รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ทองสุก อรรคเดชดำรง และ วิชาญ นฤพันธาวาทย์. 2529. การผลิตน้ำส้มสายชูหมักในระบบเครื่องหมักแบบคอลัมน์. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาเคมีเทคนิค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : กรุงเทพฯ.

วราวุฒิ ครูส่ง, นฤมล ชูวัฒนะเดช, เชิดชัย ตั้งอมรสุขสันต์ และ อินทิรา ปรุงเลิศบัวทอง. 2536. การผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าว. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า.

สมคิด ธรรมรัตน์. 2531. การผลิตวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าว. อาหาร. 18(4) : 250-262.

สมศรี ลีปิพัฒนวิทย์. 2531. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับทำวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าวแก่. อาหาร. 18(4) : 239-249.

ภาษาอังกฤษ

Adum, M.R. 1960. The Small-Scale Production of Vinegar from Bananas, Rep.Trop.Prod.Inst.G, 132

Alaban, C.A. 1962. Studies on Optimum Condition for Nata de Coco Bacterium of Nata Formation in Coconut Water, Phillippine Agriculturist 45(9) : 490-516.

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

Brown, R.M. Jr., Willison, J.H.& Richardson, C.L. 1976. Cellulose Biosynthesis in *Acetobacter xylinum* : Visualization of the Site of Sythesis and Direct Measurement of the *in vito* Process. Proc.Natn.Acad.Sci. U.S.A. 73 : 4565-4569.

Deley , J. and Fracteur, J. 1974. The Genus Gluconobacter, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Baltimore, The Williams and Wilkin Co.

Dudman, W.F. 1960. Cellulose Production by Acetobacter Stains in Submerged Culture, J.Gen.Microbiol. 22, 25-39.

Hiroshi, T., Takaaki, N., Akira, S., Masanobu, M., Takayasu, T., and Fumihiro, Y. 1995. Screening of Bacterial Cellulose-producing Acetobacter Strains Suitable for Agitated Culture. Biosci.Biotech.Biochem. 59(8) : 1498-1502.

Johnson, D.C., Neogi, A.N. 1989. Sheeted Products Formed from Recticulated Microbial Cellulose. U.S. Patent 4,863,565.

Kunihiko, W., Shigeru, Y. 1995. Effects of Oxygen Tension in the Gaseous Phase on Production and Physical Properties of Bacterial Cellulose Formed under Static Culture Conditions. Biosci. Biotech. Biochem. 59(1) : 65-68.

Lapuz, M.M., Gallardo, E.G. and Palo, M.A. 1967. The Nata Organism Cultural Requirement Characteristics and Identity, ThePhillippine Journnal of Science. 96(2) : 91-109.

Matsuoka, M., Tsuchida, T., Adacchi, O. 1996. A Synthetic Medium for Bacterial Cellulose Production by *Acetobacter xylinum* supsp. sucrofermentans. Biosci. Biotech. Biochem. 60(4) :575-579.

Novo Nordisk. 1982. Analytical Method of Cellulase.

Ogawa, R., Ohisuki, M., Miura, Y.,and Tokura, S. 1992. Biosynthesis of Highly Orientated Bacterial Cellulose under Stirred Culture of *Acetobacter xylinum*. Sen'I Gakkaishi. 48(8) : 434-436.

Peter, R., Raphael, M., and Moshe, B. 1991. Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria. Microbiol. Reviews. 55 : 35-58.

Satoshi, M., Tatsuhiko, O., and NaoKazu, S. 1993. Production of Cellulose from Glucose By *Acetobacter xylinum*. J.Ferment.Bioeng. 75 : 18-22.

Saturnino, J.A., Dimaguill, L.S. 1967. The Nata de Coco 1. Characterization and Identity of the Causal Organism. Phillipine Agriculturist. 51(6) : 440-462.

Schramm, M., Hestrin, S. 1954. Factor Affecting Production of Cellolose at the Air/Liquid Interface of a Culture of *Acetobacter xylinum*. J.Gen.Microbiol. 11 : 122-129.

Schramm, M., Gromet, Z. and Hestrin, S. 1957. Synthesis of Cellulose by *Acetobacter xylinum*. Biochem. J. 67 : 669-679.

Stephens, R.S., Westland, J.A. 1990. Method of Using Bacterial Cellulose as a Dietary Fiber Component. U.S. Patent 4,960,763.

Swissa, M., Aloni, Y., Weinbouse, H. and Benizman, M. 1980. Intermeidiary Steps in *Acetobacter xylinum* Cellulose Synthesis. J. Bacterilogy. 143(3) : 1142-1150.

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.อาหารแข็งสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ

1.1 อาหารวุ้นแข็งลาดเอียง S-1

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Yeast Extract	5 กรัม
Peptone	3 กรัม
กลีเซอรอล	10 กรัม
วุ้นผง	15 กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ด้วย เติมผงวุ้นปริมาณ 15 กรัม ต้มให้วุ้นละลายปิเปตต์อาหารลงในหลอดทดลองขนาด 16x150 เซนติเมตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปิดจุกให้แน่น นำไปนึ่งค่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองมาวางเอียงที่ระยะห่าง 13 เซนติเมตร

2. อาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อ

2.1 อาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อสูตร R20-2 (Johnson and Neogi,1989)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Yeast Extract	5 กรัม
Peptone	5 กรัม
Na_2HPO_4	5 กรัม
Citric acid	1.15 กรัม
กลูโคส	2 กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ปิเปตต์อาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งค่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.2 อาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อสูตร S-2(ดัดแปลงจาก Johnson and Neogi,1989)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Yeast Extract	5 กรัม

Peptone	3 กรัม
Glucose	20 กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ปิเปตต์อาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งค่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.3 อาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อและผลิตเซลลูโลส สูตร F-1(ดัดแปลงจาก Johnson and Neogi,1989) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Corn steep liquor	20 กรัม
Glucose	20 กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ปิเปตต์อาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งค่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.4 อาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อและผลิตเซลลูโลส สูตร F-2(ดัดแปลงจาก Johnson and Neogi,1989) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Corn steep liquor	20 กรัม
Peptone	3 กรัม
Glucose	20 กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ปิเปตต์อาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งค่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.5 อาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อและผลิตเซลลูโลส สูตร F-3(ดัดแปลงจาก Johnson and Neogi,1989) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Peptone	3 กรัม
Glucose	20 กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ปิเปตต์อาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งค่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.6 อาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อและผลิตเซลลูโลส สูตร F-4(ดัดแปลงจาก Johnson and Neogi,1989)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Yeast extract	5 กรัม
Peptone	3 กรัม
Glucose	20 กรัม
$Mg_2SO_4.7H_2O$	2 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5 กรัม
KH_2PO_4	3 กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ปิเปตต์อาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งค่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.7 อาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อและผลิตเซลลูโลส สูตร F-5(ดัดแปลงจาก Johnson and Neogi,1989) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Corn steep liquor	20 กรัม
Glucose	20 กรัม
$Mg_2SO_4.7H_2O$	2 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5 กรัม
KH_2PO_4	3 กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ปิเปตต์อาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งค่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.8 อาหารเหลวสำหรับหัวเชื้อและผลิตเซลลูโลส สูตร F-6

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Yeast extract	6 กรัม
Peptone	3 กรัม
Glucose	20 กรัม
$Mg_2SO_4.7H_2O$	2 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5 กรัม
KH_2PO_4	3 กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ปิเปตต์อาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งค่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.9 อาหารเหลว Corn steep liquor (CSL) (Johnson and Neogi,1989)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

Corn steep liquor	20 มิลลิลิตร
Fructose	3.3 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	14.7 มิลลิกรัม
$CaCl_2.2H_2O$	1 กรัม
KH_2PO_4	3.6 มิลลิกรัม
$FeSO_4.7H_2O$	2.42 มิลลิกรัม
$Na_2MoO_4.2H_2O$	250 มิลลิกรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1.73 มิลลิกรัม
$ZnSO_4.7H_2O$	1.39 มิลลิกรัม
$MnSO_4.5H_2O$	0.05 มิลลิกรัม
$CuSO_4.5H_2O$	2 มิลลิกรัม
Inositol	0.4 มิลลิกรัม
Niacin	0.4 มิลลิกรัม
Pyridoxine HCl	0.4 มิลลิกรัม
Thiamine HCl	0.2 มิลลิกรัม
Ca pantothenate	0.2 มิลลิกรัม
Riboflavin	0.2 มิลลิกรัม
Folic acid	0.002 มิลลิกรัม
Biotin	0.002 มิลลิกรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ปิเปตต์อาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งค่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.10 อาหารเหลวสำหรับการผลิตเซลลูโลส (CSL-1) (ดัดแปลงจากอาหาร CSL)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย (solid content 0.98 เปอร์เซ็นต์)

Corn steep liquor	20 มิลลิลิตร
Glucose	20 กรัม
$Mg_2SO_4.7H_2O$	2 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5 กรัม
KH_2PO_4	3 กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ปิเปตต์อาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งค่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.11 อาหารเหลวสำหรับการผลิตเซลลูโลส (CSL-2) (ดัดแปลงจากอาหาร CSL)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย (solid content 0.98 เปอร์เซ็นต์)

Glucose	20 กรัม
$Mg_2SO_4.7H_2O$	2 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5 กรัม
KH_2PO_4	3 กรัม

เติมน้ำแช่ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์จนปริมาตรถึง 1 ลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 ปิเปตต์อาหารเหลว 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งค่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียมน้ำแช่ข้าวโพดจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์

นำข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ 500 กรัม มาแช่ในน้ำ 1 คืน แล้วนำมาโม่เปียกด้วยเครื่องโม่ นำของเหลวที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง นำไปตั้งในห้องเย็น 1 คืน รินส่วนใสออกมาเก็บไว้ใช้ในการทดลอง

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1.สารละลายกรดไดไนโทรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid: DNSA reagent)

ละลายกรดไดไนโทรซาลิไซลิก 1.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมน้ำขจัดไอออน ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร แล้วเติมโพแทสเซียมทาเทรต ($KNaC_4H_4O_6.4H_2O$) ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100.0 มิลลิลิตร ด้วยน้ำขจัดไอออนแล้วเก็บในขวดสีชา

2. แอซีเทตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 4.80 ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ชั่งโซเดียมแอซีเทต ($CH_3COONa.3H_2O$) 15.8 กรัม และปีเปตต์สารละลายกรดแอซีติก ปริมาตร 4.92 มิลลิลิตร เติมน้ำขจัดไอออนจนถึงปริมาตร 2000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 4.8 ด้วยสารละลายกรดแอซีติก

3. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 12.3 ความเข้นข้น 0.25 โมลาร์

ชั่งไทรโซเดียมฟอสเฟต ($Na_3PO_4.12H_2O$) 95 กรัม เติมน้ำขจัดไอออน จนถึงปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

4. สารละลายเฟร์ริค่าความเป็นกรด-ด่าง 11.8

ชั่งโพแทสเซียมเฟร์ริไซยาไนด์ 1.6 กรัม และ ไตรโซเดียมฟอสเฟต 14 กรัม เติมน้ำขจัดไอออน จนถึงปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

1. การเตรียมเอนไซม์และซับสเตรต

1.1 สารละลายเอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้นประมาณ 0.045 NCU/ml ใน 0.1 M แอซีเทตบัฟเฟอร์

1.2 Carboxymethylcellulose (CMC) เป็นซับสเตรต

ชั่ง CMC 10 กรัม ละลายในแอซีเทตบัฟเฟอร์ ปริมาตรสุดท้าย 1000 มิลลิลิตร

2. การคำนวณค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์

1 หน่วยของแอคติวิตีเอนไซม์เซลลูเลส U คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อย CMC แล้วทำให้เกิดกลูโคส 1 ไมโครกรัมต่อนาที ในภาวะที่เหมาะสม

คำนวณจากสูตร $U = (A_1-A_0) \times 1/K \times D \times 1/T \times 1/Mglu \times 1/V$

เมื่อ A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรที่วัดจากสารละลายปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรที่วัดสารละลายปฏิกิริยาจากหลอด control

K = ค่าคงที่ที่ได้จากความชันของกราฟกลูโคส

V = ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ที่ใช้

D = จำนวนการเจือจางสารละลาย

T = เวลาในการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับCMC

Mglu = มวลโมเลกุลของกลูโคส 1 ไมโครโมล คือ 0.18016 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

แอคติวิตีของเอนไซม์เซลลูเลส

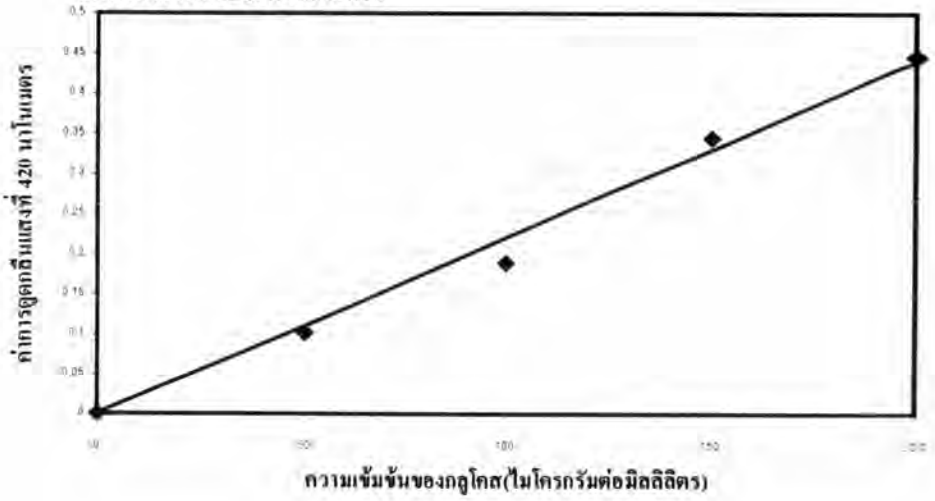
3. การเตรียมกราฟมาตรฐานของกลูโคส

3.1 เตรียมสารละลายกลูโคสในน้ำขจัดไอออน ที่ความเข้มข้น 0,50, 100, 150, 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.2 เติมสารละลายกลูโคส 1 มิลลิลิตรและซับสเตรต (ภาคผนวก ค ข้อ 1.2) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายหยุดปฏิกิริยา (ภาคผนวก ข 3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายเฟร์ริ (ภาคผนวก ข 4) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ปิดหลอดทดลองต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของกลูโคส(ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร
0	0.016
50	0.102
100	0.189
150	0.345
200	0.446

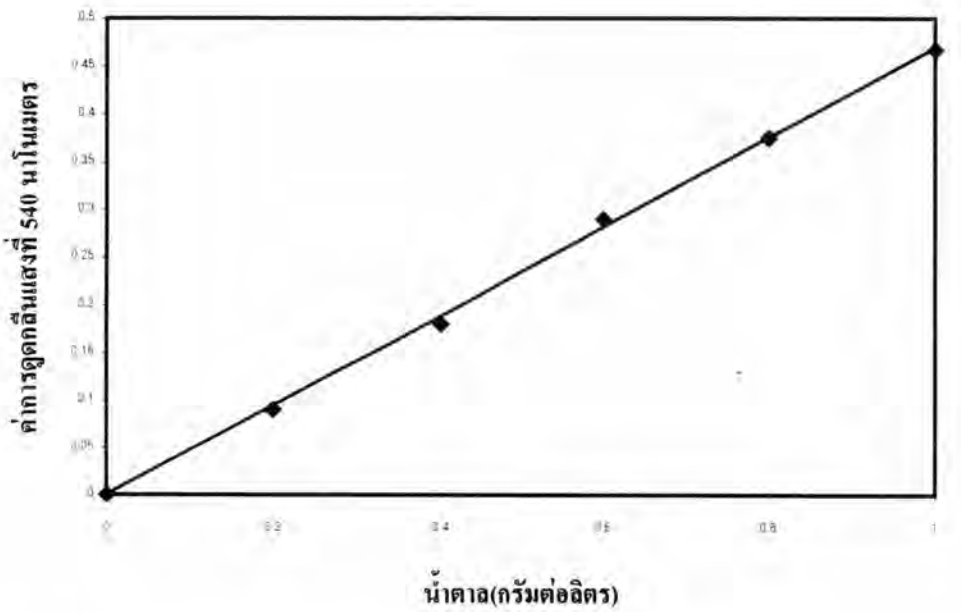
กราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร



ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐาน

1.กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้กรดไดไนโทรซาลิไซลิก



รูปที่ ง-1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลในช่วงความเข้มข้น 0.0-1.0 กรัมต่อลิตร

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

(กรัมต่อลิตร)

ประวัติผู้เขียน

นายธนาวัฒน์ พุทธวิริยะ เกิดวันที่ 29 กันยายน พ.ศ. 2515 ที่จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี เมื่อปีการศึกษา 2536 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2538