การใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตกรดโคจิก
โดย *Aspergillus oryzae K-13*

นายสุวทัย รชตอาชา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2193-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

UTILIZATION OF CASSAVA STARCH AS CARBON SOURCE FOR KOJIC ACID PRODUCTION BY *Aspergillus oryzae* K-13

Mr. Suwatai Rachata-acha

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2002
ISBN 974-17-2193-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13
โดย	นาย สุวทัย รชตอาชา
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุมาลี พิชญางกูร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุวทัย รชตอาชา : การใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13. (UTILIZATION OF CASSAVA STARCH AS CARBON SOURCE FOR KOJIC ACID PRODUCTION BY *Aspergillus oryzae* K-13) อ.ที่ปรึกษา : รศ. กรรณิกา จันทรสอาด, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. ส่งศรี กุลปรีชา, 109 หน้า. ISBN 974-17-2193-5.

การผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในขวดเขย่าภายใต้การแปรภาวะบางประการ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สูตรอาหารที่ปรับปรุงแล้วซึ่งประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 150 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.48 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 385:2 และจัดค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 ให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 21.70 กรัมต่อลิตร ภายใน 17 วัน เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยการเติมสารอาหารระหว่างการผลิต พบว่าการเติมสารละลายแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยมาแล้วเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถเพิ่มผลผลิตได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา	2545	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4272455023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: KOJIC ACID / CASSAVA STARCH / *Aspergillus oryzae* K-13
SUWATAI RACHATA-ACHA : UTILIZATION OF CASSAVA STARCH AS CARBON SOURCE FOR KOJIC ACID PRODUCTION BY *Aspergillus oryzae* K-13. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KANNIKA CHUNTARASA-ARD, THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. SONGSREE KULPREECHA, Ph.D., 109 pp. ISBN 974-17-2193-5.

Kojic acid Production from cassava starch by *Aspergillus oryzae* K-13 in shake-flask under some varied conditions was studies. The results showed that by using the improved cultivation medium containing 150 g/l cassava starch, 0.5 g/l yeast extract and 0.48 g/l ammonium sulfate (C:N ratio = 385:2) and initial pH at 6.0, the yield of kojic acid was 21.70 g/l within 17 days. By adding cassava starch hydrolysate solution as carbon source during cultivation, kojic acid yield could be increased.

Department	MICROBIOLOGY	Student's signature.....
Field of study	INDUSTRIAL MICROBIOLOGY	
	Advisor's signature	
Academic year	2002	Co-advisor's signature .....

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งในทุกด้านจาก รองศาสตราจารย์กรรณิกา จันทรสอาด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษา ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ ตักเตือน อบรมสั่งสอน และเสนอแนะแนวทางในงานวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ จึงขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ร่วม เป็นอย่างสูง ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาร่วม คอยดูแล และให้ความช่วยเหลือ ตลอดจนช่วยตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ประธานกรรมการ และคณะกรรมการทุกท่าน ที่กรุณาตรวจสอบ และแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ รุ่นพี่ และเพื่อนๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการวิจัย

ความดีของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขอมอบแด่บิดามารดา ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการเรียนมาตลอด รวมทั้งคณาอาจารย์ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และประสบการณ์แก่ผู้วิจัยจนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

สุวทัย รชตอาชา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูป ..... ฌ

บทที่

1. บทนำ 1
2. ปริทัศน์วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง..... 6
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 34
4. การวิเคราะห์ รายงานผล และอภิปรายผลการวิจัย..... 46
5. สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ 87

รายการอ้างอิง..... 89

ภาคผนวก..... 97

ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีการเตรียม..... 98

ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมสารเคมีที่สำคัญที่ใช้ในการทดลอง 100

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน..... 101

ภาคผนวก ง การคำนวณหาปริมาณสารที่สำคัญ 108

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 109

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างจุลินทรีย์และความเข้มข้นของกรดโคจิกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์นั้นได้สมบูรณ์	9
2	ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด	12
3	ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิก	18
4	ตัวอย่างแหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้ผลิตกรดโคจิก	20
5	ตัวอย่างแหล่งไนโตรเจนที่สามารถใช้ผลิตกรดโคจิก	25
6	ปริมาณกรดโคจิก ผลผลิตกรดโคจิกจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ และอัตราการผลิตกรดโคจิก เมื่อใช้ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังค่าต่างๆ	52
7	ผลของการแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์ และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดโคจิก	54
8	ปริมาณกรดโคจิก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก และอัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด เมื่อใช้ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นต่างกัน	62
9	ผลผลิตกรดโคจิก ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก และอัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในการเพาะเลี้ยงเป็น 2 ช่วง	69
10	ปริมาณกรดโคจิก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก และอัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด เมื่อใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้นต่างกัน	76
11	เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก และอัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนก่อนปรับภาวะกับหลังปรับภาวะบางประการที่ดีที่สุด	79
12	เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก และอัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด	83

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	การสังเคราะห์กรดโคจิกจากน้ำตาลกลูโคส	3
2	โครงสร้างของกรดโคจิก	6
3	กระบวนการสร้างเมลานิน	11
4	แบบแผนการผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลกลูโคสโดยตรง	16
5	แบบแผนการเกิดกรดโคจิกจากไดไฮดรอกซีอะซีโตน.....	17
6	โครงสร้างของอะมายโลส.....	23
7	โครงสร้างของอะมายโลเพคติน	24
8	ปริมาณกรดโคจิก และน้ำหนักแห้งของสายใยจากการทดลองใช้ *Aspergillus oryzae* K-13 ผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็น 50 100 และ 150 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน.....	48
9	การใช้แป้งและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการทดลองใช้ *Aspergillus oryzae* K-13 ผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็น 50 100 และ 150 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน.....	49
10	การใช้แป้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดโคจิก และน้ำหนักแห้งของสายใยจากการทดลองใช้ *Aspergillus oryzae* K-13 ผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน	50
11	ปริมาณกรดโคจิก และน้ำหนักแห้งของสายใยรา *A. oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์เป็นค่าต่างๆ.....	56
12	การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดโคจิก และน้ำหนักแห้งของสายใยรา *A. oryzae* K-13 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์เป็นค่าต่างๆ เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3).....	57
13	ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดโคจิก และน้ำหนักแห้งของสายใยรา *A. oryzae* K-13 ในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งแปรผันค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อค่าต่างๆ.....	59

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
14	ปริมาณแป้ง และน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตโดยรา *A. oryzae* K-13 เมื่อแปรค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ กัน	60
15	ปริมาณแป้ง และน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตโดยรา *A. oryzae* K-13 เมื่อควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2 ช่วง.....	65
16	เปรียบเทียบปริมาณแป้งที่เหลือระหว่างการผลิตโดยรา *A. oryzae* K-13 ในชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงแรกเป็น 5.0-6.0 และ 6.0-7.0 นาน 2 วัน	66
17	ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดโคจิก และน้ำหนักแห้งของสายใยระหว่างการผลิตโดยรา *A. oryzae* K-13 เมื่อควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2 ช่วง.....	67
18	เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตขึ้นจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ.....	71
19	น้ำหนักแห้งของสายใย ปริมาณแป้ง และน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างการผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ	72
20	ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ.....	75
21	ปริมาณกรดโคจิก แป้ง น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักแห้งของสายใย และค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 ภายใต้ภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน	78
22	ปริมาณกรดโคจิก แป้ง น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักแห้งของสายใย และค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 เมื่อใช้วิธีการเติมแป้งมันสำปะหลังระหว่างการผลิตในชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง.....	81
23	ปริมาณกรดโคจิก แป้ง น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักแห้งของสายใย และค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 เมื่อใช้วิธีการเติมแป้งมันสำปะหลังระหว่างการผลิตในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง.....	82

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

24 ปริมาณกรดโคจิก แป้ง น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักแห้งของสายใย และค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 เมื่อใช้วิธีการเติมสารละลายแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยมาแล้วด้วย *A. oryzae* K-13 ระหว่างการผลิตในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง..... 86

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การผลิต (Production) ถือเป็นหัวใจของเศรษฐกิจของทุกประเทศ ประเทศใดที่สร้างผลผลิตได้มาก โดยใช้ปัจจัยในการผลิตน้อย ก็จะมีความเจริญก้าวหน้าเร็ว โดยที่การผลิตเป็นการนำเอาปัจจัยการผลิต ซึ่งได้แก่ คน เงิน วัตถุดิบ ที่ดิน อาคาร สถานที่ เครื่องจักร อุปกรณ์ต่างๆ และเทคโนโลยี มาประกอบกันเป็นสินค้าและบริการโดยผ่านกระบวนการผลิตเพื่อก่อให้เกิดผลผลิตที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต หรือเสริมความสุข ความสะดวกสบายในชีวิตประจำวัน (สุรศักดิ์ นานานุกูล, 2525) โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัตถุดิบที่จะใช้มีความสำคัญมาก เพราะถ้าสามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก หาง่าย เป็นผลผลิตทางการเกษตรภายในประเทศ จะเป็นการลดต้นทุนการผลิต ส่งเสริมและสร้างงานในประเทศ รวมทั้งยกระดับชีวิตเกษตรกรอีกด้วย

จุลินทรีย์ ก็เป็นปัจจัยหนึ่งในการผลิต เนื่องจากในปัจจุบันพบว่ามีอุตสาหกรรมมากมายหลายประเภทที่มีการใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์โดยผ่านกระบวนการหมัก (Fermentation process) ซึ่งต้องใช้จุลินทรีย์ที่มีสายพันธุ์ดี ให้ผลผลิตสูง สามารถใช้วัตถุดิบราคาถูก และทนต่อสภาวะในการผลิต ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ และผลิตโดยจุลินทรีย์เป็นปัจจัยสำคัญที่รู้จักกันทั่วไป เช่น ยาปฏิชีวนะเพนิซิลิน เอนไซม์อะมายเลส ผงชูรส น้ำส้มสายชู นมเปรี้ยว โยเกิร์ต และกรดซิทริก เป็นต้น

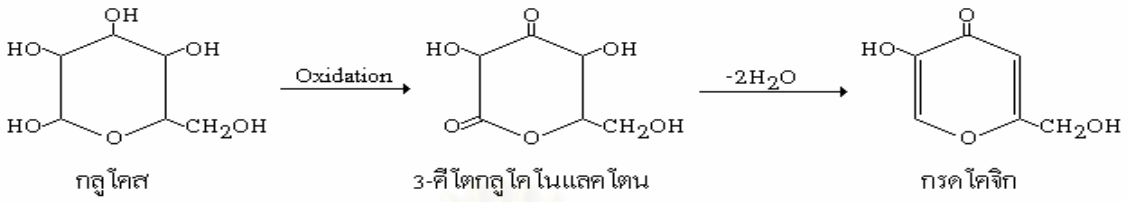
กรดโคจิก (Kojic acid : $C_6H_6O_4$) ก็เป็นผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ที่เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง มีชื่อทางเคมีว่า 5-ไฮดรอกซี-2-ไฮดรอกซีเมทธิล-แกมมาไพโรน (Bajpai *et al*., 1982) ซึ่งค้นพบครั้งแรกว่าผลิตจากสายใยของรา *Aspergillus oryzae* ที่เติบโตบนข้าวนึ่ง (Rice koji) โดย Saito (1907) กรดชนิดนี้มีประโยชน์อย่างกว้างขวาง เช่น ในทางการแพทย์ กรดโคจิกช่วยลดระดับของอนุมูลอิสระประเภทแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ (Reactive oxygen species, ROS) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อในร่างกาย และช่วยเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (Niwa and Akamastsu, 1991) กรดโคจิกใช้เป็นสารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคพืช สัตว์ หรือคน เช่น *Alternaria solani* ซึ่งก่อโรคขอบใบไหม้ (Early blight) ในมะเขือเทศ (Kane and Morey, 1949) หรือ *Bacillus anthracis* ก่อโรคแอนแทรกซ์ (Anthrax) ในวัว หรือ *Leptospira icterohemorrhagiae* ก่อโรคฉี่หนู (Leptospirosis) ในคน (Morton *et al*., 1945) อนุพันธ์ของกรดโคจิกบางชนิด เช่น 5-เมทอกซี-2-ไฮดรอกซีเมทธิล-แกมมาไพโรน และ 5-เมทอกซี-2-เมทอกซีเมทธิล-แกมมาไพโรน ใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ (Bhat and Hadi, 1994) นอกจากนี้ อะไซลอกซี-4-ไพโรน เป็นอนุพันธ์ของกรดโคจิกที่ช่วยลดโอกาสในการเกิดโรคภูมิแพ้ การอักเสบ และหลอดเลือด

หัวใจตีบตัน (Masateru and Shone, 1989) ในอุตสาหกรรมผลิตเครื่องสำอางค์ใช้กรดโคจิกเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางค์เพื่อทำให้ผิวขาวขึ้นโดยทั้งกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรดจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไธโรซิเนส ทำให้การสร้างเมลานินลดลง (Cabanes *et al*., 1994; Takami *et al*., 1994) ในอุตสาหกรรมผลิตสารเคมีใช้กรดโคจิกเป็นส่วนประกอบในการสังเคราะห์พอลิเมอร์คุณภาพดีเพื่อผลิตถังเก็บเชื้อเพลิง บ่อกักเก็บน้ำขนาดใหญ่ ตู้คอนเทนเนอร์ และวัสดุก่อสร้าง (Crueger and Crueger, 1990) ในอุตสาหกรรมอาหารใช้กรดโคจิกเป็นสารตั้งต้นในการผลิตมอลทอล (Maltol) อัลโลมอลทอล (Allomaltol) และเอทธิลมอลทอล (Ethylmaltol) เพื่อใช้ปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารและถนอมอาหาร (Bigelis and Tsai, 1995) ด้านการเกษตรมีรายงานว่ากรดโคจิกและเอสเทอร์ของกรด ช่วยเสริมฤทธิ์ยาฆ่าแมลงในกลุ่มไพรีทรอยด์หรือคาร์บาเมต ทำให้มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าแมลง (Dowd, 1988) จึงช่วยลดปริมาณยาฆ่าแมลงที่ใช้ลงได้

การผลิตกรดโคจิก สามารถทำได้ทั้งวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี และวิธีการผลิตทางชีวภาพโดยการหมักด้วยจุลินทรีย์ โดยการผลิตด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นต้องใช้สารตั้งต้นคือ น้ำตาลกลูโคส หรืออนุพันธ์ของกลูโคสเท่านั้น (Maurer, 1930; Stacey and Turton, 1946) ซึ่งสารบางชนิดมีราคาแพง และวิธีการผลิตยังมีขั้นตอนมาก ทำให้สิ้นเปลืองสารเคมีในการสังเคราะห์เป็นปริมาณมาก ในขณะที่การผลิตโดยวิธีการหมักด้วยจุลินทรีย์เป็นวิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถเลือกใช้จุลินทรีย์ได้หลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้ เช่น ราในสกุล *Aspergillus* ราในสกุล *Penicillium* และแบคทีเรียบางชนิด (Bajpai *et al*., 1982) สำหรับจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ผลิตกรดโคจิกในเชิงพาณิชย์คือ *Aspergillus oryzae* (Barbegaad *et al*., 1992) โดยจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลได้หลายชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลอื่นๆ (รพี โรจนอุไร, 2539; กนิษฐา ภูวนาถนรานุบาล, 2542; อุษา สรรค์วัฒนา, 2543; Ohara, 1954; Bajpai *et al*., 1982; Kwak and Rhee, 1992a; Ogawa *et al*., 1995) นอกจากนี้ยังผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนอื่นที่ไม่ใช่น้ำตาล เช่น เอทธานอล กรดกลูโคนิค แป้งข้าวโพด และแป้งสาคู (Katagiri and Kitahara, 1930; Sakagushi *et al*., 1948; Arntein and Bentley, 1953; Ohara, 1954; Rosfarizan *et al*., 1998a; Rosfarizan *et al*., 1998b)

กลไกการสังเคราะห์กรดโคจิกขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้นที่ใช้ แต่มีวิถีหลักของการสังเคราะห์คือ การสังเคราะห์มาจากน้ำตาลกลูโคสโดยตรงด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันและดีไฮเดรชัน (Arnstein and Bentley, 1953; Bajpai *et al*., 1982) ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยไม่มีการแตกวงของคาร์บอนในโมเลกุลของน้ำตาล และใช้วิถีรองกับแหล่งคาร์บอนใดๆก็ได้ โดยเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นสารตัวกลางที่มีคาร์บอน 3 อะตอม เช่น ไดไฮดรอกซีอะซีโตน กลีเซอรอลดีไฮด์ หลังจากนั้น

สารตัวกลาง 2 โมเลกุลจะรวมกันในที่สุดได้เป็นกรดโคจิก (Arnstein and Bentley, 1953; Bajpai *et al*., 1982)



รูปที่ 1 การสังเคราะห์กรดโคจิกจากน้ำตาลกลูโคส (Bajpai *et al*., 1982)

ในกรณีที่แหล่งคาร์บอนเป็นสารโมเลกุลซับซ้อนจะมีการย่อยสลายก่อน เช่น แป้ง (Starch) ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) ชนิดหนึ่งประกอบด้วยอะมายโลส (Amylose) และอะมายโลเพคติน (Amylopectin) โดยอะมายโลสประกอบด้วยดี-กลูโคสประมาณ 500 โมเลกุลขึ้นไปเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา (1-4) กลูโคซิดิค ส่วนอะมายโลเพคตินประกอบด้วยดี-กลูโคสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา (1-4) กลูโคซิดิค และมีแขนงที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 20-25 โมเลกุลมาต่อกันด้วยพันธะแอลฟา (1-6) กลูโคซิดิค (Voet and Voet, 1995)

ก่อนที่จะมีการผลิตกรดโคจิกจากแป้งได้นั้น ต้องมีการย่อยแป้งเพื่อเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลกลูโคสแล้วจึงเข้าสู่วิถีหลักของการผลิตกรดโคจิกดังกล่าวข้างต้น ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี เช่น ใช้วิธีย่อยด้วยกรด (Acid hydrolysis) แต่วิธีนี้ปฏิกิริยาการย่อยค่อนข้างรุนแรง หรือใช้เอนไซม์กลุ่มอะมายเลส (Amylase enzymes) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยแป้งภายใต้ภาวะที่เหมาะสม เนื่องจากให้ปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูง (Substrate specificity) และวิธีการไม่ยุ่งยาก (วาสนา แสงพิทักษ์, 2528) และรา *Aspergillus oryzae* ก็สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ (Fogarty and Kelly, 1979)

สำหรับการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลว (Submerged culture) ไม่ว่าจะใช้แหล่งคาร์บอนใดๆ มีความจำเป็นต้องจัดภาวะให้เหมาะสมกับการใช้แหล่งคาร์บอนนั้นๆ ภาวะที่จำเป็นต้องศึกษาได้แก่ ปริมาณของแหล่งคาร์บอน โดยทั่วไปจะใช้ประมาณ 50-300 กรัมต่อลิตร (Kwak and Rhee, 1992a) เช่น ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดและแป้งสาคูที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus flavus* มีค่าเท่ากับ 75 และ 100 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Rosfarizan *et al*., 1998a; Rosfarizan *et al*., 1998b) ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด โคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* หลายสายพันธุ์มีค่าเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร (Kwak and Rhee, 1992a; Ogawa *et al*., 1995; รพี โรจนอุไร, 2539; กนิษฐา ภูวนาถนรานุบาล, 2542)

แหล่งไนโตรเจนใช้ได้ทั้งสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น สารสกัดจากยีสต์ หรือ เปปโตน (Bajpai *et al*., 1982; รพี โรจนอุไร, 2539) และสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต (Kwak and Rhee, 1992b; รพี โรจนอุไร, 2539) หรือ แอมโมเนียมไนเตรต (May *et al*., 1931; กนิษฐา ภูวนาถนรานุบาล, 2542) โดยใช้ 0.5-2.0 กรัมต่อลิตร หรือใช้ร่วมกัน เช่น การผลิตกรด โคจิกโดย *Aspergillus oryzae* ใช้สารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตรร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 0.75 กรัมต่อลิตร (Kwak and Rhee, 1992b) สำหรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ Katagiri และ Kitahara (1933) รายงานว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *Aspergillus oryzae* คือ 5.0 แต่ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 2.4 สำหรับ *Aspergillus flavus* ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกจากแป้งสาคูมีค่าเท่ากับ 3.0 (Rosfarizan *et al*., 1998b) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* อยู่ในช่วง 29-31 องศาเซลเซียส (Katagiri and Kitahara, 1933) โดยจากรายงานการทดลองหลายรายงานพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 30 องศาเซลเซียส (May *et al*., 1931; Bajpai *et al*., 1982; Kwak and Rhee, 1992a; Ogawa *et al*., 1995) โดยการศึกษาดังกล่าวข้างต้นทำเพื่อเพิ่มผลผลิตกรดโคจิก ลดระยะเวลาในการผลิต สามารถควบคุมปัจจัยต่างๆในการผลิต และช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ นอกจากนี้การเลือกใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกและหาง่ายในท้องถิ่น เช่น แป้งสาคูในมาเลเซีย (Rosfarizan *et al*., 1998a) หรือน้ำตาลทรายในไทย (รพี โรจนอุไร, 2539) รวมทั้งการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิต ซึ่งมีรายงานว่าเมื่อเติมน้ำตาลกลูโคสลงไปในระหว่างการผลิตกรดโคจิกเมื่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสใกล้หมด ทำให้ได้ผลผลิตกรดเพิ่มขึ้น (Ariff *et al*., 1996; Ogawa *et al*., 1995; ชมจิต ท้าวธงไชย, 2544)

สำหรับวัตถุดิบที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิกที่น่าสนใจ มีราคาถูก หาได้ง่าย มีปริมาณเพียงพอต่อความต้องการในการผลิต และเป็นผลผลิตทางการเกษตรภายในประเทศไทย ได้แก่ น้ำตาลทรายและแป้งมันสำปะหลัง โดยมีงานวิจัยหลายชิ้นที่ใช้น้ำตาลทรายเพื่อการผลิตกรดโคจิก (Katagiri and Kitahara, 1930; May *et al*., 1931; Ohara, 1954; Bajpai *et al*., 1982; Ogawa *et al*., 1995) รวมทั้งจากรา *A. oryzae* K-13 ซึ่งเป็นสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ทั้งในระดับขวดเขย่าโดย รพี โรจนอุไร (2539) และในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตรโดย อุษา สรรค์วัฒนา (2543) ในขณะที่แป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch) เป็นผลผลิตทาง อุตสาหกรรมจากวัตถุดิบทางการเกษตร คือ มันสำปะหลัง ซึ่งเป็นพืชเขตร้อนที่สามารถทนความแห้งแล้งได้ดี ปลูกได้ในดินที่ด้อยคุณภาพ สำหรับประเทศไทย มันสำปะหลังจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง ปลูกมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ผลผลิตของมันสำปะหลังส่วนมากจะนำมาใช้เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ และใช้ในอุตสาหกรรมบางประเภทเช่น กาว,

วุ้นเส้น, แป้งมัน, กระดาษ เป็นต้น บางส่วนส่งขายไปยังต่างประเทศในรูปของมันเส้น, แป้งมัน, มันอัดเม็ด แต่กระนั้นก็ตามยังปรากฏว่ามีเหลืออยู่ในประเทศปีละมากๆ (วาสนา แสงพิทักษ์, 2528) อีกทั้งราคาถูกมาก และยังไม่เคยมีรายงานว่ามีการใช้เพื่อผลิตกรดโคจิกมาก่อน ตลอดจนการทดลองเบื้องต้นพบว่า *Aspergillus oryzae* K-13 สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเหลวระดับขวดเขย่าเพื่อศึกษาหาภาวะและวิธีการผลิตที่เหมาะสมต่อการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการแปรรูปไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นที่มีราคาสูงขึ้น โดยใช้เทคโนโลยีและค่าใช้จ่ายไม่สูงจนเกินไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาภาวะและวิธีการผลิตให้เหมาะสมสำหรับการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเหลว

ขอบเขตของการวิจัย

1. ศึกษาเบื้องต้นเพื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13
2. หาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลัง
3. หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตกรดโคจิก
4. ปรับปรุงการผลิตโดยการเติมแหล่งคาร์บอน และ/หรือ สารอาหารอื่นในระหว่างการผลิตกรดโคจิก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถศึกษาหาภาวะการผลิตและวิธีการผลิตให้เหมาะต่อการใช้แป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัตถุดิบราคาถูกในการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ซึ่งมีผลให้ต้นทุนการผลิตลดลง และสามารถเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบราคาถูกจากการเกษตรที่มีจำนวนมากในประเทศ

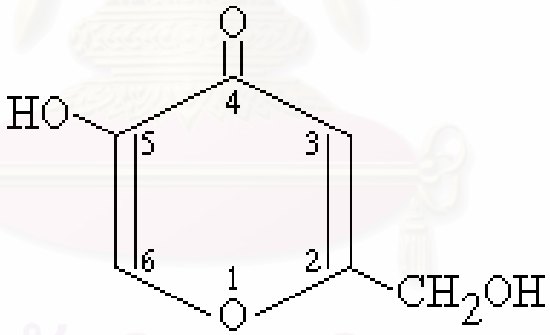
บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

กรดโคจิกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีองค์ประกอบหลักเป็นวงแกมมาไพโรน มีสูตรทางเคมีคือ $C_6H_6O_4$ (Arnstein and Bentley, 1953) มีชื่อทางเคมีว่า 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-γ-pyrone (Bajpai *et al*., 1982) ดังแสดงในรูปที่ 2

กรดโคจิกเป็นผลผลิตในกระบวนการหมักที่มีการเติมอากาศจากแหล่งวัตถุดิบที่เป็นคาร์โบไฮเดรตโดยจุลินทรีย์หลายชนิด (Beelik, 1956) ซึ่งในปัจจุบันมีการผลิตในทางการค้าโดยการหมักด้วยรา (Prescott and Dunn, 1959)

มีการค้นพบกรดโคจิกเป็นครั้งแรกจากสายใยของรา *Aspergillus oryzae* ที่เติบโตบนข้าวนึ่งโดย Saito (1907) ซึ่งเขาสามารถแยกผลึกกรดชนิดหนึ่งออกมาได้ และยังจำแนกกรดนี้ไว้ในกลุ่มกรดเบตารีโซซิลคาร์บอกซิลิก ต่อมา Yabuta (1913) นักชีวเคมีชาวญี่ปุ่น ได้ศึกษาจนทราบถึงโครงสร้างทั้งหมดของกรดนี้เป็นผลสำเร็จ และตั้งชื่อกรดนี้ว่า "**กรดโคจิก**" ในปี ค.ศ. 1924



Kojic acid

5-hydroxy-2-hydroxymethyl-γ-pyrone

รูปที่ 2 โครงสร้างของกรดโคจิก

(Bajpai *et al*, 1982)

สมบัติของกรดโคจิก

1. **สมบัติทางกายภาพ**

ผลึกกรดโคจิก เป็นผลึกใสไม่มีสีรูปเข็มปลายแหลมทั้งด้านหัวและท้าย (Primatic needle) (Yabuta, 1913; Traetta-Mosca, 1914) ละลายได้ดีในน้ำ เอทธานอล และอะซีโตน โดยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น การละลายของกรดโคจิกก็จะดีขึ้นด้วย เช่น ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส กรดโคจิกจะมีค่าการละลายเท่ากับ 2.8 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กรดโคจิกจะมีค่าการละลายเพิ่มขึ้นเป็น 6.8 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร กรดโคจิกนั้นสามารถละลายได้เล็กน้อยในอีเธอร์ เอทธิลอะซิเตต คลอโรฟอร์ม และไพริดีน (Traetta-Mosca and Preti, 1921; Yabuta, 1923) มีจุดหลอมเหลว 151-154 องศาเซลเซียส (Birkinshaw *et al*., 1931; Di-Capua, 1933; Yabuta, 1913; Maurer, 1930; May *et al*., 1931) กรดโคจิกสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 315 นาโนเมตร (Stacey and Turton, 1946)

2. **สมบัติทางเคมี**

มวลโมเลกุลของกรดโคจิกคือ 142.11 โดยในกรด 1 โมเลกุลประกอบด้วย ธาตุคาร์บอน 50.71 เปอร์เซ็นต์ ธาตุออกซิเจน 45.03 เปอร์เซ็นต์ และธาตุไฮโดรเจน 4.26 เปอร์เซ็นต์ (Challenger *et al*., 1931) จากโครงสร้างของกรดที่เป็นวงแกมมาไพโรน และมีหมู่เกาะที่ตำแหน่งต่างๆ ซึ่งมีผลต่อสมบัติทางเคมีของกรดโคจิกเป็นสำคัญ ดังนี้

หมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group, -OH) ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของวงแกมมาไพโรน (รูปที่ 2) สามารถแตกตัวให้ไฮโดรเจนอิออน (H^+) โดยมีค่าการแตกตัวของกรด (pKa) เท่ากับ 7.90 - 8.03 (Beelik, 1956) ทำให้โมเลกุลมีสมบัติเป็นกรดอ่อน (Weak acid) และถูกแทนที่ด้วยอิออนของโลหะชนิดต่างๆ กลายเป็นเกลือของกรดดังกล่าว ซึ่งโลหะที่สามารถทำปฏิกิริยากับกรดนี้ได้แก่ โซเดียม แบริลเรียม แคลเซียม โคบอลท์ คอปเปอร์ นิกเกิล เหล็ก แมงกานีส แคดเมียม สังกะสี และอลูมิเนียม (Na, Ba, Ca, Co, Cu, Ni, Fe, Mn, Cd, Zn, and Al) เป็นต้น (Yabuta, 1923; Maurer, 1930; Bryant and Fernelius, 1954) และยังใช้กรดนี้ในการเตรียมอนุพันธ์ของสารประกอบไฮดรอกซีในรูปของอีเธอร์ (ether, R-O-R) และ เอสเทอร์ (ester, R-COO-R)

หมู่คาร์บอนิล (Carbonyl group, C=O) โดยปกติมักไม่ทำปฏิกิริยา แต่สามารถเกิดปฏิกิริยากับโพแทสเซียมไซยาไนด์ (KCN) ทำให้กรดโคจิกอยู่ในรูปของเหลว (Bajpai *et al*., 1982)

ตำแหน่งพันธะคู่ระหว่างคาร์บอน สามารถเกิดปฏิกิริยาการเติมไอโอดีนหรือโบรมีนเข้าไปเพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่มีสมบัติแตกต่างออกไป (Bajpai *et al*., 1982)

คาร์บอนตำแหน่งที่ว่าง คือตำแหน่งที่ 3 และ 6 โดยเฉพาะคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 จะไวต่อปฏิกิริยา และทำให้เกิดอนุพันธ์ได้มากกว่าคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เนื่องจากคาร์บอนตรงตำแหน่งที่

3 นั้นมีหมู่คาร์บอนิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 และหมู่ไฮดรอกซีเมทธิล (Hydroxymethyl group, $-CH_2OH$) ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 เป็นตัวกีดขวางการเข้าทำปฏิกิริยาของสารอื่น

3. สมบัติทางชีวภาพ

มีผลยับยั้งการเจริญ และ/หรือ ทำลายจุลินทรีย์ทั่วไป และจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Oxford, 1942; Foster and Karow, 1945; Morton *et al*., 1945) นอกจากนี้ Bajpai และคณะ (1982) ยังรายงานว่ากรดโคจิกในปริมาณมากเป็นพิษต่อหัวใจ (Cardiotoxic) มนุษย์ แต่ถ้าใช้ในปริมาณที่พอเหมาะก็จะช่วยบำรุงหัวใจ (Cardiotonic) ได้

ประโยชน์ของกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด

1. ทางการแพทย์

1.1 ลดอาการของโรคที่เกิดจากการมีอนุมูลอิสระมากเกินไป

เนื่องจากกรดโคจิกสามารถลดระดับของแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ที่ร่างกายสร้างออกมาซึ่งเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อในร่างกาย อันได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) อนุมูลอิสระของซุปเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) และอนุมูลอิสระของไฮดรอกไซด์ (OH^-) ไปอยู่ในรูปที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ จึงเป็นการลดปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้มากจนถึงขีดอันตรายต่อเนื้อเยื่อในร่างกาย (Niwa and Akamatsu, 1991)

1.2 ใช้เป็นยาปฏิชีวนะ (Antibiotics)

มีการศึกษาถึงสมบัติการเป็นสารสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญและ/หรือทำลายจุลินทรีย์โดยทั่วไป และจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากมาย (Oxford, 1942; Foster and Karow, 1945; Jennings and Williams, 1945; Morton *et al*., 1945; Kavanagh, 1947; Lee *et al*., 1950) ดังตัวอย่างที่แสดงในตารางที่ 1 เนื่องจากกรดโคจิกมีความเป็นพิษต่ำ และมีความปลอดภัยในการใช้กับมนุษย์และสัตว์ นอกจากนี้อนุพันธ์ของกรดโคจิกหลายชนิดก็มีสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะได้ดี เช่น กรดฟีนิลเมอคิวรีโคจิก กรดพาราไฮดรอกซีฟีนิลเมอคิวรีโคจิก และเกลือของกรดได้แก่ เกลือไอโอไดด์ เกลือโบรไมด์ และเกลือคลอไรด์ (Nishimura *et al*., 1994)

1.3 ช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายของมนุษย์และสัตว์

โดยกรดโคจิกจะช่วยให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ (Neutrophills) มีการสะสมของแคลเซียมอิออน (Ca^{++}) เพิ่มขึ้น ทำให้มีประสิทธิภาพในการทำงานดีขึ้น (Niwa and Akamastsu, 1991)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลินทรีย์และความเข้มข้นของกรดโคจิกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์นั้นได้สมบูรณ์ (Morton *et al*., 1945)

จุลินทรีย์	ความเข้มข้นของกรดโคจิกที่ยับยั้งจุลินทรีย์ได้สมบูรณ์ (น้ำหนักกรดต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)
Alcaligenes faecalis	1 : 500
Bacillus anthracis	1 : 500 – 1 : 1,000
Bacillus subtilis	> 1 : 500
Brucella abortus	1 : 4,000
Brucella melitensis	1 : 2,000
Clostridium botulinum	1 : 500 – 1 : 1,000
Escherichia coli	1 : 2,000
Klebsiella pneumoniae	1 : 500 – 1 : 1,000
Leptospira canicola	1 : 1,000,000
Leptospira icterohemorrhagiae	1 : 100,000
Micrococcus roseus	1 : 500
Pasteurella pestis	1 : 4,000
Proteus mirabilis	1 : 500
Proteus vulgaris	1 : 500
Pseudomonas aeruginosa	1 : 500
Pseudomonas fluorescens	1 : 2,000
Salmonella paratyphi	1 : 500 – 1 : 1,000
Shigella dysenteriae	1 : 500 – 1 : 2,000
Serratia marcescens	1 : 500
Spirillum rubrum	1 : 1,000
Staphylococcus aureus	1 : 500
Streptococcus, alpha	1 : 500
Streptococcus, beta	1 : 500

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงในตารางนี้เป็นเพียงค่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของกรด โคจิกเท่านั้น ซึ่งมิได้ระบุอย่างชัดเจนว่าเป็น Bactericidal หรือ Bacteriostatic

1.4 ใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ (Local anaesthetic)

โดยใช้อนุพันธ์ของกรดโคจิกบางชนิด เช่น 5-เมทธอกซี-2-ไฮดรอกซีเมทธิล-แกมมา ไพโรน และ 5–เมทธอกซี-2-เมทธอกซีมทธิล-แกมมาไพโรน (Armit and Nolan, 1931; Bhat and Hadi, 1994)

1.5 ลดโอกาสในการเกิดโรคไขข้ออักเสบและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

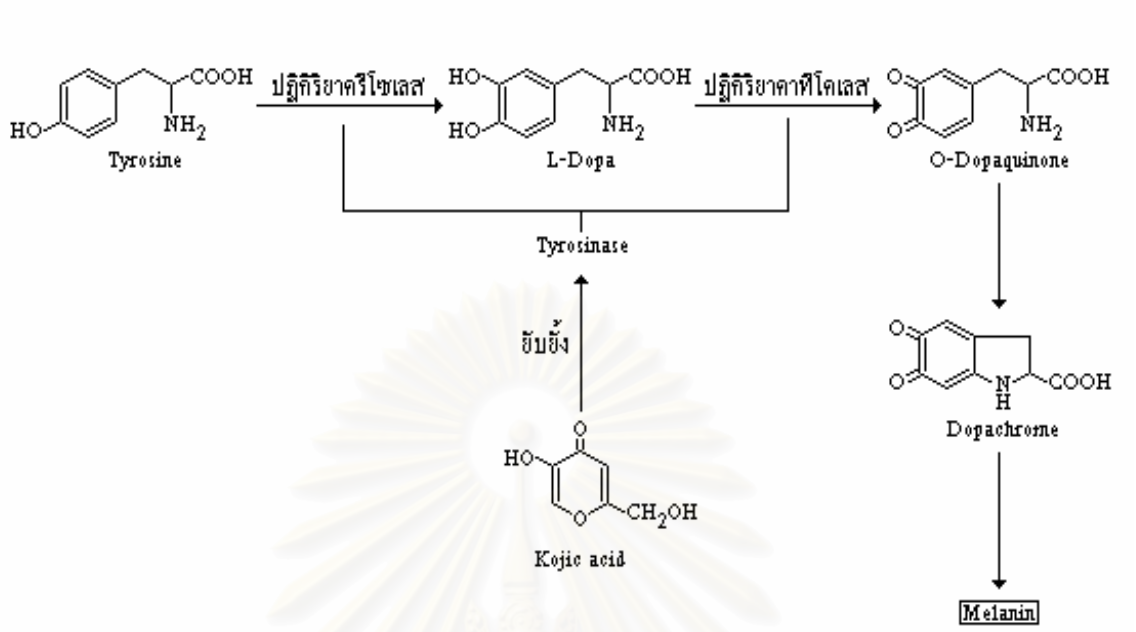
เนื่องจากอนุพันธ์ของกรดโคจิกพวกอะไซลอกซี-4-ไพโรน สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวโทรฟิลล์อีลาสเทส (Neutrophills elastase) ในร่างกายมนุษย์ ซึ่งเอนไซม์นี้ทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างสารที่เป็นปัจจัยในการก่อโรคไขข้ออักเสบ (Rheumatoid arthritis) และทำให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในร่างกาย (Masateru and Shone, 1989) จึงทำให้โอกาสในการเกิดโรคไขข้ออักเสบ และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งลดลง

1.6 ใช้แทนฮอร์โมนอินซูลินเพื่อรักษาโรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน และโรคอ้วน

โดย Caravan และคณะ (1995) ได้รายงานว่ากรดโคจิกและมอลทอลสามารถใช้เป็นลิแกนด์ (Ligand) ที่จะไปติดกับสารในกลุ่มออกโซวานาเดียมคีเลต (Oxovanadium IV chelates) เพื่อใช้แทนฮอร์โมนอินซูลินได้

2. อุตสาหกรรมผลิตเครื่องสำอางค์

มีการพบว่าทั้งกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรดหลายชนิด เช่น กรดฟอสฟาติดิลโคจิก กรด 1,2-ไดปามิโตอิล-3-เอสเอ็น-ฟอสฟาติดิลโคจิก กรดโคจิก-5-ออโธ-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ และกรดโคจิก-7-ออโธ-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ นำไปใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางค์เพื่อทำให้ผิวขาวนวล (Cabanes *et al*., 1994; Takami *et al*., 1994) เนื่องจากเป็นสารที่ยับยั้งกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินโดยการยับยั้งเป็นไปอย่างช้าๆ (Slow-binding inhibitor) โดยจะไปแย่งจับกับเอนไซม์ไธโรซิเนส (Tyrosinase) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาคาทีโคเลส (Catecholase activity) แบบแข่งขันแทนที่เอนไซม์จะจับกับแอลโดปา (L-dopa) เพื่อเปลี่ยนไปเป็นออโธโดปาควิโนน (O-dopaquinone) ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งของขบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน (รูปที่ 3) เนื่องจากกรดโคจิกและอนุพันธ์มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกับแอลโดปา ผลก็คือมีการสร้างเมลานินในร่างกายลดลงจนไม่เกิดการสร้างเมลานินเมื่อใช้อย่างต่อเนื่อง จึงทำให้ผิวขาวนวลขึ้น นอกจากนี้ยังมีการผสมกรดโคจิกลงในผลิตภัณฑ์ที่ต้องการความหอม เพื่อกำจัดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ออกไป เช่น น้ำหอม โคโลญจ์ แป้ง แชมพู เทียนหอม โลชัน อีกด้วย (Bigelis and Tsai, 1995)



รูปที่ 3 กระบวนการสร้างเมลานิน

(Wilson, 1981)

3. ด้านการเกษตร

กรดโคจิกนั้นยังใช้ในการต่อต้านโรคพืชจากเชื้อรา (Fungal diseases of plants) หลายชนิดโดยอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนของกรดโคจิกกับโลหะหนักที่มีอิเล็คทรอนวงนอกเป็นสอง (Bivalent heavy metals) เช่น Cu^{2+}, Hg^{2+}, Cd^{2+}, Pd^{2+} และ Sn^{2+} (Kane and Morey, 1949) นอกจากนี้กรดโคจิกยังสามารถกระตุ้นการทำงานของยาฆ่าแมลงในกลุ่มที่มีนิโคติน (Nicotine insecticides) เป็นองค์ประกอบ ที่ใช้ต่อต้านหนอนฟัก (*Diaphania hyalinata* L.) และหนอนกระทู้ (*Prodenia eriania* Cram.) (Mayer *et al*., 1947)

อนุพันธ์กรดอะมิโนและเปปไทด์ (Peptide) ของกรดโคจิก เช่น คาร์โบเบนซอกซี-อะลานีน-โคเจต คาร์โบเบนซอกซี-ลูซีน-อะลานีน-โคเจต และคาร์โบเบนซอกซี-ฟีนิลอะลานีน-ไกลซีน-โคเจต สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคพืช เช่น *Pythium graminicola*, *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* ซึ่งก่อโรคต้นอ่อนไหม้ (Seeding blight) โรคเหี่ยวจากฟูซาเรียม (Fusarium wilt) และใบไหม้ (Sheath blight) ตามลำดับ (Kayahara *et al*., 1990) และมีรายงานว่ากรดโคจิกและอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดเมื่อใช้ร่วมกับยาฆ่าแมลงในกลุ่มไพรีทรอยด์ หรือคาร์บาเมต จะทำให้ได้สารประกอบที่มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าแมลง (Dowd,

1990) ทำให้สามารถลดปริมาณการใช้สารฆ่าแมลงทั้งสองกลุ่มลงได้ โดยยังคงประสิทธิภาพเท่าเดิม ทำให้พบสารฆ่าแมลงตกค้างในธรรมชาติน้อยลง สำหรับกรดโคจิกนั้นสามารถสลายได้ในธรรมชาติ

4. ทางอุตสาหกรรมอาหาร

ใช้กรดโคจิกเป็นสารตั้งต้นในการผลิตมอลทอล เอทธิลมอลทอล และอัลโลมอลทอล ซึ่งเป็นสารที่จะพบอยู่ในอาหารและเครื่องดื่มหลายชนิด เช่น ลูกกวาดกลิ่นผลไม้ ไวน์ เหล้า เบียร์ น้ำผลไม้ ไอศกรีม เป็นต้น เนื่องจากเป็นสารที่ใช้ในการปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารให้ดีขึ้น และสามารถใช้แทนน้ำตาลได้ 5–15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยไม่สูญเสียความหวาน (Bigelis and Tsai, 1995) นอกจากนี้ยังใช้กรดโคจิกเป็นสารที่ช่วยป้องกันสีแปลี่ยนระหว่างการหมักแป้งในอาหารประเภทแป้งและเส้นก๋วยเตี๋ยว รวมทั้งใช้ในการถนอมอาหารประเภทอาหารทะเลแช่แข็งด้วย (Yabuta, 1923; Kwak & Rhee, 1992)

5. ทางอุตสาหกรรมเคมี

ในอุตสาหกรรมเคมีใช้กรดโคจิกเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เป็นสารอื่นที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ที่กล่าวมาแล้ว นอกจากนั้นยังใช้ในอุตสาหกรรมผลิตพลาสติก โดยใช้เป็นส่วนประกอบในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ เพื่อผลิตถังเก็บเชื้อเพลิง บ่อกักเก็บน้ำขนาดใหญ่ ตู้คอนเทนเนอร์ และวัสดุก่อสร้าง นอกจากนั้นยังใช้ในอุตสาหกรรมผลิตพลาสติก โดยกรดโคจิกจะทำให้พลาสติกมีความยืดหยุ่นดี (Crueger and Crueger, 1990) และยังใช้เป็นส่วนผสมในสีย้อมของบริษัท Wako Pure Chemical Industry Ltd. (Kouno and Suzuki, 1994)

สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด

กรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรดนั้นมีประโยชน์มากมายหลากหลายประการดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จึงมีผู้ที่สนใจและทำการวิจัยเกี่ยวกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด ซึ่งได้มีการขึ้นทะเบียนสิทธิบัตรไว้ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด

หมายเลขสิทธิบัตร	ผู้จดสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
US 4278656	Nagai and Izumi (1981)	Cosmetic composition containing kojic acid ester

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด (ต่อ)

หมายเลขสิทธิบัตร	ผู้จดสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
US 4369174	Nagai and Izumi (1983)	Cosmetic composition containing kojic acid ester
US 4603144	Campbell and Miyano (1986)	Kojic acid ether - ester derivatives
US 4644071	Masateru and Shone (1987)	Aralkoxy and aryloxyalkoxy kojic acid derivatives
US 4689039	Masaki (1987)	Electrotherapeutic apparatus for iontophoresis
US 4696813	Higa (1987)	Melanin inhibiting cosmetic composition
US 4705871	Masateru and Shone (1987)	Aralkoxy and aryloxyalkoxy kojic acid derivatives
US 4735964	Campbell and Miyano (1988)	Kojic acid ether - ester derivatives
US 4786278	Masaki (1988)	Therapeutic device for iontophoresing cation and anion
US 4812474	Campbell and Miyano (1989)	Kojic acid ether - ester derivatives
US 4812584	Masateru and Shone (1989)	Aralkoxy and aryloxyalkoxy kojic acid derivatives
US 4847074	Hatae and Nakashima (1989)	Whitening cosmetic
US 4891361	Hatae (1990)	Method of minimizing erythema and elastosis
US 4912118	Hider *et al.* (1990)	Pharmaceutical composition
US 4919921	Hatae (1990)	Compositions for topical use having melanin synthesis inhibing activity
US 4948577	Hara (1990)	Composition for external application

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด (ต่อ)

หมายเลขสิทธิบัตร	ผู้จดสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
US 4956353	Dowd (1990)	Kojic acid and esters as insecticide synergists
US 4985255	Higa (1991)	External preparations of melanogenesis - inhibitory agent
US 4985455	Motono (1991)	External preparations free of discoloration
US 4990330	Oyama (1991)	Compositions for topical use having melanin synthesis-inhibing activity
US 4990532	Yamamoto (1991)	External preparations
US 5063056	Yamamoto (1991)	Melanogenesis-inhibiting preparation for external application
US 5104865	Hider *et al.* (1992)	Iron complexes of hydroxypyridones useful for treating iron overload
US 5164182	Meybeck and Dumas (1992)	Composition containing a mulberry extract incorporated into hydrated lipidic lamellar phases of liposomes
US 5279834	Meybeck (1994)	Pharmaceutical or cosmetic composition containing hydroquinone and kojic acid
US 5427775	Sakai *et al.* (1995)	Whitening embellisher
US 5486624	Yung *et al.* (1996)	Kojic acid derivative
US 5523421	Yung *et al.* (1996)	Kojic acid derivatives
US 5527790	McNeil and Orvig (1996)	Bis(maltolato)oxovanadium compositions for the treatment of elevated blood sugar
US 5547678	Gagnebien-Cabanne (1996)	Compositions and methods for combating blemishes and/or ageing of the skin

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด (ต่อ)

หมายเลขสิทธิบัตร	ผู้จดสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
US 5560907	Sakai *et al.* (1996)	Whitening embellisher
US 5599528	Igaki (1997)	Preparation for epidermis
US 5620967	McNeil *et al.* (1997)	Methods of treating hypertension with vanadium compositions
US 5637293	Honda (1997)	Preparation for epidermis
US 5688784	McNeil *et al.* (1997)	Methods of suppressing appetite with vanadium complexes
US 5695799	Ishikawa and Iwasa (1997)	Process for producing wheat flour and wheat flour products
US 5750563	Honda (1998)	Preparation for epidermis
US 5866563	McNeil and Orvig (1999)	Vanadium compositions
US 5874463	Ancira (1999)	Hydroxy – kojic acid skin peel
US 5888993	McNeil and Orvig (1999)	Vanadium compounds in the treatment of elevated blood sugar levels
US 5968487	Galey and Pichaud (1999)	Derivative of kojic acid and its use as a depigmenting agent

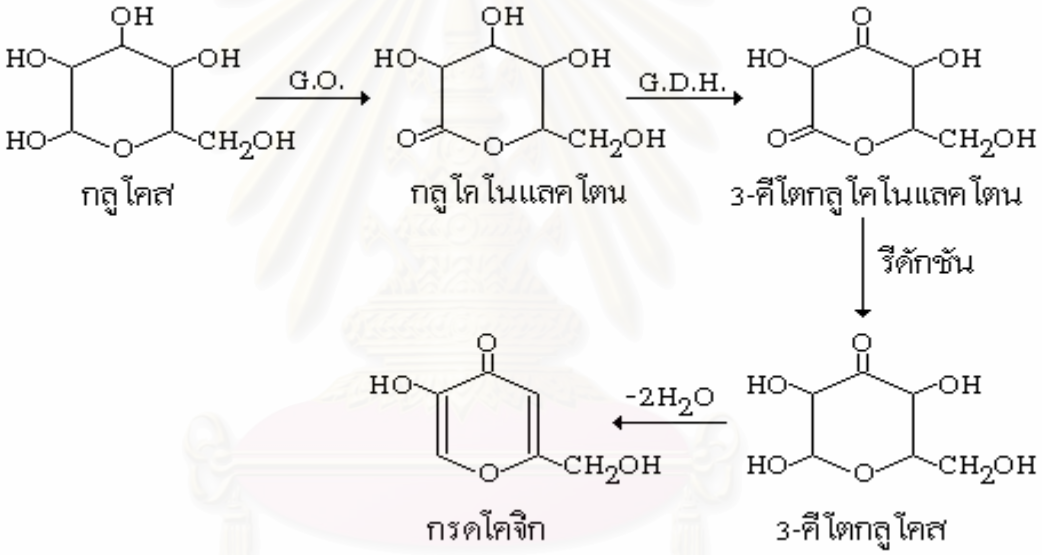
การผลิตกรดโคจิก

การผลิตกรดโคจิกสามารถทำได้ทั้งวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี และวิธีการผลิตทางชีวภาพ ซึ่งเป็นวิธีการผลิตที่นิยมใช้ในปัจจุบันโดยการหมักด้วยจุลินทรีย์ เนื่องจากสามารถใช้จุลินทรีย์ได้หลากหลายสายพันธุ์ในการผลิต และอีกทั้งมีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิด ซึ่งบางชนิดมีราคาถูก ทำให้เหมาะสมแก่การขยายการผลิตไปสู่ระดับอุตสาหกรรม ในขณะที่การผลิตโดยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นต้องใช้สารตั้งต้นคือ กลูโคส หรืออนุพันธ์ของกลูโคสเท่านั้น ซึ่งบางชนิดมีราคาแพง ตลอดจนขั้นตอนการผลิตก็ยุ่งยากซับซ้อน (Maurer, 1930; Stacey & Turton, 1946)

กระบวนการชีวสังเคราะห์ของกรดโคจิก

ในปีค.ศ. 1923 Yabuta ทราบถึงโครงสร้างของกรดโคจิกเป็นครั้งแรก และพบว่าสามารถผลิตได้โดยจุลินทรีย์ หลังจากนั้นเป็นต้นมาจึงมีการศึกษาเพื่อที่จะทราบถึงกลไกในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของกรดโคจิก แต่เนื่องจากจุลินทรีย์มีความสามารถในการใช้วัตถุดิบตั้งต้นได้หลายชนิดในการผลิตกรดโคจิก ดังนั้นกระบวนการชีวสังเคราะห์กรดโคจิกจึงมีหลายวิธี ซึ่งสรุปได้ดังนี้

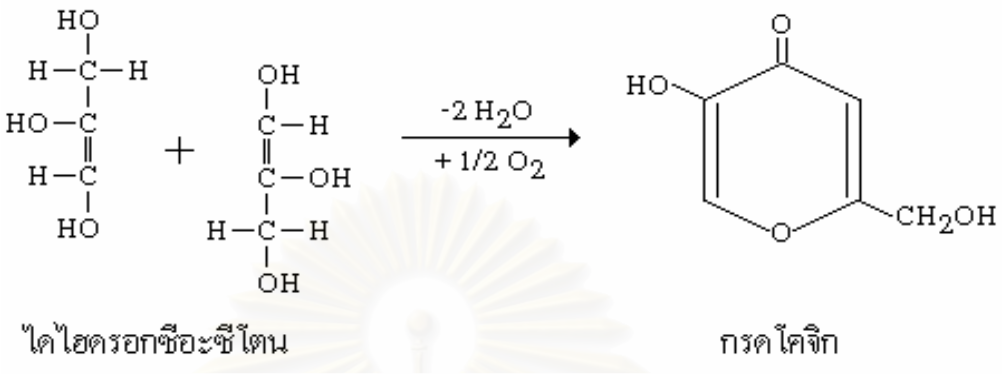
1. วิถีหลักของการผลิตกรดโคจิก คือ การเปลี่ยนมาจากน้ำตาลกลูโคสโดยตรงด้วยปฏิกิริยาการดึงไฮโดรเจน (Dehydrogenation) ปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction) และปฏิกิริยาการดึงน้ำออก (Dehydration) ซึ่งไม่มีการแตกวงของสายคาร์บอนในโมเลกุลของกลูโคส ดังแสดงในรูปที่ 4



รูปที่ 4 แบบแผนการผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลกลูโคสโดยตรง
(G.O. = Glucose oxidase, G.D.H. = Glucose dehydrogenase)
(Bajpai *et al*., 1982)

2. วิถีรองของการผลิตกรดโคจิก คือ เกิดจากสารตัวกลางที่ประกอบด้วยคาร์บอน 3 อะตอม อันได้แก่ ไดไฮดรอกซีอะซีโตน กลีเซอรอลดีไฮด์ และ กลีเซอริกไดอัลดีไฮด์ โดยมีเอนไซม์ที่สำคัญ คือ แอลโดเลส (Aldolase) ที่เร่งปฏิกิริยาการผลิตกลีเซอรอลดีไฮด์ และไดไฮดรอกซีอะซีโตนกับไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส (Triose phosphate isomerase) ที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณของสารตัวกลางทั้งสองชนิดให้มีความสมดุลย์ โดยที่ภาวะสมดุลย์จะมีปริมาณไดไฮดรอกซี

อะซีโตนถึง 95 เปอร์เซ็นต์ และกลีเซอรอลดีไฮด์เพียง 5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นไดไฮดรอกซีอะซีโตนก็จะรวมตัวกันกลายเป็นกรดโคจิก ดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แบบแผนแสดงการเกิดกรดโคจิกจากไดไฮดรอกซีอะซีโตน
(อ้างถึงใน Presscott and Dunn, 1959)

3. กรณีที่ผลิตกรดโคจิกจากแหล่งคาร์บอนโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น น้ำตาลซูโครส หรือแป้ง จุลินทรีย์จะต้องย่อยแหล่งคาร์บอนนั้นๆ ก่อน เพื่อให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส แล้วจึงเข้าสู่กระบวนการชีวสังเคราะห์กรดโคจิกตามวิถีหลักต่อไป
4. กรณีที่ผลิตกรดโคจิกจากแหล่งคาร์บอนโมเลกุลขนาดเล็ก จุลินทรีย์จะใช้แหล่งคาร์บอนนั้นๆ ผ่านวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก เพื่อผลิตสารตัวกลางที่ประกอบด้วยคาร์บอน 3 อะตอม หลังจากนั้นสารตัวกลางที่เกิดขึ้นก็จะรวมตัวกันกลายเป็นกรดโคจิก

ปัจจัยในการผลิตกรดโคจิก

1. **วิธีการเพาะเลี้ยง**

วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเพื่อการผลิตมีด้วยกัน 3 วิธีดังนี้

1.1 การเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (Solid state culture)

เป็นการเพาะเลี้ยงที่ใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติพวกธัญพืช เช่น ฟางข้าว หญ้า หรืออาจเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากสัตว์หรือพืชที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต และ/หรือ โปรตีนสูง โดยต้องมีการปรับสภาพวัตถุดิบเสียก่อน เช่น การเติมน้ำเพื่อปรับให้มีปริมาณความชื้นที่เหมาะสม ซึ่งจะเพียงพอต่อการเติบโต และมีเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์เท่านั้น แต่วิธีการเพาะเลี้ยงนี้ จะควบคุมปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างได้ยาก ต้องใช้พื้นที่มาก และเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ลำบาก (Saito, 1907; Yabuta, 1913)

1.2 **การเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารเหลว** (Liquid surface culture)

วิธีการจะคล้ายการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง แต่เปลี่ยนจากอาหารแข็งเป็นอาหารเหลว โดยให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตบนผิวหน้าของอาหารเหลว ซึ่งต้องไม่มีการกวน จึงทำให้มีปริมาณของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อย ดังนั้นจำเป็นต้องอาศัยพื้นที่ผิวมากพอในการหมักแต่ไม่ควรมากเกินไป ต้องมีปัจจัยเสริมเพื่อช่วยในการเติบโต และมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมจึงจะช่วยส่งเสริมการผลิตให้สูงขึ้น สำหรับวิธีการนี้มีข้อได้เปรียบที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง คือ สามารถปรับเปลี่ยนสภาพของอาหารได้ง่ายกว่า เช่น การเติมสารอาหารเพิ่มเติมลงไป หรือการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้น เป็นต้น แยกผลผลิตออกจากจุลินทรีย์ได้ง่าย (กนิษฐา ภูวนาถนรานุบาล, 2542; ชมจิต ท้าวธงไชย, 2544; May *et al*., 1931; Katagiri and Kitahara, 1933; Basappa *et al*., 1970; Ogawa et al., 1995)

1.3 **การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว** (Submerged culture)

เป็นการเพาะเลี้ยงที่ให้จุลินทรีย์เติบโตอยู่ภายในอาหารเหลวเพื่อให้จุลินทรีย์ผลิตสารที่ต้องการ โดยเพาะเลี้ยงในขวดปากแคบที่มีการให้อากาศด้วยการเขย่า ซึ่งเรียกว่า Shaking flask culture technique ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นก่อนที่จะขยายไปจนถึงการใช้ถังหมักขนาดใหญ่ที่สามารถควบคุมการให้อากาศและการกวนต่อไป ทั้งยังเป็นการทำให้จุลินทรีย์ได้สัมผัสกับอาหารอยู่ตลอดเวลา ทำให้ได้ผลผลิตสูง โดยวิธีการนี้จะแก้ไขข้อจำกัดต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงวิธีอื่นๆ ข้างต้นได้ แต่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการเขย่า หรือการให้อากาศและการกวน ตลอดจนเครื่องมือและเทคโนโลยีที่สูงขึ้น (รพี โรจนอุไร, 2539; อุษา สรรค์วัฒนา, 2543; Bajpai *et al*., 1982; Kwak and Rhee, 1992a; Kwak and Rhee, 1992b; Ariff *et al*., 1996; Rosfarizan *et al*., 1998a; Rosfarizan *et al*., 1998b)

2. **ชนิดของจุลินทรีย์**

การผลิตกรดโคจิกด้วยจุลินทรีย์นั้น มีจุลินทรีย์ให้เลือกใช้ได้หลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะราในตระกูล *Aspergillus* ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิก

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus candidus	Yabuta, 1913; Tamiya and Hida, 1930
A. effusus	Birkinshaw *et al*., 1931; Jennings and William, 1945

ตารางที่ 3 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิก (ต่อ)

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
A. flavus	Corbellini and Gregorini, 1930; Tamiya and Hida, 1930; May *et al*., 1931; Di-Cupta, 1933; Barham and Smits, 1936; Arnstein and Bentley, 1953; Basappa *et al*., 1970; Ariff *et al*., 1996; Rosfarizan *et al*., 1998a; Rosfarizan *et al*., 1998b
A. glaucus	Traetta-Mosca, 1914; Traetta-Mosca and Preti, 1921
A. gymnosardae	Tamiya and Hida, 1930
A. luteo-virescens	Morton *et al*., 1945
A. nidulans	Yabuta, 1913; Foster and Karow, 1945
A. oryzae	Saito, 1907; Yabuta, 1913; Yabuta, 1923; Kinoshita, 1928; Tamiya, 1928; Challenger *et al*., 1929; Katagiri and Kitahara, 1930; Tamiya and Hida, 1930; Challenger *et al*., 1931; Tamiya, 1932; Katagiri and Kitahara, 1933; Arnstein and Bentley, 1953; Ohara, 1954; Kitada *et al*., 1967; Gupta *et al*., 1971; Kwak and Rhee, 1992a; Kwak and Rhee, 1992b; Ogawa *et al*., 1995
A. parasiticus	Birkinshaw *et al*., 1931
A. tamarii	Birkinshaw *et al*., 1931; Lee *et al*., 1950; Ohara, 1954
Penicillium daleae	Birkinshaw *et al*., 1931
กลุ่ม acetic acid bacilli	Takahashi and Asai, 1933
Gluconoacetobacter opacus var. *mobilis*	Sakagushi *et al*., 1948
G. roseus	Ikeda, 1954

ในระดับอุตสาหกรรมนั้น จะทำการผลิตกรดโคจิกโดยการหมักด้วยเชื้อราซึ่งจำเป็นต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ให้มีสมบัติเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิต เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสารประกอบอื่นๆ ที่แตกต่างกัน มีสมบัติ ทนต่อสภาวะการผลิต หรือความต้องการปัจจัยในการเติบโตและในการผลิตที่ต่างกันอีกด้วย โดยต้องมีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกสูง ให้ผลผลิตสม่ำเสมอ ไม่กลายพันธุ์ง่าย เจริญเติบโตและให้ผลผลิตเร็ว ทนสภาพการเลี้ยงได้กว้าง และไม่ผลิตสารพิษออกมาด้วย ซึ่งราที่นิยมใช้ ได้แก่ *Aspergillus oryzae* (Kwak and Rhee, 1992b; Ogawa, 1995)

3. แหล่งคาร์บอน

การเริ่มต้นศึกษาถึงการผลิตกรดโคจิกนั้น แหล่งของคาร์บอนที่ใช้ศึกษาในขณะนั้นเป็นข้าวและธัญญพืชอื่นๆ แต่ในการศึกษาทำได้ค่อนลำบาก เนื่องจากมีปัญหาในการแยกสกัดกรดโคจิกบริสุทธิ์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (Saito, 1907; Yabuta, 1913) ต่อมาเมื่อพบว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตได้หลากหลายชนิด โดยเฉพาะการผลิตกรดโคจิกจากสารประกอบที่ประกอบด้วยคาร์บอน 2-7 อะตอมต่อโมเลกุล (Beelik, 1956) ตัวอย่างแหล่งคาร์บอนที่ใช้ผลิตกรดโคจิก แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตัวอย่างแหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้ผลิตกรดโคจิก

แหล่งคาร์บอน	สูตรเคมี	เอกสารอ้างอิง
เอทธานอล	C_2H_5OH	Sakagushi *et al.*, 1948; Ohara, 1954; Basappa *et al.*, 1970
ไดไฮดรอกซีอะซีโตน	$C_3H_6O_3$	Challenger *et al.*, 1931; Katagiri and Kitahara, 1933; Arnstein and Bentley, 1953
กลีเซอรอล	$C_3H_8O_3$	Katagiri and Kitahara, 1930; Challenger *et al.*, 1931; Tamiya, 1932; Sakagushi *et al.*, 1948
น้ำตาลอะราบิโนส	$C_5H_{10}O_5$	Challenger *et al.*, 1929; Corbellini and Gregorini, 1930; Katagiri and Kitahara, 1930; Tamiya, 1932; Ohara, 1954
น้ำตาลไซโลส	$C_5H_{10}O_5$	Challenger *et al.*, 1929; Corbellini and Gregorini, 1930; Katagiri and Kitahara, 1930; Tamiya, 1932; Barham and Smits, 1936; Ohara, 1954; Basappa *et al.*, 1970
น้ำตาลฟรักโทส	$C_6H_{12}O_6$	Traetta-Mosca, 1914; Tamiya, 1928; Corbellini and Gregorini, 1930; Katagiri and Kitahara, 1930; Birkinshaw *et al.*, 1931; Tamiya, 1932; Takahashi and Asai, 1933; Sakagushi *et al.*, 1948; Ikeda, 1954; Ohara, 1954

ตารางที่ 4 ตัวอย่างแหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้ผลิตกรดโคจิก (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	สูตรเคมี	เอกสารอ้างอิง
น้ำตาลกาแลคโทส	$C_6H_{12}O_6$	Katagiri and Kitahara, 1930; Tamiya, 1932; Sakagushi *et al*., 1948;Ohara, 1954
น้ำตาลกลูโคส	$C_6H_{12}O_6$	กนิษฐา ภูวนาถนรานุบาล, 2542; ชมจิต ท้าวธงไชย, 2544; Traetta-Mosca, 1914; Yabuta, 1923; Challenger *et al*., 1929; Corbellini and Gregorini, 1930; Katagiri and Kitahara, 1930; May *et al*., 1931; Tamiya, 1932; Katagiri and Kitahara, 1933; Sakagushi *et al*., 1948; Arnstein and Bentley, 1953; Ohara, 1954; Basappa *et al*., 1970
กรดกลูโคนิค	$C_6H_{12}O_7$	Katagiri and Kitahara, 1930
แมนนิทอล	$C_6H_{14}O_6$	Kinoshita, 1928; Tamiya, 1932; Takahashi and Asai, 1933; Ohara, 1954
น้ำตาลแลคโทส (กลูโคส + กาแลคโทส)	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Birkinshaw *et al*., 1931; Ohara, 1954
น้ำตาลมอลโทส (กลูโคส + กลูโคส)	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Katagiri and Kitahara, 1930; Jennings and Williams, 1945; Ohara, 1954
น้ำตาลซูโครส (กลูโคส + ฟรักโทส)	$C_{12}H_{22}O_{11}$	รพี โรจนอุไร, 2539; อุษา สรรค์วัฒนา, 2543; Traetta-Mosca, 1914; Kinoshita, 1928; Corbellini and Gregorini, 1930; Katagiri and Kitahara, 1930; Di-Capua, 1933; Ohara, 1954
แป้งมันฝรั่ง (Potato starch)	$(C_6H_{11}O_5)_n$	Rosfarizan *et al*., 1998b
แป้งข้าวโพด (Corn starch)	$(C_6H_{11}O_5)_n$	Rosfarizan *et al*., 1998b
แป้งสาคู (Sago starch)	$(C_6H_{11}O_5)_n$	Rosfarizan *et al*., 1998a; Rosfarizan *et al*., 1998b

แหล่งคาร์บอนเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดปัจจัยหนึ่งต่อการผลิตกรดโคจิกโดยจุลินทรีย์ เพราะในโมเลกุลของกรดโคจิก ประกอบด้วยธาตุคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ดังนั้นวัตถุดิบในการผลิตก็คือแหล่งคาร์โบไฮเดรตนั่นเอง และเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย จึงทำให้ความเข้มข้นที่จะใช้ก็หลากหลายไปด้วย จึงควรคำนึงถึงชนิดและปริมาณเป็นสำคัญ โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตต้องมีราคาถูก หาง่าย ให้ผลผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดในเวลาสั้น ซึ่งได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส (Bajpai *et al*., 1982; Ogawa *et al*., 1995) ส่วนปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนโดยทั่วไปจะใช้ประมาณ 5-30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* มีค่าประมาณ 100 กรัมต่อลิตร หรือ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Kwak and Rhee, 1992b; Ogawa *et al*., 1995) ส่วนความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus flavus* จะมีค่า 200 กรัมต่อลิตร หรือ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (May *et al*., 1931) สำหรับแหล่งคาร์บอนอื่นๆ ตัวอย่างเช่น ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส และกลีเซอรอลที่เหมาะสมคือ 150 กรัมต่อลิตร หรือ15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Barham and Smits, 1936) และ 50 กรัมต่อลิตร หรือ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (Katagiri and Kitahara, 1930) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยที่ระบุถึงการใช้แป้งชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus flavus* ได้แก่ แป้งมัน ฝรั่ง แป้งข้าวโพด และแป้งสาคูที่ความเข้มข้น 50 75 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Rosfarizan *et al*., 1998b) แต่อย่างไรก็ตามจนถึงขณะนี้ยังไม่มีรายงานการศึกษาโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิกตีพิมพ์ออกมาเลย

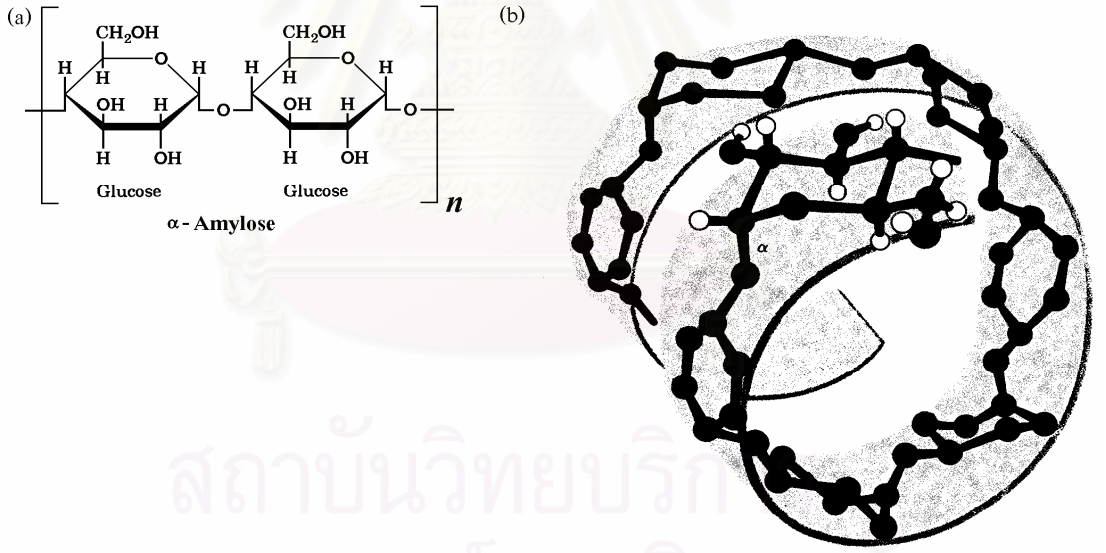
แป้งมันสำปะหลัง : แหล่งคาร์บอนที่น่าสนใจ

เมื่อพิจารณาถึงวัตถุดิบที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิกในประเทศไทย พบว่า วัตถุดิบซึ่งมีราคาถูก หาได้ง่าย มีเพียงพอต่อความต้องการในการใช้ และมีการประกันราคาจากภาครัฐ นอกจากน้ำตาลทรายแล้ว แป้งมันสำปะหลังก็เป็นแหล่งคาร์บอนที่น่าสนใจศึกษาได้อีกชนิดหนึ่งเช่นกัน

มันสำปะหลัง เป็นพืชเขตร้อน สามารถทนความแห้งแล้งได้ดี ปลูกได้ในดินที่ด้อยคุณภาพ สำหรับประเทศไทย มันสำปะหลังจัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่ง ปลูกมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ผลผลิตของมันสำปะหลังส่วนมากจะนำมาใช้เป็นอาหารของมนุษย์และสัตว์ และใช้ในอุตสาหกรรมบางประเภทเช่น กาว, วุ้นเส้น, แป้งมัน, กระดาษ เป็นต้น บางส่วนส่งขายไปยังต่างประเทศในรูปของมันเส้น, แป้งมัน, มันอัดเม็ด แต่กระนั้นก็ตามยังปรากฏว่ามี

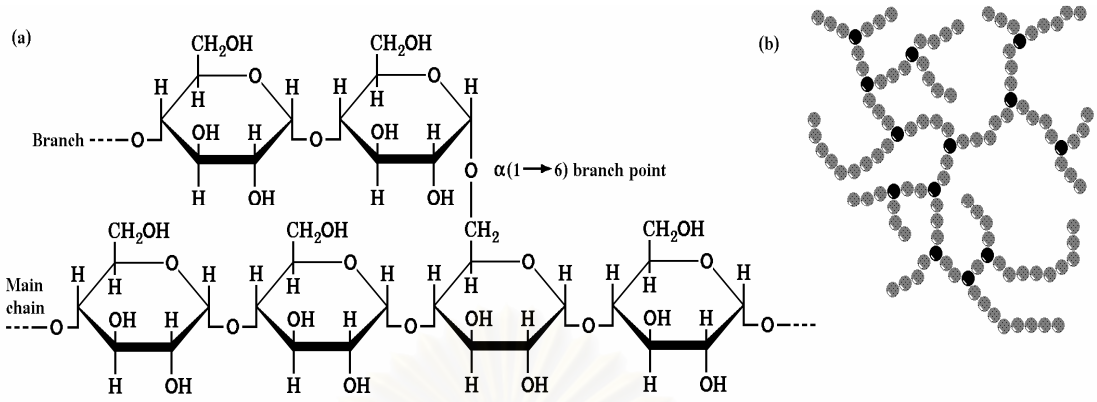
เหลืออยู่ในประเทศปีละมากๆ (วาสนา แสงพิทักษ์, 2528) ดังนั้นจึงควรหาวิธีการแปรรูปไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นที่มีราคาสูงขึ้น โดยใช้เทคโนโลยีที่ไม่สูง และมีราคาไม่แพงจนเกินไป

แป้ง จัดเป็นโพลีแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งที่สะสมอยู่ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เมล็ด, ราก, หัว, ลำต้น เป็นต้น ในโมเลกุลของแป้งประกอบด้วยอะมายโลส และอะมายโลเพคติน ในปริมาณที่แตกต่างกันไปตามแหล่งที่มาของแป้งนั้น ซึ่งองค์ประกอบทั้งสองส่วนจะมีโครงสร้าง และคุณสมบัติทางฟิสิกส์ เช่น การละลายน้ำ, ขนาดโมเลกุล, การย่อยด้วยเอนไซม์ และการเกิดสีกับสารละลายไอโอดีน ที่แตกต่างกัน โดยส่วนของอะมายโลส มีโมเลกุลเป็นเส้นตรงประกอบด้วย ดี-กลูโคสประมาณ 500 โมเลกุลขึ้นไป เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา (1-4) กลูโคซิดิค ดังแสดงในรูปที่ 6 ส่วนอะมายโลเพคติน จะประกอบด้วย ดี-กลูโคสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา (1-4) กลูโคซิดิค และมีแขนงที่ประกอบด้วย ดี-กลูโคสประมาณ 20-25 โมเลกุลมาต่อกันด้วยพันธะแอลฟา (1-6) กลูโคซิดิค ดังแสดงในรูปที่ 7 นอกจากนี้อาจยังมีสารอื่นๆ ที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรตปะปนมาเล็กน้อยจากพืชที่ใช้ในการผลิต หรือกระบวนการผลิต เช่น กรดไขมัน, ไขมัน, สารอนินทรีย์พวกฟอสฟอรัส เป็นต้น (Voet and Voet, 1995)



รูปที่ 6 โครงสร้างของอะมายโลส (Voet and Voet, 1995)
(a) ส่วนของดีกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา (1-4)
(b) สายของพอลิเมอร์ที่จัดตัวเป็นเกลียวที่วนซ้าย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 โครงสร้างของอะมายโลเพคติน (Voet and Voet, 1995)
(a) โครงสร้างหลักของอะมายโลเพคตินที่มีจุดแตกกิ่งเป็นพันธะแอลฟา (1-6)
(b) รูปแบบโครงสร้างที่มีการแตกกิ่งของกลูโคส

จากข้อมูลและภาพดังกล่าวข้างต้นระบุว่าในแป้ง 1 โมเลกุลประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสจำนวนมาก ดังนั้นก่อนที่จะมีการผลิตกรดโคจิกจากแป้ง จะต้องมีการย่อยแป้งเพื่อเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลกลูโคสเสียก่อน ซึ่งอาจทำได้หลายวิธี เช่น ใช้วิธีย่อยด้วยกรด เช่น กรดเกลือ (HCl), กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) เป็นต้น แต่วิธีนี้ปฏิกิริยาการย่อยค่อนข้างรุนแรง หรือใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการย่อยแป้ง เนื่องจากให้ปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรง มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูง และทำได้ง่าย สำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ (Forgarty and Kelly, 1979)

1. เดกซ์ทริไนซิง หรือ ลิควิไฟอิง เอนไซม์ จัดเป็นเอนโดอะมายเลส ที่ย่อยพันธะแอลฟา (1-4) กลูโคซิดิคแบบสุ่ม ทำให้ความหนืดของแป้งลดลงอย่างรวดเร็ว ได้ผลผลิตเป็น แอลฟา-ดีกลูโคส, มอลโตส และแอลฟาลิมิตเดกซ์ตรินที่มีความยาวต่างๆ กัน เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ แอลฟาอะมายเลส

2. แซคคาริไฟอิง เอนไซม์ จัดเป็นเอกโซอะมายเลส ที่ย่อยแป้งจากปลายที่ไม่มีสมบัติในการ รีดิวส์ ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 2 พวก คือ

2.1 กลูโคอะมายเลส ซึ่งย่อยได้ทั้งพันธะแอลฟา (1-4) กลูโคซิดิค และแอลฟา (1-6) กลูโคซิดิคของแป้ง ได้เป็นแอลฟา-ดีกลูโคส

2.2 เบตาอะมายเลส ซึ่งย่อยพันธะเบตา (1-4) กลูโคซิดิค ได้เป็นเบตามอลโตส และเบตาลิมิตเดกซ์ตรินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

แหล่งของเอนไซม์นั้นได้มาจากแหล่งต่างๆ คือ สัตว์, พืช และจุลินทรีย์ กล่าวคือ เบตาอะมายเลส ส่วนมากพบในเมล็ดธัญญพืชเช่น บาเลย์, ข้าวสาลี และไรย์ พืชอื่นๆ เช่น ถั่วเหลือง, มันเทศ เป็นต้น และยังพบในจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Baciilus polymyxa* อีกด้วย สำหรับแอลฟาอะมายเลส จะพบในมอลท์ น้ำลายของคนและสัตว์ รวมทั้งจุลินทรีย์พวก *Aspergillus* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizopus* sp., และ *Endomycopsis* sp. เป็นต้น ส่วนกลูโคอะมายเลส ผลิตได้จากราหลายชนิด เช่น *Aspergillus oryzae*, *A. niger*, *A. awamori*, *Rhizopus* sp. (Windish and Mhatre, 1965)

4. แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการควบคุมการเจริญเติบโต และสร้างผลิตภัณฑ์ของรา ซึ่งราโดยทั่วไปสามารถใช้สารประกอบได้ทั้งที่เป็นสารประกอบอินทรีย์-ไนโตรเจน และสารประกอบอนินทรีย์-ไนโตรเจน แหล่งไนโตรเจนที่สามารถใช้ในการผลิตกรดโคจิกมีด้วยกันหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ตัวอย่างแหล่งไนโตรเจนที่สามารถใช้ผลิตกรดโคจิก

แหล่งไนโตรเจน	เอกสารอ้างอิง
สารประกอบอินทรีย์-ไนโตรเจน	
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	รพี โรจนอุไร, 2539; Arnstein and Bentley, 1953; Ohara, 1954; Bajpai *et al.*, 1982; Kwak and Rhee, 1992a; Ogawa *et al.*, 1995
เปปโตน (peptone)	Bajpai *et al.*, 1982
สารประกอบอนินทรีย์-ไนโตรเจน	
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	รพี โรจนอุไร, 2539; Katagiri and Kitahara, 1930; May *et al.*, 1931; Kwak and Rhee, 1992a
แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3)	กนิษฐา ภูวนาถนรานุบาล, 2542; Kinoshita, 1928; Challenger *et al.*, 1929; May *et al.*, 1931
โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)	May *et al.*, 1931; Arnstein and Bentley, 1953
แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$)	May *et al.*, 1931

สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมไนเตรต และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งของไนโตรเจนที่นิยมใช้ในการผลิตกรดโคจิก เพราะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูง แต่ต้องคำนึงถึงปริมาณที่จะใช้ในการผลิตด้วยโดยในอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีแหล่งไนโตรเจนแค่เพียงพอต่อการเติบโตแต่ต้องไม่มากเกินไป เนื่องจากปริมาณไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตกรดโคจิก ซึ่งถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณไนโตรเจนมาก จะทำให้ราเจริญเติบโตมากจนมีผลทำให้ราผลิตกรดโคจิกลดลง (May *et al*., 1931; Kwak and Rhee, 1992a; Ogawa *et al*., 1995) โดยปกติแล้วปริมาณไนโตรเจนที่ใช้มีค่าประมาณ 0.5-2.0 กรัมต่อลิตร ตัวอย่างเช่น การผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน จะใช้สารสกัดของยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตรร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 0.75 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต (Kwak and Rhee, 1992b)

5. แร่ธาตุและสารพิเศษบางอย่าง

ชนิดและปริมาณของแร่ธาตุเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิก สำหรับแร่ธาตุที่ต้องคำนึงนั้นมีรายงานว่าฟอสเฟตในรูปโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) เป็นตัวที่ส่งเสริมทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคจิก โดยปริมาณที่เหมาะสมคือในช่วง 1.0 - 4.0 กรัมต่อลิตร เนื่องจากถ้ามีระดับฟอสเฟตสูงจะมีการสังเคราะห์และย่อยสลายกรดโคจิกอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ระดับฟอสเฟตต่ำทั้งการผลิตและการย่อยสลายกรดโคจิกก็จะช้าด้วย (อ้างถึงใน Bajpai *et al*., 1982) นอกจากนี้ Kitada (1967) พบว่าโซเดียมฟลูออไรด์ (NaF), โพแทสเซียมไซยาไนด์ (KCN) และโซเดียมซัลไฟด์ (Na_2S) แค่เพียงเล็กน้อยนั้นเป็นสารยับยั้งการผลิตกรดโคจิกโดยจะไปยับยั้งขบวนการนำกลูโคสไปใช้ของเซลล์ และมีการพบว่า เกลือของกรดอิสระ เช่น เกลือซิเตรต เกลือไพรูเวต เกลือซัคซิเนต และเกลือออกซาเลต จะเร่งการเจริญเติบโตของราทำให้มีผลผลิตกรดโคจิกสูง (Tamiya, 1928) นอกจากนี้ โซเดียมแลคเตต และโซเดียม อาซิเนต จะยับยั้งการผลิตกรดโคจิกของรา *Aspergillus oryzae* เนื่องจากไปยับยั้งกระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorelation) ของเซลล์ (Sakagushi *et al*., 1948)

6. ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกนั้น ต้องทำการทดลองจึงจะทราบว่าสายพันธุ์ใดต้องการเท่าใด ซึ่งปกติความเป็นกรดด่างนั้นมีค่าอยู่ในช่วงประมาณ 2-5 โดย Katagiri และ Kitahara (1933) รายงานว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *Aspergillus oryzae* คือ 5.0 แต่ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 2.4 และยังมีรายงานอีกว่าค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5 เป็นค่าที่เหมาะสมต่อการหมัก

ราด้วยน้ำตาลซูโครส (Tamiya, 1928) ส่วน Barham และ Smits (1936) พบว่า ช่วงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลไซโลสด้วยรา *Aspergillus flavus* คือ 2.0-3.5 ซึ่งจะเห็นว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดยราจะมีค่าต่ำ ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเติมสารบัฟเฟอร์ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง

7. อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกด้วยรา *Aspergillus flavus* อยู่ในช่วงประมาณ 29-35 องศาเซลเซียส (May *et al*., 1931) ส่วนอุณหภูมิในช่วง 29-31 องศาเซลเซียสจะเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* (Katagiri and Kitahara, 1933) ซึ่งจากรายงานการทดลองหลายการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 30 องศาเซลเซียส (รพี โรจนอุไร, 2539; May *et al*., 1931; Bajpai *et al*., 1982; Kwak and Rhee, 1992a; Ogawa *et al*., 1995)

8. ปริมาณออกซิเจน

ความต้องการออกซิเจนในกระบวนการผลิตก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญซึ่งจำเป็นต้องพิจารณา เนื่องจากการผลิตกรดโคจิกโดยราเป็นกระบวนการหมักแบบใช้อากาศ โดยในปีค.ศ. 1931 May และคณะ ทดลองผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่า และแปรผันอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในช่วง 0.22:1 ถึง 1:1 พบว่าค่าอัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 0.5:1 ต่อมา Kwak และ Rhee (1992a) ทดลองผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่า พบว่าถ้าใช้ขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร ควรใส่ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 120 มิลลิลิตร และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จะมีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก นอกจากนี้ Ariff และคณะ (1996) ทดลองผลิตกรดโคจิกจากรา *Aspergillus flavus* ในอาหารที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อนาที จะมีความเหมาะสมในการผลิต

การเก็บเกี่ยวผลผลิตกรดโคจิก

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักราเพื่อการผลิตกรดโคจิกแล้ว ก็จะทำการแยกกรดโคจิกที่อยู่ในน้ำหมัก ซึ่งอาจอยู่ในรูปสารละลาย และผลึกของกรดที่ปนอยู่ โดยนำน้ำหมักมาทำการกรองแยกสายใยออก จากนั้นจึงนำส่วนน้ำหมักที่ผ่านการกรองไปแยกเพื่อให้ได้กรดโคจิก ซึ่งทำได้หลายวิธีดังนี้ (Yabuta, 1913; Beelik, 1956; Bajpai *et al*., 1982)

1. ตกตะกอนในรูปเกลือทองแดง
2. สกัดด้วยเอทธิลอะซีเตต
3. สกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้อีเธอร์
4. ตกผลึกโดยลดปริมาตรน้ำหมัก
5. ตกผลึกที่อุณหภูมิเยือกแข็งของน้ำ (0 องศาเซลเซียส)
6. ใช้ผงถ่านดูดซับแล้วชะด้วยบิวทิลอะซีเตตที่อิ่มตัวด้วยแอมโมเนียแห้ง

พัฒนาการของงานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตกรดโคจิก

จากการค้นพบกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งบนข้าวนึ่งของ Saito ในปีค.ศ. 1907 หลังจากนั้นเป็นต้นมาจึงมีการศึกษาพัฒนาการผลิตกรดโคจิกกันอย่างต่อเนื่อง ดังจะนำเสนอต่อไปนี้

Tamiya (1928) เพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการผลิตกรดโคจิกจะสูงสุดเมื่อใช้ความเป็นกรดด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 โดยที่กรดอิสระจะยับยั้งการเติบโตของเชื้อ แต่เกลือของกรดจะเร่งการเติบโตได้ และถ้าเติมกรดออกซาลิก กรดไฮโดรคลอริก กรดซิตริก กรดฟอร์มิก หรือกรดไนตริกลงไป พบว่าการผลิตกรดโคจิกจะลดลงมาก แต่เมื่อเติมกรดฟอสฟอริก กรดแลคติก หรือกรดไพรูวิกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้การผลิตกรดโคจิกสูงขึ้น

Challenger และคณะ (1929) ศึกษาถึงการผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลเพนโตสด้วย *Aspergillus oryzae* ซึ่งน้ำตาลที่ใช้ได้แก่ น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลอะราบิโนสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 กรัม และแอมโมเนียมไนเตรต 0.04 กรัมเป็นแหล่งไนโตรเจน ในน้ำ 100 มิลลิลิตร ผลการทดลองสรุปได้ว่าแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดคือ เมื่อใช้น้ำตาลไซโลส 5.0 กรัม

May และคณะ (1931) ศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่าโดยรา *Aspergillus flavus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายด์ซาเพกซ์ดอกซ์ ที่มีกลูโคสอยู่ 200 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วแปรผันปริมาณไนโตรเจน พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือแอมโมเนียมไนเตรตที่ความเข้มข้น 2.25 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส ใช้เวลาผลิต 12-17 วัน ให้ผลผลิตกรดประมาณ 170 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Katagiri และ Kitahara (1933) ทดลองผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* โดยทำการหมักแบบเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารเหลว พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 2.1 และที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 จะไม่มีการผลิตกรดโคจิก

Takahashi และ Asai (1933) ทดลองผลิตกรดโคจิกจากจุลินทรีย์กลุ่มอะซีติกแอซิดแบคทีเรียในระดับขวดเขย่า โดยใช้แมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าต้องเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อรักษาระดับความเป็นกรดด่างให้คงที่อยู่ในช่วง 6.95 - 7.54 ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยแบคทีเรียกลุ่มนี้

Sakagushi และคณะ (1948) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรักโทส กาแลคโทส และกลีเซอรอล พบว่า ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิกมีโมโนไอโอโดอะซีเตต โซเดียมอาซีเนต โซเดียมอาซีไนต์ หรือ โซเดียมฟลูออไรด์ จะทำให้ผลผลิตกรดโคจิกลดลง เนื่องจากสารเหล่านี้จะไปยับยั้งขบวนการ ฟอสโฟรีเลชันของเซลล์

Kitada และคณะ (1967) ศึกษาผลกระทบของสารต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* เมื่อใช้กลูโคส 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่า โซเดียมฟลูออไรด์ โมโนไอโอโด อะซีติก โซเดียมอาซีเนต มาโลเนต โปแตสเซียมไซยาไนด์ โซเดียมเอไซด์ ไดไนโตรฟีนอล เพนตะ คลอโรฟีนอล ความเข้มข้น 0.0005, 0.0005, 0.001, 0.001, 0.01, 0.01, 0.001 และ 0.001 โมลาร์ ตามลำดับ จะยับยั้งการนำกลูโคสไปใช้ ทำให้การผลิตกรดโคจิกถูกยับยั้ง

Basappa และคณะ (1970) ผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus flavus* ในอาหารซาเพกดอกซ์เคซีนไทอามีนที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการหมักบนผิวหน้าอาหารเหลว พบว่าการผลิตกรดโคจิกจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหาร และอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวเหนืออาหารต่อปริมาตรของอาหาร โดยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6 - 7 และอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวเหนืออาหารต่อปริมาตรอาหารเท่ากับ 4:1 จะเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตกรดโคจิก ซึ่งจะให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 0.17 กรัมต่อลิตรในวันที่ 5 ของการผลิต

Bajpai และคณะ (1982) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยของรา *Aspergillus oryzae* มาผลิตซ้ำๆ ทำโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารยีสต์เอกแทรกซ์ซูโครส ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.0 และทำการผลิตบนผิวหน้าอาหารในขวดขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร แล้วแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน 2 ชนิดคือ กลูโคส และซูโครส ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน พบว่าน้ำตาลทั้งสองชนิด ให้ผลผลิตกรดโคจิกใกล้เคียงกันคือ ประมาณ 81.5 กรัมต่อลิตรในซ้ำแรก และพบว่าหลังจากถ่ายสายใยไปเลี้ยงในอาหารใหม่ พบว่าผลผลิตยังคงสูงเท่าเดิมคือ ประมาณ 80 กรัมต่อลิตรในซ้ำที่สอง

Kwak และ Rhee (1992a) ผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่าโดยรา *Aspergillus oryzae* ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน มีสารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกัน ใช้หัวเชื้อตั้งต้น $5x10^4$ สปอร์ต่อสารละลายอัลจิเนตปริมาตร 1 มิลลิลิตร และใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาตรเซลล์ตรึงต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1:3 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยแปรผันขนาดของเม็ดเจลให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 1.0-3.0 มิลลิเมตร และแปรผันปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเป็น 5 ค่าคือ 0.138 0.183 0.275 0.367 และ 0.57 กรัมต่อลิตร พบว่าขนาดของเม็ดเจล และความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ 1.25 มิลลิเมตร และ 0.275 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 22 กรัมต่อลิตรในวันที่ 8 ของการหมัก และมีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 2.91

Kwak และ Rhee (1992b) ทำการทดลองผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่าโดยรา *Aspergillus oryzae* ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต ใช้อาหารที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน มีสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.75 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเป็น 6.0 ด้วย 3 N NaOH เลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหาร 120 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรหัวเชื้อสปอร์ตรึงต่ออาหารเพื่อผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 1:3 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ใช้เวลาเพาะเลี้ยงประมาณ 23 วัน จะได้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 83 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นจะนำเซลล์ตรึงไปถ่ายใส่อาหารในขวดทดลองใหม่ พบว่าใน 2 กะแรกเชื้อจะผลิตกรดโคจิกได้สูงคือ ประมาณ 80 กรัมต่อลิตร และลดลงหลังจากวันที่ 12 ในกะที่ 3 โดยมีผลผลิตกรด 70 กรัมต่อลิตร เนื่องจากมีการสลายตัวของโครงสร้างเจลบริเวณศูนย์กลางของเม็ดเจลซึ่งล้อมสายใยราไว้ ทำให้ไม่สามารถตรึงเซลล์ของราไว้ได้

Ogawa และ คณะ (1995) ทดลองผลิตกรดโคจิกจาก *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยการเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารเหลว โดยมีพอลิซัลโฟน เอสอี 20 ซึ่งมีลักษณะเป็นเยื่อบางๆ ไว้ใช้เป็นพาหะสำหรับยึดเหนี่ยว เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในอาหารเหลว โดยใช้น้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าวิธีเลี้ยงบนผิวหน้าเยื่อยึดเหนี่ยวจะให้ผลผลิตกรดสูงกว่าเป็นสองเท่าของการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว โดยให้ผลผลิตกรด 20 กรัมต่อลิตรในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อทดลองเปลี่ยนวิธีการผลิตจากแบบกะมาเป็นแบบที่มีการเติมสารอาหารลงไปเป็นระยะในระหว่างการผลิต พบว่าจะให้ผลผลิตสูงขึ้นโดยเมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตของทั้ง 3 วิธี คือ การผลิตในอาหารเหลว การผลิตบนผิวหน้าเยื่อยึดเหนี่ยวแบบกะ และการผลิตบนผิวหน้าเยื่อยึดเหนี่ยวแบบที่มีการเติมสารอาหารลงไปเป็นระยะใน

ระหว่างการผลิต ให้ผลผลิตเป็น 1.6 2.9 และ14.2 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ และพบอีกว่าปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกทั้ง 3 วิธีมีค่าเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร

Ariff และคณะ (1996) ทำการทดลองเลี้ยงหัวเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงของ *Aspergillus flavus* Link 44-1 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอัตราการกวน 600 รอบต่อนาทีคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง โดยเปรียบเทียบการทดลองที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลาย (Dissolve oxygen tension, DOT) ที่เปอร์เซ็นต์การอิ่มตัว 30 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ กับการทดลองที่ไม่ได้ควบคุมค่าออกซิเจนละลาย แต่กำหนดให้มีการให้อากาศที่ 15 ลิตรต่อนาที พบว่าให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 5.7 10.0 14.6 และ 15.8 กรัมต่อลิตร และให้การเติบโตของสายใยเท่ากับ 19.5 15.8 13.5 และ 13.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 384 384 288 และ 432 ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองในชุดที่ไม่ได้ควบคุมค่าออกซิเจนละลายในระยะการเติบโต จะมีค่าออกซิเจนละลายลดลงต่ำมาก และจะเพิ่มขึ้นเป็น 65 เปอร์เซ็นต์ในช่วงการผลิต แสดงให้เห็นว่าการให้ออกซิเจนในระหว่างระยะการเติบโตไม่เพียงพอต่อการเติบโตของรา ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่ดีเท่าที่ควร และยังแสดงให้เห็นอีกว่าในระยะการผลิตจะใช้ปริมาณออกซิเจนไม่มาก ดังนั้นจึงควรลดปริมาณออกซิเจนเมื่อเข้าสู่ระยะการผลิต นอกจากนี้การทดลองที่มีการควบคุมค่าออกซิเจนละลาย จะให้น้ำหนักแห้งของสายใยน้อยลงเมื่อมีการใช้ค่าออกซิเจนละลายที่สูงขึ้น ในขณะที่การผลิตกรดโคจิกจะเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ระดับค่าออกซิเจนละลายสูงจะไปควบคุมการเติบโตของรา และส่งเสริมการผลิตกรดโคจิก ดังนั้นเมื่อทดลองควบคุมค่าออกซิเจนละลายที่อิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ในระยะเติบโต และใช้ค่าออกซิเจนละลาย 30 เปอร์เซ็นต์ในระยะการผลิตกรด พบว่าให้ผลผลิตกรดเพิ่มขึ้นเป็น 28.9 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 228 และเมื่อทดลองผลิตแบบการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิต โดยเติมสารสกัดจากยีสต์ พบว่าในภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนสูงจะมีการส่งเสริมให้มีการเติบโตของสายใยมากกว่าการผลิตกรด

รพี โรจนอุไร (2539) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในระดับขวดเขย่าคือ ใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมงที่ความหนาแน่น 4-8 x 10^7 สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีน้ำตาลทรายขาว 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน มีสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตรร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 0.24 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุวิตามิน โดยมีอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840:2 ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 4.5 และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุเพื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอกได้โดยผลผลิตไม่ลดลง ซึ่งให้ผลผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 40.03 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง

Rosfarizan และคณะ (1998a) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus flavus* จากแป้งสาคู ซึ่งทำการทดลองเปรียบเทียบกันใน 2 ระดับคือ ระดับขวดเขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร และระดับถังหมักขนาด 50 ลิตร โดยในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดโคจิกนั้นแบ่งเป็น 2 ขั้น คือ ขั้นแรกเป็นช่วงของการเติบโต แป้งจะถูกย่อยสลายไปเป็นน้ำตาลกลูโคสโดยการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะมายเลส และกลูโคอะมายเลส ส่วนขั้นที่สองเป็นช่วงของการผลิต ซึ่งกลูโคสจะเปลี่ยนไปเป็นกรดโคจิก จากการทดลองพบว่า เมื่อใช้แป้งสาคู 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งในระดับขวดเขย่าจะให้ผลผลิตกรดโคจิก 23.5 กรัมต่อลิตร และเมื่อเทียบกับระดับถังหมักขนาด 50 ลิตร ซึ่งใช้กลูโคส และกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้ง จะให้ผลผลิตกรดโคจิก เป็น 31.5 กรัมต่อลิตร และ 27.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าในระดับถังหมักจะให้ผลผลิตไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากยังไม่ทราบสภาวะในการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตในระดับถังหมักขนาด 50 ลิตร

Rosfarizan และคณะ (1998b) ศึกษาความสามารถในการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนของ *Aspergillus flavus* ในระดับขวดเขย่าโดยใช้แป้งสุกชนิดต่างๆคือ แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าวโพด และแป้งสาคู เปรียบเทียบการผลิตกรดกับอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่เท่ากันคือ 50 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าการใช้แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าวโพด แป้งสาคู และน้ำตาลกลูโคสให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 1.7 10.5 0.3 และ 12.1 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 12.5 13.1 12.7 และ 11.4 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 360 384 360 และ 384 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าการใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตกรดโคจิกใกล้เคียงกับน้ำตาลกลูโคสจึงน่าจะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อแทนน้ำตาลกลูโคสได้ เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก และเมื่อแปรความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดในปริมาณต่างๆ พบว่าที่ความเข้มข้น 75 กรัมต่อลิตรเหมาะสมที่สุด โดยจะให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 19.2 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 480 (วันที่ 20)

กนิษฐา ภูวนาถนรานุบาล (2542) ทำการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 ให้เติบโตบนผิวหน้าอาหารเหลว โดยใช้สูตรอาหารที่ปรับปรุงแล้วซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมไนเตรต 1.814 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร และกรดฟอสฟอริก 0.054 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งมีค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102:1.75 ให้ผลผลิตกรดโคจิก 23.26 กรัมต่อลิตรภายใน 16 วัน และเมื่อทำการผลิตภายใต้ภาวะเหมาะสมคือ อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57:1.0 ขนาดหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราการพ่นให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวมีค่าเท่ากับ 176 ลิตรต่อนาทีต่อตารางเมตร สามารถเพิ่มผลผลิตขึ้นเป็น 30.35 กรัมต่อลิตรในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง

อุษา สรรค์วัฒนา (2543) ศึกษาถึงการผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลทรายโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรภายใต้การแปรภาวะบางประการ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อและค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะสมต่อการเติบโต และการผลิตนั้นแตกต่างกัน ซึ่งในส่งเสริมการเติบโตที่ดีจะจัดค่าออกซิเจนละลาย และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว และ 5.0 ตามลำดับเป็นเวลา 54 ชั่วโมง ส่วนการผลิตกรดโคจิกจะใช้ปริมาณออกซิเจนละลายเพียง 50 เปอร์เซ็นอากาศอิ่มตัว และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.5 โดยขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมคือ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ภายใต้ภาวะดังกล่าว จะให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 20.80 กรัมต่อลิตรภายใน 17 วัน และมีอัตราการผลิตเท่ากับ 0.351 กรัมต่อลิตรต่อวัน นอกจากนี้การเติมแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นในระหว่างการผลิตและการผลิตโดยใช้สายใยซ้ำทำให้เพิ่มผลผลิตได้

ชมจิต ท้าวธงไชย (2544) ทำการผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นโดยเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 ให้เติบโตบนผิวหน้าอาหารเหลวภายใต้การแปรภาวะบางประการ พบว่า ถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 3.2 ลิตรมีความเหมาะสม ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมคือ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ผลิตกรดโคจิกได้ 30.28 กรัมต่อลิตรในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง การพ่นให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 2 เซนติเมตรในอัตราเร็ว 50 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาที สามารถเพิ่มผลผลิตขึ้นเป็น 33.27 กรัมต่อลิตรซึ่งช่วยลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงลง 4 วัน เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิตเพื่อเพิ่มผลผลิต พบว่า จากอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 2 ลิตร ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนแล้วทยอยเติมแหล่งคาร์บอนในรูปสารละลายน้ำตาลกลูโคส 4 ครั้งในระหว่างการผลิต จนมีปริมาตรรวม 3.2 ลิตร พบว่า ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงถึง 35.26 กรัมต่อลิตรในเวลาการผลิต 17 วัน นอกจากนี้การใช้สายใยซ้ำของ *A. oryzae* K-13 มาผลิตกรดโคจิกโดยอาหารเหลวที่ใช้ในซ้ำที่ 1 และ 2 เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนลดลง 10 และ 50 เปอร์เซ็นต์ จะให้ผลผลิตกรดโคจิกรวม 231.04 และ 249.34 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 9.6 ลิตร ซึ่งมีอัตราการผลิตกรดโคจิกต่อวันเท่ากับ 1.95 และ 1.95 กรัมต่อลิตรต่อวันตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์

1. เคมีภัณฑ์

แป้งมันสำปะหลัง (เกรดอุตสาหกรรม) ตราปลา 4 ดาว

บริษัท อี. ที. ซี. เอี๊ยบตงจั่น จำกัด, ประเทศไทย

น้ำตาลดี (+) กลูโคสโมโนไฮเดรต ($C_6H_{12}O_6.H_2O$)

บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)

บริษัท Difco laboratories, U.S.A.

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

กรดโคจิก ($C_6H_6O_4$)

บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

น้ำตาลกลูโคส ($C_6H_{12}O_6$)

บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

น้ำตาลมอลโตส ($C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O$)

บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

น้ำตาลมอลโตไตรโอส ($C_{18}H_{32}O_{16}$)

บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

น้ำตาลมอลโตเตตระโอส ($C_{24}H_{42}O_{21}$)

บริษัท Sigma Chemical Co., U.S.A.

น้ำตาลนีสโตส ($C_{24}H_{42}O_{21}.3H_2O$)

บริษัท Wako Pure Chemical Industries LTD, Japan.

ทวีน 80 (Tween 80)

บริษัท BHD laboratory Chemicals LTD, England.

เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$)

บริษัท BHD laboratory Chemicals Ltd, England.

กรดไฮโดรคลอริก (HCl)

บริษัท Riedel – dehaen, Germany.

กรด 3,5 - ไดไนโตรซาลิไซลิก ($C_7H_4N_2O_7$)

บริษัท Fluka Chemie, Switzerland.

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

บริษัท E. Merck Darmstadt, Germany.

โปตัสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ($C_4H_4KNaO_6.H_2O$)

บริษัท May and Baker Ltd, England.

เกล็ดไอโอดีน (I_2)

บริษัท Carlo Erba Reagenti, Spain.

โปตัสเซียมไอโอไดด์ (KI)

บริษัท Mallinekrodt Baker Inc., U.S.A.

อะซิโตไนไตรล์ (CH_3CN)

บริษัท Scharlau, Spain.

2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่สำคัญ

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36

บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environment incubator shaker) รุ่น G-10

บริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc, USA.

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000

บริษัท Eutech Cybernetics, Singapore.

เครื่องดูดสูญญากาศ (Vacuum system) รุ่น B-169

บริษัท Buchi Laboratoriums-Technik AG, Switzerland.

ตู้อบแห้ง (Hot air oven) รุ่น UL-80

บริษัท Memmert Gmbh, Germany.

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น O-207

บริษัท Memmert Gmbh, Germany.

เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G-560 E

บริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc, USA.

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Novaspec II

บริษัท Pharmacia Biotech., England.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope) รุ่น CH-B145-T

บริษัท Olympus, Japan.

อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ขนาด blight line deep 1/10 mm.

บริษัท Boeco, Germany.

ตาชั่ง (Balance) รุ่น A200S

บริษัท Sartorius analytic, Germany.

เครื่องโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) รุ่น LC-3A โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb 10NH-2 (Phenomenax)

บริษัท Shimadzu, Japan.

เครื่องวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบของสารอินทรีย์ (CHNS/O Analyser) รุ่น Perkin Elmer PE2400 Series II: Option CHN

บริษัท Perkin Elmer Corp., U.S.A.

วิธีดำเนินการทดลอง

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองคือ *Aspergillus oryzae* K-13 ที่คัดเลือกจากดินหลายแหล่งในประเทศไทย (เพชรรุ่ง พันธุ์พิริยะ, 2536)

2. การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยสปอร์ของรา *A. oryzae* K-13 ลากบนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเดกซ์โทรส (Potato dextrose agar slant, PDA) (ภาคผนวก ก1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5-7 วัน หรือเมื่อราสร้างสปอร์เต็มที่ แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมกล้าเชื้อ

3.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอย

เพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 บนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นเติมน้ำปราศจากอิออน (Deionized water) ผสมทวีน 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อขูดเบาๆให้ สปอร์หลุดออกมากระจายในน้ำ ปรับจำนวนสปอร์ราให้

เป็น 2-4 x 10^7 สปอร์ต่อปริมาตรสปอร์แขวนลอย 1 มิลลิลิตร โดยการนับจำนวนด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อต่อไป

3.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

ถ่ายสปอร์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 3.1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกล้าเชื้อสปอร์งอก (ภาคผนวก ก2) ซึ่งดัดแปลงจากรพี โรจนอุไร (2539) โดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลซูโครสไปเป็นแป้งมันสำปะหลัง ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อสปอร์งอกที่มีความหนาแน่นเป็น 4-8 x 10^5 สปอร์งอกต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร

4. การผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่า

ถ่ายกล้าเชื้อสปอร์งอกที่ได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3) ซึ่งดัดแปลงจากรพี โรจนอุไร (2539) โดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลทรายขาวไปเป็นแป้งมันสำปะหลัง ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วัน

5. การเก็บเกี่ยวกรดโคจิก

เก็บตัวอย่างทุกวันตลอดการเพาะเลี้ยง โดยนำตัวอย่างที่ได้ในแต่ละวัน มากรองแยกสายใย *A. oryzae* K-13 ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิกด้วยตะแกรงเหล็กปลอดสนิมขนาดรูพรุน 4 ช่องต่อตารางมิลลิเมตร นำส่วนน้ำที่กรองได้ไปตรวจวัดปริมาณแป้ง และค่าความเป็นกรดด่าง ส่วนที่เหลือนำไปกรองต่อด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 หลังจากนั้นนำส่วนน้ำใสที่กรองได้ไปตรวจหาปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ส่วนของสายใยที่กรองได้นำไปวัดการเติบโตของเชื้อรา ตามวิธีการในข้อ 6

6. การวัดการเติบโตของรา *Aspergillus oryzae* K-13

ล้างสายใยรา *A. oryzae* K-13 ที่กรองได้ด้วยน้ำปราศจากอิออนอย่างน้อย 3 ครั้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แล้วเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (Desicator) ชั่งน้ำหนัก แล้วนำกลับไปอบแห้งและชั่งน้ำหนักใหม่ ทำจนได้น้ำหนักแห้งคงที่ เพื่อใช้คำนวณหาน้ำหนักแห้งต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

7. **การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกโดยวิธีของ** Bentley (1957)

เจือจางน้ำหมักที่ผ่านการกรองแยกสายใย *A. oryzae* K-13 ออกแล้วในข้อ 5 จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (ภาคผนวก ข1) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำปราศจาก อิออนปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณกรดโคจิกโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค1)

8. **การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล**

8.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Bernfeld, 1955)

เจือจางน้ำหมักที่ผ่านการกรองแยกสายใย *A. oryzae* K-13 ออกแล้วในข้อ 5 จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ข2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิดปากหลอดทดลองด้วยลูกแก้วแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที หลังจากนั้นเติมน้ำปราศจากอิออนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค2)

8.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (ใช้บริการศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

นำน้ำหมักที่ผ่านการกรองแยกสายใย *A. oryzae* K-13 ออกแล้วในข้อ 5 ที่ช่วงเวลาต่างๆ มาตรวจสอบด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (HPLC) รุ่น Shimadzu LC-3A โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb 10NH-2 (Phenomenax) และใช้สารละลายอะซิโตไนไตรล์ความเข้มข้น 74 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข3) เป็นตัวพา ปรับให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจสอบโดยเครื่องตรวจวัดค่าดัชนีหักเหแสง (Refractive Index Detector, RID) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลมอลโตไตรโอส และน้ำตาลมอลโตเตตระโอส โดยใช้น้ำตาลนีสโตสเป็นสารมาตรฐานภายใน (Internal standard) (ภาคผนวก ค3-6 ตามลำดับ)

9. **การวิเคราะห์ปริมาณแป้ง** (Street and Close, 1956)

เจือจางน้ำหมักที่ผ่านการกรองแยกสายใย *A. oryzae* K-13 ออกแล้วในข้อ 5 จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสาร

ละลายไอโอดีนเจือจาง (ภาคผนวก ข4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณแป้งโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค7)

10. การทดลองเบื้องต้นในการผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลัง โดย *Aspergillus oryzae* K-13

จากเหตุผลที่ว่า การผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวด้วยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายนั้น ได้มีการศึกษามาแล้วทั้งในระดับขวดเขย่าโดย รพี โรจนอุไร (2539) และในระดับขยายส่วนโดยอุษา สรรค์วัฒนา (2543) พบว่าให้ผลผลิตกรดโคจิกดี เมื่อจัดภาวะต่างๆให้เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อดังกล่าว และจากการที่แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบซึ่งน่าสนใจเนื่องจากมีราคาถูก หาได้ง่ายภายในประเทศ และมีปริมาณอย่างเพียงพอ อีกทั้งเมื่อถูกย่อยโดยสมบูรณ์แล้วจะให้น้ำตาลกลูโคสเป็นจำนวนมาก ซึ่งจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิกจะได้นำน้ำตาลกลูโคสนั้นไปใช้ผลิตเป็นกรดโคจิก นอกจากนี้ยังมีเอกสารที่ยืนยันว่าเชื้อราในตระกูล *Aspergillus* นั้นมีความสามารถในการย่อยแป้ง (Fogarty and Kelly, 1979) ดังนั้นจากข้อมูลที่กล่าวมาทั้งหมด จึงมีแนวความคิดว่าน่าจะมีการศึกษาถึงการใช้แป้งมันสำปะหลังมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ซึ่งจะทำการศึกษาในระดับขวดเขย่าก่อน

10.1 วิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอนในแป้งมันสำปะหลัง

(ใช้บริการของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

นำตัวอย่างแป้งมันสำปะหลัง 1-3 มิลลิกรัม มาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอนในแป้งมันสำปะหลังด้วยเครื่องวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบของสารอินทรีย์ (CHNS/O Analyser) รุ่น Perkin Elmer PE2400 Series II: Option CHN โดยการทำงานของเครื่องอาศัยหลักการสำคัญ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นที่หนึ่งการเผาไหม้ (Combustion) หรือการทำให้สารแตกสลายตัวด้วยความร้อน (Pyrolysis) ในสภาวะปิดของบรรยากาศออกซิเจนบริสุทธิ์ที่มีสถานะคงที่ เรียกเทคนิคนี้ว่า Static-state oxidation เพื่อให้สารอยู่ในสภาพแก๊สทั้งหมด ก่อนเข้าสู่ขั้นที่สองซึ่งเป็นการแยกสารด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟีโดยผ่านคอลัมน์ Porapak PQS ที่อุณหภูมิการทำงาน 82.2 องศาเซลเซียส แล้วตรวจวัดปริมาณด้วยเครื่องวัดการนำความร้อน (Thermal conductivity detector, TCD) เพื่อใช้เป็นข้อมูลปริมาณคาร์บอนในแป้งมันสำปะหลังต่อไป

10.2 การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิก

เป็นการทดลองผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงจากรพี โรจนอุไร (2539) โดยเปลี่ยนเฉพาะแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลทรายเป็นแป้งมันสำปะหลัง (ภาคผนวก ก3) แล้วแปรปริมาณของแป้งมันสำปะหลังคือเท่ากับ 50 100 และ 150 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.5 และใช้ภาวะในการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ที่ได้มีการศึกษามาแล้วโดย รพี โรจนอุไร (2539) ตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 4 เพื่อศึกษาการย่อยแป้ง และการผลิตกรดโคจิก

11. การหาปริมาณของแหล่งวิตามินและปัจจัยส่งเสริมการเติบโตที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิก

จากการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอนในแป้งมันสำปะหลังตามวิธีดำเนินงานในข้อ 10.1 ด้วยเครื่องวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบของสารอินทรีย์โดยใช้บริการจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รายงานผลว่า ในแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัม มีคาร์บอนเท่ากับ 38.5 กรัม นอกจากนี้ยังมีไนโตรเจนอยู่ 0.1 กรัมอีกด้วย (ภาคผนวก ง1) และจากผลการทดลองในข้อ 10.2 ซึ่งเป็นการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิกที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ให้ผลดีกว่ากลุ่มทดลองอื่น แต่ก็พบว่าให้การเติบโตของสายใยที่สูง และได้ผลผลิตต่ำ โดยสาเหตุของปัญหานี้อาจเป็นผลมาจากการมีปริมาณแหล่งของวิตามินและปัจจัยส่งเสริมการเติบโต หรือมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไปจนไม่สมดุลกับแหล่งคาร์บอนและการผลิต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าโดยกล้าเชื้อของรา *A. oryzae* K-13 ที่เตรียมจากข้อ 3.2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ได้จากการทดลองในข้อ 10.2 คือ 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยไม่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งเป็นแหล่งวิตามินและปัจจัยส่งเสริมการเติบโต และแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเป็น 0 คือไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ กับที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์เป็น 0.125 0.25 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากยีสต์ได้เท่ากับ 0.0 0.0125 0.025 0.05 และ 0.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อรวมปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วคิดเป็น 0.1 0.1125 0.125 0.15 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ในอาหารแต่ละสูตรได้เท่ากับ 385:1 385:1.1 385:1.2 385:1.5 และ 385:2 ตามลำดับ โดยเทียบกับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3) คือ มีสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร กับ

แอมโมเนียมซัลเฟต 0.24 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนได้เท่ากันคือ 0.05 กรัมต่อลิตร เมื่อรวมปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารจะมีค่าเป็น 0.2 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ในอาหารได้เท่ากับ 385:2 ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้ภาวะการเพาะเลี้ยงตามวิธีดำเนินการทดลองข้อ 4 เป็นเวลา 25 วัน ตรวจวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลผลิต การเติบโต การย่อยแป้งและการใช้น้ำตาล รวมทั้งค่าความเป็นกรดด่างในอาหารสูตรต่างๆ

12. การหาภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* K-13 เพื่อผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลัง

เนื่องจากในการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวโดย *A. oryzae* K-13 ได้มีการศึกษามาแล้วโดยรพี โรจนอุไร (2539) โดยใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นเมื่อเปลี่ยนวัตถุดิบเป็นแป้งมันสำปะหลัง จึงทำการศึกษาภาวะบางประการที่จำเป็นในการผลิตเมื่อมีการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอน

12.1 การหาค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก

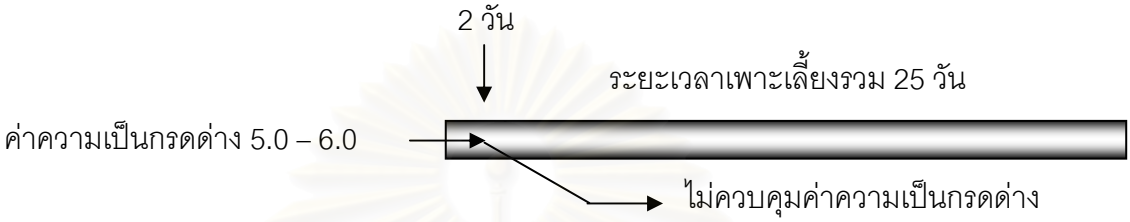
เพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในขวดเขย่าที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อและจัดภาวะการเลี้ยงเชื้อตามที่ศึกษาได้จากวิธีดำเนินงานในข้อ 11 คือสูตรอาหารภาคผนวก ก3 ที่แปรค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 และ 9.0 โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.4 นอร์มอล หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.4 นอร์มอล ตรวจความเป็นแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ กรดโคจิก และการเติบโตทุกวัน เป็นเวลา 25 วัน เปรียบเทียบผลผลิตกรดโคจิกที่ได้มาจากการแปรค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆกัน

12.2 การผลิตกรดโคจิกโดยควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2 ช่วง

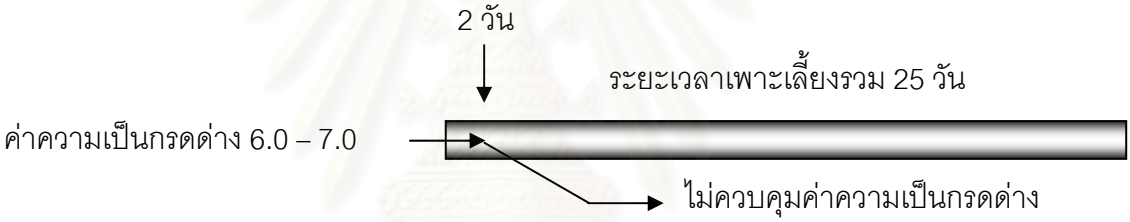
ผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 12.1 ที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในช่วงแรกให้เหมาะต่อการย่อยแป้งด้วยรา *A. oryzae* ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 5.5-7.0 (Fogarty and Kelly, 1979) โดยในการทดลองจะแบ่งเป็น 2 ชุดคือ ชุดที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 5.0-6.0 กับชุดที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 6.0-7.0 การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างจะทำโดยตรวจค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักทุกๆ 2 ชั่วโมง และปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้มีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วงดังกล่าว นาน 2 วัน หลังจากนั้นแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดคือ ชุดหนึ่งปล่อยให้ค่าความเป็นกรดด่างเป็นไปตามธรรมชาติคือ ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างจนสิ้นสุดการทดลอง อีกชุดหนึ่งปรับค่าความ

เป็นกรดด่างให้เหมาะต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 2.4-2.6 (รพี โรจนอุไร, 2539) ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกทันทีและควบคุมจนสิ้นสุดการทดลอง และอีกชุดหนึ่งค่อยๆปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2.4-2.6 ภายใน 5 วัน และควบคุมจนสิ้นสุดการทดลอง โดยใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงรวมทั้งสิ้น 25 วัน ตามแผนการทดลองดังต่อไปนี้

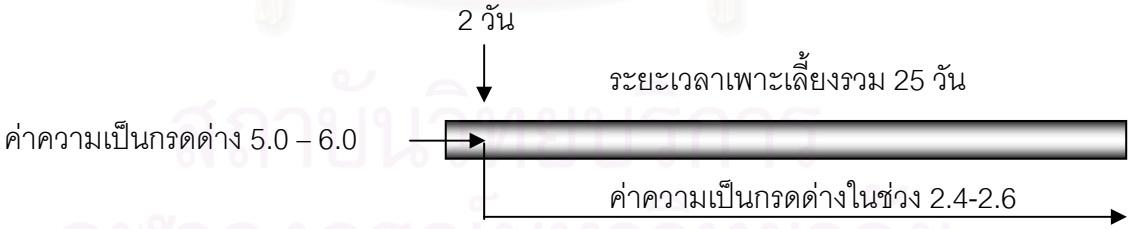
12.2.1 ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในช่วงแรกเป็น 5.0 - 6.0 นาน 2 วัน แล้วไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในช่วงหลัง ดังรูป



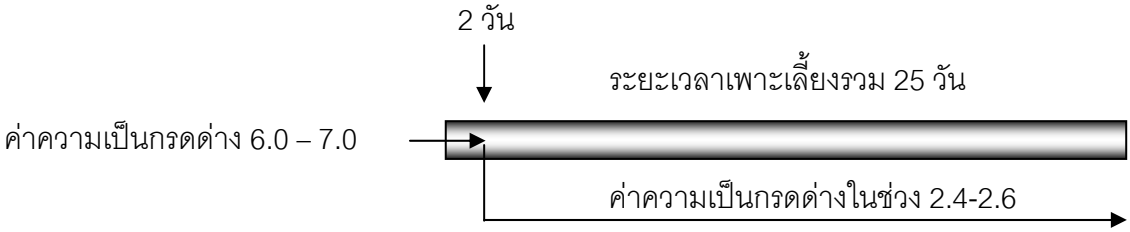
12.2.2 ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในช่วงแรกเป็น 6.0 - 7.0 นาน 2 วัน แล้วไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในช่วงหลัง ดังรูป



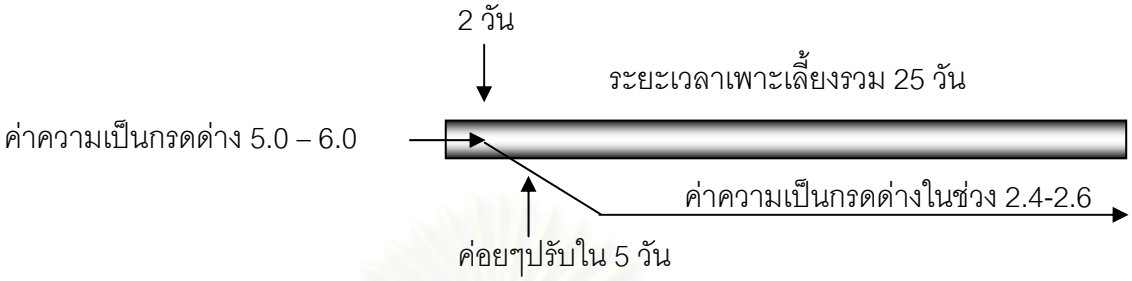
12.2.3 ค่าความเป็นกรดด่างช่วงแรกเป็น 5.0 - 6.0 นาน 2 วัน แล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างในช่วงหลังเป็น 2.4-2.6 ทันที และควบคุมจนสิ้นสุดการทดลอง ดังรูป



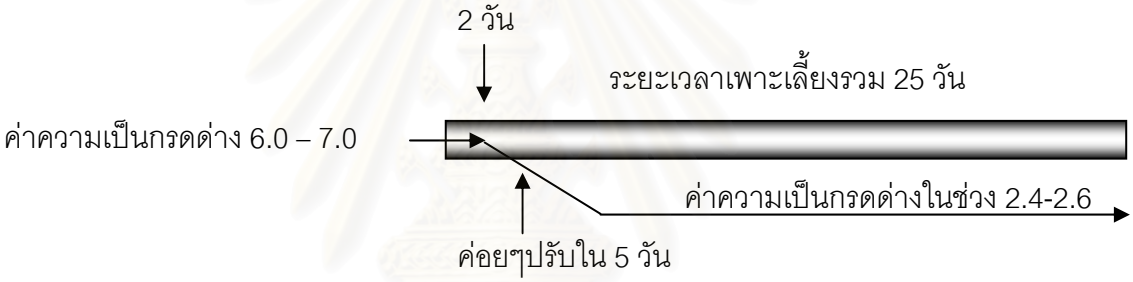
12.2.4 ค่าความเป็นกรดด่างช่วงแรกเป็น 6.0 - 7.0 นาน 2 วัน แล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างในช่วงหลังเป็น 2.4-2.6 ทันที และควบคุมจนสิ้นสุดการทดลอง ดังรูป



12.2.5 ค่าความเป็นกรดด่างช่วงแรกเป็น 5.0 - 6.0 นาน 2 วัน แล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างในช่วงหลังเป็น 2.4-2.6 โดยค่อยๆปรับลงภายใน 5 วัน และควบคุมจนสิ้นสุดการทดลอง ดังรูป



12.2.6 ค่าความเป็นกรดด่างช่วงแรกเป็น 6.0 - 7.0 นาน 2 วัน แล้วปรับค่าความเป็นกรดด่างในช่วงหลังเป็น 2.4-2.6 โดยค่อยๆปรับลงภายใน 5 วัน และควบคุมจนสิ้นสุดการทดลอง ดังรูป



เปรียบเทียบผลผลิตและระยะเวลาในการผลิตกับการทดลองข้อ 12.1 แล้วเลือกการทดลองปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ให้ผลผลิตสูงในระยะเวลาที่สั้น เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

13. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3) โดยแปรค่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 100 150 200 250 และ 300 กรัมต่อลิตร โดยคงค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมที่เลือกจากผลการทดลองข้อ 11 คือ 385 : 2 และเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่เลือกจากผลการทดลองข้อ 12 แล้วทำการตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และน้ำตาลรีดิวซ์ทุกวัน เป็นเวลา 25 วัน เปรียบเทียบผลผลิตกรดโคจิก ระยะเวลา และความคุ้มค่าเมื่อแปรค่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่างๆกัน

14. การผลิตกรดโคจิกที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนโดยอาหารสูตรเหมาะสมและภายใต้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้างต้น

เพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 โดยใช้กล้าเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมงปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสปอร์แขวนลอยความหนาแน่น 2-4 x 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลงในขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังปริมาตร150 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก4) และจัดภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมคือ ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 วัน ตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต ค่าความเป็นกรดด่าง การย่อยแป้งมันสำปะหลัง และการใช้น้ำตาลทุกวันตลอดการทดลอง แล้ววิเคราะห์ปริมาณผลผลิตกรดโคจิกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดจากแป้งมันสำปะหลัง

15. การปรับปรุงการผลิตโดยการเติมแหล่งคาร์บอนระหว่างการผลิตกรดโคจิก

จากการทดลองที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่ากรดโคจิกเป็นผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ กล่าวคือ ราจะมีการใช้แหล่งคาร์บอนไปในการผลิตกรดโคจิกอย่างเต็มที่ และได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดในช่วงภาวะการเติบโตคงที่ (Stationary phase) ดังนั้นในงานทดลองนี้จึงสนใจที่จะผลิตกรดโคจิกโดยการเติมแหล่งคาร์บอนในระหว่างการผลิต ซึ่งเป็นการเพิ่มวัตถุดิบสำหรับผลิตกรดโคจิก จึงอาจให้ผลผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นต่อการผลิต 1 ครั้ง

15.1 ผลิตโดยการเติมแป้งมันสำปะหลังในระหว่างการผลิต

ทำการผลิตกรดโคจิกจากอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมตามการทดลองข้อ 14 โดยจัดการทดลองเป็น 2 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1 เติมแป้งมันสำปะหลังก่อนที่ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักจะต่ำกว่า 5.0 ซึ่งจากการทดลองข้อ 14 พบว่าอยู่ในช่วง 10-12 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นเติมสารละลายแป้งสุกปริมาตร 30 มิลลิลิตรซึ่งมีแป้งมันสำปะหลังอยู่ 5 กรัมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก4) ปริมาตร 150 มิลลิลิตรที่เพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 นาน 8 ชั่วโมง

ขุดที่ 2 เติมแป้งมันสำปะหลังก่อนวันที่อัตราการผลิตกรดโคจิกจะลดลง ซึ่งจากการทดลองข้อ 14 พบว่าอัตราการผลิตกรดหรือความชันของกราฟจะเริ่มลดลงในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงเติมสารละลายแป้งสุกปริมาตร 30 มิลลิลิตรซึ่งมีแป้งมันสำปะหลังอยู่ 5 กรัมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก4) ปริมาตร 150 มิลลิลิตรที่เพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 นาน 13 วัน

โดยการทดลองทั้งสองชุดเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 ± 1 องศาเซลเซียส และทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต แป้ง และน้ำตาลรีดิวซ์ทุกวัน จนกระทั่งพบว่ามีผลผลิตกรดโคจิกลดลง แล้วเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนในระหว่างการผลิตกับการผลิตกรดโคจิกแบบกะ

15.2 ผลิตโดยการเติมสารละลายแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยมาแล้วด้วย จุลินทรีย์ในระหว่างการผลิต

นอกจากการเติมแป้งมันสำปะหลังในระหว่างการผลิตในการทดลองข้อ 15.1 แล้วยังมีทางเลือกอีกทางหนึ่งซึ่งอาจทำให้ผลผลิตสูงขึ้นด้วยการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนที่ใช้เติมในระหว่างการผลิตจากแป้งมันสำปะหลังสุกมาเป็นสารละลายแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยมาแล้วด้วย *A. oryzae* K-13 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ทำโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับย่อยแป้งมันสำปะหลังปริมาตร 150 มิลลิลิตร ซึ่งมีเพียงแป้งมันสำปะหลัง 25 กรัมและสารสกัดจากยีสต์ 0.04 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นเท่ากับ 6.0 เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองสายใยออกด้วยตะแกรงตาถี่ขนาดรูพรุน 4 ช่องต่อตารางมิลลิเมตร แล้วนำน้ำหมักที่กรองได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เติมลงในขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตรที่กำลังเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก4) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมตามการทดลองข้อ 14 แล้วเพาะเลี้ยงต่อไปโดยการเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต แป้ง และน้ำตาลรีดิวซ์ทุกวัน จนกระทั่งพบว่ามีผลผลิตกรดโคจิกลดลง เปรียบเทียบผลผลิตที่ได้กับผลการทดลองข้อ15.1 และการผลิตแบบกะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
การวิเคราะห์ รายงานผล และอภิปรายผลการวิจัย

1. ผลการทดลองเบื้องต้นในการหาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13

ทำการผลิตกรดโคจิกจากอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในระดับขวดเขย่าโดยเพาะเลี้ยงรา *A. oryzae* K-13 ภายใต้ภาวะที่ได้ศึกษามาแล้วว่าเหมาะกับการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่า (รพี โรจนอุไร, 2539) คือ ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้น้ำตาลทราย (ภาคผนวก ก3) แล้วแปรปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็น 3 ค่า ได้แก่ อาหารที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 50 100 และ 150 กรัมต่อลิตร โดยใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 150 มิลลิลิตร ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นเท่ากับ 4.5 และใช้กล้าเชื้อต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1:50 หรือ 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตรที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงสปอร์แขวนลอยความหนาแน่น 2 - 4 x 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าแบบโรตารีที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส

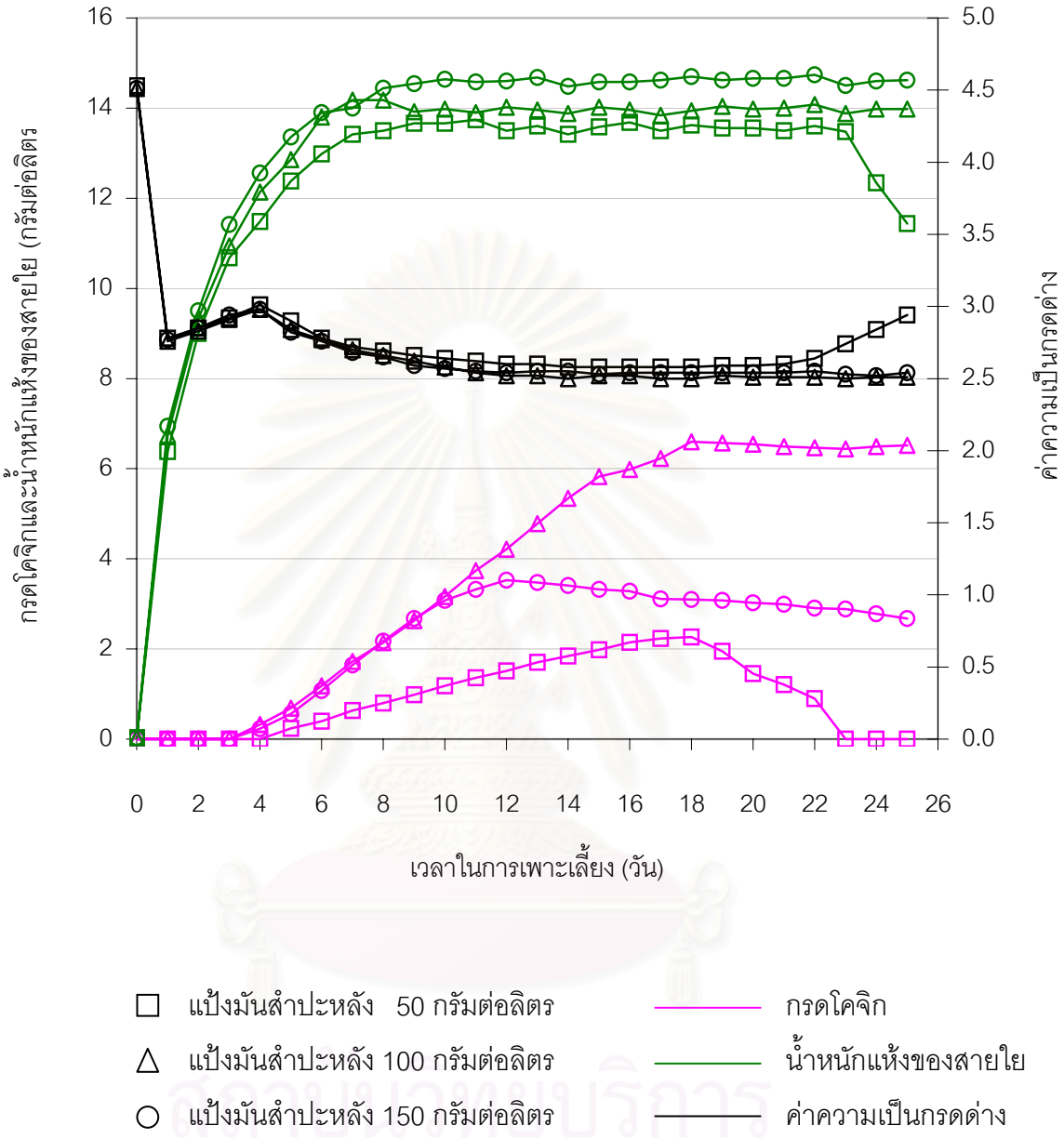
เมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 25 วัน ผลการทดลองพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดเท่ากับ 6.60 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง และให้การเติบโตของสายใยเท่ากับ 13.94 กรัมต่อลิตร รองลงมาคืออาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 150 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 3.53 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง และให้การเติบโตของสายใยเท่ากับ 14.60 กรัมต่อลิตร ส่วนอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตรจะให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำที่สุดคือ 2.27 กรัมต่อลิตร และให้การเติบโตของสายใยเท่ากับ 13.62 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 8

ในระหว่างการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นแป้งทั้ง 3 ค่า คือ 50 100 และ 150 กรัมต่อลิตร จะเห็นการเติบโตของสายใยราเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะเริ่มแรกของการเพาะเลี้ยง แล้วเข้าสู่ระยะที่มีการเติบโตคงที่ประมาณวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน ในขณะที่กรดโคจิกจะเริ่มผลิตเมื่อการเติบโตใกล้จะคงที่ ในวันที่ 4 หรือ 5 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป และสะสมเพิ่มสูงขึ้นในอาหาร (รูปที่ 8) โดยในช่วงการเติบโตนั้น แป้งมันสำปะหลังจะถูกย่อยไปเป็นน้ำตาล (ตรวจวัดในรูปน้ำตาลรีดิวซ์) อย่างรวดเร็วในวันแรกของการเพาะเลี้ยง ดูได้จากความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ลดลง และความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 9) ซึ่งชี้ให้เห็นว่า *A. oryzae* K-13 มีความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยอาศัยเอนไซม์กลุ่มอะมายเลสที่ตัวเองสร้างและหลั่งออกมา ทำให้เกิดการสะสมของน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจนมีค่าสูงสุดเท่ากับ 27.57 62.25 และ 86.95 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 2 ของการ

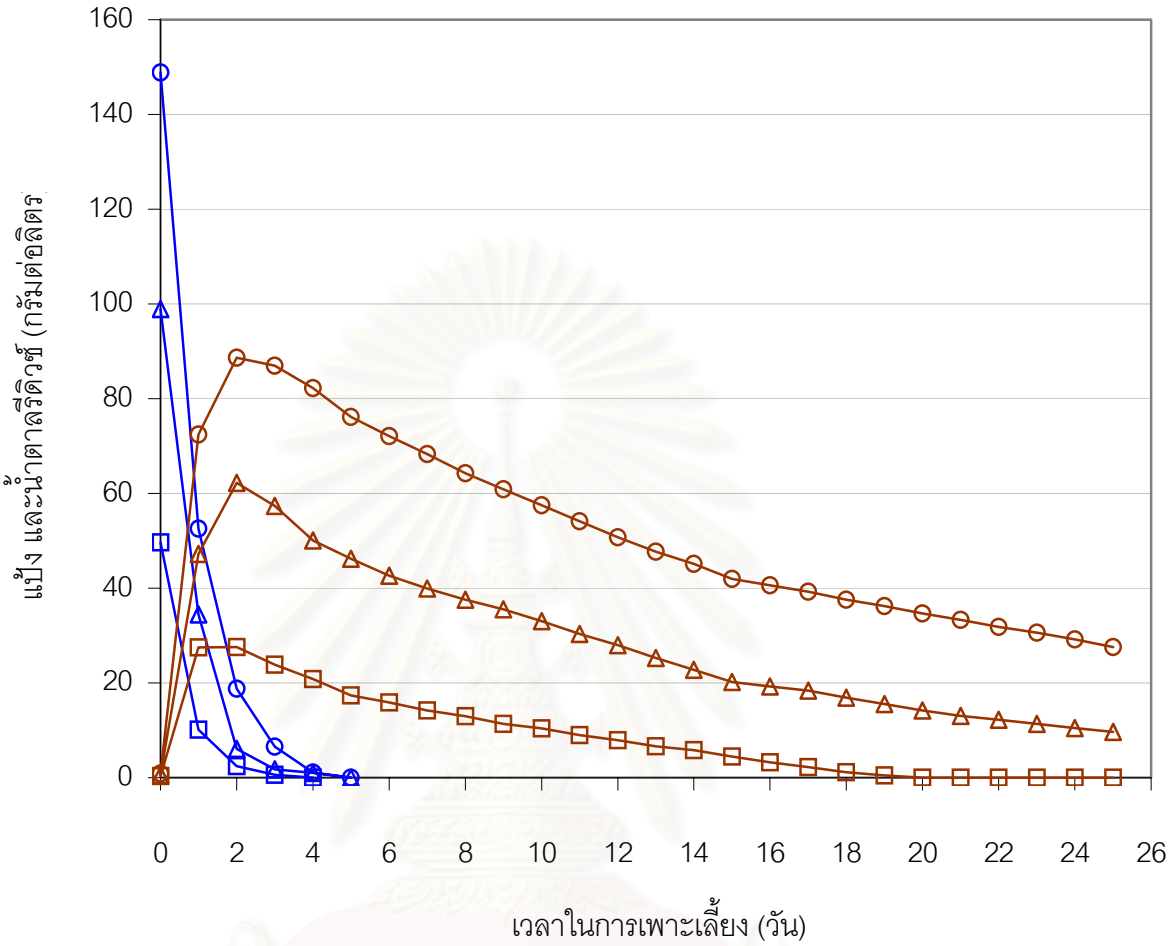
เพาะเลี้ยงเหมือนกัน (รูปที่ 9) ซึ่งแป้งมันสำปะหลังจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมดในวันที่ 4 5 และ 5 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ทราบด้วยการทดสอบความเป็นแป้งกับสารละลายไอโอดีน แล้วไม่เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสี ซึ่งบ่งชี้ว่าแป้งได้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลขนาดต่างๆ ที่มีความยาวตั้งแต่ 1 โมเลกุลแต่ไม่เกิน 6 โมเลกุล (Voet and Voet, 1995) จนหมดแล้ว หลังจากนั้นน้ำตาลรีดิวซ์จะมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เป็นผลจากการที่รานำน้ำตาลที่เกิดขึ้นนั้นไปใช้เพื่อการเติบโตและในสร้างเป็นกรดโคจิกต่อไป เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 25 ของการเพาะเลี้ยงจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.00 9.68 และ 27.57 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 9) แต่ในความเป็นจริง อาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร น้ำตาลรีดิวซ์จะหมดไปตั้งแต่วันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง และยังพบว่าหลังวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณกรดโคจิกจะลดลงจนหมดในวันที่ 23 ของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากรานำกรดโคจิกไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลที่หมดไป ดังแสดงในรูปที่ 10 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wei และคณะ (1991) ที่พบว่ากรดโคจิกจะลดลงเนื่องจากมีการนำกรดโคจิกไปใช้เมื่อแหล่งคาร์บอนเริ่มเหลือน้อยลงและทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน จากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อการผลิตกรดโคจิก

สำหรับค่าความเป็นกรดด่างระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารทั้ง 3 สูตร พบว่า จะมีค่าลดลงตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยงแล้วคงค่าอยู่ในช่วง 2.8 - 3.0 จนเมื่อมีการผลิตกรดโคจิก ค่าความเป็นกรดด่างจะลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป ค่าความเป็นกรดด่างจะคงค่าอยู่ที่ 2.50 – 2.60 จนสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งปริมาณกรดโคจิกสูงสุดที่สะสมอยู่ในอาหารนั้นจะอยู่ในช่วงเวลานี้ ยกเว้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตร หลังจากวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยงจะมีค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้น ซึ่งผลมาจากปริมาณกรดโคจิกที่ลดลงจนหมด และอาจมีการสลายตัวของสายใยปล่อยสารที่มีฤทธิ์เป็นด่างออกมา (รูปที่ 8)

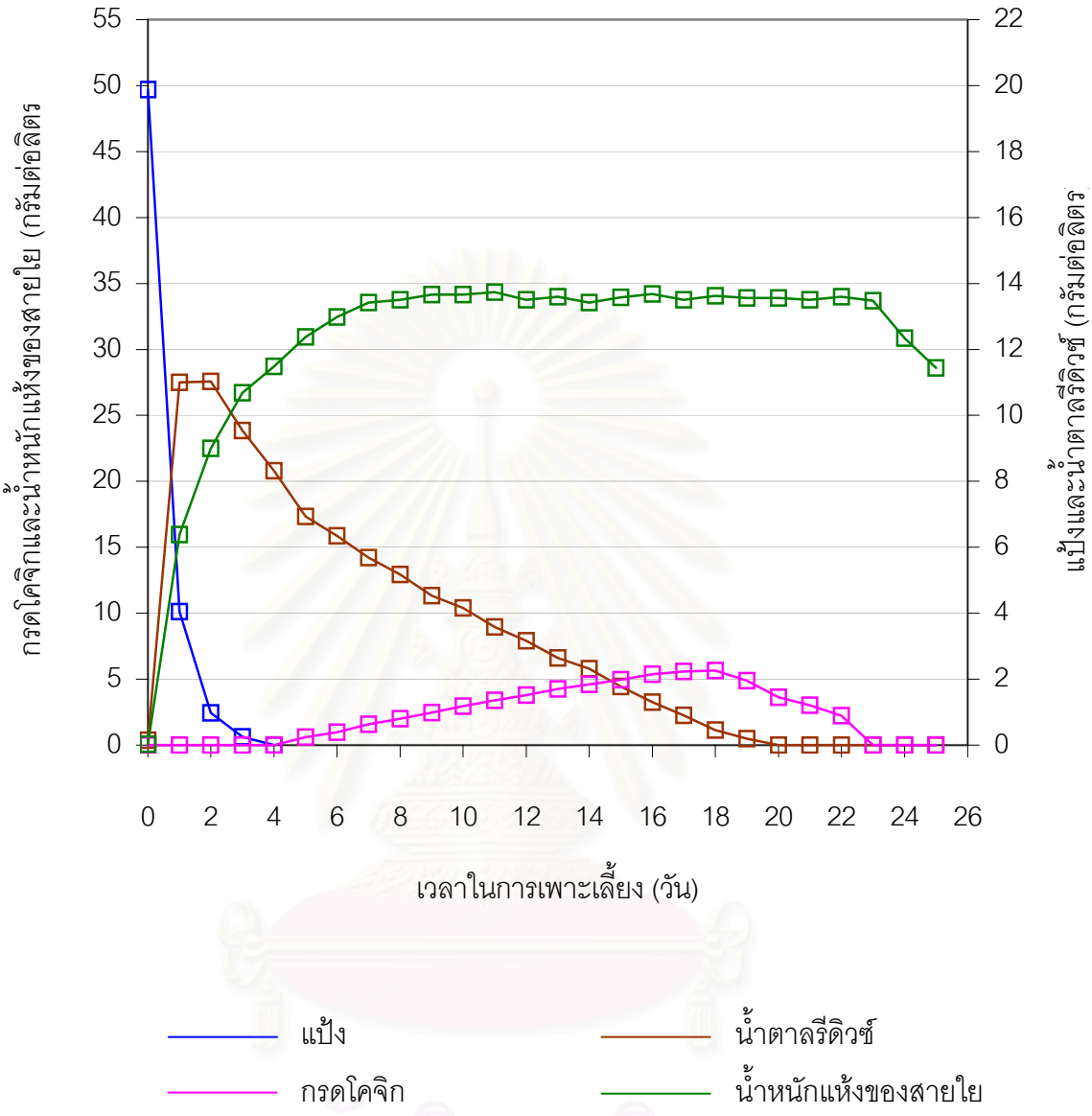
เมื่อเปรียบเทียบผลการเติบโตของสายใยราที่ใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนที่ต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่มีองค์ประกอบอื่นๆ เหมือนกัน คือมีสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.24 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะเดียวกัน พบว่าจะให้น้ำหนักแห้งของสายใยสูงสุดที่ต่างกันแต่ไม่มากนัก โดยเมื่อใช้ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเพิ่มขึ้น ก็จะได้ปริมาณสายใยมากขึ้นด้วย (รูปที่ 8) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ รพี โรจนอุไร (2539) ที่รายงานว่า ราจะมีการเติบโตของสายใยมากขึ้นอีกเล็กน้อย เมื่อใช้ปริมาณแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันเพิ่มขึ้น



รูปที่ 8 ปริมาณกรดโคจิก และน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 50 100 และ 150 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 9 การใช้แป้ง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 50 100 และ 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน (เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 10 การใช้แป้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดโคจิก และน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส)

เมื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังทั้ง 3 ค่า ต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 มีผลดังแสดงในตารางที่ 6 โดยในการเพาะเลี้ยงที่ใช้ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตรจะให้ทั้งปริมาณความเข้มข้นของกรดโคจิก ผลผลิตกรดโคจิกต่อแหล่งคาร์บอนที่ใช้ไปและอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด ในขณะที่พบว่าความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 150 กรัมต่อลิตร จะมีปริมาณผลผลิตกรดโคจิกลดลง ถึงแม้จะมีการเติบโตดีที่สุด ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากความหนืดของอาหารที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง (แป้งสุก) ที่มากขึ้น มีผลให้อัตราการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ซึ่งตามรายงานของ Ariff และคณะ (1996) พบว่า ในช่วงที่มีการเติบโต รามีความต้องการอัตราการให้อากาศที่สูง เพื่อผลิตสายใยที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สำหรับการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดโคจิกที่สูง ดังนั้นจากเหตุผลดังกล่าว จึงทำให้ได้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำลง

จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน มีสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งวิตามินและปัจจัยส่งเสริมการเติบโต ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 0.24 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนเสริม ซึ่งให้ผลผลิตกรดโคจิกที่สูงกว่าสูตรอื่นๆ ทั้งยังเป็นสูตรอาหารที่เตรียมได้ง่าย จึงเลือกเป็นอาหารที่จะใช้ในการผลิตกรดโคจิกโดยรา *A. oryzae* K-13 ในการทดลองขั้นต่อไป แต่อย่างไรก็ตาม ผลผลิตกรดโคจิกที่ได้นั้นยังน้อย และให้การเติบโตสูง เนื่องจากเป็นเพียงการทดลองเบื้องต้นที่ยังไม่มีการจัดปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสมกับการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนในการผลิต

2. ผลการหาปริมาณแหล่งวิตามินและปัจจัยส่งเสริมการเติบโตที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลัง

จากการวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอนในแป้งมันสำปะหลังด้วยเครื่องวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบของสารอินทรีย์โดยใช้บริการจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รายงานผลว่า ในแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัม มีปริมาณคาร์บอนเป็นองค์ประกอบอยู่ 38.5 กรัม อีกทั้งยังมีปริมาณไนโตรเจนอยู่ 0.1 กรัมอีกด้วย และจากการทดลองข้างต้นที่ทำการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าโดยกล้าเชื้อของรา *A. oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิกที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลดีกว่ากลุ่มทดลองอื่น แต่ก็พบว่าผลผลิตที่ได้ยังต่ำ และมีการเติบโตของสายใยที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ของรพี โรจนอุไร (2539) รวมถึงรายงานของ Kwak และ Rhee (1992a) Ogawa และคณะ (1995) ที่สรุปว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกที่มีปริมาณไนโตรเจนสูง จะให้การเติบโตของสายใยมาก มีผลทำให้การผลิตกรดโคจิกลดลง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการ

ตารางที่ 6 ปริมาณกรดโคจิก ผลผลิตกรดโคจิกจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ และอัตราการผลิตกรดโคจิก เมื่อใช้ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังค่าต่างๆ

สูตรอาหาร	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตั้งต้น* (กรัมต่อลิตร)	เวลา** (วัน)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป** (กรัมต่อลิตร)	ผลผลิตกรดโคจิกจากคาร์บอนที่ใช้ (% Yp/s)	อัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย*** (กรัมต่อลิตรต่อวัน)
แป้งมัน 5%	55.56	18	2.27	54.43	4.17	0.18
แป้งมัน 10%	111.11	18	6.60	94.24	7.00	0.47
แป้งมัน 15%	166.67	12	3.53	115.92	3.04	0.44

* คิดจากสูตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ = ปริมาณแป้ง หารด้วย 0.90 (Lane and Eynon, 1928)

** คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

*** คิดจากวันที่เริ่มผลิตจนถึงวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าโดยเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อของ *A. oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งเป็นแหล่งของวิตามินกับปัจจัยส่งเสริมการเติบโตและแหล่งไนโตรเจนด้วย รวมทั้งเป็นการแปรอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C:N ratio) ไปพร้อมๆ กันด้วย โดยการเติมสารสกัดจากยีสต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0 0.125 0.25 0.5 และ 1.0 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากยีสต์ได้เท่ากับ 0 0.0125 0.025 0.05 และ 0.1 กรัมต่อลิตร และคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารแต่ละสูตรได้เท่ากับ 385:1 385:1.1 385:1.2 385:1.5 และ 385:2 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3) ที่มีสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร กับแอมโมเนียมซัลเฟต 0.24 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนได้เท่ากับ 0.05 กับ 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ รวมทั้งหมดเป็น 0.2 กรัมต่อลิตร และคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 385:2

เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิกที่ใช้เปรียบเทียบ จะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดคือ 6.52 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์เป็น 1.0 0.5 0.25 0.125 กรัมต่อลิตรและไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ ให้ปริมาณผลผลิตกรดโคจิกลดหลั่นกันลงมาเท่ากับ 5.61 4.81 3.13 1.21 และ 0.62 กรัมต่อลิตรในวันที่ 17 19 20 22 และ 22 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7 ซึ่งจะเห็นว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรจะให้เวลาที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดต่างกัน คือ เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์น้อยลง จะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ผลผลิตสูงสุดนานขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Ogawa และคณะ (1995) ที่รายงานว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์เพิ่มขึ้น จะใช้เวลาในการให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดลดลง

สำหรับการเติบโต ผลการทดลองรายงานว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณของไนโตรเจนสูงที่สุดคือ 0.2 กรัมต่อลิตร และคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนได้เท่ากับ 385:2 จะให้การเติบโตของสายใยมากที่สุด คือ 15.08 กรัมต่อลิตร ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์เป็น 0.5 0.25 0.125 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ ให้การเติบโตของสายใยลดหลั่นกันลงมาเป็น 11.94 10.44 9.62 และ 4.90 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3) ที่ใช้เปรียบเทียบ ให้การเติบโตของสายใยเท่ากับ 14.14 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 11 และเมื่อพิจารณาผลการเติบโตของสายใยกับการผลิตกรดโคจิก จะพบว่าการลดปริมาณสารสกัดจากยีสต์ให้น้อยลง จะทำให้การเติบโตของ *A. oryzae* K-13 น้อยลงตามไปด้วย

ตารางที่ 7 ผลของการแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์ และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดโคจิก

แหล่งคาร์บอน	ปริมาณไนโตรเจนในแป้งมันสำปะหลัง (กรัมต่อลิตร)	สารสกัดจากยีสต์		แอมโมเนียมซัลเฟต		ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหาร (กรัมต่อลิตร)	อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน	ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	เวลาในการเพาะเลี้ยง**** (วัน)
		ที่ใช้ในอาหาร (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน** (กรัมต่อลิตร)	ที่ใช้ในอาหาร (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน*** (กรัมต่อลิตร)				
แป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตร*	0.1	0.5	0.05	0.24	0.05	0.20	385:2.0	6.52	18
	0.1	1.0	0.10	0	0	0.20	385:2.0	5.34	17
	0.1	0.5	0.05	0	0	0.15	385:1.5	4.81	19
	0.1	0.25	0.025	0	0	0.12	385:1.2	3.13	20
	0.1	0.125	0.0125	0	0	0.11	385:1.1	1.21	22
	0.1	0	0	0	0	0.10	385:1.0	0.62	22

* แป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมมีปริมาณของคาร์บอนอยู่ 38.5 กรัม และมีไนโตรเจนอยู่ 0.1 กรัม

** สารสกัดจากยีสต์ 1 กรัมมีปริมาณของไนโตรเจนอยู่ 0.1 กรัม

*** แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมมีปริมาณของไนโตรเจนอยู่ 0.2 กรัม

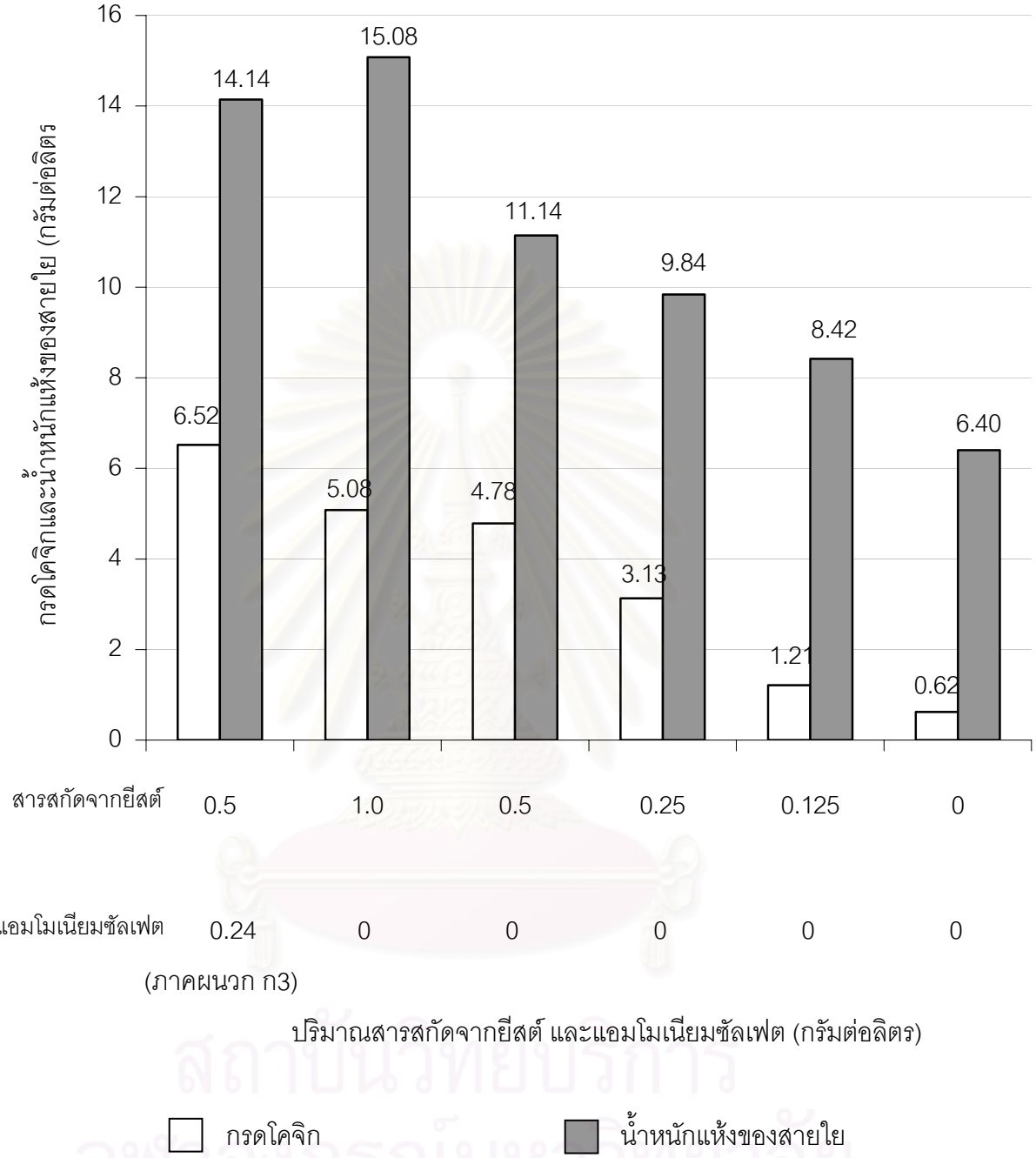
**** ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

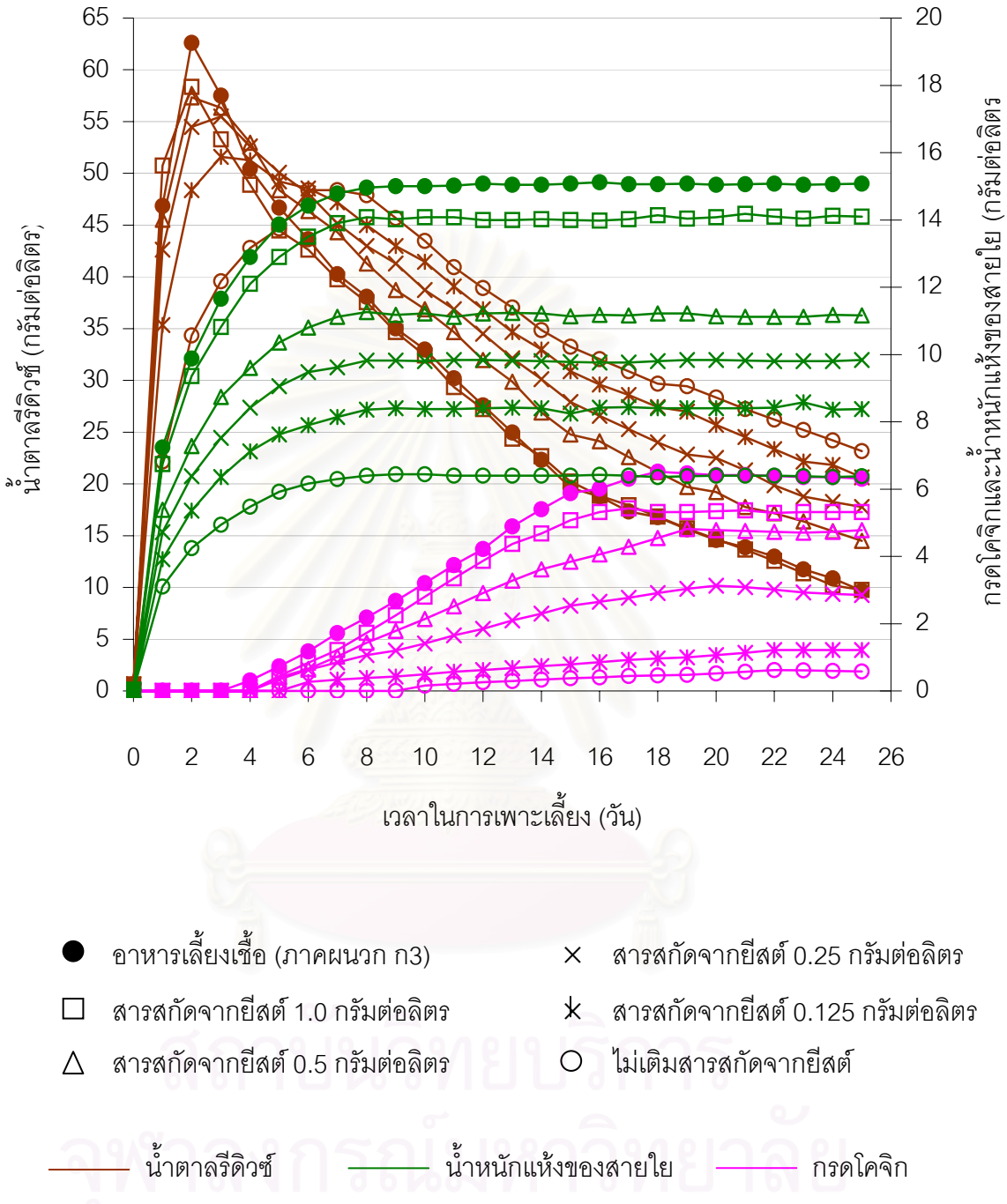
อาจเป็นผลให้มีปริมาณสายใยไม่เพียงพอต่อการให้ผลผลิตที่สูง ดังนั้นจึงส่งผลให้มีปริมาณกรดโคจิกน้อยลงด้วย (รูปที่ 11)

เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาล พบว่า เมื่อใช้ปริมาณสารสกัดยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น ราจะมีการใช้น้ำตาลมากขึ้น (รูปที่ 12) โดยในอาหารที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัมต่อลิตร กับอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิกที่มีปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.24 กรัมต่อลิตร ราจะมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดและใกล้เคียงกัน แต่เมื่อเทียบผลการเติบโตและผลผลิตกรดโคจิก จะพบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสารสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัมต่อลิตร รามีการใช้น้ำตาลไปเพื่อการเติบโตของสายใยมากกว่าที่จะนำไปใช้เพื่อการผลิตกรดโคจิก จึงให้ผลการเติบโตของสายใยที่มากกว่า และให้ผลผลิตกรดโคจิกที่น้อยกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ogawa และคณะ (1995) ที่ทดลองผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* จากน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วแปรปริมาณสารสกัดจากยีสต์เป็นค่าต่างๆ พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณสารสกัดจากยีสต์มาก ราจะใช้น้ำตาลกลูโคสไปเพื่อการเติบโต เป็นผลให้การผลิตกรดโคจิกลดลง

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3) ซึ่งมีแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน มีสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตรที่เป็นทั้งแหล่งไนโตรเจนกับแหล่งวิตามินและปัจจัยส่งเสริมการเติบโต ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 0.24 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนเสริม โดยคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนได้เท่ากับ 385:2 เป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดยรา *A. oryzae* K-13 โดยจะเห็นว่ายังคงใช้อาหารสูตรที่ดัดแปลงจากรพี โรจนอุไร (2539) คือเปลี่ยนเพียงแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลทรายเป็นแป้งมันสำปะหลังเท่านั้น และเมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในงานวิจัยของรพี โรจนอุไร (2539) ที่ใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอน และกนิษฐา ภูวนารถนรานุบาล (2542) ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน รวมทั้งในงานวิจัยนี้ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าต้องใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์เท่ากันคือ 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จะให้ผลผลิตกรดโคจิกดีที่สุดจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ไม่ว่าจะใช้แหล่งคาร์บอนเป็นอะไรก็ตามดังที่กล่าวมาแล้ว



รูปที่ 11 ปริมาณกรดโคจิก และน้ำหนักแห้งของสายใย *A. oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์เป็นค่าต่างๆ



รูปที่ 12 การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดโคจิก และน้ำหนักแห้งของสายใย *A. oryzae* K-13 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์เป็นค่าต่างๆ เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3)

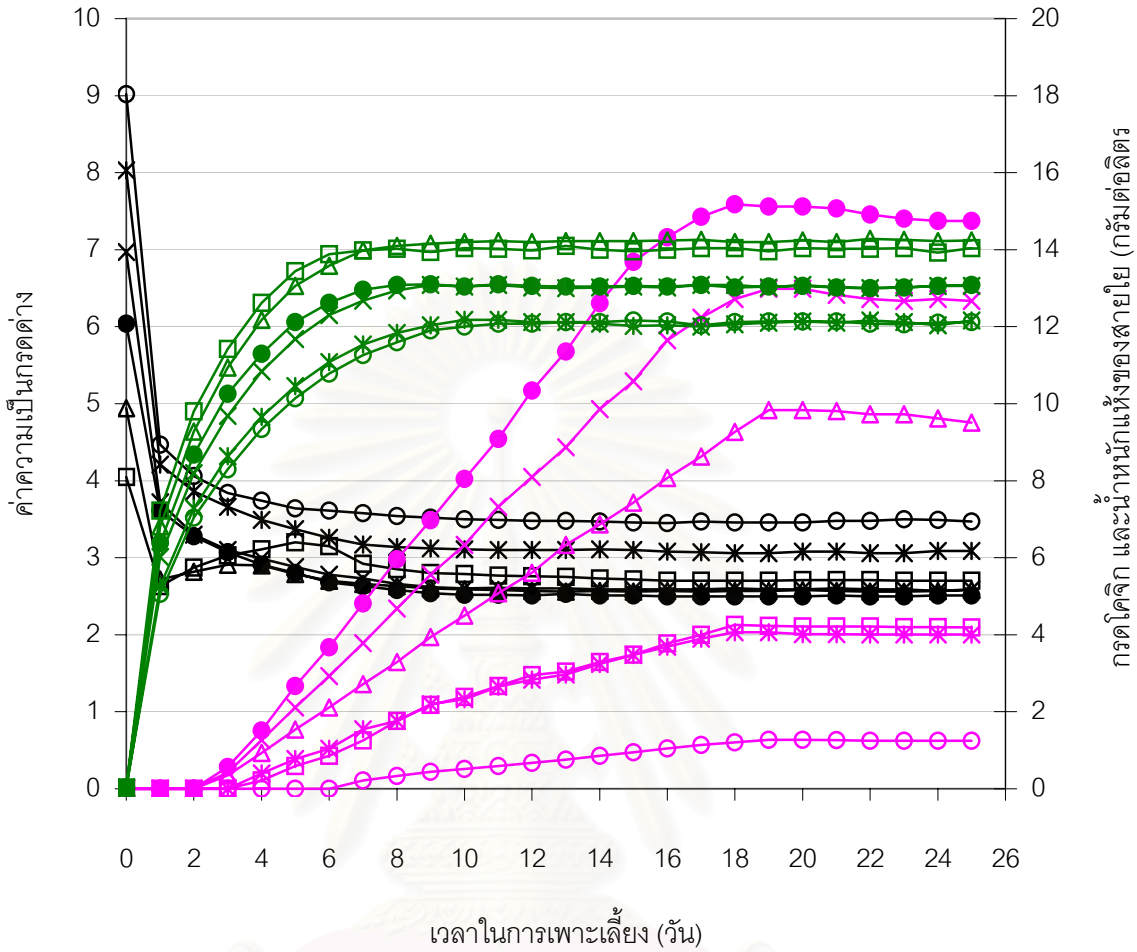
3. ผลการหาภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิกจากแป้ง

3.1 ผลการหาค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลัง

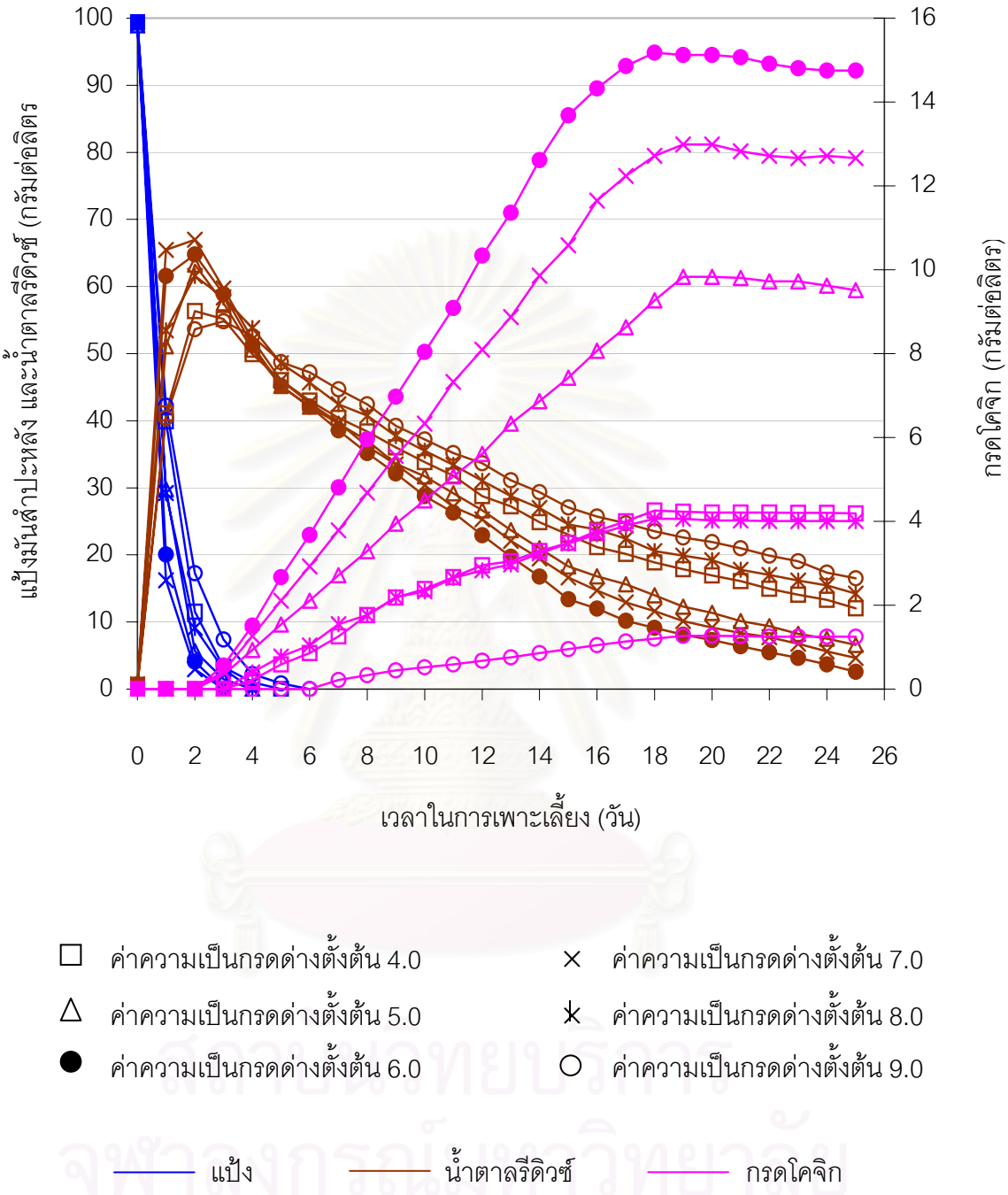
เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3) โดยใช้ปริมาตรอาหาร 150 มิลลิลิตรในขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตร โดยแปรผันค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 และ 9.0 ผลการทดลองพบว่า ที่ทุกค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้น ราจะมีการเติบโตอย่างรวดเร็วในระยะเริ่มแรกของการเพาะเลี้ยง แล้วเข้าสู่ระยะที่มีการเติบโตคงที่ประมาณวันที่ 7 - 9 ของการเพาะเลี้ยง แต่จะมีการเติบโตของสายใยที่แตกต่างกัน คือ ถ้าค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นสูงขึ้น การเติบโตจะลดลง ดังแสดงในรูปที่ 13 และ ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดจะมีน้ำหนักแห้งของสายใยเป็น 14.04 14.20 13.02 13.02 12.06 และ 12.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยจะเห็นว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นเท่ากับ 5.0 ให้การเติบโตของสายใยสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Katagiri และ Kitahara (1933) ที่พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *Aspergillus oryzae* มีค่าประมาณ 5.0

เมื่อพิจารณาถึงค่าความเป็นกรดด่างระหว่างการผลิตกรดโคจิกในอาหารเมื่อแปรค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นเป็น 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 และ 9.0 พบว่า จะมีค่าความเป็นกรดด่างลดลงจนคงที่ โดยในวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดจะมีค่าเป็น 2.70 2.57 2.50 2.59 3.06 และ 3.46 ตามลำดับ (รูปที่ 13) ส่วนผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดจะมีค่าเท่ากับ 4.25 9.83 15.83 12.99 4.06 และ 1.27 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 19 18 19 18 และ 19 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ (รูปที่ 13) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นเท่ากับ 8.0 และ 9.0 มีการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างระหว่างการผลิตยังไม่มากพอที่จะทำให้ผลิตกรดโคจิกได้ดี จึงส่งผลให้มีปริมาณผลผลิตกรดโคจิกต่ำ ในขณะที่ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นเท่ากับ 6.0 พบว่าระหว่างการผลิตมีค่าความเป็นกรดด่างลดลงต่ำที่สุดคือ 2.5 ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกซึ่งสอดคล้องกับรายงานของรพี โรจนอุไร (2539) ที่พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด โคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13 มีค่าเท่ากับ 2.5 และสอดคล้องกับรายงานของ Kwak และ Rhee (1992a) Ogawa และคณะ (1995) Ariff และคณะ (1996) ที่พบว่า การผลิตกรดโคจิกจะเกิดในสภาวะที่เป็นกรดเท่านั้นโดยค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 2.0 – 3.0 ดังนั้นจึงให้การผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด

สำหรับการใช้น้ำตาลในระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่า รา *A. oryzae* K-13 จะย่อยแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตร ไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์อย่างรวดเร็วในวันแรกของการเพาะเลี้ยง ดูได้จากปริมาณแป้งที่ลดลง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 14 แต่ความเป็นแป้งของการทดลองที่ความเป็นกรดด่างตั้งต้นเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 และ 9.0 จะหมดในเวลา



รูปที่ 13 ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดโคจิก และน้ำหนักแห้งของสายใย *A. oryzae* K-13 ในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งแปรผันค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อค่าต่างๆ



รูปที่ 14 ปริมาณแป้ง และน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตโดยรา *A. oryzae* K-13 เมื่อแปรค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆกัน

ที่ต่างกันคือ ในวันที่ 6 4 3 3 4 และ 6 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ (รูปที่ 14) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการย่อยแป้ง ทั้งนี้เนื่องจากค่าความเป็นกรดด่างเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์กลุ่มอะมายเลสอันได้แก่ เอนไซม์แอลฟาอะมายเลสที่จะตัดพันธะภายในโมเลกุลของแป้งแบบสุ่มได้เป็นน้ำตาลที่มีโมเลกุลขนาดต่างๆ จึงทำให้ความหนืดของแป้งลดลงอย่างรวดเร็ว กับเอนไซม์กลูโคอะมายเลสที่จะตัดพันธะจากปลายด้านที่ไม่ใช่รีดิวซ์ของโมเลกุลแป้งหรือน้ำตาลขนาดหลายโมเลกุลเข้ามาทีละโมเลกุล ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (น้ำตาลกลูโคส) (Fogarty และ Kelly, 1979)

จากผลการทดลองจะเห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการย่อยแป้งหมดเร็ว จะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูง เนื่องจากทำให้มีแหล่งของน้ำตาลรีดิวซ์อย่างเพียงพอที่นำจะใช้ และเมื่อพิจารณาถึงแบบแผนการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ (รูปที่ 14) จะพบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นเท่ากับ 6.0 กับ 7.0 ซึ่งย่อยแป้งได้ดีที่สุด จะมีการใช้น้ำตาลในช่วงการผลิตกรดโคจิกที่มากและเร็วกว่าค่าอื่น แต่ที่ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นเท่ากับ 6.0 เนื่องจากมีค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการผลิตกรดโคจิกเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตกรดดังกล่าว ทำให้รานำน้ำตาลรีดิวส์ไปใช้เพื่อการผลิตกรดโคจิกมากและเร็วที่สุด ส่งผลให้มีปริมาณกรดโคจิกสูงที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้น้ำตาลไปในการผลิตกรดโคจิกของรา (Yp/s) ซึ่งเป็นค่าที่บอกถึงความสามารถของราในการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์โดยปกติมีค่าในช่วง 0-1 ซึ่งถ้ายิ่งมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่ามีการใช้สารตั้งต้นอย่างคุ้มค่าและให้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูง มีผลดังแสดงในตารางที่ 8 โดยพบว่า การใช้ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 จะมีค่าประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิกได้สูงสุดคือ 0.149 หรือร้อยละ 14.9 โดยน้ำหนัก และอัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ยสูงสุดคือ 1.01 กรัมต่อลิตรต่อวัน รองลงมาคือ ที่ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นเท่ากับ 7.0 และ 5.0 ตามลำดับ ส่วนค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นที่สูงเกินไป (8.0 และ 9.0) หรือต่ำเกินไป (4.0) จะทำให้รามีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิกน้อยลงมาก

ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้น สรุปได้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3) ที่ใช้ความเป็นกรดด่างตั้งต้นเป็น 6.0 ในการผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังโดย *Aspergillus oryzae* K-13 เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีการผลิตกรดโคจิกในปริมาณที่สูง รวมทั้งมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ไปเป็นกรดโคจิกดีที่สุด เมื่อเทียบกับค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นค่าอื่น ในขณะที่รายงานการวิจัยของรพี โรจนอุไร (2539) กับอุษา สรรค์วัฒนา (2543) พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลทรายโดย *A. oryzae* K-13 เท่ากับ 4.5 และ 5.0 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีค่าความเป็นกรดด่างต่างกัน เนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็น

แป้งจึงจำเป็นต้องผ่านการย่อยเสียก่อน จึงต้องการค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งด้วย

ตารางที่ 8 ปริมาณกรดโคจิก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก และอัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด เมื่อใช้ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นต่างกัน

ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้น	วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป* (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก (Yp/s)	อัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย** (กรัมต่อลิตรต่อวัน)
4.0	18	4.25	92.25	0.046	0.30
5.0	19	9.83	98.80	0.099	0.61
6.0	18	15.18	101.97	0.149	1.01
7.0	19	12.99	100.96	0.129	0.81
8.0	18	4.06	90.56	0.045	0.29
9.0	19	1.27	88.53	0.014	0.11

* คิดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นที่มีค่าประมาณ 111.11 กรัมต่อลิตร ลบด้วย ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในอาหาร ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

** คิดจากวันที่เริ่มผลิตจนถึงวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 ผลการหาค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบ่งเป็น 2 ช่วง สำหรับผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลัง

เมื่อเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ *A. oryzae* K-13 ในขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3) 150 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าแบบโรตารีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 ± 1 องศาเซลเซียสตลอดการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 25 วัน โดยแบ่งการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 2 ช่วงคือ ช่วงแรกให้เหมาะต่อการย่อยแป้ง และช่วงหลังให้เหมาะต่อการผลิตกรดโคจิก ทั้งนี้เพราะจากผลการทดลองข้อ 3.1 พบว่า ความเป็นกรดด่างตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 และ 7.0 จะมีการย่อยแป้งหมดเร็วที่สุด และทำให้มีแนวโน้มในการผลิตมากขึ้น ในการทดลองข้อนี้จึงจัดภาวะให้เหมาะต่อการย่อยแป้งในช่วงแรกซึ่งจะใช้เวลานาน 2 วัน หลังจากนั้นจึงปรับเข้าสู่ภาวะที่เหมาะต่อการผลิตกรดโคจิกต่อไป ซึ่งได้แบ่งการทดลองออกเป็น 6 การทดลองดังนี้

1. ผลิตกรดโคจิกโดยควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 5.0 – 6.0 นาน 2 วัน แล้วไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในช่วงหลัง

2. ผลิตกรดโคจิกโดยควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 6.0 – 7.0 นาน 2 วัน แล้วไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในช่วงหลัง

3. ผลิตกรดโคจิกโดยควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 5.0 – 6.0 นาน 2 วัน แล้วจึงปรับค่าความเป็นกรดด่างมาอยู่ในช่วง 2.4 – 2.6 ทันที และควบคุมจนสิ้นสุดการทดลอง

4. ผลิตกรดโคจิกโดยควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 6.0 – 7.0 นาน 2 วัน แล้วจึงปรับค่าความเป็นกรดด่างมาอยู่ในช่วง 2.4 – 2.6 ทันที และควบคุมจนสิ้นสุดการทดลอง

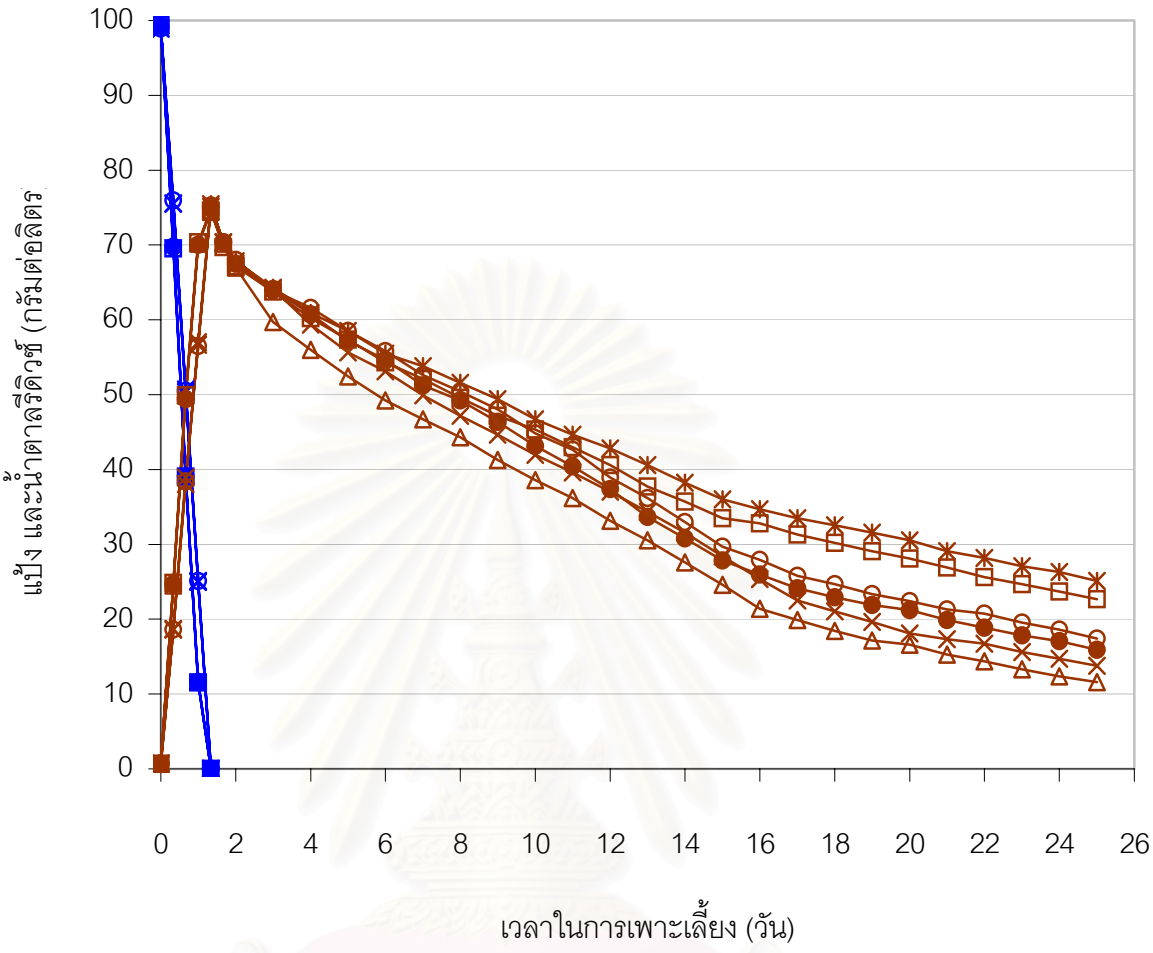
5. ผลิตกรดโคจิกโดยควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 5.0 – 6.0 นาน 2 วัน แล้วจึงปรับค่าความเป็นกรดด่างมาอยู่ในช่วง 2.4 – 2.6 โดยค่อยๆ ปรับลงภายใน 5 วัน และควบคุมจนสิ้นสุดการทดลอง

6. ผลิตกรดโคจิกโดยควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 6.0 – 7.0 นาน 2 วัน แล้วจึงปรับค่าความเป็นกรดด่างมาอยู่ในช่วง 2.4 – 2.6 โดยค่อยๆ ปรับลงภายใน 5 วัน และควบคุมจนสิ้นสุดการทดลอง

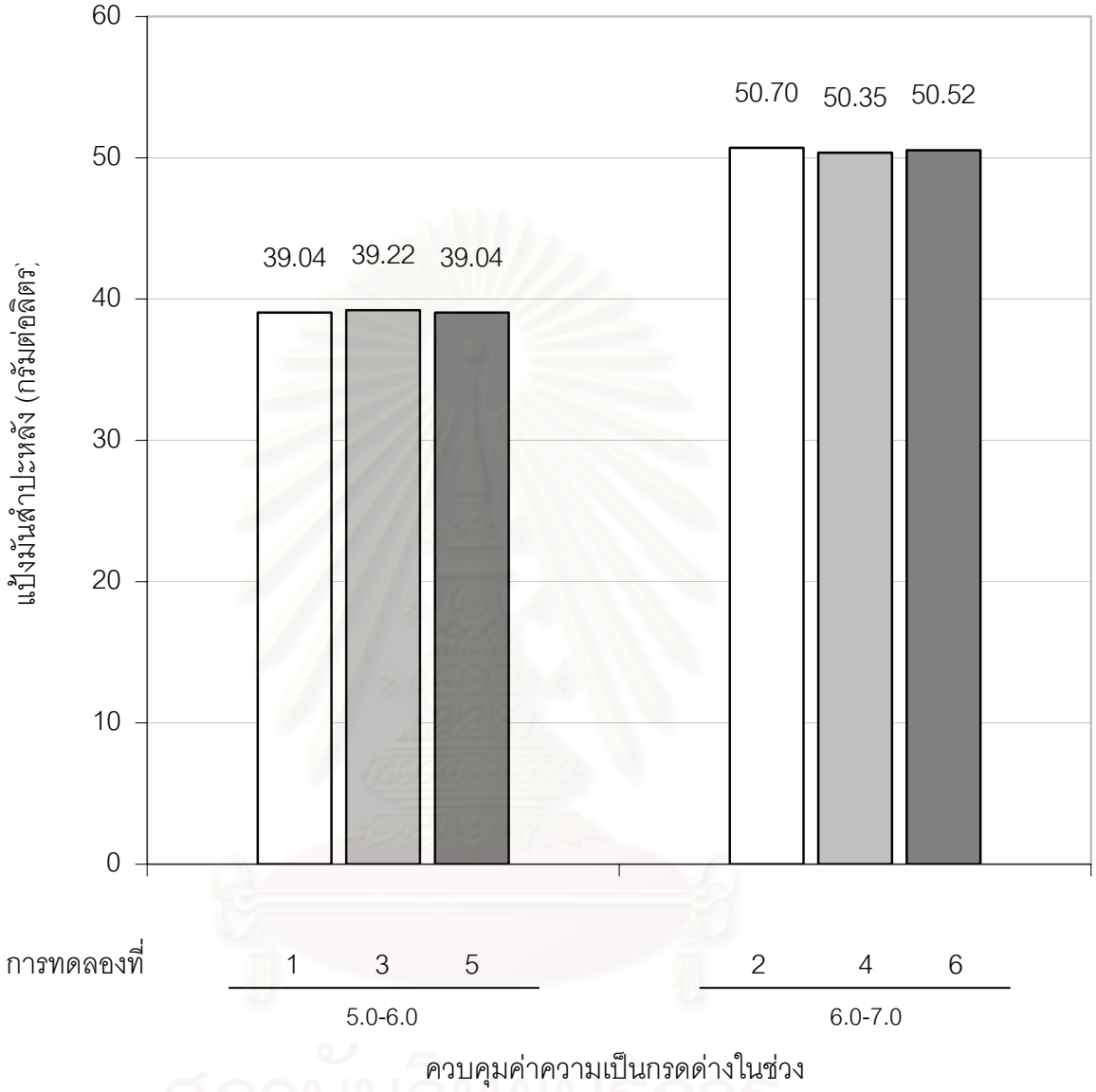
ผลการทดลอง พบว่า การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในช่วงแรกเป็น 5.0 - 6.0 และเป็น 6.0 - 7.0 นาน 2 วัน จะช่วยให้มีการย่อยแป้งมันสำปะหลังไปเป็นน้ำตาล (ตรวจในรูปน้ำตาลรีดิวซ์) หมดภายในเวลาเพียง 32 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์จะมีการสะสมเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดไล่เลี่ยกันที่เวลาเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 15 แต่เมื่อเปรียบเทียบ

ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเห็นว่าการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 5.0 – 6.0 จะมีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งที่ดีกว่า ดูได้จากปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่น้อยกว่า ณ เวลาเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ 16 ซึ่งเป็นผลมาจากค่าความเป็นกรดด่างที่จัดให้มีความเหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะมายเลส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fogarty และ Kelly (1979) ที่ระบุว่า *Aspergillus oryzae* สามารถสร้างเอนไซม์แอลฟาอะมายเลสที่ทำงานได้ดีที่สุดในช่วงค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 – 5.9 และค่าความเป็นกรดด่างที่เอนไซม์มีความเสถียรอยู่ในช่วง 5.5 – 8.5

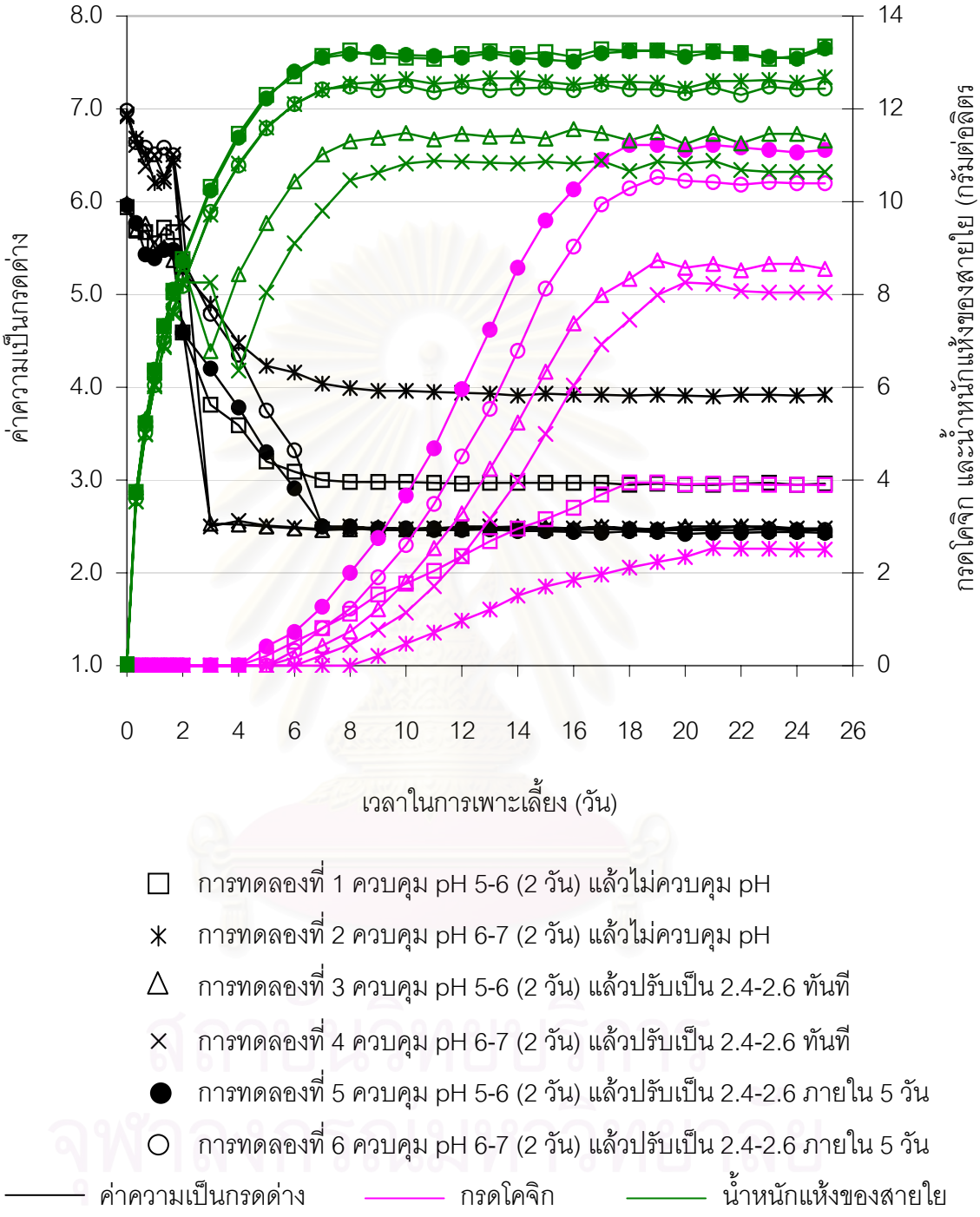
เมื่อควบคุมครบกำหนด 2 วันแล้ว หลังจากนั้น ปรับค่าความเป็นกรดด่างในช่วงหลังตามการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 17 โดยในการทดลองที่ 5 กับ 6 ที่ค่อยๆ ปรับค่าความเป็นกรดด่างมาอยู่ในช่วง 2.4 – 2.6 ภายใน 5 วัน แล้วควบคุมไว้จนสิ้นการทดลอง จะได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดเท่ากับ 11.22 และ 10.53 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 และ 19 ของการเพาะเลี้ยง ให้น้ำหนักแห้งของสายใยเป็น 13.24 และ 12.42 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการทดลองที่ 3 กับ 4 ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 2.4 – 2.6 ทันที แล้วควบคุมไว้จนสิ้นสุดการทดลอง ได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเป็น 8.74 และ 8.26 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 และ 20 ของการเพาะเลี้ยง โดยจะเห็นว่าได้ปริมาณกรดโคจิกที่น้อยกว่า เนื่องจากการปรับค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 5.0 – 6.0 กับ 6.0 – 7.0 มาเป็น 2.5 อย่างกระทันหัน ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง จะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงภาวะในการเพาะเลี้ยงที่รวดเร็วเกินไป จึงส่งผลต่อการเติบโตของสายใยโดยทำให้น้ำหนักแห้งของสายใยลดลงในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เพราะทำให้ระบบเอนไซม์ต่างๆ ของราไม่สามารถทำงานได้ หรือถูกทำลายไป หลังจากนั้นราจะมีการปรับตัวต่อภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงไปนั้น จึงทำให้การเติบโตค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนคงที่ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง แต่มี น้ำหนักแห้งของสายใยสูงสุดเท่ากับ 11.50 และ 10.82 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้การผลิตกรดโคจิกมีประสิทธิภาพไม่เต็มที่ และยังพบว่าการผลิตกรดโคจิกจะเริ่มผลิตก็ต่อเมื่อการเติบโตของสายใยไม่มีความแปรปรวนแล้ว จึงได้ผลผลิตกรดน้อยลง สำหรับการทดลองที่ 1 กับ 2 ที่ปล่อยค่าความเป็นกรดด่างให้เป็นไปตามธรรมชาติ ทำโดยไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างจนสิ้นสุดการทดลอง ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเพียง 3.94 และ 2.53 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 และ 21 ของการเพาะเลี้ยง มีน้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 13.26 และ 12.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งการที่ได้ผลผลิตกรดน้อยมาก อาจเป็นผลมาจากค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเพาะเลี้ยงที่ลดลงไม่ถึงช่วงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก โดยมีค่าความเป็นกรดด่าง ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดอยู่ที่ 2.95 และ 3.90 ตามลำดับ



รูปที่ 15 ปริมาณแป้ง และน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตโดย *A. oryzae* K-13 เมื่อควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2 ช่วง



รูปที่ 16 เปรียบเทียบปริมาณแป้งที่เหลือระหว่างการผลิตโดย *A. oryzae* K-13 ในชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงแรกเป็น 5.0-6.0 และ 6.0-7.0 นาน 2 วัน



รูปที่ 17 ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดโคจิก และน้ำหนักแห้งของของสายใยระหว่างการผลิตโดย *A. oryzae* K-13 เมื่อควบคุมความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2 ช่วง

สำหรับการใช้น้ำตาลใน 6 การทดลอง แสดงดังในรูปที่ 15 จะเห็นว่า รามีการใช้น้ำตาลไปใน 2 ลักษณะคือ เพื่อการเติบโต และเพื่อการผลิตกรดโคจิกที่แตกต่างกัน โดยในช่วงการเติบโตของการทดลองที่ 3 กับ 4 รามีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เร็วที่สุดและมากที่สุด เนื่องจากต้องใช้เพื่อการปรับตัวและสร้างสายใยทดแทนสายใยที่ถูกทำลายจากการปรับค่าความเป็นกรดด่างลงอย่างกะทันหัน จึงทำให้มีน้ำตาลตั้งต้นไปใช้ในช่วงการผลิตที่น้อยลง ส่วนในช่วงการผลิตกรดโคจิกจะมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เร็วใกล้เคียงกับการทดลองที่ 5 และ 6 ดังนั้นจึงทำให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ วันสิ้นสุดการทดลองเพียง 11.59 และ 13.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่การใช้น้ำตาลของการทดลองที่ 1 กับ 2 จะช้ากว่าการทดลองอื่นตั้งแต่เริ่มการผลิตจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง จึงทำให้เหลือน้ำตาลรีดิวซ์ในวันสิ้นสุดการทดลองมากที่สุดคือ 22.67 และ 25.12 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาถึงผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิกของรา และอัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย ในการทดลองนี้ทั้ง 6 การทดลอง แสดงดังในตารางที่ 9 พบว่า การผลิตกรดโคจิกเมื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 5.0 – 6.0 นาน 2 วัน แล้วจึงปรับค่าความเป็นกรดด่างมาอยู่ในช่วง 2.4 – 2.6 โดยค่อยๆ ปรับลงภายใน 5 วัน และควบคุมจนสิ้นสุดการทดลอง (การทดลองที่ 5) มีผลผลิตกรดโคจิก ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิกของรา และอัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ยสูงที่สุด ในเวลาที่น้อยที่สุด ที่เป็นเช่นนี้เพราะรามีค่าความเป็นกรดด่างในช่วงการเติบโตและการผลิตที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Katagiri และ Kitahara (1933) ที่พบว่า *Aspergillus oryzae* มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโตที่ 5.0 และเหมาะกับการผลิตกรดโคจิกที่ 2.4 นอกจากนี้ในการปรับค่าความเป็นกรดด่างในช่วงการผลิตลง จำเป็นต้องปรับอย่างถูกวิธีด้วย โดยสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของอุษา สรรค์วัฒนา (2543) ที่พบว่า การค่อยๆ ปรับลดค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการผลิตกรดโคจิกลง เป็นวิธีการที่ถูกต้อง เนื่องจากทำให้สายใยสามารถปรับตัวเข้ากับค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนไปได้ และส่งผลกระทบต่อระบบเอนไซม์ในการผลิตกรดน้อยลง ทำให้มีการผลิตกรดสูงขึ้นได้ ดังนั้นการทดลองที่ 5 นี้จึงเป็นการทดลองที่ดีที่สุดในการผลิตกรดโคจิกเมื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2 ช่วงและเลือกเป็นตัวแทนของผลการทดลองในข้อ 3.2 นี้

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิต และระยะเวลาในการผลิตของผลการทดลองที่ดีที่สุดจากข้อ 3.1 คือ การผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นเท่ากับ 6.0 ซึ่งให้ผลผลิตเท่ากับ 15.18 กรัมต่อลิตร กับผลการทดลองที่ดีที่สุดจากข้อ 3.2 นี้ ซึ่งให้ผลผลิตเท่ากับ 11.22 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 9) จะเห็นว่าการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นเท่ากับ 6.0 จะให้ผลผลิตกรดโคจิกที่สูงกว่าประมาณ 4 กรัมต่อลิตร โดยที่ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเท่ากันคือ 18 วัน นอกจากนี้ยังเป็นวิธีการที่สะดวกไม่ยุ่งยาก เนื่องจากเพียงจัดค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นก่อนทำ

การเพาะเลี้ยงเท่านั้น ไม่ต้องคอยมาควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการเพาะเลี้ยงตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุด ซึ่งที่ต้องสิ้นเปลืองทั้งแรงงาน สารเคมี และเครื่องมือ

จากผลการทดลองจึงตัดสินใจเลือกจัดภาวะในการผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังโดย *Aspergillus oryzae* K-13 โดยปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3) เท่ากับ 6.0 เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 9 ผลผลิตกรดโคจิก ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก และอัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด เมื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในการเพาะเลี้ยงเป็น 2 ช่วง

การทดลองที่	วันที่เริ่มผลิตกรดโคจิก	วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด	ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป* (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก (Yp/s)	อัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย** (กรัมต่อลิตรต่อวัน)
1	5	18	3.94	80.91	0.049	0.30
2	9	21	2.53	82.01	0.031	0.21
3	6	19	8.74	93.94	0.093	0.67
4	7	20	8.26	93.01	0.089	0.64
5	**5**	**18**	**11.22**	**88.19**	**0.127**	**0.86**
6	6	19	10.53	87.76	0.120	0.81
ผลการทดลองที่ดีที่สุดจากข้อ 3.1 คือเมื่อใช้ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นเท่ากับ						
6.0	**3**	**18**	**15.18**	**101.97**	**0.149**	**1.01**

* คิดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นที่มีค่าประมาณ 111.11 กรัมต่อลิตร ลบด้วย ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในอาหาร ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

** คิดจากวันที่เริ่มผลิตจนถึงวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

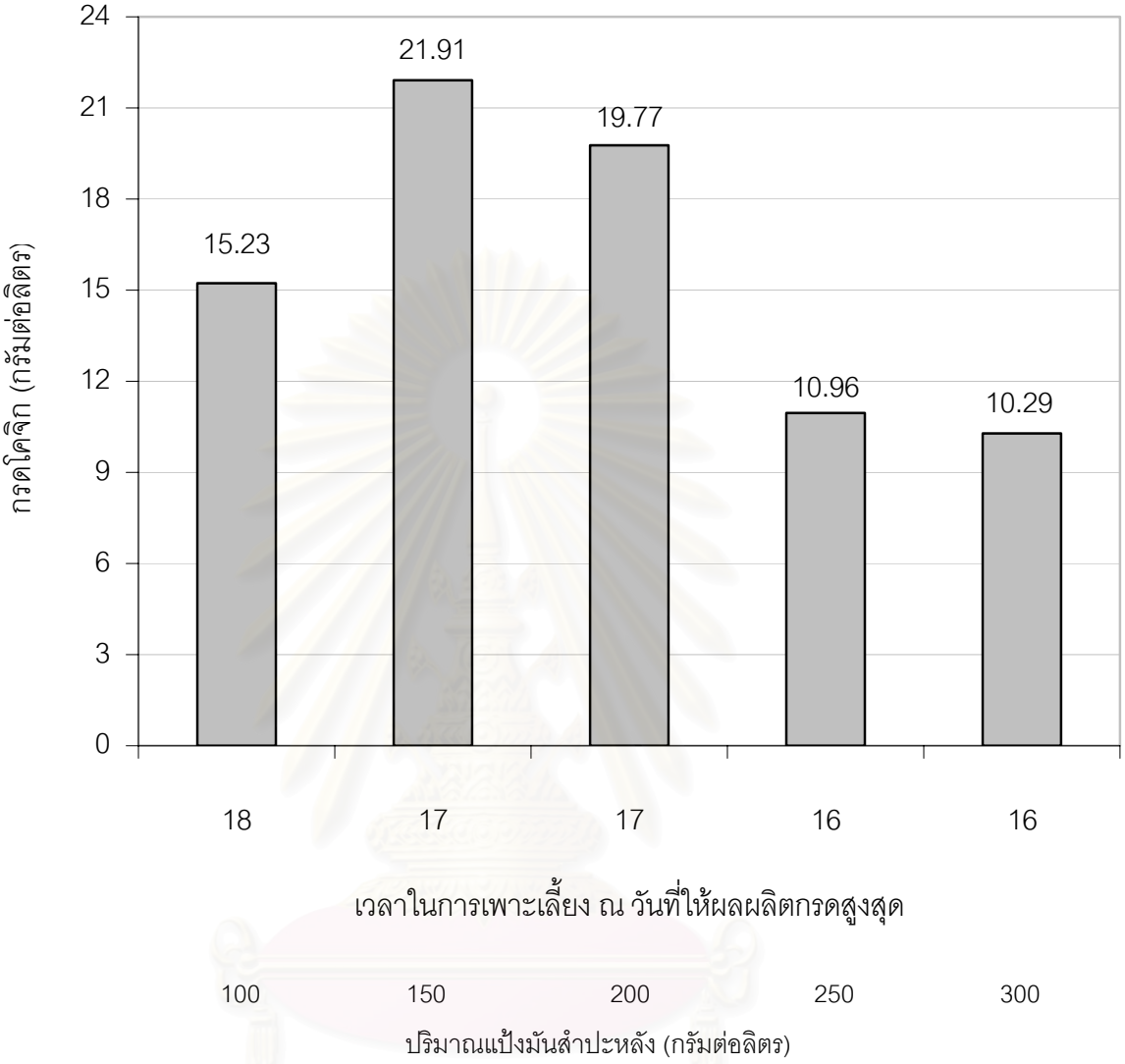
4. ผลการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อได้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ดีที่สุดจากผลการทดลองข้อ 2 และการจัดค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจากผลการทดลองข้อ 3 คือ 385:2 และค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 ที่ทำให้เกิดความสมดุลย์ระหว่างการเติบโต และการผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตกรดสูงแล้ว จึงหาปริมาณของคาร์บอนสูงสุดที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก โดยการแปรปริมาณของแป้งมันสำปะหลัง เท่ากับ 100 150 200 250 และ 300 กรัมต่อลิตร โดยยังคงค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ดีที่สุดเท่ากับ 385:2 ในแต่ละการทดลอง คือ ใช้สารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตรเท่ากัน แต่แปรปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.24 0.48 0.71 0.95 และ 1.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แล้วปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวเท่ากับ 6.0 เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 25 วัน

ผลการทดลองพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังตั้งต้นเท่ากับ 150 และ 200 กรัมต่อลิตรให้ผลผลิตกรดสูงกว่าปริมาณแป้งมันสำปะหลังค่าอื่นคือ เท่ากับ 21.91 และ 19.77 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 17 และ 17 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ รองลงมาคือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร โดยให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 15.23 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้นเท่ากับ 250 และ 300 กรัมต่อลิตร ให้การผลิตกรดโคจิกได้น้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อค่าอื่นๆ โดยจะให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 10.96 และ 10.29 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 16 และ 16 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 18

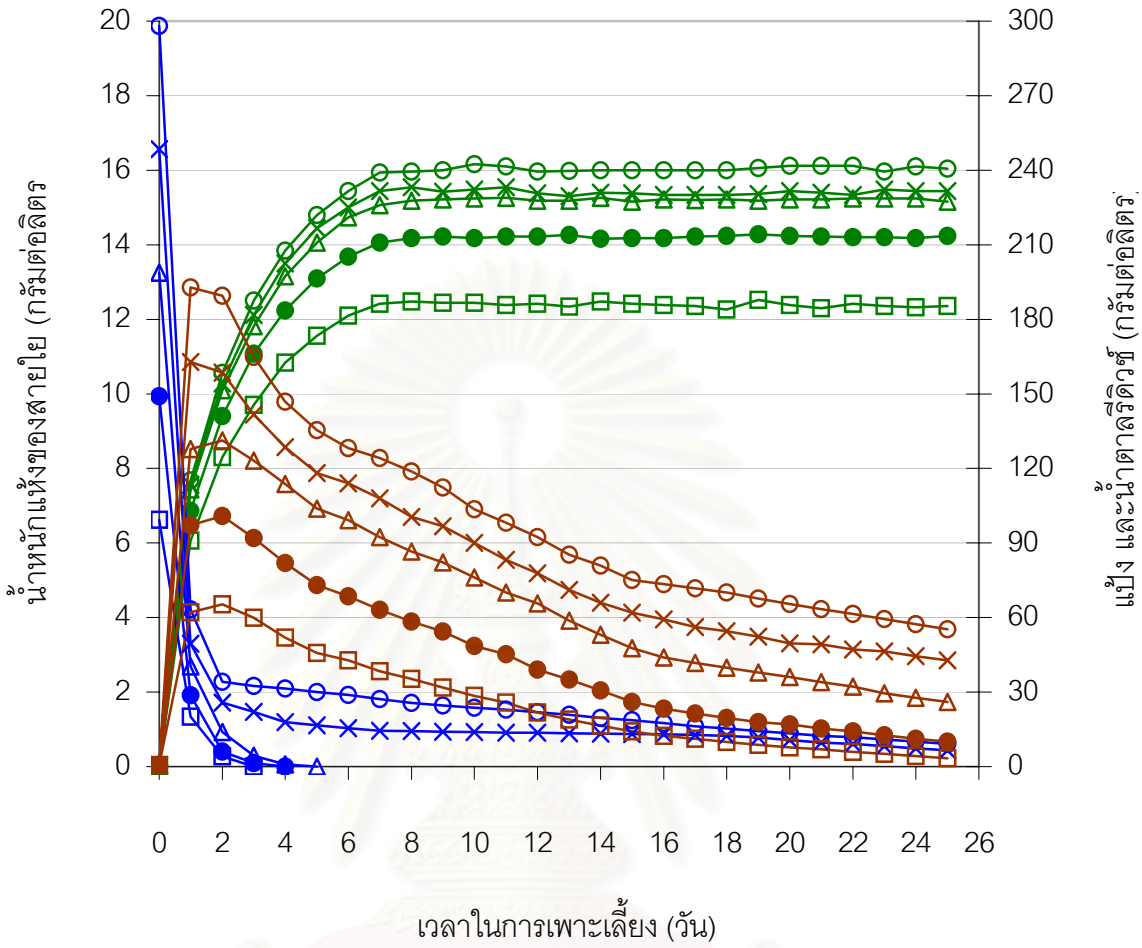
ส่วนการเติบโตของสายใย พบว่า เมื่อมีปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น จะทำให้มีการเติบโตของสายใยสูงขึ้น โดยในระหว่างการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นแป้งทั้ง 5 ค่า คือ 100 150 200 250 และ 300 กรัมต่อลิตร จะเห็นว่ามีแบบแผนการเติบโตในลักษณะเดียวกัน คือมีการเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง แล้วช้าลงจนการเติบโตของราเกือบจะคงที่ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะให้น้ำหนักแห้งของสายใยสูงสุดเท่ากับ 12.36 14.24 15.16 15.44 และ 16.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 19 โดยจะเห็นว่าเมื่อใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้นสูงจะส่งเสริมให้มีการสร้างสายใยมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของรพี โรจนอุไร (2539) กนิษฐา ภูวนาถนรานุบาล (2542) May และคณะ (1931) ที่พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนจะทำให้มีการเติบโตของราสูงขึ้น

ในระหว่างการเติบโต จะเห็นว่า รามีการย่อยแป้งมันสำปะหลังไปเป็นน้ำตาล (ตรวจวัดในรูปน้ำตาลรีดิวซ์) อย่างรวดเร็วในวันแรกของการเพาะเลี้ยง ดูได้จากความเข้มข้นของแป้งมัน



รูปที่ 18 เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตขึ้นจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 น้ำหนักแห้งของสายใย ปริมาณแป้งและน้ำตาลรีดิวซ์ในระหว่างการผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ

สำปะหลังที่ลดลง และความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อจนมีค่าสูงสุดเท่ากับ 65.30 100.82 131.28 162.83 และ 192.85 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 2 2 2 1 และ 1 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ (รูปที่ 19) หลังจากนั้นน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เป็นผลจากการที่รานำน้ำตาลที่เกิดขึ้นนั้นไปใช้เพื่อการเติบโต และในสร้างเป็นกรดโคจิกต่อไป ซึ่งเมื่อดูถึงการใช้น้ำตาล พบว่ามีแบบแผนการใช้น้ำตาลแบบเดียวกัน และยังพบว่าการใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้นมากกว่า 200 กรัมต่อลิตรคือ 250 และ 300 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่มากเกินไป ไม่เหมาะต่อการผลิตกรดโคจิก เนื่องจากยังมีแป้งเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และให้ผลผลิตกรดโคจิกที่ต่ำกว่าอาหารที่ใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ซึ่งแป้งจะถูกย่อยเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมดในวันที่ 3 4 และ 5 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ (รูปที่ 19)

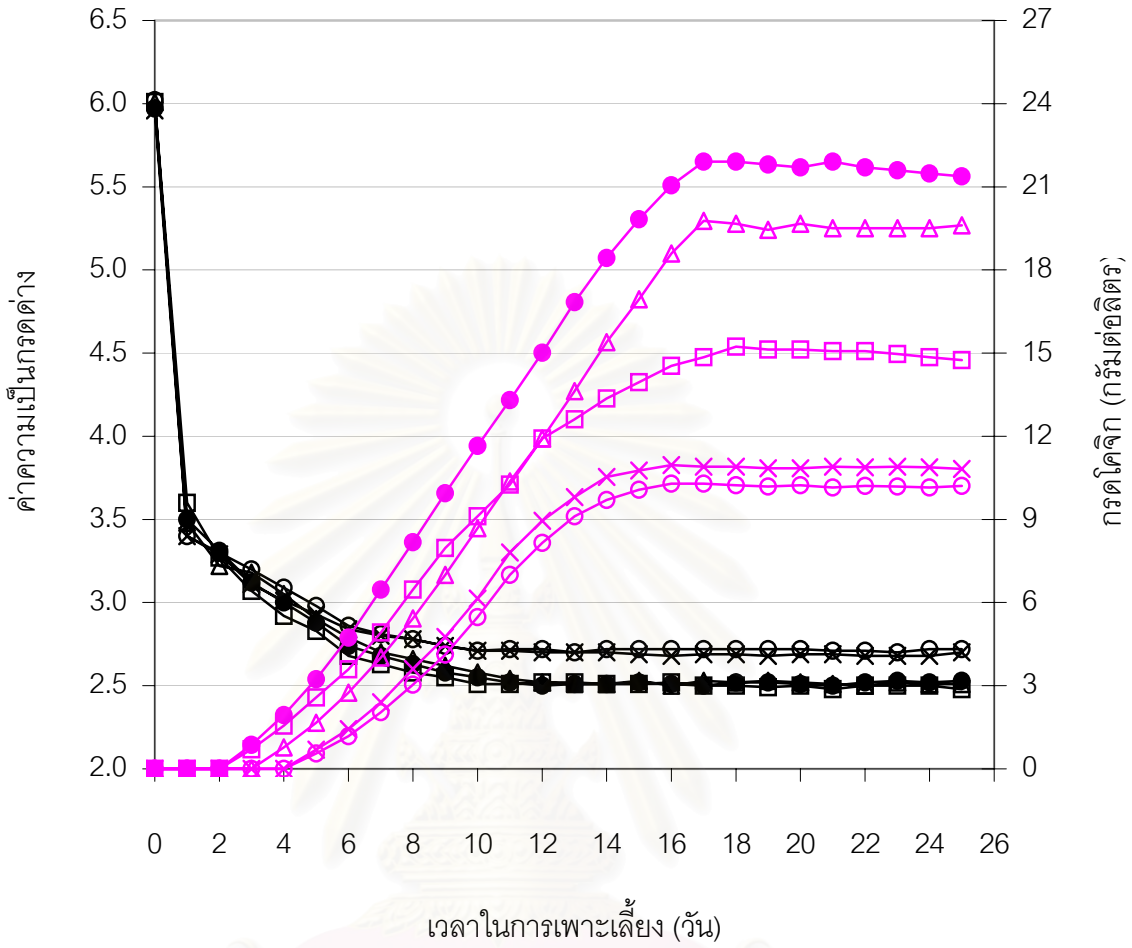
สำหรับค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้น 100 150 200 250 และ 300 กรัมต่อลิตร พบว่ามีแบบแผนการลดลงอย่างรวดเร็วของค่าความเป็นกรดด่างในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยงใกล้เคียงกันคือ มีค่าอยู่ใน 3.4 - 3.6 หลังจากนั้นค่าความเป็นกรดด่างยังลดลงเรื่อยๆ จนเริ่มคงที่หลังจากวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป จนสิ้นสุดการทดลอง โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้น 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดจะมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.50 2.50 และ 2.53 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างในช่วงที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของรพี โรจนอุไร (2539) Kwak และ Rhee (1992a) Ogawa และคณะ (1995) Ariff และคณะ (1996) ที่เคยกล่าวถึงมาแล้ว จึงให้ผลผลิตมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้น 250 และ 300 กรัมต่อลิตร ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.68 และ 2.72 ตามลำดับ (รูปที่ 20)

เมื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังทั้ง 5 ค่า ต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 มีผลดังแสดงในตารางที่ 10 โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้นเท่ากับ 150 กับ 100 กรัมต่อลิตร จะให้ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิกสูงที่สุดคือ 0.15 โดยน้ำหนักเท่ากัน แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร มีค่าประสิทธิภาพของสายใยราในการผลิตกรดโคจิก (Yp/x) สูงกว่าโดยมีค่าเท่ากับ 1.54 ส่งผลให้มีการผลิตกรดโคจิกในแต่ละวันที่มากกว่า (รูปที่ 20) ดังนั้นจึงให้ปริมาณผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด อัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ยที่สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเร็วกว่า 1 วันคือในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยง

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้น 150 กรัมต่อลิตรเป็นปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกภายใต้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 385:2 และค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 ดังนั้นจึงเลือกเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก4) ที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน มีสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งวิตามินและปัจจัยส่งเสริมการเติบโต ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 0.48 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนเสริม ในการทดลองขั้นต่อไป

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของแป้งตั้งต้นที่ใช้ในงานวิจัยนี้ กับรายงานของ Rosfarizan และคณะ (1998a) ที่ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus flavus* จากแป้งสาคู พบว่า เมื่อใช้แป้งสาคู 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนในระดับขวดเขย่าจะให้ผลผลิตกรดโคจิก 23.5 กรัมต่อลิตรในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง และรายงานของ Rosfarizan และคณะ (1998b) ที่แปรความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดในปริมาณต่างๆ เพื่อศึกษาความสามารถในการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนของ *Aspergillus flavus* พบว่าความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดที่ 75 กรัมต่อลิตรเหมาะสมที่สุด โดยจะให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 19.2 กรัมต่อลิตรในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง จะเห็นได้ว่าการใช้แป้งต่างชนิดกัน จะต้องใช้ความเข้มข้นของแป้งตั้งต้นที่แตกต่างกันเพื่อให้เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ปริมาณกรดโคจิก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก และอัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด เมื่อใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้นต่างกัน

ปริมาณแป้งมันสำปะหลังตั้งต้น	วันที่เริ่มผลิตกรดโคจิก	วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด	ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป* (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก (Yp/s)	อัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย** (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	น้ำหนักแห้งของสายใย*** (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดโคจิก (Yp/x)
100	3	18	15.23	101.13	0.15	1.02	12.26	1.24
150	**3**	**17**	**21.91**	**145.27**	**0.15**	**1.56**	**14.22**	**1.54**
200	4	17	19.77	180.44	0.11	1.52	15.22	1.30
250	5	16	10.96	218.57	0.05	1.00	15.34	0.71
300	5	16	10.29	259.91	0.04	0.94	16.00	0.64

* คิดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (ปริมาณแป้งหารด้วย 0.9) ลบด้วย ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในอาหาร ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

** คิดจากวันที่เริ่มผลิตจนถึงวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

*** คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

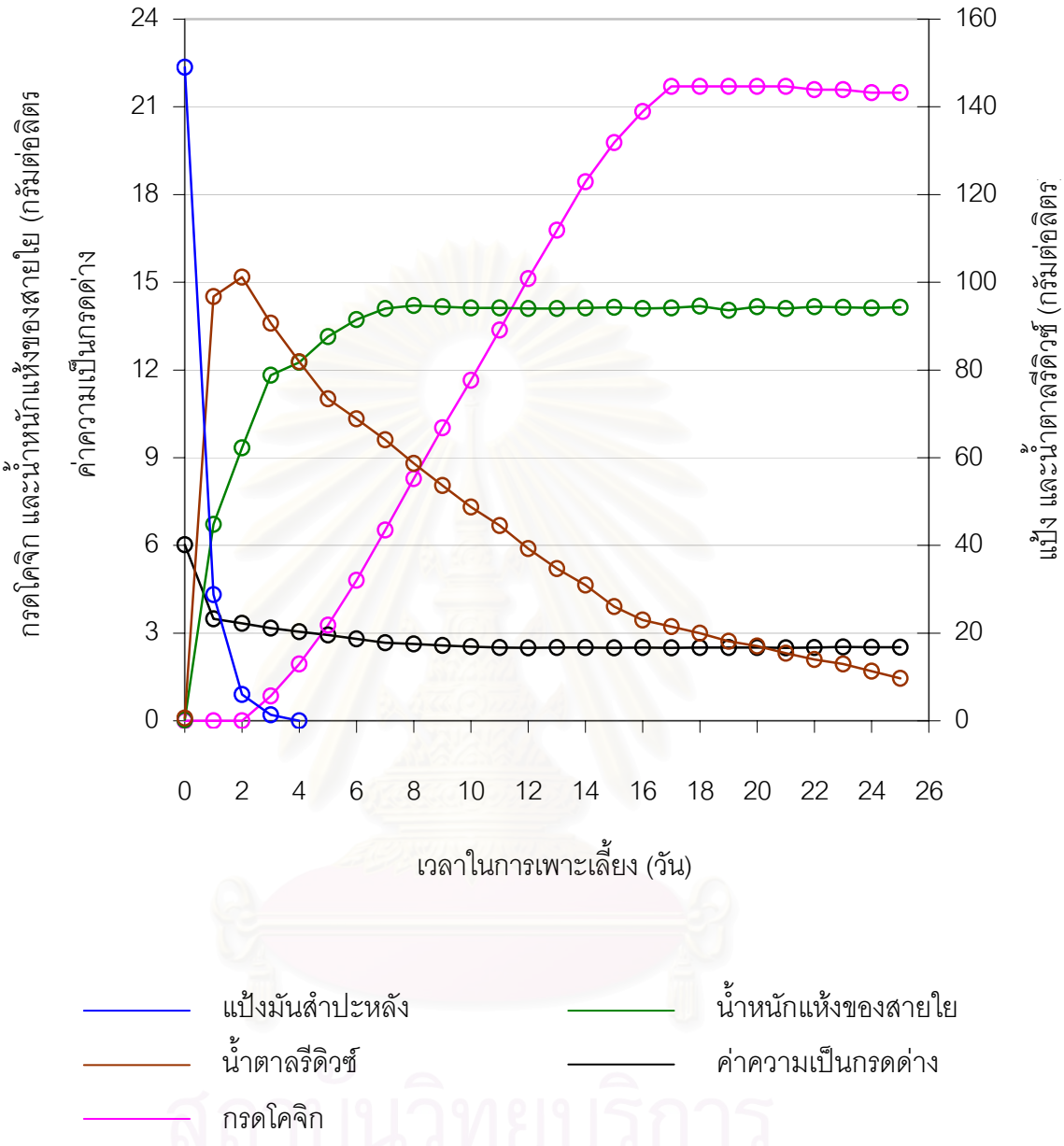
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. ผลการผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้สูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสม

เมื่อทำการผลิตกรดโคจิกโดยรา *A. oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก4) ปริมาตร 150 มิลลิลิตรในขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตร ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองคือ ปรับค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 21.70 กรัมต่อลิตรในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยง มีน้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 14.12 กรัมต่อลิตร โดยมีการสลายแป้งมันสำปะหลังไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เพื่อนำน้ำตาลรีดิวซ์นั้นไปใช้ในการเติบโตและสร้างกรดโคจิกจนสิ้นสุดการทดลองจะเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 9.68 กรัมต่อลิตร ส่วนค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเพาะเลี้ยงจะลดลงตั้งแต่วันแรกจนมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 2.5 ตั้งแต่วันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไปจนสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 21

จากผลการทดลองจะเห็นว่า การหาภาวะบางประการต่อการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลทรายเป็นแป้งมันสำปะหลังสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดยรา *A. oryzae* K-13 ในงานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ โดยดูได้จากการเปรียบเทียบผลผลิตกรดโคจิกจากการทดลองเบื้องต้นที่ยังไม่มีการปรับภาวะคือ การเพาะเลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก3) กับผลผลิตกรดโคจิกหลังทำการปรับจนได้ภาวะที่ดีที่สุดแล้วคือ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก4) และใช้ภาวะการเพาะเลี้ยงตามการทดลองข้างต้น พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกจาก 6.60 กรัมต่อลิตรเป็น 21.70 กรัมต่อลิตร คือเพิ่มขึ้น 15.10 กรัมต่อลิตร เนื่องจากภาวะที่ทำการปรับนั้น ช่วยส่งเสริมการผลิตกรดโคจิกโดยเพิ่มประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดโคจิกอีกเท่าตัวคือจาก 0.07 เป็น 0.15 มีอัตราการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอีกประมาณ 3 เท่าคือจาก 0.47 เป็น 1.55 กรัมต่อลิตรต่อวัน และลดระยะเวลาในการผลิตลง 1 วัน ดังแสดงในตารางที่ 11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 21 ปริมาณกรดโคจิก แป้ง น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักแห้งของสายใย และค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 ภายใต้ภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก และอัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนก่อนปรับภาวะกับหลังปรับภาวะบางประการที่ดีที่สุด

การทดลอง	วันที่เริ่มผลิตกรดโคจิก	วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด	ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป* (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก (Yp/s)	อัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย** (กรัมต่อลิตรต่อวัน)
ก่อนปรับภาวะ	4	18	6.60	94.24	0.07	0.47
หลังปรับภาวะ	3	17	21.70	145.19	0.15	1.55

* คิดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (ปริมาณแป้งหารด้วย 0.9) ลบด้วย ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในอาหาร ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

** คิดจากวันที่เริ่มผลิตจนถึงวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

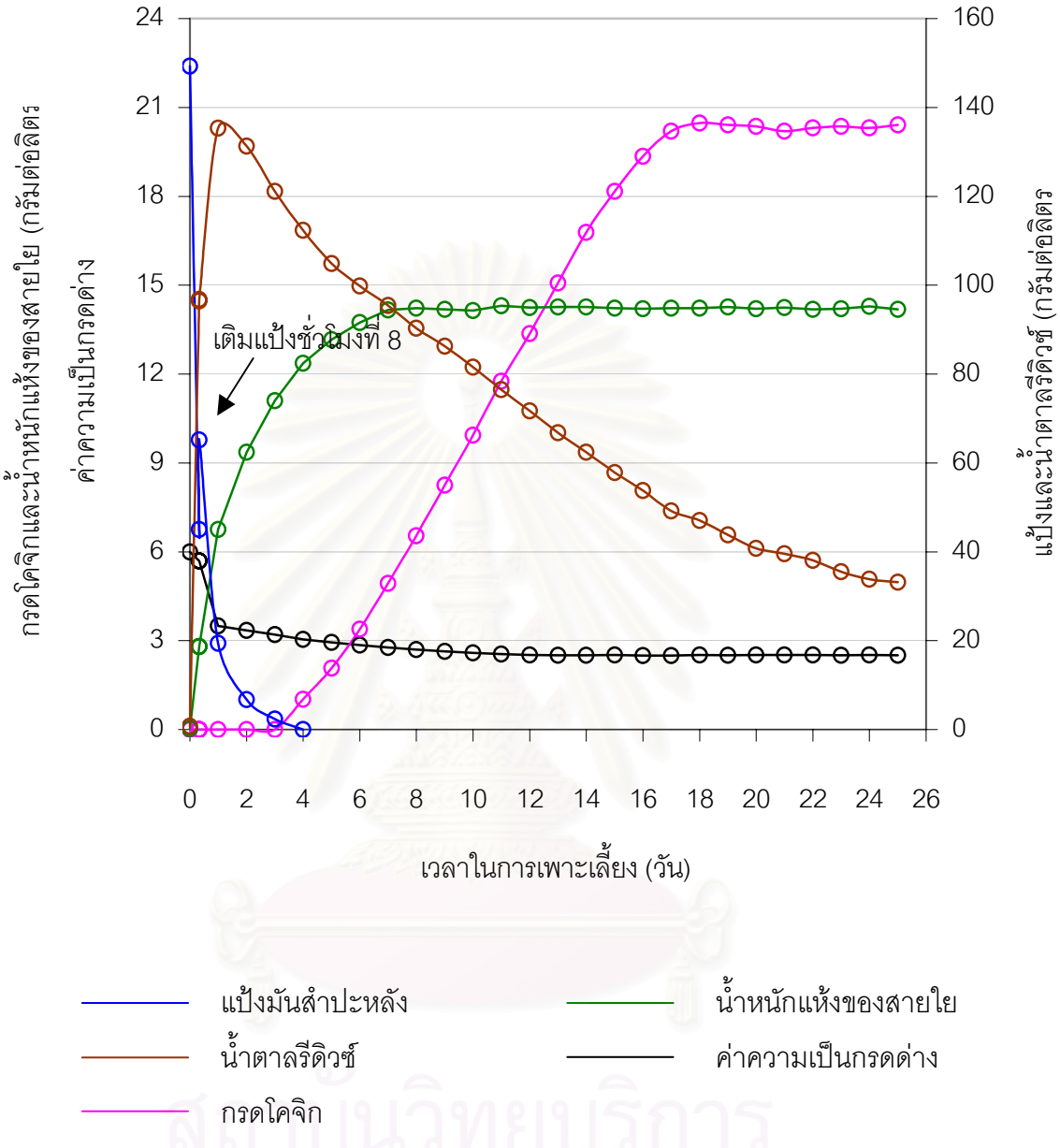
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. ผลการปรับปรุงการผลิตโดยการเติมแหล่งคาร์บอนระหว่างการผลิตกรดโคจิก

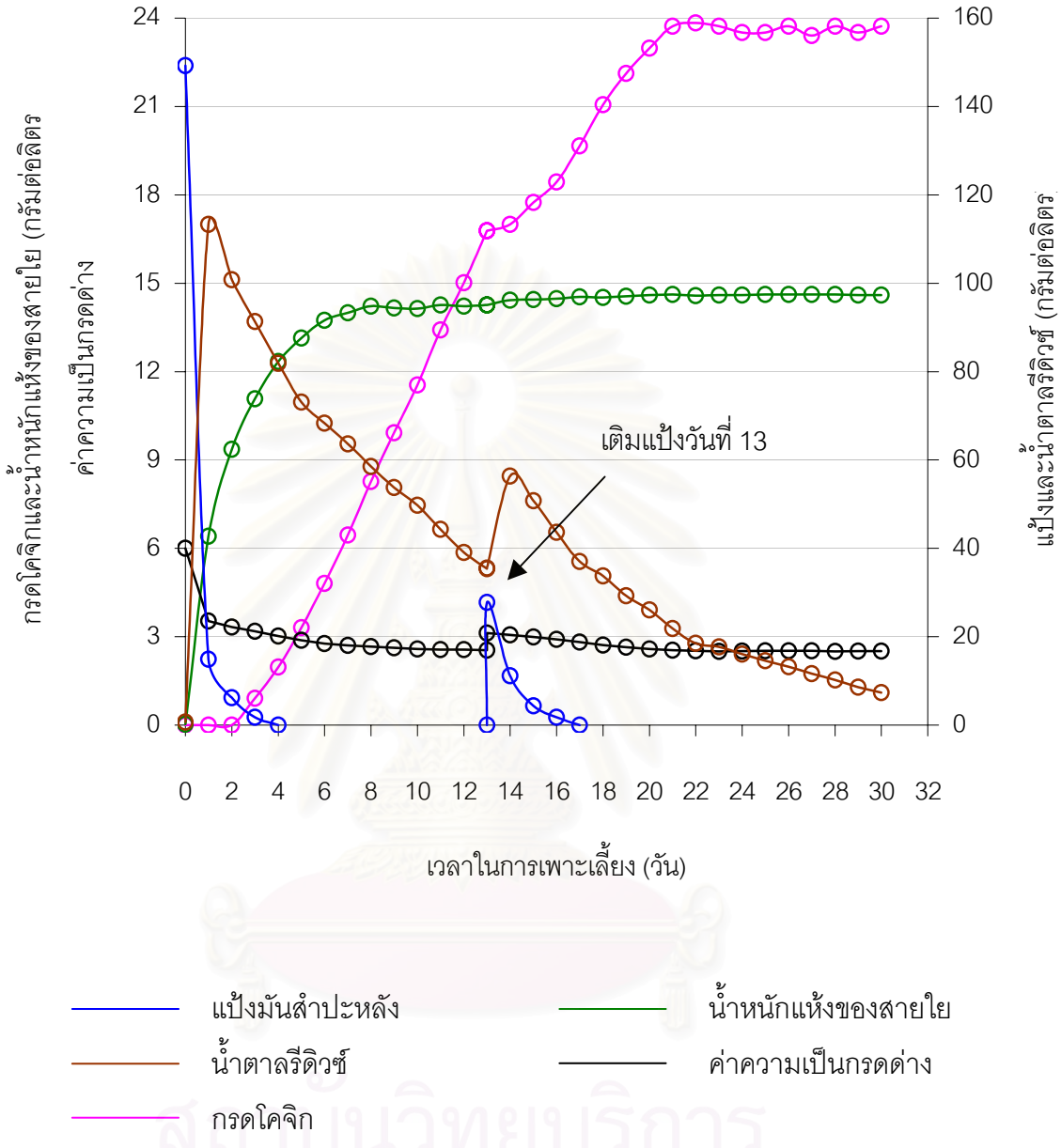
6.1 ผลการผลิตกรดโคจิกโดยการเติมแป้งมันสำปะหลังในระหว่างการผลิต

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ให้เติบโตในอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษามาแล้ว จากนั้นจึงเติมแป้งมันสำปะหลังในระหว่างการเพาะเลี้ยง ซึ่งจัดการทดลองเป็น 2 ชุดดังกล่าวแล้วในวิธีการทดลอง ผลการทดลองพบว่า ชุดที่มีการเติมแป้งมันสำปะหลังในชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง (ชุดที่ 1) ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 20.47 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีปริมาณกรดโคจิกน้อยและช้ากว่าการผลิตกรดโคจิกแบบกะ (ผลการทดลองข้อ 5) ที่ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 21.70 กรัมต่อลิตรในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งน่าจะมีสาเหตุมาจากการสลายแป้งมันสำปะหลังที่เติมลงไปและแป้งมันสำปะหลังตั้งต้นไปเป็นน้ำตาลอย่างรวดเร็ว เนื่องจากในช่วงเวลาดังกล่าวคือ ชั่วโมงที่ 8 จะมีภาวะความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะมายเลสซึ่งอยู่ในช่วง 5.5 ถึง 5.9 ตามรายงานของ Fogarty และ Kelly (1979)ทำให้มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สะสมอยู่ในอาหารเป็นจำนวนมาก ซึ่งสอดคล้องรายงานของ May และคณะ (1931) ที่ว่าถ้ามีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงจะมีผลทำให้มีค่าแรงดันออสโมติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีพของรา จึงทำให้กิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ลดลง มีผลทำให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำ ดังแสดงในรูปที่ 22 ส่วนการเติมแป้งมันสำปะหลังในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง (ชุดที่ 2) สามารถเพิ่มผลผลผลิตกรดโคจิกได้คือ ให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 23.83 กรัมต่อลิตร แต่ใช้เวลานานขึ้นเป็น 22 วัน โดยพบว่าหลังจากเติมแป้งมันสำปะหลังลงไปแล้ว มีการสลายแป้งมันสำปะหลังไปเป็นน้ำตาล ดูได้จากปริมาณแป้งที่ลดลงและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่การผลิตกรดโคจิกจะหยุดลงแล้วค่อยๆ เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากค่าความเป็นกรดด่างในอาหารที่สูงขึ้นในวันที่เติมแป้ง จึงไม่เหมาะกับการผลิต แล้วค่าความเป็นกรดด่างค่อยๆ ลดลงจนมีค่าความเป็นกรดด่างคงเดิมที่ประมาณ 2.5 ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด ดังรูปที่ 23 และจากการผลิตกรดที่หยุดลงในบางช่วงแล้วค่อยเริ่มผลิตใหม่ จึงทำให้ได้ผลผลิตรวมไม่มากเท่าที่ควร

สำหรับประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิกของราทั้ง 2 ชุดการทดลองเทียบกับการผลิตแบบกะ แสดงดังในตารางที่ 12 จะเห็นได้ว่า ทั้งชุดที่ 1 และ 2 จะมีค่าเท่ากันคือ 0.13 แต่มีค่าน้อยกว่าการผลิตแบบกะที่มีค่าเท่ากับ 0.15 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การเติมแป้งมันสำปะหลังที่เป็นแหล่งคาร์บอนลงไปโดยตรง ณ ชั่วโมงที่ 8 ไม่สามารถเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกให้มีปริมาณสูงขึ้นได้ แต่การเติมแป้งมันสำปะหลังในวันที่ 13 ของการผลิต จะเพิ่มผลผลิตได้ โดยมีค่าสูงขึ้นเพียง 2.13 กรัมต่อลิตร และต้องใช้เวลาในการผลิตนานขึ้นอีก 5 วัน จึงไม่คุ้มค่า



รูปที่ 22 ปริมาณกรดโคจิก แป้ง น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักแห้งของสายใย และค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 เมื่อใช้วิธีการเติมแป้งมันสำปะหลังระหว่างการผลิตในชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 23 ปริมาณกรดโคจิก แป้ง น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักแห้งของสายใย และค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 เมื่อใช้วิธีการเติมแป้งมันสำปะหลังระหว่างการผลิตในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก และอัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด

ผลการทดลอง	วันที่เริ่มผลิตกรดโคจิก	วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด	ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป* (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก (Yp/s)	อัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย** (กรัมต่อลิตรต่อวัน)
ข้อ 6.1 ชุดที่ 1	4	18	20.47	152.97	0.13	1.46
ข้อ 6.1 ชุดที่ 2	3	22	23.83	181.48	0.13	1.25
ข้อ 6.2	3	19	25.97	160.92	0.16	1.62
การผลิตแบบกะ	3	17	21.70	145.19	0.15	1.55

* คิดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น (ปริมาณแป้งหารด้วย 0.9) ลบด้วย ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในอาหาร ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

** คิดจากวันที่เริ่มผลิตจนถึงวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำหรับวิธีการผลิตโดยการเติมแหล่งคาร์บอนในระหว่างการผลิตกรดโคจิกนั้น ยังไม่เคยมีรายงานที่ใช้วิธีการผลิตโดยการเติมแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในระหว่างการผลิตกรดโคจิกมาก่อน จึงถือว่าเป็นงานวิจัยแรกโดยสามารถเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกได้อีก 2.13 กรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาในการผลิตนานขึ้นอีก 5 วัน (วันที่ 22) เมื่อเทียบกับรายงานที่มีเติมวัตถุดิบชนิดอื่นเป็นแหล่งคาร์บอนในระหว่างการผลิต ตัวอย่างเช่น อุษา สรรค์วัฒนา (2543) ที่ผลิตโดยการเติมน้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนในระหว่างการผลิตโดยทำการทดลองในขวดเขย่า พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกขึ้นอีก 7.22 กรัมต่อลิตรโดยใช้เวลานานขึ้นอีก 12 วัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าให้ผลที่ดีกว่า แต่จะให้ผลไม่ดีนักเมื่อเทียบกับรายงานของชมจิต ท้าวธงไชย (2544) ที่พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นที่มีแหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุครบถ้วน แล้วทยอยเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอนในรูปสารละลายกลูโคสในระหว่างการผลิต จะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดถึง 35.26 กรัมต่อลิตรซึ่งเพิ่มขึ้นจากการผลิตแบบกะอีก 1.99 กรัมต่อลิตรโดยใช้เวลาในการผลิตเท่าเดิมคือในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยง

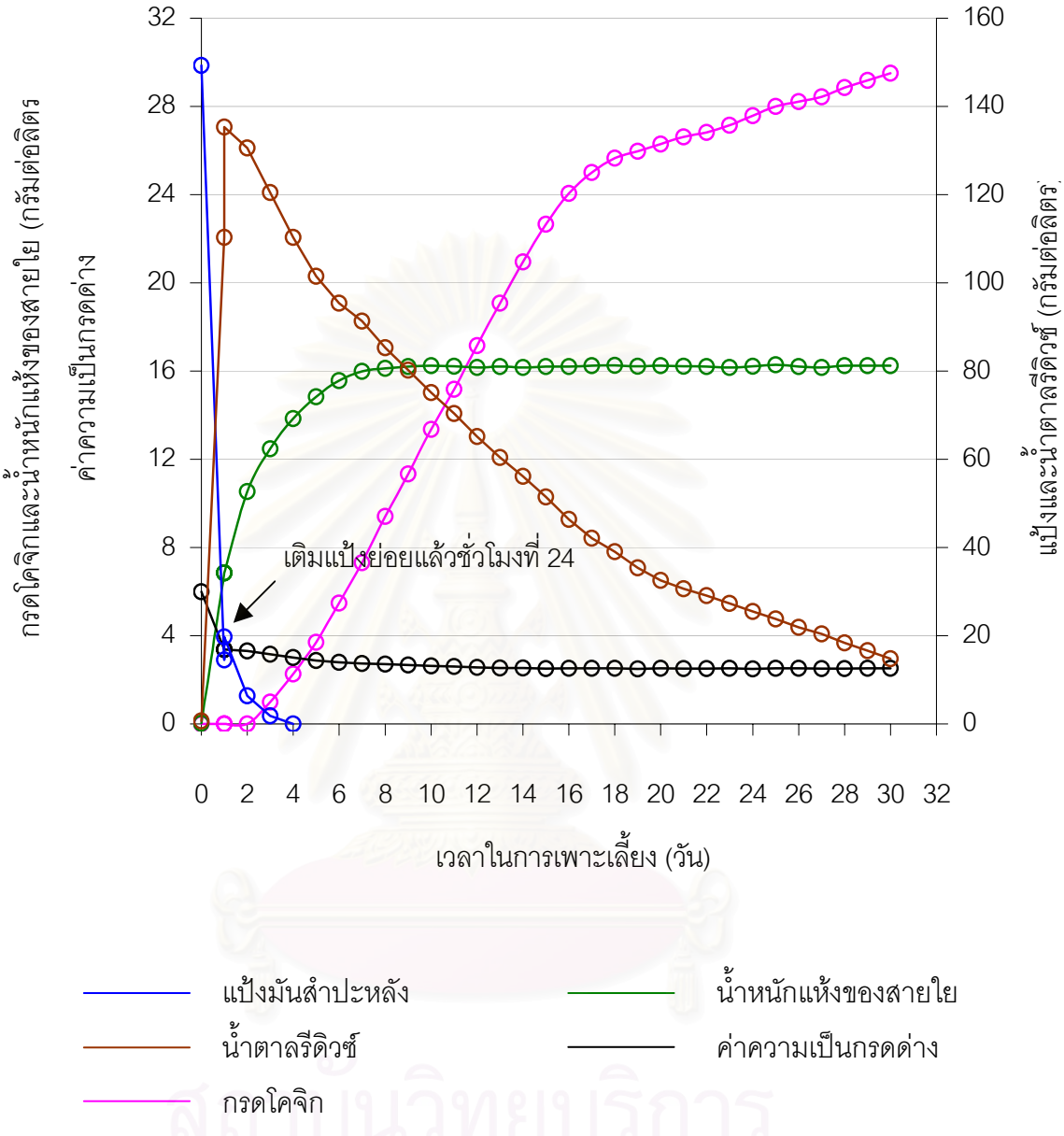
6.2 ผลการผลิตกรดโคจิกโดยการเติมสารละลายแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยมาแล้วด้วยจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิต

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับย่อยแป้งมันปะหลังปริมาตร 150 มิลลิลิตร ซึ่งมีเพียงแป้งมันสำปะหลัง 25 กรัมและสารสกัดจากยีสต์ 0.04 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นเท่ากับ 6.0 เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองสายใยออกด้วยตะแกรงตาถี่ขนาดรูพรุน 4 ช่องต่อตารางมิลลิเมตร แล้วนำน้ำหมักที่กรองได้ (คือแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งซึ่งย่อยแล้ว) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เติมลงในขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตรที่กำลังเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก4) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมตามการทดลองข้อ 14 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 24 พบว่ารามีการผลิตกรดโคจิกตั้งแต่วันที่ 3 แล้วเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันที่ 19 จะมีอัตราการผลิตกรดโคจิกต่ำที่สุด ให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 25.97 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นยังมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นไปเรื่อยๆ อย่างช้าๆ จนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง) เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองข้อ 6.1 ชุดที่ 2 จะเห็นว่าให้ผลผลิตที่สูงกว่า 2.14 กรัมต่อลิตรในเวลาที่เร็วขึ้นอีก 3 วัน และเทียบกับการผลิตแบบกะ จะเห็นว่าสามารถเพิ่มผลผลิตกรดได้อีก 4.27 กรัมต่อลิตรโดยใช้เวลาเพิ่มขึ้นอีก 2 วัน และมีน้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 16.22 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นเนื่องจากปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่อาจยังหลงเหลืออยู่ในสารละลายแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการ

ย่อยมาแล้วด้วยจุลินทรีย์ จึงทำให้มีสายใยมากพอในการให้ผลผลิตสูง โดยมีค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำสุดเท่ากับ 2.5 ตั้งแต่วันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไปจนสิ้นการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตกรดโคจิก ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก และอัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย กับการผลิตแบบกะ ดังแสดงในตารางที่ 12 พบว่า การเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนที่ใช้เติมในระหว่างการผลิตจากแป้งมันสำปะหลังสุกมาเป็นสารละลายแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยมาแล้วด้วย *A. oryzae* K-13 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ดี เนื่องจากสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังไปเป็นน้ำตาลในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงได้อย่างรวดเร็ว และถ้ามีการจัดภาวะให้เหมาะสมต่อการย่อยแป้ง ดังเช่นในการทดลองที่ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ช่วง 5.5 – 6.0 จะทำให้ย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ไปเป็นน้ำตาลได้หมดภายในเวลา 32 ชั่วโมงเท่านั้น จึงเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งที่น่าสนใจที่จะทำให้ได้ผลผลิตสูงขึ้น แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นเพียงการทดลองเบื้องต้นในการเติมแหล่งคาร์บอนในระหว่างการผลิตเพื่อเพิ่มผลผลิต ซึ่งหากต้องการให้วิธีการเติมแหล่งคาร์บอนในระหว่างการผลิตประสบความสำเร็จมากกว่านี้ คงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมเช่น เวลาที่จะเติมแหล่งคาร์บอน หรือปริมาณแหล่งคาร์บอนตั้งต้นและที่จะใช้เติมลงไปจำนวนครั้งในเติมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 24 ปริมาณกรดโคจิก แป้ง น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักแห้งของสายใย และค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 เมื่อใช้วิธีการเติมสารละลายแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยมาแล้วด้วย *A. oryzae* K-13 ระหว่างการผลิตในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะลี้ยง

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบในแป้งด้วยเครื่องวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบของสารอินทรีย์ ได้ผลว่าในแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัม จะมีคาร์บอน 38.5 กรัม และไนโตรเจน 0.1 กรัม เป็นองค์ประกอบ ที่สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13

2. ในการทดลองเบื้องต้นใช้สูตรอาหารที่ดัดแปลงจากสูตรของ รพี โรจนอุไร (2539) โดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลทรายมาเป็นแป้งมันสำปะหลัง พบว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่ดีที่สุดที่ทำให้การผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 ยังสามารถดำเนินต่อไปได้ดี เนื่องจากถ้าความเข้มข้นของแป้งมาก จะทำให้ความหนืดของอาหารเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อการเพาะเลี้ยงและการผลิต โดยให้ผลผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 6.60 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง

3. อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกคือ 385:2 โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตร และมีแหล่งไนโตรเจนในแป้งร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณ 0.24 กรัมต่อลิตร

4. ภาวะบางประการที่มีความสำคัญต่อการใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตกรดโคจิก คือ การจัดค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 สามารถเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกที่สูงกว่าค่าอื่น และดีกว่าการจัดค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2 ช่วง โดยมีผลผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 15.18 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง

5. เมื่อปรับปรุงสูตรอาหารให้เหมาะต่อการผลิตกรดโคจิก พบว่าสูตรอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง สารสกัดจากยีสต์ และแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณ 150 0.5 และ 0.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ผลผลิตสูงกว่าสูตรอื่น

6. การจัดสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก ภายใต้ภาวะที่ดีที่สุดจากการทดลองข้างต้น พบว่า สามารถให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 21.70 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการผลิต 17 วัน ซึ่งสูงกว่าผลผลิตกรดโคจิกเมื่อตอนเริ่มต้นวิจัย โดยที่ยังไม่ได้ปรับปรุงสูตรอาหารและภาวะในการเพาะเลี้ยงถึง 15.10 กรัมต่อลิตร และลดระยะเวลาในการให้ผลผลิตสูงสุดลงไป 1 วัน

7. เมื่อทดลองปรับปรุงการผลิตกรดโคจิกด้วยวิธีการเติมแหล่งคาร์บอนในระหว่างการผลิต พบว่าการเติมสารละลายแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยมาแล้วด้วย *A. oryzae* K-13 (จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้) สามารถเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกขึ้นอีก 4.27 กรัมต่อลิตรโดยใช้เวลาใน

การผลิตเพิ่มขึ้นเพียง 2 วัน เมื่อเทียบกับการผลิตแบบกะ ซึ่งแสดงว่าการเติมแหล่งคาร์บอนระหว่างการผลิตเป็นทางเลือกสำหรับการผลิตกรดโคจิกได้อีกทางหนึ่ง

8. สามารถสรุปได้ว่าประสบความสำเร็จในการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกโดยวิธีการเติมสารอาหาร (แหล่งคาร์บอน) ระหว่างการเพาะเลี้ยง เช่น ระยะเวลาที่จะเติมสารอาหาร ปริมาณสารอาหารที่จะเติม หรืออาจมีการเพิ่มสารอาหารอื่นๆ พร้อมกับแหล่งคาร์บอนที่เติมระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วย

2. ควรมีงานวิจัยขั้นต่อไปโดยการขยายส่วนผลิตในถังหมักที่มีการกวนและการให้อากาศ เนื่องจากในงานวิจัยนี้ให้ผลผลิตกรดสูงน่าสนใจ โดยใช้วัตถุดิบราคาถูก และหาง่ายภายในประเทศ

3. ควรมีงานวิจัยที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างลงให้มีค่าเท่ากับ 2.5 เมื่อเพาะเลี้ยงราจนมีการเติบโตคงที่แล้ว เนื่องจากเป็นช่วงที่มีปริมาณสายใยอย่างเพียงพอในการผลิตกรดโคจิก และมีอัตราการผลิตกรดโคจิกที่สูงอีกด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กนิษฐา ภูวนาถนรานุบาล. 2542. การเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 บนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อการผลิตกรดโคจิก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชมจิต ท้าวธงไชย. 2544. การผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 บนผิวหน้าอาหารเหลวในถาดาตื้น. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เพชรรุ่ง พันธ์พิริยะ. 2536. การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อการผลิตกรดโคจิก. รายงานการวิจัยโครงการส่งเสริมประสบการณ์การเรียนการสอนในเชิงวิทยาศาสตร์ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รพี โรจนอุไร. 2539. ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในระดับขวดเขย่า. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วาสนา แสงพิทักษ์. 2528. การย่อยแป้งด้วยเชื้อราที่ถูกตรึง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรศักดิ์ นานานุกุล. 2525. การบริหารงานผลิต. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด.

อุษา สรรค์วัฒนา. 2543. การผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลทรายโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในถังหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Ariff, A.B., Salleh, M. S., Ghani, B., Hassan, M. A., Rusul, G., and Karim, M. I. A. 1996. Aeration and yeast extract requirements for kojic acid production by *Aspergillus flavus* link. Enzyme and Microbial Technology 19(7): 545-550.

Armit, J. W., and Nolan, T. J. 1931. Derivatives of kojic acid. Journal of the Chemical Society Part II: 3023-3031.

Arnstein, H. R. V., and Bentley, R. 1951. The mechanism of alkaline cleavage of some γ–pyrones. Journal of the Chemical Society: 3436-3439.

Arnstein, H. R. V., and Bentley, R. 1953. The biosynthesis of kojic acid. Biochemical Journal 54: 493-522.

Bajpai, P., Agranal, P. K., and Vishwanathan, L. 1982. Kojic acid: synthesis and properties. Journal of Scientific and Industrial Research 41(3): 185-194.

Barbesgaard, P., Heldt-Hansen, H. P., and Diderichsen, B. 1992. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. Applied Microbiology and Biotechnology 36: 569-572.

Barham, H. N., and Smits, B. L. 1936. Production of kojic acid from xylose by *Aspergillus flavus*. Industrial and Engineering Chemistry 28: 567-570. Cited in Beelik, A. 1956. Kojic acid. Advances in Carbohydrate Chemistry 11: 145-183.

Basappa, S. C., Sreenwasamurthy, V., and Parpia, H. A. B. 1970. Alfatoxin and kojic acid production by resting cells of *Aspergillus flavus* link. Journal of General Microbiology 61: 81-86.

Beelik, A. 1956. Kojic acid. Advances in Carbohydrate Chemistry 11: 145-183.

Bentley, T. 1957. Preparation and analysis of kojic acid. In S. P. Colowich and N. O. Kaplan (eds.), Methods in Enzymology 24: 238-241. New York: Academic Press.

Bernfeld, P. 1955. Amylase α and β. In S. P. Colowich and N. O. Kaplan (eds.), Methods in Enzymology 1: 149. New York: Academic Press.

Bhat, R., and Hadi, S. M. 1994. Photoinactivation of bacteriophage lambda by kojic acid and Fe(III): role of oxygen radical intermediateds in the reaction. Biochemistry and Molecular Biology International 32(4): 731-735.

Bigelis, R., and Tsai, S. P. 1995. Microorganisms for Organic Acid Production. In Y. H. Hui and G. G. Khachatourians (eds.), Food Biotechnology Microorganisms. pp. 264-265. New York: VCH Publishers.

Birkinshaw, J. H., Charles, J. H. V., Lilly, C. H., and Raistrick, H. 1931. Studies in the biochemistry of microorganisms: VII kojic acid (5-hydroxy-2-hydroxymethyl-γ-pyrone). Transactions of the Royal Society of London B220: 127. Cited in Beelik, A. 1956. Kojic acid. Advances in Carbohydrate Chemistry 11: 145-183.

Bryant, B.E., and Fernelius, W. C. 1954. Some metal complexes of kojic acid. The Journal of the American Chemical Society 76: 5351-5352.

Cabanes, J., Chazarra, S., and Garciacarmona, F. 1994. Kojic acid, A cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. Journal of Pharmacy and Pharmacology 46(12): 982-985.

Caravan, P., *et al*. 1995. Reaction chemistry of BMOV, bis(maltolato)oxovanadium (IV)- a potent insulin mimetic agent. The Journal of the American Chemical Society 117: 12759-12770.

Challenger, F., Klein, L., and Walker, T. K. 1929. The production of kojic acid from pentoses by *Aspergillus oryzae*. Journal of the Chemical Society Part II: 1498-1505.

Challenger, F., Klein, L., and Walker, T. K. 1931. The formation of kojic acid from sugars by *Aspergillus oryzae*. Journal of the Chemical Society : 16-23.

Cole, R. J., and Cox, R. H. 1981. *Aspergillus* toxins. Handbook of toxic fungal metabolites. pp. 759-763. New York: Academic Press, Inc. Cited in Prescott, N. S., and Dunn, C. G. 1959. Industrial Microbiology. pp. 609-617. New York: McGraw-Hill book company.

Corbellini, A., and Gregorini, B. 1930. La formazione dell'acido kojico dagli idrati di carbonione azione dell' *Aspergillus flavus*. Gazzetta Chimica Italiana 60: 244-256. Cited in Beelik, A. 1956. Kojic acid. Advances in Carbohydrate Chemistry 11: 145-183.

Crueger, W., and Crueger, A. 1990. Organic acids. In T. D. Brock (ed.). Biotechnology: A textbook of industrial microbiology. 2nd ed. p. 148. Sunderland: Sinauer Associates.

Di-Capua, A. 1933. Azione del ferro sulla formazione di acido kojico per mezzo di *Aspergillus flavus*. Gazzetta Chimica Italiana 63: 296-302. Cited in Beelik, A. 1956. Kojic acid. Advances in Carbohydrate Chemistry 11: 145-183.

Dowd, P. F. 1990. Kojic acid and esters as insecticide synergists. U.S. Patent, 4,956,353.

Fogarty, W. M., and Kelly, C. T. 1979. Starch debranching enzyme of microbial origin. In M. J. Bull (ed.). Progress in industrial microbiology vol. 15, pp. 87-123. New York: Elsevier Scientific Publishing.

Foster, J. W., and Karow, E. O. 1945. Microbiological aspects of penicillin: VIII penicillin from different fungi. Journal of Bacteriology 49: 19-29.

Gupta, S. R., Viswanathan, L., and Venkitasubramanian, T. A. 1971. A comparative study of toxigenic and non-toxigenic strains of *Aspergillus flavus*. Journal of General Microbiology 65: 243-247.

Ikeda, Y. 1954. Kojic acid fermentation: III production of reductone substance and its antibiotic activity. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan 26 (1952): 90-95. Chemical Abstracts 48: 10113.

Jennings, M.A., and Williams, T. I. 1945. Production of kojic acid by *Aspergillus effusus* Tiraboshi. Nature 155: 302. Cited in Beelik, A. 1956. Kojic acid. Advances in Carbohydrate Chemistry 11: 145-183.

Kane, W. C. O., and Morey, G. H. 1949. Fungicidal compositions. U.S. Patent, 2,460,188. Chemical Abstracts 43: 4419.

Katagiri, H., and Kitahara, K. 1930. The formation of kojic acid by *Aspergillus oryzae*: I The formation of kojic acid from pentoses, sugar alcohols and gluconic acid. Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan 5 (1929): 38-47. Chemical Abstracts 24: 3813-3814.

Katagiri, H., and Kitahara, K. 1933. Formation of kojic acid by *Aspergillus oryzae*. Memoirs of the College Agriculture Kyoto University No. 26 (1933): 1-29. Chemical Abstracts 27: 3235-3236.

Kavanagh, F. 1947. Activities of twenty-two antibacterial substances against nine species of bacteria. Journal of Bacteriology 54: 761-766.

Kayahara, H., Ohashi, A., Tadasa, K., and Kato, S. 1990. N-protected tripeptide inhibitors of angiotensin converting enzyme. Agricultural and Biological Chemistry 54(5): 1325-6.

Kinoshita, K. 1928. Growth of molds on cobaltammine salt. Acta Phytochim 3 (1927): 35-50. Chemical Abstracts 22: 1990.

Kitada, M., Ueyamma, H., Suzuki, E., and Fukimbara, T. 1967. Studies on kojic acid fermentation, (1) Cultural condition in submerged culture. Journal of Fermentation Technology 45: 1101-1107. Cited in Kwak, M. Y., and Rhee, J. S. 1992b. Cultivation characteristics of immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production. Biotechnology and Bioengineering 39(8): 903-906.

Kouno, N., and Suzuki, J. 1994. Acid dye stainning method. JPX Patent. 5,284560.

Kwak, M. Y., and Rhee, J. S. 1992a. Controlled mycelial growth for kojic acid production using Ca-immobilized fungal cells. Applied Microbiology and Biotechnology 36(5): 578-583.

Kwak, M. Y., and Rhee, J. S. 1992b. Cultivation characteristics of immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production. Biotechnology and Bioengineering 39(8): 903-906.

Lane, J. H., and Eynon, L. 1928. Starch. Cambridge: Heffer. Cited in Lyne, F. A. 1976. Determination of Starch in Various Products. In J. A. Readley (ed.), Examination and Analysis of Starch and Starch Products. p. 179. London: Appied Science Publishers.

Lee, H. F., Boltjes, B., and Eisenman, W. 1950. Kojic acid as an inhibitor of tubercle bacilli. The American Review of Tuberculosis 61: 738-741.

Masateru, M., and Shone, E. L. 1989. Aralkoxy and aryloxyalkoxy kojic acid derivatives. US Patent. 4,644,071.

Maurer, K. 1930. Die ueberfuhrung von einfachen zuckern in γ–pyron-derivate und die darstellung weiterer ungesattigter anhydro-zucker, III. Berichte de Deutschen Chemischen Gesellschaft 63B: 25-34. Cited in Beelik, A. 1956. Kojic acid. Advances in Carbohydrate Chemistry 11: 145-183.

May, O. E., Moyer, A. J., Wells, P. A., and Herrick, H. T. 1931. The production of kojic acid by *Aspergillus flavus*. Journal of the American Chemical Society 53(1): 774-782.

Mayer, E. L., Talley, F. B., and Woodword, C. F. 1947. Nicotine insecticides II: Search for activators. Bureau Entomological Plant Quarantine E-709, 1946: 1-16. Chemical Abstracts 41: 2528-2529.

Miyano, M., and Hider, R. C. 1989. Aralkoxy and aryloxyalkoxy kojic acid derivatives. U.S. Patent, 4,812,584.

Morton, H. E., Kocholaty, W., Kocholaty, R. J., and Kelner, A. 1945. Toxicity and antibiotic activity of kojic acid produced by *Aspergillus luteo-virescens*. Journal of Bacteriology 50: 579-584.

Niwa, Y., and Akamastsu, H. 1991. Kojic acid scavenges free radicals while potentiating leukocyte functions including free radical generation. Inflammation 15(4): 303-315.

Ogawa, A., Wakisaka, Y., Tanaka, T., Sakiyama, T., and Nakanishi, K. 1995. Product of kojic acid by membrane-surface liquid culture of *Aspergillus oryzae* NRRL484. Journal of Fermentation and Bioengineering 80(1): 41-45.

Ohara, I. 1954. Classification of the *Aspergillus tamarii-oryzae* group: I the production of kojic acid from various compounds as an aid in identification. Research Bulletin of the Faculty Agricultural Gifu University No.1 (1951): 71-85. Chemical Abstracts 48: 12883.

Oxford, A. E. 1942. Antibacterial substances from molds: bact III some observations on the bacteriostatic powers of the mold products citrinin and penicillic acid. Journal of the Society of Chemical Industry 61: 48. Cited in Beelik, A. 1956. Kojic acid. Advances in Carbohydrate Chemistry 11: 145-183.

Prescott, N. S., and Dunn, C. G. 1959. The kojic acid fermentation. Industrial Microbiology. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Book Company. pp. 609-618.

Rosfarizan, M., Ariff, A. B., Hassan, M. A., and Karim, M. I. A. 1998a. Kojic acid production by *Aspergillus flavus* using gelatinized and hydrolyzed sago starch as carbon sources. Folia Microbiologica (Praha) 43(5): 459-464.

Rosfarizan, M., Madihah, S., and Ariff, A. B. 1998b. Isolation of a kojic acid-producing fungus capable of using starch as a carbon source. Letters in Applied Microbiology 26: 27-30.

Saito, K. 1907. Ueber die sauerbildung bei *Aspergillus* oryzae. Journal of Botany (Tokyo) 21: 240. Cited in May, O. E., Moyer, A. J., Wells, P. A., and Herrick, H. T. 1931. The production of kojic acid by *Aspergillus flavus*. Journal of the American Chemical Society 53(1): 774-782.

Sakaguchi, K., Asai, I., and Ikeda, Y. 1948. Kojic acid fermentation. Journal of the Agricultural and Chemical Society of Japan 19 (1943): 711-718. Chemical Abstracts 42: 5508.

Stacey, M., and Turton, L. M. 1946. Tetra-acetyl glucosone hydrate: a novel route to the syntheses of analogues of ascorbic acid and a possible mechanism for the transformation of hexoses into kojic acid. Journal of the Chemical Society Part II: 661-665.

Street, H. V., and Close, J. R. 1956. The starch-iodine colour method. Clinica Chimie Acta 1: 256.

Takahashi, T., and Asai, T. 1933. Formation of fructose and kojic acid by acetic acid bacteria. Proceeding of the Impact Academy of Tokyo 8 (1932): 364-366. Chemical Abstracts 27: 1026.

Takami, M., Hidaka, N., Miki, S., and Suzuki, Y. 1994. Enzymetic synthesis of novel phosphatidylkojic acid and phosphatidylarbutin, and their inhibitory effects on tyrosinase activity. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 58(9): 1716-1717.

Tamiya, H. 1932. Physiology of the assimilation of *Aspergillus oryzae*: IV The suitability of different organic compounds as building materials and sources of energy for the mildew fungus. Acta Phytochim 6 (1932): 1-129. Chemical Abstracts 26: 4627-4628.

Tamiya, H., and Hida, T. 1930. Comparative studies on acid formation, respiration, oxidase reaction and dehydrogenating power of some *Aspergillus* species. Acta Phytochim 4 (1929): 343-361. Chemical Abstracts 24: 2496.

Tamiya, I. H. 1928. Metabolism of *Aspergillus oryzae* I. Acta Phytochim 3 (1927): 51-173. Chemical Abstracts 22: 1990.

Traetta, M. F. 1914. La fermentazione di alcuni zuccheri, mediante l'*Aspergillus glaucus*, con alcune considerazioni sulla fermentazioni alcoolica. Annales de Chimie Applie 1: 477-492. Cited in Beelik, A. 1956. Kojic acid. Advances in Carbohydrate Chemistry 11: 145-183.

Traetta, M.F., and Preti, M. 1921. Azione dell' *Aspergillus* glaucus sulla glicerina. Gazzetta Chimica Italiana 51(II): 269-277. Cited in Beelik, A. 1956. Kojic acid. Advances in Carbohydrate Chemistry 11: 145-183.

Voet, D., and Voet, J. G. 1995. Sugars and polysaccharides. Biochemistry. 2nd ed. pp. 262-263. New York: John Wiley & Sons.

Wei, C. I., Huang, T. S., Chen, J. S., Marshall, M. R., and Chung, K. T. 1991. Production of kojic acid by *Aspergillus candidus* in three culture media. Journal of the Food Protection 54: 546-548.

Wilson, M. J. 1981. Melanin pigment production. In L. M. Schwartz and M. M. Azar (eds.). Advanced cell biology. p. 501. New York: Van Nostrand Reinhold Company.

Windish, W., and Mhatre, N. S. 1965. Microbial amylase. In W. Windish (ed.). Advance in Applied Microbiology Vol.7, pp. 273-297. New York: Academic Press.

Yabuta, T. 1913. Kojic acid, a new organic acid formes by *Aspergillus oryzae*. Applied Chemistry 25 (1912): 455-462. Chemical Abstracts 7: 2191-2192.

Yabuta, T. 1923. A new organic acid (kojic acid) forms by Aspergillus oryzae. Journal of the Chemical Society 37 (1916): 1185-1269. Chemical Abstracts 17: 1475-1476.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็งโปเตโตเด็กซ์โตรส (PDA)
   ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเด็กซ์โตรส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

เตรียมโดยนำมันฝรั่งมาล้างให้สะอาด ปอกเปลือก ชั่งให้ได้น้ำหนัก 200 กรัมแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ต้มในน้ำเดือดนาน 15-20 นาที กรองเอาส่วนน้ำออกมาเติมส่วนประกอบที่เหลือ ละลายให้เข้ากัน เติมน้ำปราศจากอิออนให้ครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกล้าเชื้อ (ดัดแปลงจากรพี โรจนอุไร, 2539)
   ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลัง	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1	กรัม

เติมน้ำปราศจากอิออนจนครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิก (ดัดแปลงจากรพี โรจนอุไร, 2539)
   ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลัง	100	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.5	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.24	กรัม

(มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 385 : 2)

เติมน้ำปราศจากอิออนจนครบ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลัง
ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลัง	150	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.5	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.48	กรัม

เติมน้ำปราศจากอิออนจนครบ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.4 นอร์มอล แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ในอาหารสูตรนี้มีค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 385 : 2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
วิธีเตรียมสารเคมีที่สำคัญที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายเฟอริกคลอไรด์

เตรียมโดย

ละลายเฟอริกคลอไรด์ 5 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก

เตรียมโดย

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 5 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บนอ่างน้ำร้อน คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ในขณะเดียวกันก็ละลายโซเดียมโปตัสเซียมตาร์เตรต 150 กรัมด้วยน้ำปราศจากอิออน 250 มิลลิลิตร บนอ่างน้ำร้อน คนให้ละลายจนหมด แล้วเทลงไปผสมกับสารละลายข้างต้น เติมน้ำปราศจากอิออนให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3. สารละลายอะซิโตไนไตรล์เข้มข้น 74 เปอร์เซ็นต์

เตรียมโดย

ตวงอะซิโตไนไตรล์ปริมาตร 74 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากอิออนให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร นำไปไล่ฟองอากาศโดยใช้เครื่องดูดสูญญากาศ (ควรเตรียมสารละลายใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

4. สารละลายไอโอดีน

เตรียมโดย

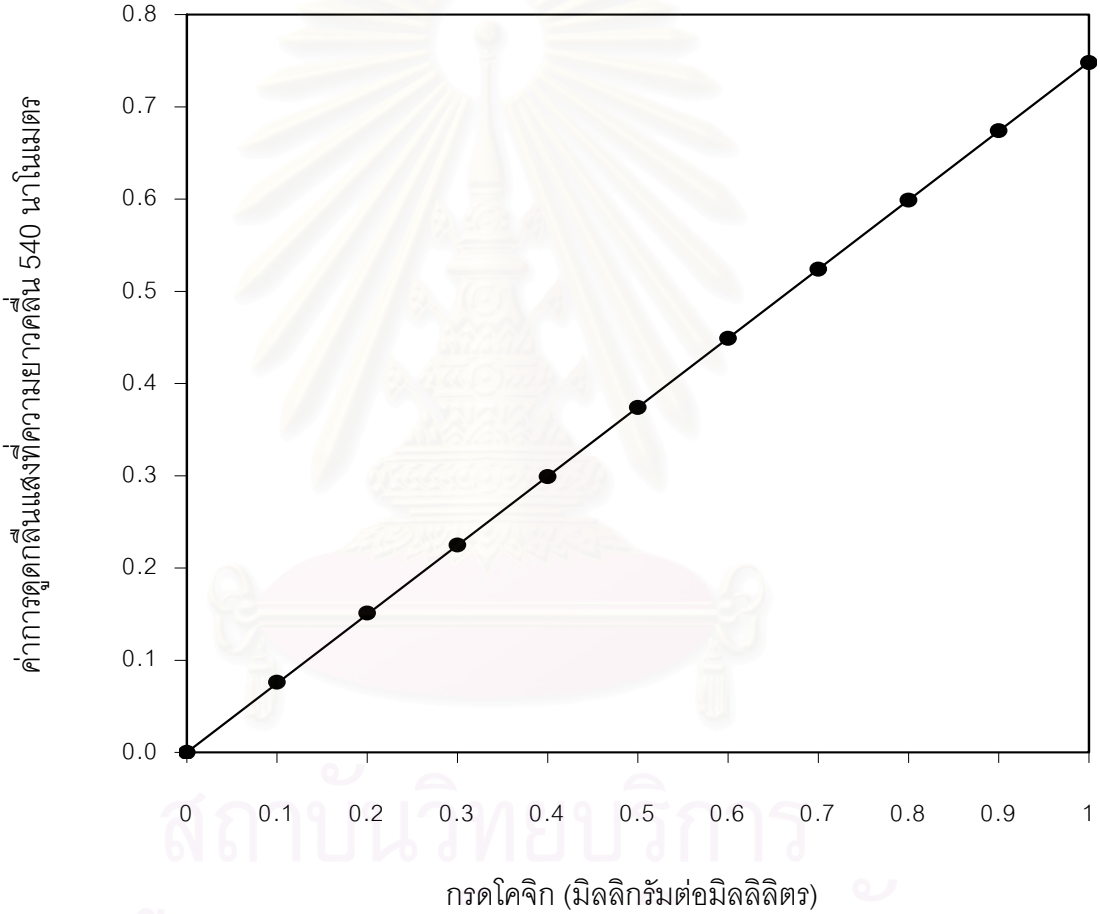
ละลายเกล็ดไอโอดีน 0.5 กรัม และโปตัสเซียมไอโอไดด์ 5 กรัมในน้ำปราศจากอิออนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่หุ้มฟอยด์

ก่อนใช้ต้องนำมาเจือจางโดยนำสารละลายไอโอดีนข้างต้น 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำปราศจากอิออนปริมาตร 200 มิลลิลิตร (ควรเตรียมสารละลายใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

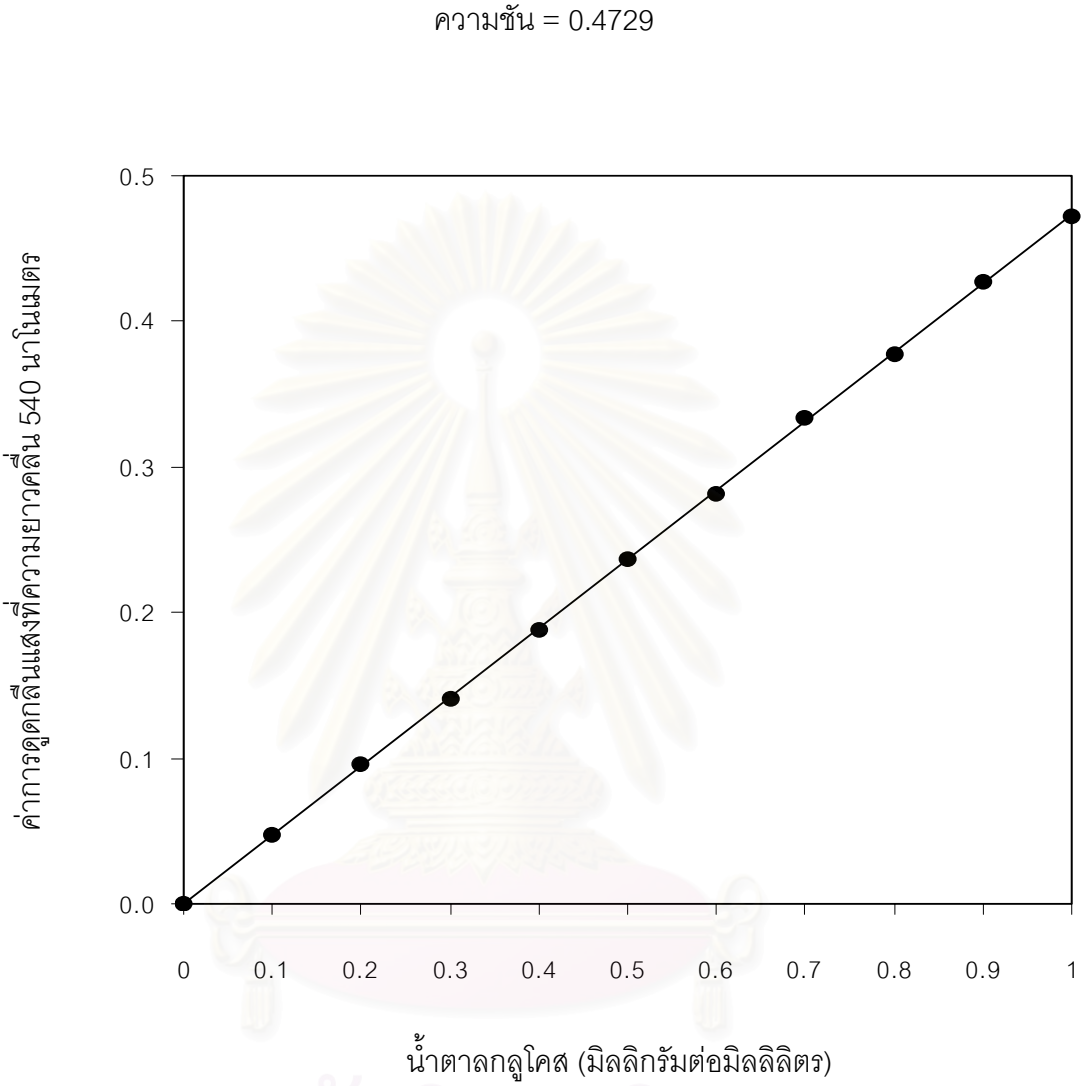
1. กราฟมาตรฐานของกรดโคจิก เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกด้วยวิธีของ Bentley (1957)

ความชัน = 0.7485



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

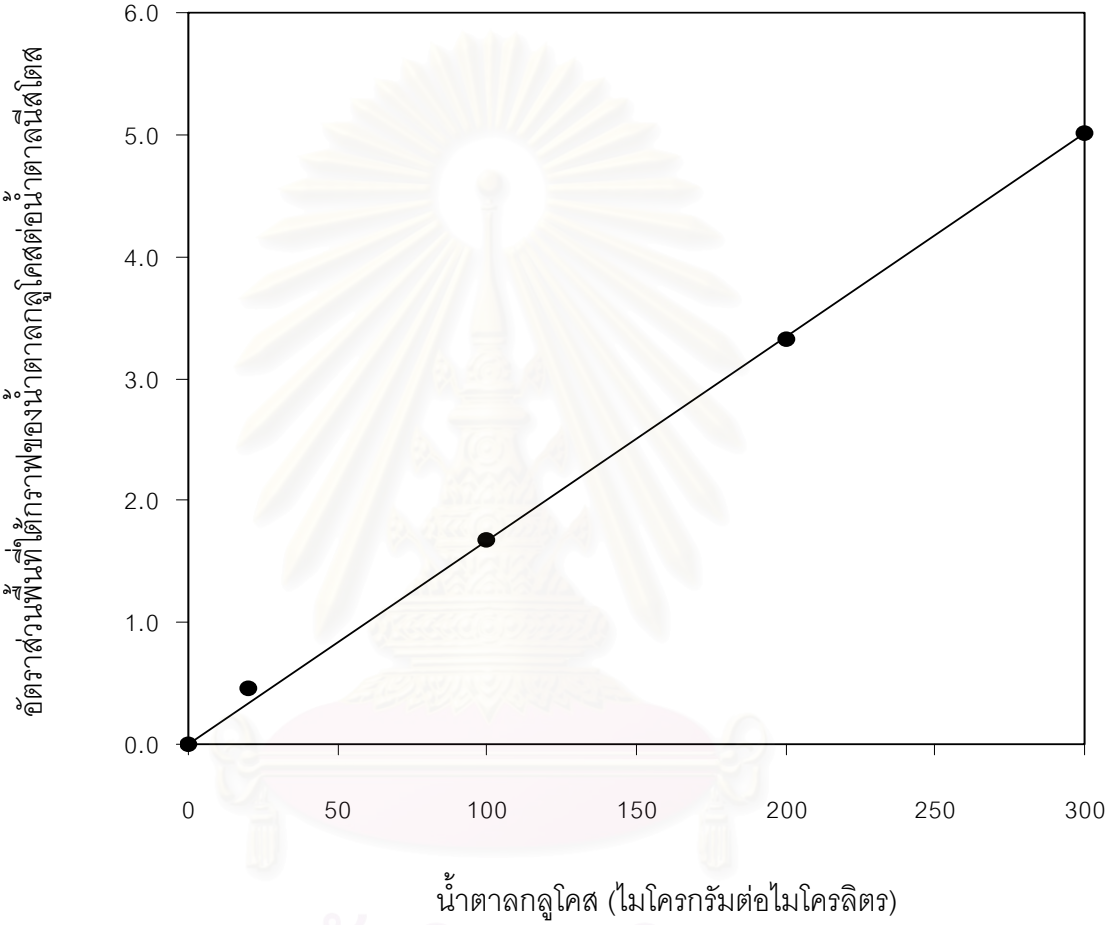
2. กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีของ Bernfeld (1955)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

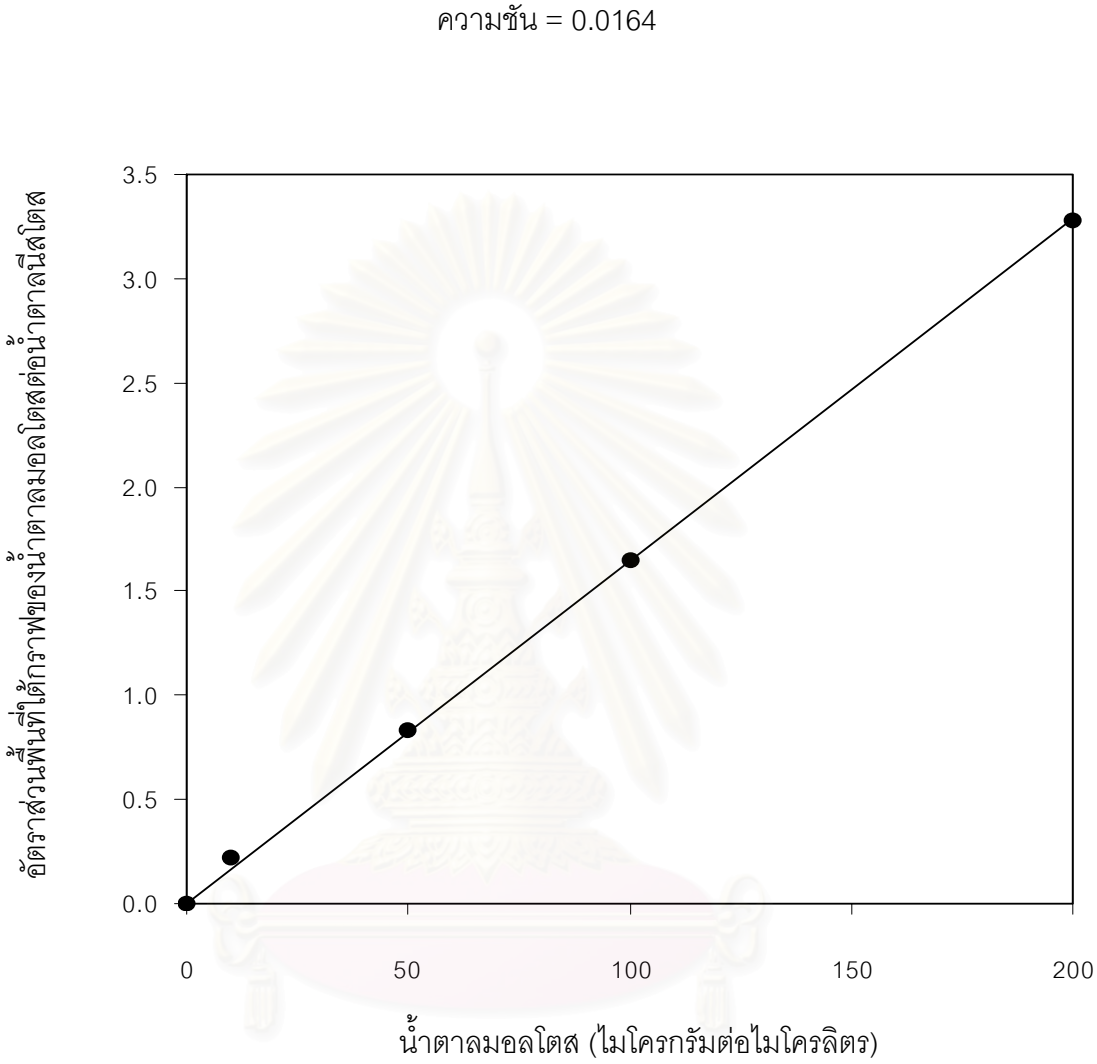
3. กราฟมาตรฐานของการหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ความชัน = 0.0167



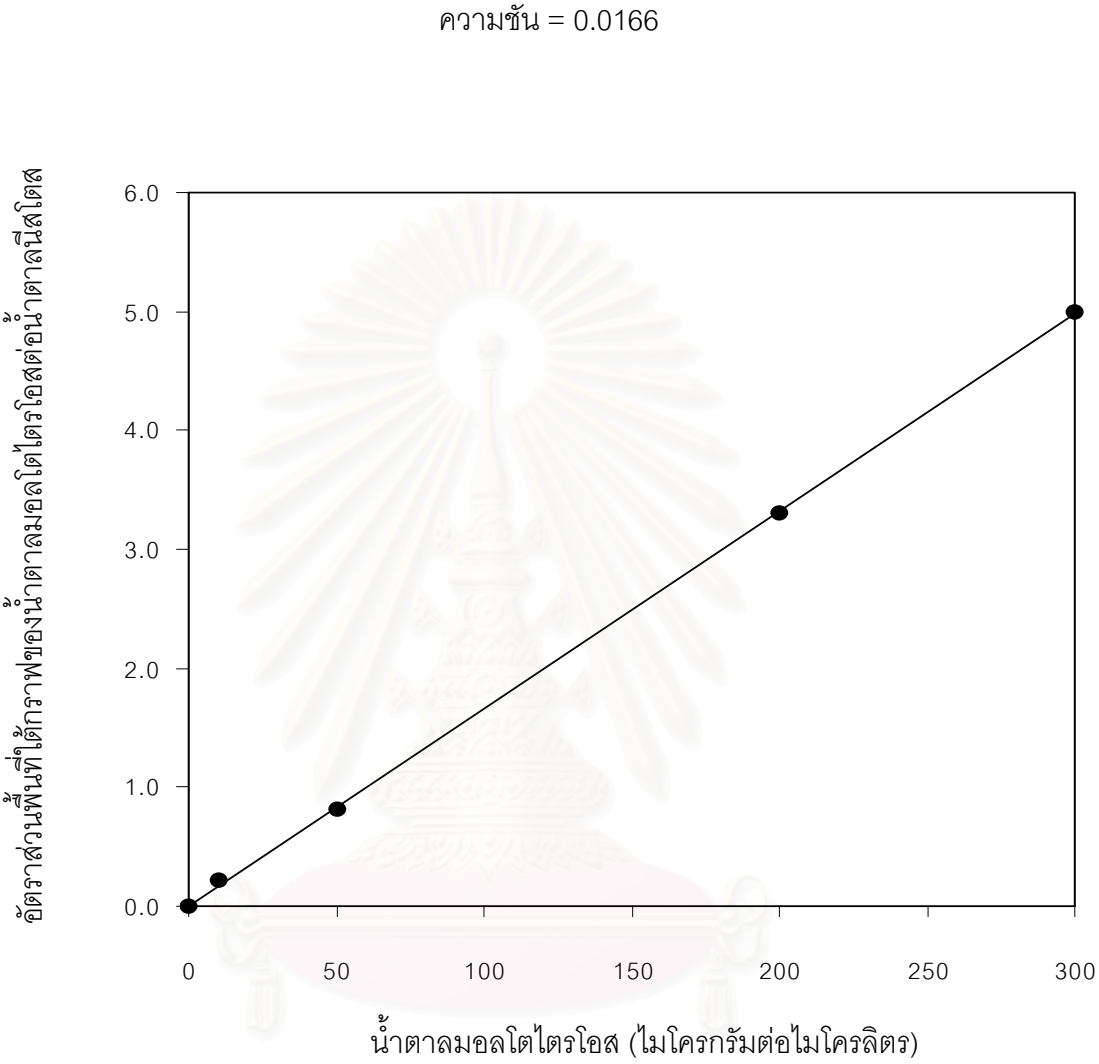
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. กราฟมาตรฐานของการหาปริมาณน้ำตาลมอลโตสเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



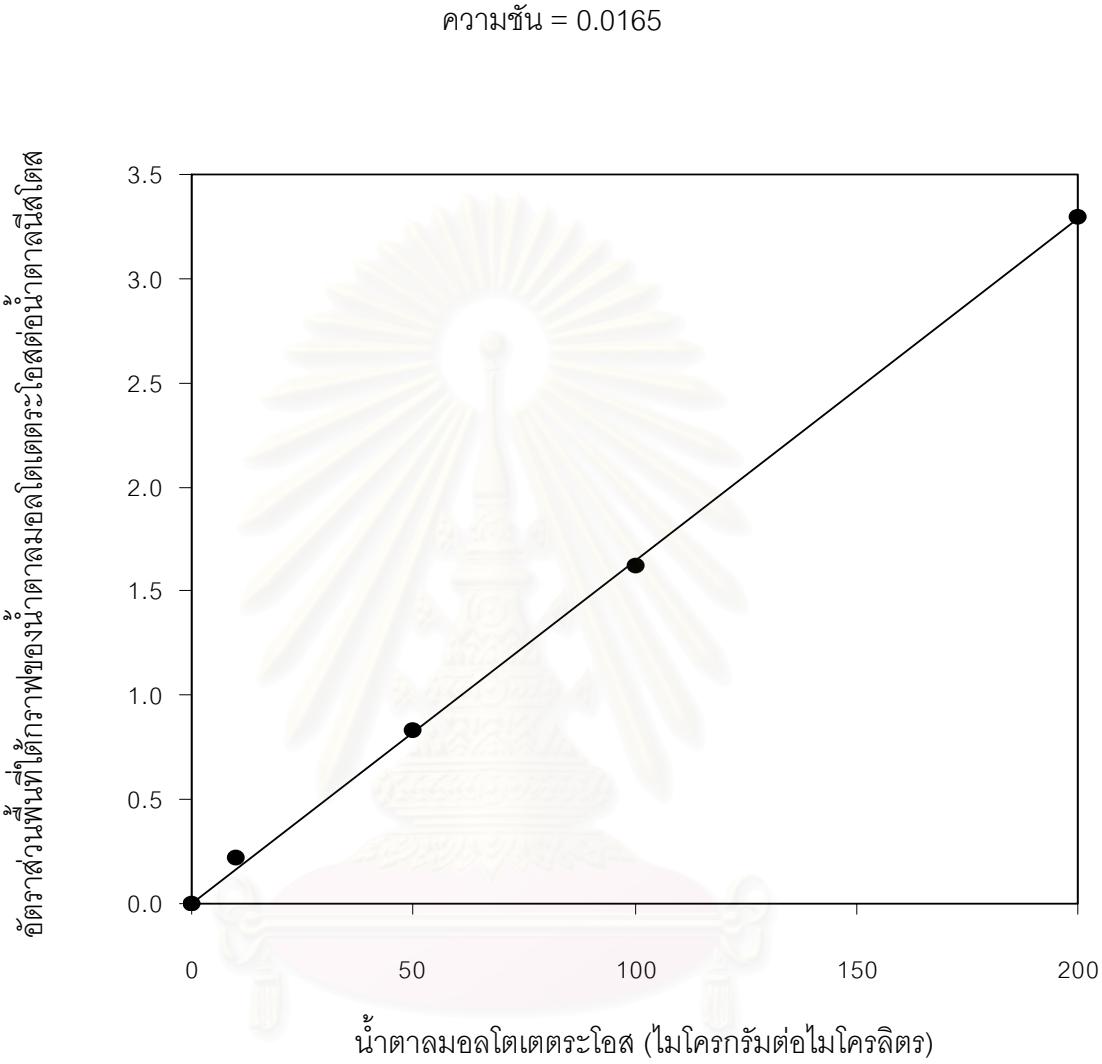
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. กราฟมาตรฐานของการหาปริมาณน้ำตาลมอลโตไตรโอสเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

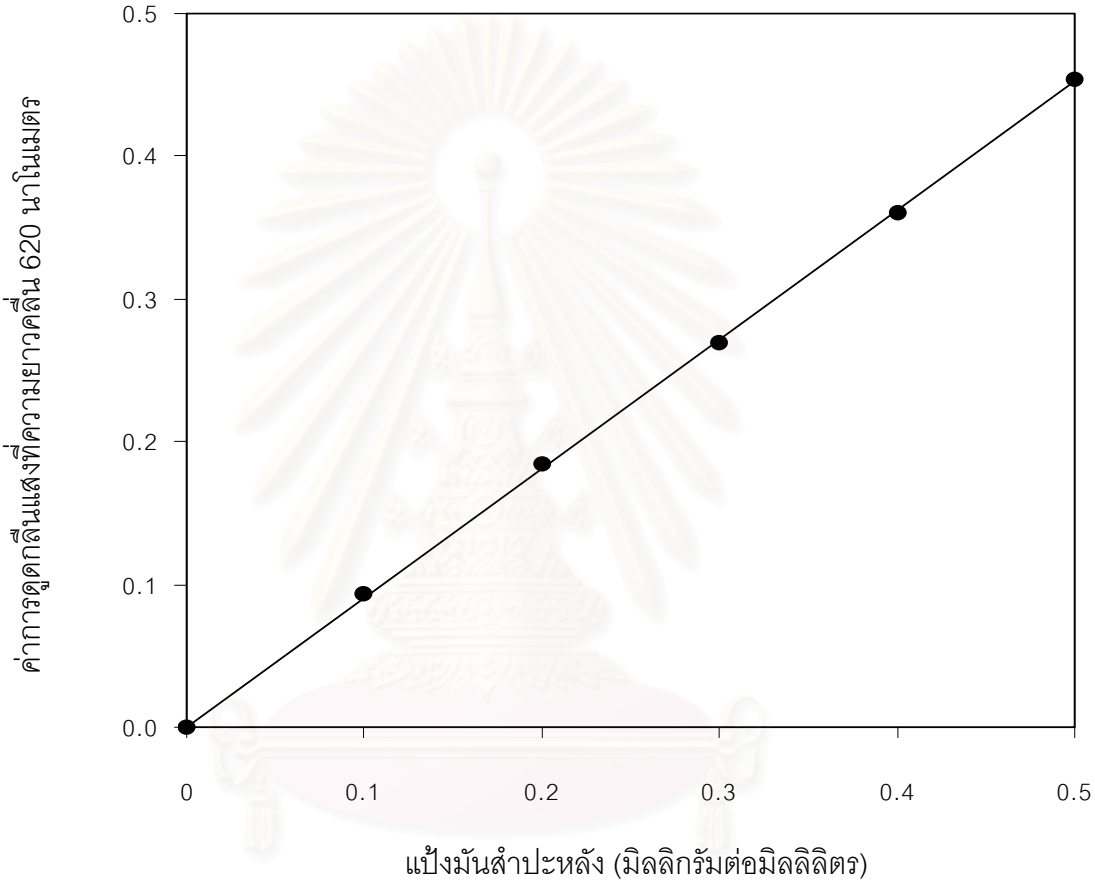
6. กราฟมาตรฐานของการหาปริมาณน้ำตาลมอลโตเตตระโอสเมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. กราฟมาตรฐานแป้งมันสำปะหลังเมื่อวิเคราะห์ปริมาณแป้งด้วยวิธีของ Street & Close (1956)

ความชัน = 0.9057



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง
การคำนวณหาปริมาณสารที่สำคัญ

1. การหาปริมาณคาร์บอนในแป้งมันสำปะหลังด้วยเครื่องวิเคราะห์ธาตุองค์ประกอบของสารอินทรีย์ (ใช้บริการศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

ผลการวิเคราะห์

ตัวอย่าง	% คาร์บอนโดยมวล	% ไฮโดรเจนโดยมวล	% ไนโตรเจนโดยมวล
ซ้ำที่ 1	38.426	6.123	0.105
ซ้ำที่ 2	38.626	6.312	0.092
เฉลี่ย	**38.526**	**6.218**	**0.099**

2. การคำนวณหาปริมาณกรดโคจิกในตัวอย่างน้ำหมักเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Bentley (1957)

จากกราฟมาตรฐานของกรดโคจิก เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกด้วยวิธีของ Bentley (1957) (ภาคผนวก ค1) ให้ค่าความชันเท่ากับ 0.7485 นำที่ได้มาคำนวณหาปริมาณกรดโคจิกในตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 จากสูตร

$$\text{ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร x ค่าการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน}}$$

3. การคำนวณหาปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆในตัวอย่างน้ำหมักเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลชนิดต่างๆ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งมีน้ำตาลนีสโตสเป็นสารมาตรฐานภายใน (ภาคผนวก ค3-6) ให้ค่าความชันเท่ากับ 0.0167 0.0164 0.0166 และ 0.0165 ตามลำดับ นำที่ได้มาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ ในตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 จากสูตร

$$\text{ปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของน้ำตาลชนิดนั้นในน้ำหมักต่อน้ำตาลนีสโตส x ค่าการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันจากกราฟมาตรฐานน้ำตาลชนิดนั้น}}$$

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-นามสกุล นายสุวทัย รชตอาชา

เกิดเมื่อวันที่ 19 มกราคม พ.ศ. 2520

ภูมิลำเนา กรุงเทพมหานคร

การศึกษา

- ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (ประสานมิตร) สำเร็จการศึกษาเมื่อปีการศึกษา 2541
- พ.ศ. 2542 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย