 องศาเซลเซียส แล้วปั่นกวนไว้เป็นเวลา 5 นาที
6. เพิ่มอุณหภูมิเป็น 90 องศาเซลเซียส แล้วปรับลดอุณหภูมิลงเป็น 60 องศาเซลเซียส ทันที
7. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.3-4.5 ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์
8. เติมเอนไซม์ Dextrozyme 225/75L ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
9. ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง
10. เมื่อครบ 30 ชั่วโมงแล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์
11. แยกตะกอนกากแข็งออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง(centrifuge)
12. เก็บสารละลายน้ำตาลที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สมบัติของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

ปริมาณของแข็งทั้งหมด	368.52	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	332.44	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	320.24	กรัมต่อลิตร
สมมูลเดกซ์โทรส	90.20	
น้ำตาลกลูโคสร้อยละ	86.90	

2. การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก

วัตถุดิบที่ใช้

1. กากมันสำปะหลังสดซึ่งผ่านการล้างน้ำก่อน
2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร

ขั้นตอนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟิวริก

1. หาเปอร์เซนต์ความชื้นในกากมันสำปะหลังสด
2. ชั่งกากมันสำปะหลังสดให้ได้น้ำหนักเท่ากับกากมันสำปะหลังแห้ง 300 กรัม
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
4. นำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที
5. ปั่นแยกสารละลายน้ำตาลซึ่งเป็นส่วนใสไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ประมาณ 7.00 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต
6. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 5. ไปปั่นแยกตะกอนแคลเซียมซัลเฟตออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง
7. นำสารละลายที่ได้จากข้อ 6. ซึ่งมีสีน้ำตาลคล้ำไปผ่านผงถ่านกัมมันต์ (activated carbon) 10% (น้ำหนักผงถ่านกัมมันต์ต่อน้ำหนักของแข็งทั้งหมดของสารละลายน้ำตาล) แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 60 นาที
8. ปั่นแยกเอาเฉพาะสารละลายน้ำตาลที่เป็นส่วนใสไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สมบัติของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังก่อนนำไปผ่านผงถ่านกัมมันต์

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เท่ากับ 6.250

ปริมาณของแข็งทั้งหมด	195.07	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	165.07	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	144.04	กรัมต่อลิตร
สมมูลเดกซ์โทรส	84.77	
น้ำตาลกลูโคสร้อยละ	73.84	

สมบัติของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังหลังจากผ่านผงถ่านกัมมันต์

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร เท่ากับ 0.140

ปริมาณของแข็งทั้งหมด	162.33	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	145.84	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	130.12	กรัมต่อลิตร
สมมูลเดกซ์โทรส	89.84	
น้ำตาลกลูโคสร้อยละ	80.16	

3. การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

วัตถุดิบที่ใช้

กากมันสำปะหลังที่ผ่านการล้างน้ำแล้ว

เอนไซม์ BAN 240 L ของบริษัท NOVO NORDISK ประเทศเดนมาร์ก

AMG ของบริษัท NOVO NORDISK ประเทศเดนมาร์ก

Promozyme ของบริษัท NOVO NORDISK ประเทศเดนมาร์ก

ขั้นตอนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

1. หาเปอร์เซนต์ความชื้นของกากมันสำปะหลังสด
2. ชั่งกากมันสำปะหลังสดให้ได้น้ำหนักเท่ากับกากมันสำปะหลังแห้ง 1,000 กรัม นำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดละเอียด(blender)
3. เติมน้ำที่กำจัดไอออนแล้วปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร ปั่นกวนให้เข้ากัน
4. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มัล
5. เติมเอนไซม์ BAN ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
6. ปรับอุณหภูมิเป็น 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
7. เพิ่มอุณหภูมิเป็น 90 องศาเซลเซียส นาน 5 นาท
8. ปรับลดอุณหภูมิเป็น 60 องศาเซลเซียส
9. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.3-4.5 ด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์
10. เติมเอนไซม์ AMG ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเอนไซม์ Promozyme ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

11. ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

12. เมื่อครบ 36 ชั่วโมง เพิ่มอุณหภูมิเป็น 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์

13. ปั่นแยกตะกอนกากมันสำปะหลังออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง

14. เก็บสารละลายน้ำตาลที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สมบัติของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

ปริมาณของแข็งทั้งหมด	134.95	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	82.41	กรัมต่อลิตร
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส	67.13	กรัมต่อลิตร
สมมูลเดกซ์โทรส	61.07	
น้ำตาลกลูโคสร้อยละ	49.74	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค.

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมสารละลายตัวพา (mobile phase) สำหรับการวิเคราะห์กรดมะนาวและกรดไอโซซิตริกโดย HPLC

ละลายไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัม ในน้ำที่กำจัดไอออนแล้วอย่างดี ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้ได้เท่ากับ 2.00 ด้วยกรดฟอสฟอริก แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตดซึ่งมีรูพรุน(pore size) ขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นนำไปกำจัดก๊าซโดยใช้เครื่องกำเนิดคลื่นอัลตราโซนิค(sonicator) เป็นเวลา 20 นาที

2. การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

ละลาย 10 กรัมของกรดไดไนโตรซาลิไซลิกในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมโพแทสเซียมโซเดียมตาร์เตรต 30.0 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100.0 มิลลิลิตร ด้วยน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว เก็บในขวดสีชา

3. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0

ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 195 มิลลิลิตร

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 305 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งสองเข้าด้วยกัน เติมน้ำที่กำจัดไอออนแล้ว ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็น

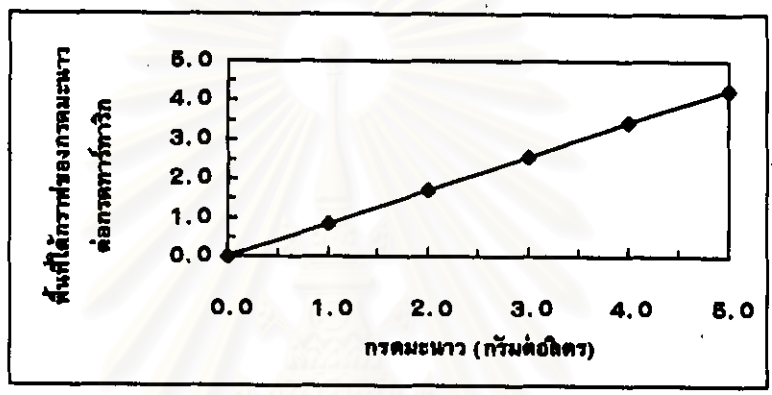
4. การเตรียมสารละลายเอนไซม์ พี.จี.โอ.

ละลายเอนไซม์ พี.จี.โอ. 1 แคปซูล ซึ่งประกอบด้วยกลูโคสออกซิเดส 500 หน่วย และเปอร์ออกซิเดส 100 หน่วย ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.00 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร เติมออร์โธ-ไดอะนิซิดีน เข้มข้นร้อยละ 1 ในเอทานอล ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เก็บไว้ในขวดสีชาและเก็บไว้ในตู้เย็น

ภาคผนวก ง.

กราฟมาตรฐาน

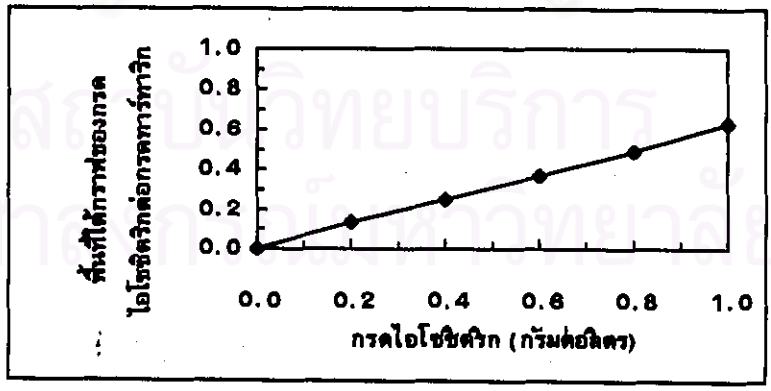
1. กราฟมาตรฐานของกรดมะนาวโดยวิธี HPLC



รูปที่ ง-1 กราฟมาตรฐานของกรดมะนาวในช่วงความเข้มข้น 0.0-5.0 กรัมต่อลิตร

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

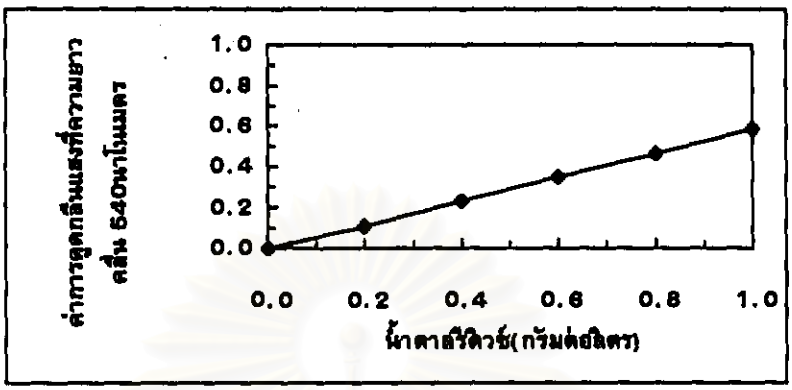
2. กราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิตริก โดยวิธี HPLC



รูปที่ ง-2 กราฟมาตรฐานของกรดไอโซซิตริกในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0กรัมต่อลิตร

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

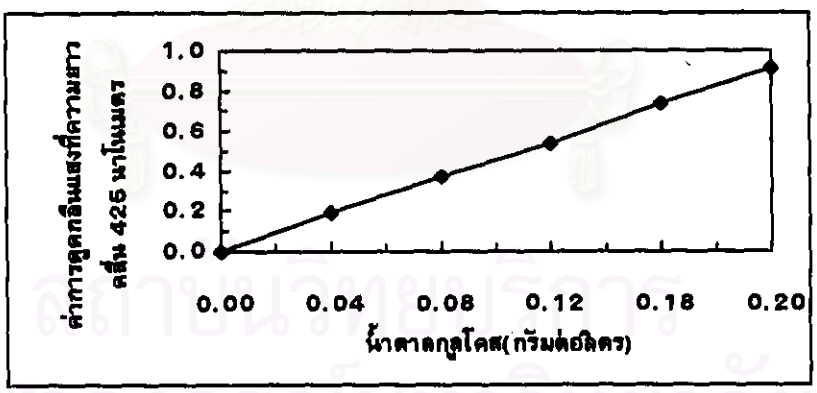
3. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีใช้กรดไดไนโตรซาลิไซลิก



รูปที่ ง-3 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร

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

4. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส โดยวิธี พี.จี.โอ. เอนไซม์



รูปที่ ง-4 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสในช่วงความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.0-0.2 กรัมต่อลิตร

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

ภาคผนวก จ.

สูตรการคำนวณ

การวิเคราะห์ผลผลิต

1. $Y_{P/S}$ = $(P-P_0) / (S-S_0)$
   = กรดมะนาวที่ได้ (กรัมต่อลิตร) / น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)
2. $Y_{X/S}$ = $(X-X_0) / (S-S_0)$
   = น้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อลิตร) / น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)
3. $Y_{P/X}$ = $(P-P_0) / (X-X_0)$
   = กรดมะนาวที่ได้ (กรัมต่อลิตร) / น้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อลิตร)

สมมูลเดกซ์โทรส (dextrose equivalent ; DE)

สมมูลเดกซ์โทรส = น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) x 100
ปริมาณของแข็งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

1. ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely random design หรือ CRD)

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

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

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

SSE = SST-SSA

โดยที่ SST = ผลบวกกำลังสองทั้งหมด (total of sum square)

SSA = ผลบวกกำลังสองของทรีทเมนต์ (sum square of treatment)

SSE = ผลบวกกำลังสองของค่าคลาดเคลื่อน (sum square of error)

X = ค่าสังเกตที่ได้

n = จำนวนซ้ำ

k = จำนวนชุดทดลอง

แล้วนำผลต่าง ๆ ที่ได้มาเขียนลงในตาราง ซึ่งเรียกว่า ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ดังนี้

ตารางที่ 3-19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

Sum of Variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean Squares	F_0
Treatment	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_0 ที่ได้กับค่า F ในตารางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัย 0.05 และ 0.01

2. การออกแบบบล็อกเชิงสุ่ม (randomized bolck design: RBD)

$$SST = \sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} X_{ij}^2 - \frac{X_{oo}^2}{abn}$$

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

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

SSE = SST-SSA-SSB

โดยที่ SST = ผลบวกกำลังสองทั้งหมด

SSA = ผลบวกกำลังสองของทรีทเมนต์

SSB = ผลบวกกำลังสองของบล็อก

SSE = ผลบวกกำลังสองของค่าคลาดเคลื่อน

นำค่าที่คำนวณได้เขียนลงในตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนดังนี้

ตารางที่ 3-20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการออกแบบบล็อกเชิงสุ่ม

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	F_0
Treatments	a-1	SSA	MSA=SSA/a-1	MSA/MSE
Blocks	b-1	SSB	MSB=SSB/b-1	MSB/MSE
Error	(a-1)(b-1)(n-1)	SSE	MSE=SSE/(a-1)(b-1)	
Total	abn-1	SST		

เปรียบเทียบค่า F_0 ที่คำนวณได้กับค่า F ในตารางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01

3. การเปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวเฉลี่ย โดยการทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญน้อยที่สุด (least significant difference: LSD)

สูตรการคำนวณสถิติที่ใช้เปรียบเทียบ

$$LSD = t_{\frac{\alpha}{2},\nu}\sqrt{\frac{2\,MSE}{r}}$$

โดยที่ n = ระดับขั้นความเสรีของค่าคลาดเคลื่อน

r = จำนวนคู่ของค่าเฉลี่ยที่ใช้ทดสอบ

เปรียบเทียบผลต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่กับค่าสถิติ LSD ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสินีนาถ เจียมอนุกูลกิจ เกิดวันที่ 16 กรกฎาคม พ.ศ. 2514 สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2536 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2537

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย