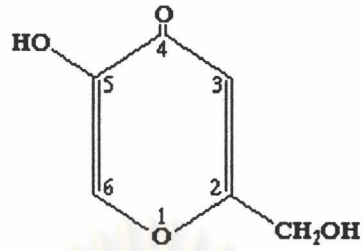
บทที่ 1

บทนำ

กรดโคจิก (Kojic acid: $C_6H_6O_4$) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง มีชื่อทางเคมีว่า 5 - hydroxy - 2 - hydroxymethyl - γ - pyrone หรือ 5 - hydroxy - 2 - hydroxymethyl - 4H - pyrone หรือ 5 - hydroxy - 2 - hydroxymethyl - 4H - pyran - 4 - one (อ้างถึงใน Prescott และ Dunn, 1959; Bajpai และคณะ, 1982a; Merck, 1989; Lokoj และคณะ, 1991) กรดโคจิกจัดเป็นสารประกอบในกลุ่มไพโรนที่ขาดหมู่คาร์บอกซิล สมบัติของกรดจึงเกิดจากหมู่อิโนลิกไฮดรอกซิล (enolic hydroxyl group) (Casida, 1968) ซึ่งอยู่ตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 มีผลให้กรดโคจิกมีสมบัติเป็นกรดอย่างอ่อน สามารถเกิดปฏิกริยากับอิออนของโลหะต่างๆ กลายเป็นเกลือของกรดได้ โดยโลหะที่สามารถทำปฏิกริยาร่วมกับกรดโคจิก เช่น โซเดียม แบเรียม แคลเซียม สตรอนเซียม โคบอลล์ ทองแดง นิเกิล เหล็ก แมกนีเซียม แคดเมียม พลวง สังกะสี อลูมิเนียม และอื่นๆ (Wiley และคณะ, 1942; Bryant และ Fernelius, 1954; อ้างถึงใน Bajpai และคณะ, 1982a) ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก 1 โมเลกุลประกอบด้วย คาร์บอน 50.71 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจน 4.26 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจน 45.03 เปอร์เซ็นต์ (Merck, 1989) สมบัติทางกายภาพของกรดโคจิก คือ ผลึกของกรดเป็นรูปเข็มปลายแหลมทั้งด้านหัวและท้าย จุดหลอมเหลวประมาณ 152 - 154 องศาเซลเซียส มีค่าการแตกตัวของกรด (pKa) 7.90 8.03 ละลายได้ดีในอะซิโตน เอทธานอล และน้ำ ละลายได้เล็กน้อยในอีเธอร์ เอทธิลอะซิเตต คลอโรฟอร์ม และไพริดีน ไม่สามารถละลายในเบนซีนและเฮกเซน (Morton และคณะ, 1945;Beelik, 1956; อ้างถึงใน Prescott และ Dunn, 1959; Bajpai และคณะ, 1982a)

มีการค้นพบกรดโคจิกครั้งแรกโดย Saito ปี ค.ศ. 1907 ซึ่งสามารถแยกผลึกของกรดโคจิกได้จากสายใยของรา *Aspergillus oryzae* ที่เติบโตบนข้าวนึ่ง (koji) และได้จำแนกกรดนี้ไว้ในกลุ่มกรดเบตา - รีซอซิลคาร์บอกไซลิก (β - resorcylcarboxylic acid) ต่อมาในปี ค.ศ. 1913 Yabuta นักเคมีชาวญี่ปุ่นได้ตั้งชื่อกรดนี้ว่า "กรดโคจิก" หลังจากนั้นอีก 11 ปี คือ ในปี ค.ศ. 1924 Yabuta ได้ศึกษาโครงสร้างทางเคมีทั้งหมดของกรดได้เป็นผลสำเร็จ และตั้งชื่อทางเคมีว่า 5 - hydroxy - 2 - hydroxymethyl - γ - pyrone ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก (อ้างถึงใน Prescott และ Dunn, 1959)

ประโยชน์ของกรดโคจิก

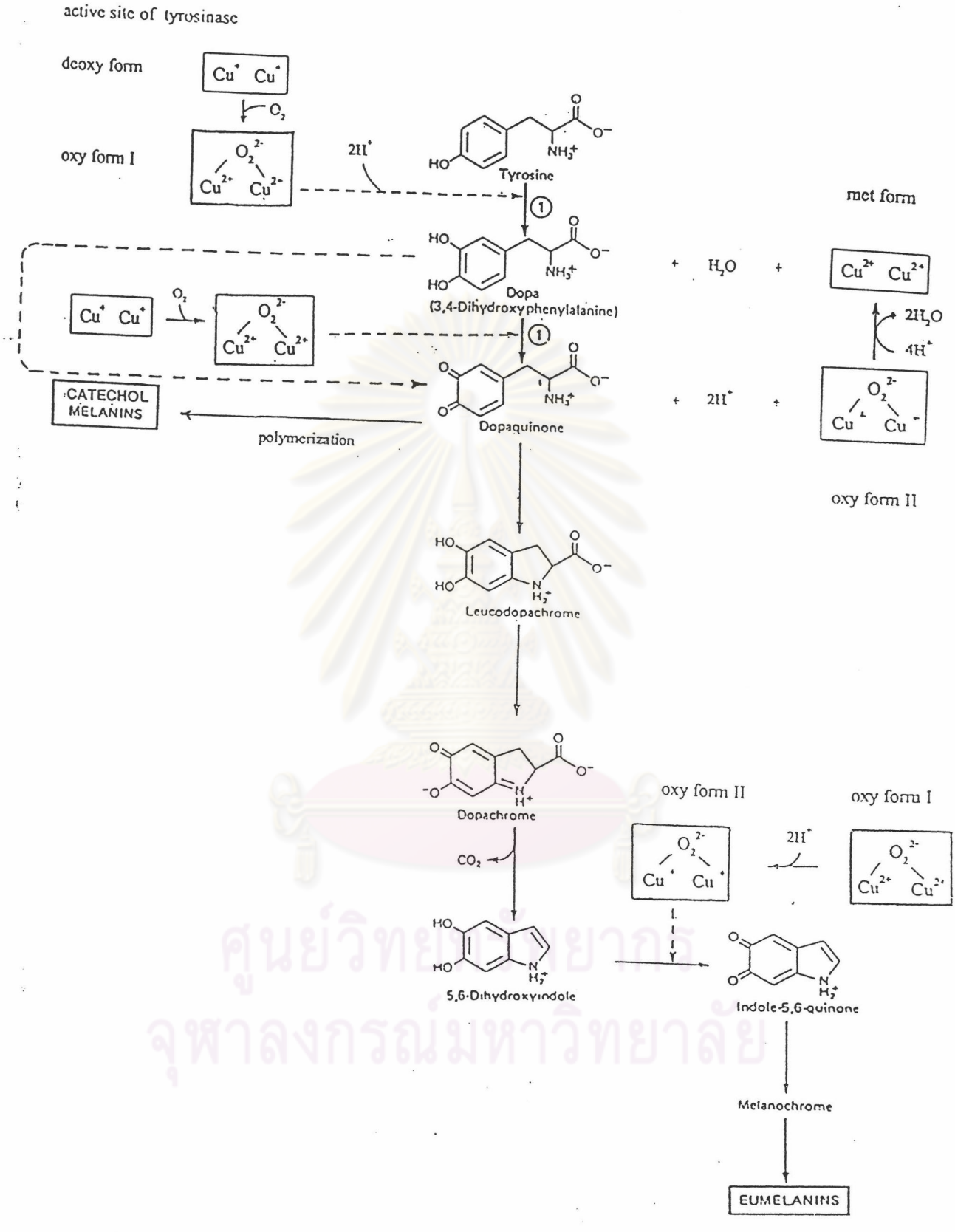
มีการนำกรดโคจิกมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. อุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์

กรดโคจิกสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไธโรซิเนส หรือ เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (EC 1.14.18.1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไธโรซีนไปเป็นเมลานินที่เป็นสาเหตุทำให้ผิวหนังเป็นจุดสีน้ำตาล โดยกรดโคจิกจะมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับไธโรซีน จึงยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบแย่งจับกับสารตั้งต้น (competitive inhibition) จึงมีการนำกรดโคจิกไปเป็นส่วนสำคัญของเครื่องสำอางค์ที่ช่วยทำให้ผิวขาวขึ้น (Hatae และ Nakashima, 1989; Hara, 1990; Hatae, 1990a; Cabanes และคณะ, 1994; Sakai และคณะ, 1995) สำหรับการทำงานของเอนไซม์ไธโรซิเนส จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนจากไธโรซีนเป็นโดปา จากนั้นจะเปลี่ยนจากโดปาเป็นโดปาควิโนน และเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีต่อไปโดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ได้สารตัวกลางต่างๆ โดยเอนไซม์จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอีกครั้งให้สารตัวกลางต่างๆ เปลี่ยนไปเป็นยูเมลานิน ซึ่งมีผลทำให้ผิวหนังเป็นจุดสีน้ำตาล (ดังแสดงในรูปที่ 2) โดยความเข้มข้นของกรดโคจิกที่ใช้ในเครื่องสำอางค์ประมาณ 0.5 - 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Cabanes และคณะ, 1987; Tanaka และคณะ, 1989; Chen และคณะ, 1991a; Chen และคณะ, 1991b)

2. อุตสาหกรรมอาหาร

ใช้กรดโคจิกเป็นส่วนผสมร่วมกับกรดแอสคอบิกและกรดซิตริก เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไธโรซิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งการเกิดสีน้ำตาลเนื่องจากสารสีคาทีคอลเมลานินในอาหารประเภทพืชและจากสารสียูเมลานินในอาหารทะเลจำพวกกุ้ง (Cabanes และคณะ, 1987; Tanaka และคณะ, 1989; Chen และคณะ, 1991a; Chen และคณะ, 1991b; Murray และคณะ, 1993; Kahn,



รูปที่ 2 การทำงานของเอนไซม์ไธโรซิเนสสำหรับการสังเคราะห์คาทีคอลเมลานินในพืชและยูเมลานินในสัตว์ (Murray และคณะ, 1993)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1995; Kahn และคณะ, 1995) และเนื่องจากกรดโคจิกมีสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ จึงมีการเติมลงในเหล้าสาเกเพื่อทำลายแบคทีเรียที่ผลิตกรดจากแอลกอฮอร์ในเหล้าสาเก ทำให้เหล้าไม่เปรี้ยว (Teramoto, 1953)

มีการใช้กรดโคจิกเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารที่ช่วยเพิ่มหรือปรุงแต่งกลิ่นรสในอาหารและเครื่องดื่ม เช่น มอลทอล และเอทธิลมอลทอล ซึ่งต้องเติมในขั้นสุดท้ายของการผลิตเท่านั้นเนื่องจากสารประกอบดังกล่าวระเหยได้ง่าย สารดังกล่าวทำให้รสชาติของอาหารดีขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่มีรสหวาน ขนมปัง และเค้ก โดยใช้เติมที่ความเข้มข้นเพียง 0.004 ส่วนต่ออาหารล้านส่วน ในปัจจุบันได้มีการผลิตมอลทอลและเอทธิลมอลทอลขายในสหรัฐอเมริกาภายใต้ชื่อทางการค้าว่า "Vetol" และ "Vetol - Plus" โดยบริษัท Pfizer นอกจากนี้ยังเติมกรดโคจิกลงในเครื่องดื่มผลไม้ ไวน์ เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ผลิตภัณฑ์นม และอาหารหวานชนิดต่างๆ เนื่องจากกรดโคจิกสามารถกลบรสขมของน้ำตาลแซคคาริน แอสปาเตม อะซีซัลเฟมเค ไซคลาเมท และซูคราโลส ซึ่งเป็นสารให้ความหวานสังเคราะห์ที่มักใช้เติมในเครื่องดื่มดังกล่าว (LeBlanc และ Akers, 1989; Bigelis และ Tsai, 1995)

3. อุตสาหกรรมพลาสติก

มีการใช้กรดโคจิกไปเป็นส่วนประกอบของพลาสติก ทำให้มีความยืดหยุ่นดีขึ้น และยังใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตพอลิเมอร์คุณภาพสูง เพื่อใช้ผลิตถังเก็บเชื้อเพลิง บ่อเก็บกักน้ำขนาดใหญ่ ตู้คอนเทนเนอร์ และวัสดุก่อสร้าง (McCulloch, 1961; Crueger และ Crueger, 1990)

4. ทางด้านการแพทย์

กรดโคจิกช่วยเสริมสุขภาพได้โดยอาศัยสมบัติการเป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ สามารถลดระดับ reactive oxygen species (ROS) ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) อนุมูลอิสระของซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) และอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล (OH^-) ซึ่งเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อในร่างกาย ไม่ให้เกิดอนุมูลอิสระมากจนเป็นอันตราย และเสริมการทำงานของเม็ดเลือดขาวโดยกรดโคจิกจะช่วยส่งเสริมการสะสมของแคลเซียมอิออนในนิวโทรฟิล ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้นิวโทรฟิลมีประสิทธิภาพในการทำงานดี (Niwa และ Akamatsu, 1991)

มีการนำลิโพโซมมาใช้ร่วมกับกรดโคจิกเพื่อให้กรดโคจิกทำงานได้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยลิโพโซมเป็นไขมันที่มีส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว เมื่ออยู่ในของเหลวจะจับตัวกันเป็นวงกลม โดยหันส่วนที่ไม่มีขั้วเข้าหากัน ส่วนที่มีขั้วจะสัมผัสกับของเหลวและส่วนที่มีขั้วกลางโมเลกุลจะใช้หุ้มกรดโคจิก ทำให้กรดโคจิกที่อยู่ภายในค่อยๆ ถูกปล่อยออกมาช้าๆ จึงอยู่ในร่างกายได้นานขึ้น

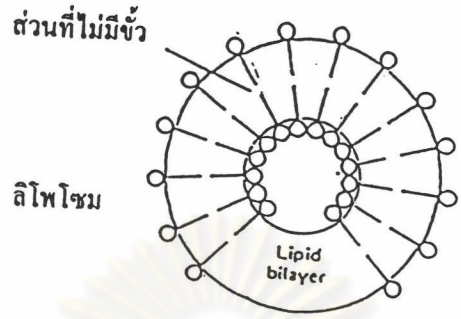
(Murray และคณะ, 1993; Meybeck, 1994) ลักษณะการจับตัวกันของลิโพโซมกับกรดโคจิกแสดงดังรูปที่ 3

อนุพันธุ์บางตัวของกรดโคจิก คือ อะราลคอกซี และเอริลออกซีอัลคอกซี สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวโทรฟิลอีลาสเทสในร่างกายมนุษย์ ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารตัวกลางที่เป็นปัจจัยในการก่อโรคไขข้ออักเสบ (rheumatoid arthritis) และกระตุ้นการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในร่างกาย (Miyano และคณะ, 1988) ทำให้สามารถลดอาการไขข้ออักเสบและลดการแพร่ของเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้มีการค้นพบว่าอนุพันธุ์และเกลือของกรด เช่น ฟีนิวเมอร์คิวรี่ โคจิก แอซิด พารา - ไฮดรอกซีฟีนิวเมอร์คิวรี่โคจิก แอซิด กลูโคไพราโนซิล - แอลฟา - 0 - 2 - เมทธิล - 5 - ไฮดรอกซี - แกมมา - ไพราโมน เกลือไอโอไดด์ เกลือโบรไมด์ และเกลือคลอไรด์ ยังมีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Bacillus subtilis Staphylococcus aureus Escherichia coli Pseudomonas aeruginosa Clostridium botulinum Salmonella paratyphi Shigella disenteriae* ซึ่งอาจใช้อนุพันธุ์และเกลือของกรดโคจิกเป็นส่วนผสมของยาหรือสารยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียดังกล่าวได้ (Morton และคณะ, 1945; Beelik, 1956; Obata และคณะ, 1984; Nishimura และคณะ, 1994)

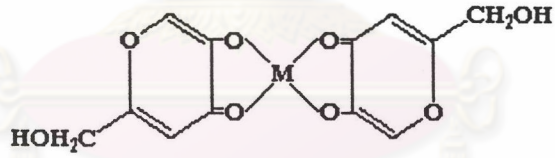
5. ทางด้านการเกษตร

เมื่อนำกรดโคจิกและเอสเทอร์ของกรดโคจิกไปรวมกับสารฆ่าแมลงในกลุ่มไพรีทรอยและคาร์บาเมท จะทำให้ได้สารฆ่าแมลงที่มีประสิทธิภาพดีกว่าเดิมทำให้ช่วยลดปริมาณการใช้สารฆ่าแมลงลงได้อีกประการ ซึ่งจะมีผลดีต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากกรดโคจิกสลายตัวได้ง่ายในธรรมชาติ จึงช่วยลดปริมาณสารพิษตกค้างได้ (Dowd, 1990)

อนุพันธุ์ที่เกิดจากกรดโคจิก 2 โมเลกุลกับโลหะหนัก (รูปที่ 4) เช่น ทองแดงและเหล็ก สามารถทำลายราก่อโรคพืชได้ เช่น *Scerotina fructicola Venturia inacqualis Alternaria solani* และ *Phytophthora infestans* ซึ่งก่อโรคจุดเน่าสีน้ำตาล (brown rot) แผลเน่าของแอ็ปเปิ้ล (apple scab) โรคต้นไหม้ระยะต้น (early blight) และโรคต้นไหม้ระยะหลัง (late blight) ตามลำดับ อีกทั้งกรดโคจิกละลายน้ำได้ดี ย่อยสลายได้รวดเร็ว จึงไม่ตกค้างในระบบนิเวศน์และไม่เป็นอันตรายต่อต้นพืช (O'Kane และ Morey, 1949)



รูปที่ 3 ลักษณะโมเลกุลของลิโพโซม (Murray และคณะ, 1993)



รูปที่ 4 อนุพันธุ์ที่เกิดจากกรดโคจิก 2 โมเลกุลกับโลหะหนัก
M คือ ตำแหน่งที่โลหะเข้าไปเกิดพันธะ (O'Kane และ Morey, 1949)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรดโคจิกและอนุพันธุ์ของกรด

เนื่องจากกรดโคจิกและอนุพันธุ์ของกรดมีประโยชน์มากมายดังกล่าวข้างต้น จึงมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับกรดโคจิกและอนุพันธุ์ของกรดมากมาย และทำการขึ้นทะเบียนจดสิทธิบัตร ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสิทธิบัตรเกี่ยวกับกรดโคจิกและอนุพันธุ์ของกรด

ผู้จดสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง	หมายเลขสิทธิบัตร
Higa (1987)	Melanin inhibition cosmetic composition	US 4696813
Campbell และ Miyano (1989)	Kojic acid ether-ester derivatives	US 4812474
Masateru และ Shone (1989)	Aralkoxy and aryloxyalkoxykojic acid derivatives	US 4812584
Hatae และ Nakashima (1989)	Whiten cosmetic	US 4847074
Hara (1990)	Composition for external application	US 4948577
Motono (1991)	External preparations free of discoloration	US 4985455
Meybeck (1994)	Pharmacertical or cosmetic composition containing hydroquinone and kojic acid	US 5279834
Kouno และ Suzuoki (1994)	Acid dye staining method	US 5284560
Sakai และคณะ (1995)	Whitening embellisher	US 5427775
Yang และคณะ (1996)	Kojic acid derivatives	US 5526421
Jacqueline (1996)	Stable acidic oil-in-water type emulsions and compositions containing them	US 5531993
John และ Chris (1996)	Bis(maltolato)oxovanadium compositions for the treatment of elevated blood sugar	US 5527790
McNeill และคณะ (1995)	Method of suppressing appetite with vanadium complexes	US 5688784
Igaki (1997)	Preparation for epidermis	US 5599528
Junko และคณะ (1998)	Synthetic medium for production of kojic acid	JP 10165172A

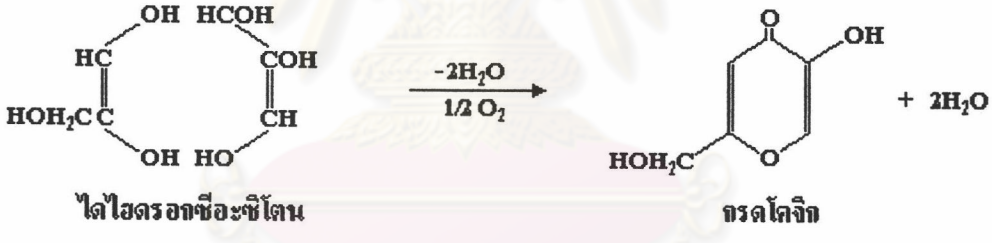
กระบวนการทางชีวภาพในการสังเคราะห์กรดโคจิก

มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ศึกษาวิธีการสังเคราะห์กรดโคจิกและเสนอทฤษฎีต่างๆ มากมาย ดังนี้

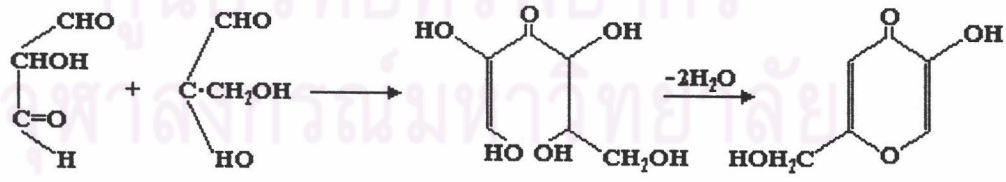
1. การสังเคราะห์กรดโคจิกโดยใช้สารประกอบที่มีคาร์บอน 3 อะตอมเป็นสารตั้งต้น

(Challenger และคณะ, 1929; Corbellini และ Gregorini, 1933; May และคณะ, 1931; Katagiri และ Kitahara, 1933)

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดโคจิกโดยใช้แหล่งคาร์บอนใดก็ตาม จุลินทรีย์จะใช้แหล่งคาร์บอนนั้นในการสร้างสารที่ภายในหนึ่งโมเลกุลประกอบด้วยคาร์บอน 3 อะตอม ได้แก่ ไดไฮดรอกซีอะซิโตน (dihydroxyacetone) กลีเซอรอลดีไฮด์ (glyceraldehyde) และกลีเซอริกไดอัลดีไฮด์ (glyceric dialdehyde) แล้วใช้สารเหล่านี้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดโคจิกโดยสารตั้งต้นไดไฮดรอกซีอะซิโตนจะถูกดึงน้ำและเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้เป็นกรดโคจิก (รูปที่ 5ก) ในขณะที่สารตั้งต้นในกลุ่มกลีเซอรอลจะถูกดึงน้ำออกกลายเป็นกรดโคจิก (รูปที่ 5ข)



(ก)



(ข)

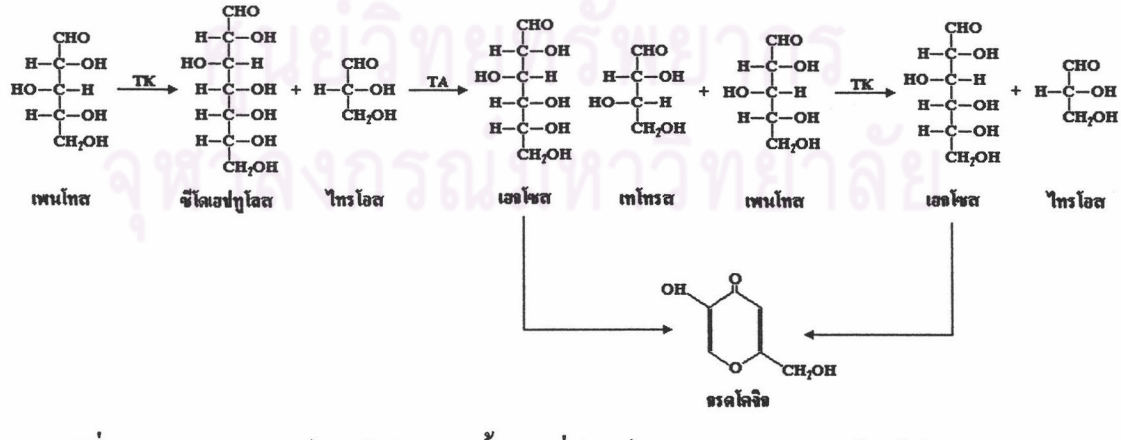
รูปที่ 5 การสังเคราะห์กรดโคจิกจากสารที่มีคาร์บอน 3 อะตอม (Challenger และคณะ, 1929; อ้างถึงใน Gray, 1959)

เอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิกจากสารตั้งต้นที่ประกอบด้วยคาร์บอน 3 อะตอมในหนึ่งโมเลกุล คือ เอนไซม์อัลโดเลส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการผลิตไดไฮดรอกซีอะซิโตน และกลีเซอรอลดีไฮด์ และเอนไซม์ไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส ซึ่งทำให้เกิดความสมดุลของสารตัวกลางทั้งสองชนิด โดยมีปริมาณของไดไฮดรอกซีอะซิโตนประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์และกลีเซอรอลดีไฮด์ 5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นไดไฮดรอกซีอะซิโตนจะรวมตัวกันกลายเป็นกรดโคจิก (Arnstein และ Bentley, 1951)

2. การสังเคราะห์กรดโคจิกโดยใช้น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอมเป็นสารตั้งต้น

(อ้างถึงใน Prescott และ Dunn, 1959)

เริ่มจากน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (น้ำตาลเพนโทส) 2 โมเลกุล ถูกเปลี่ยนไปเป็นสารตัวกลางที่มีคาร์บอน 7 และ 3 อะตอม (ซีโดเฮปทูโลสและไทรโอส ตามลำดับ) โดยมีเอนไซม์ทรานคีโตเลส (TK) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา จากนั้นสารตัวกลางทั้งสองชนิดจะทำปฏิกิริยากันต่อโดยเอนไซม์ทรานอัลโดเลส (TA) เป็นตัวเร่งปฏิกริยา ได้เป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 และ 4 อะตอม (เฮกโซสและเทโทรส ตามลำดับ) โดยน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอมจะใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดโคจิกต่อไป ขณะที่น้ำตาลคาร์บอน 4 อะตอมจะต่อกับน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม โดยอาศัยเอนไซม์ทรานคีโตเลสเร่งปฏิกริยาได้เป็นน้ำตาลคาร์บอน 6 และ 3 อะตอม (เฮกโซสและไทรโอส ตามลำดับ) ซึ่งน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอมจะใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดโคจิกเช่นกัน ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 การสังเคราะห์กรดโคจิกจากน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (อ้างถึงใน Prescott และ Dunn, 1959; Solomon, 1996)

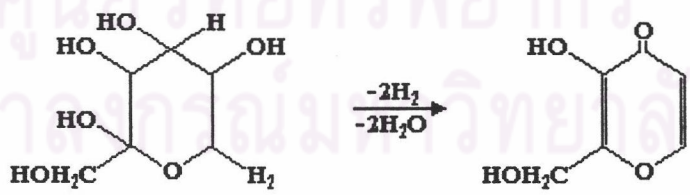
3. การสังเคราะห์กรดโคจิกโดยใช้น้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมเป็นสารตั้งต้น

(Yabuta, 1913; Kinoshita, 1927; Haworth, 1929; Corbellini และ Gregorini, 1933; Bajpai และคณะ, 1981)

น้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอมที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดโคจิก คือ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรักโทส เมื่อใช้น้ำตาลฟรักโทสเป็นสารตั้งต้น น้ำตาลจะถูกดึงน้ำและไฮโดรเจนออกได้เป็นกรดโคจิก ซึ่งแสดงดังรูปที่ 7

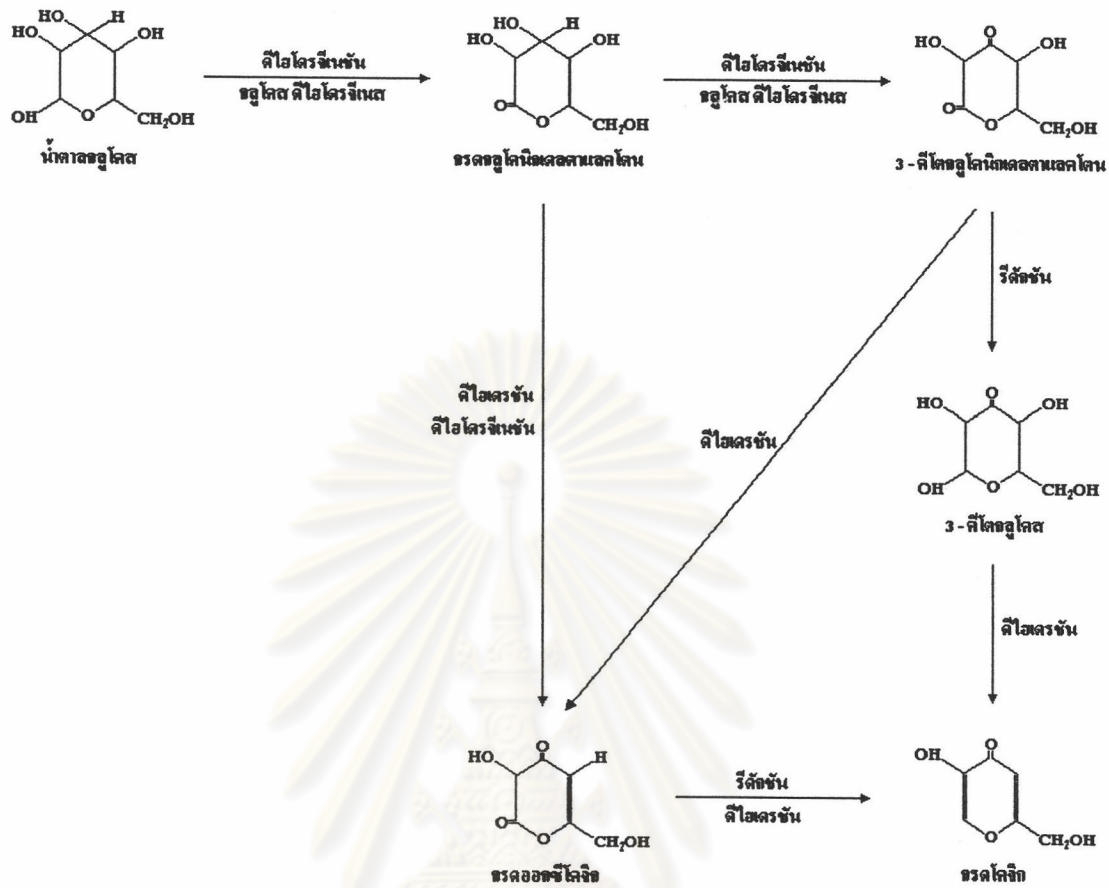
กรณีที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดโคจิก จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดโคจิกได้โดยไม่มีการแตกวงของน้ำตาลกลูโคสจากปฏิกริยาออกซิเดชั่นและดีไฮเดรชั่น โดยอาศัยเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนสและกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนสเป็นตัวเร่งปฏิกริยา มีกรดกลูโคนิกเดลตาแลคโตน 3 - คีโตกลูโคนิกเดลตาแลคโตน 3 - คีโตกลูโคส และกรดออกซีโคจิกเป็นสารมัธยันต์ดังรูปที่ 8

วิธีการผลิตกรดโคจิกจากการเปลี่ยนแปลงโดยตรงจากน้ำตาลกลูโคส โดยไม่มีการแตกวงของสายคาร์บอนในโมเลกุลเป็นวิธีที่มีการยอมรับมากที่สุด (Arnstein และ Bentley, 1953) ในปี ค.ศ. 1981 Bajpai ได้ศึกษาเรื่องชีวสังเคราะห์ของกรดโคจิก พบว่า มีเอนไซม์หลายตัวที่เกี่ยวข้องในวิถีการผลิตกรดโคจิก เช่น เอนไซม์เฮกโซไคเนส กลูโคส - 6 - ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส 6 - ฟอสฟอกลูโคนิก แอซิด ดีไฮโดรจีเนส กลูโคสออกซิเดส กลูโคสดีไฮโดรจีเนส และกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส แต่ในขณะที่จุลินทรีย์มีการผลิตกรดโคจิกสูง จะตรวจพบปริมาณเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส และกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนสสูงมาก



ดี - ฟรักโทส **ไอโซเมอร์ของกรดโคจิก**

รูป 7 การสังเคราะห์กรดโคจิกโดยใช้น้ำตาลฟรักโทสเป็นสารตั้งต้น (อ้างถึงใน Bajpai และคณะ, 1982a)



รูปที่ 8 การสังเคราะห์กรดโคจิกโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น (Bajpai และคณะ, 1981)

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนผิวหน้าอาหารเหลว (Liquid surface culture)

เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ข้อดีของวิธีนี้ คือ ไม่ต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูงมาก ไม่สิ้นเปลืองพลังงานและค่าใช้จ่ายในการผลิตมากนักเนื่องจากไม่มีการให้อากาศและการปั่นกวน ใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำ วิธีการผลิตง่าย จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจที่จะนำไปใช้ในประเทศที่กำลังพัฒนาและเป็นวิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิก

1. สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

ควรใช้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ไม่กลายพันธุ์ง่าย ทนต่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นได้สูง ทนกรดได้ดี ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงและสม่ำเสมอ มีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้ ทั้งในกลุ่มของแบคทีเรียและรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งราในสกุล Aspergillus และ Penicillium ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้

ชนิดของจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Acetic bacteria	Takahashi และ Asai, 1933
Gluconoacetobacter roseus	Ikeda, 1954
Gluconoacetobacter opacus var mobilis	Sakaguchi และคณะ, 1948
Penicillium purpurogenum	Parrish และคณะ, 1966
Penicillium grisefulvum	Parrish และคณะ, 1966
Penicillium citrinum	Parrish และคณะ, 1966
Aspergillus effusus	Parrish และคณะ, 1966
Aspergillus ustus	Parrish และคณะ, 1966
Aspergillus luteovirscens	Morton และคณะ, 1945
Aspergillus giganteus	Tamiya และ Hida, 1930
Aspergillus candidus	Tamiya และ Hida, 1930; Wei และคณะ, 1991
Aspergillus clavatus	Tamiya และ Hida, 1930; Parrish และคณะ, 1966
Aspergillus tamarii	Horn และคณะ, 1996; Ohara,1954; Parrish และคณะ, 1966
Aspergillus flavus	May และคณะ, 1931; Bentley และคณะ, 1957; Parrish และคณะ, 1966; Bajpai และคณะ, 1982a; Bajpai และคณะ, 1982b
Aspergillus oryzae	รพี โรจนอุไร, 2539; กนิษฐา ภูวนารถนรานุบาล, 2542; Yabuta, 1913; Yabuta, 1923; Yabuta, 1924; Tamiya, 1928; Challenger และคณะ, 1929; Tamiya และ Hida, 1930 Katahiri และ Kitahara, 1933; Sakaguchi และคณะ, 1948; BarnardและChallenger, 1949; Arnstein และ Bentley, 1953; Ohara, 1954; Bentley, 1957; Parrish และคณะ; 1966; Kwak และ Rhee, 1992a; Kwak และ Rhee, 1992b; Ogawa และคณะ, 1995; Wakisaka และคณะ, 1998

2. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

องค์ประกอบต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญมากต่อการผลิตกรดโคจิก ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนและแร่ธาตุต่างๆ ในปริมาณที่เหมาะสม จะทำให้รามีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโคจิกได้สูงขึ้น โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีสารอาหารต่างๆ ที่ส่งเสริมการเติบโตของราอย่างเพียงพอ และเนื่องจากกรดโคจิกเป็นผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องเหลือแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดโคจิก ซึ่งจะช่วยเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกได้มากขึ้น องค์ประกอบต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ควรคำนึงถึงในการผลิตกรดโคจิก มีดังนี้

2.1 แหล่งคาร์บอน

จุลินทรีย์สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลายชนิดเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิก ทั้งในรูปของโมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ และโพลีแซคคาไรด์ ดังแสดงในตารางที่ 3 การพิจารณาเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่หาง่าย ราคาถูก และให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงมีความสำคัญยิ่งสำหรับการผลิตกรดโคจิกในระดับอุตสาหกรรม เพื่อให้ต้นทุนในการใช้วัตถุดิบต่ำที่สุด

2.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตกรดโคจิก สามารถใช้ได้ทั้งในรูปของอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจนดังแสดงในตารางที่ 4 นอกจากชนิดของแหล่งไนโตรเจนแล้ว ปริมาณที่ใช้ก็มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกเช่นกัน ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ควรมีแหล่งไนโตรเจนมากเกินไปนัก เพราะจะทำให้จุลินทรีย์ใช้แหล่งคาร์บอนไปในการเติบโตมากกว่าการผลิตกรด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ด้วย มีรายงานการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus flavus* พบว่า แอมโมเนียมไนเตรต 1.25 กรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อหนึ่งลิตร สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกได้ (May และคณะ, 1931; Kwak และ Rhee, 1992a; Ogawa และคณะ, 1995) ส่วน *Aspergillus oryzae* NRRL484 จะใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.75 กรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อหนึ่งลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิก (Kwak และ Rhee, 1992a)

2.3 แร่ธาตุและสารอื่นๆ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิก ต้องการแร่ธาตุหลายชนิดในการเจริญเติบโต เช่น แมกนีเซียม โพแทสเซียมฟอสเฟต (Ogawa และคณะ, 1995) แร่ธาตุเหล่านี้เมื่อเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เหมาะสม จะทำให้ผลผลิตกรดสูงขึ้น นอกจากนี้ยังมีสารบางตัวที่สามารถกระตุ้นและยับยั้งการผลิตกรดโคจิกได้ เช่น มีรายงานว่าการเติมเอทธิลีน คลอโรไฮดรินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อหนึ่งลิตร จะสามารถเพิ่มผลผลิตกรดให้สูงขึ้น (อ้างถึงใน May และ

ตารางที่ 3 แหล่งคาร์บอนที่สามารถนำมาใช้ผลิตกรดโคจิก

แหล่งคาร์บอน	เอกสารอ้างอิง
1) น้ำตาลกลูโคส	รพี โรจนอุไร,2539; กนิษฐา ภูวนารถรานุบาล, 2542; Challenger และคณะ, 1929; Bentley และคณะ, 1957; Parrish และคณะ, 1966; Basappa และคณะ,1970; Bajpai และคณะ, 1982a; Bajpai และคณะ, 1982b; Coupland และ Niehaus, 1987; Ogawa และคณะ, 1995; Rosfarizan และคณะ, 1998a; Rosfarizan และคณะ, 1998b; Rosfarizan และ Ariff, 2000
2) น้ำตาลฟรักโทส	รพี โรจนอุไร, 2539; Takahashi และ Asia, 1933 ; Ohara, 1954; Ikeda, 1954
3) น้ำตาลกาแลคโตส	Sakagushi และคณะ, 1948; Ohara, 1954
4) น้ำตาลซูโครส	รพี โรจนอุไร, 2539; กนิษฐา ภูวนารถรานุบาล, 2542; Katagiri และ Kitahara, 1933, Ohara, 1954; Lin และคณะ, 1976; Bajpai และคณะ, 1982b
5) น้ำตาลมอลโตส	Katagiri และ Kitahara, 1933;Ohara, 1954
6) น้ำตาลแลคโตส	Ohara, 1954
7) น้ำตาลไซโลส	Challenger และคณะ, 1929; Ohara, 1954; Basappa และคณะ, 1970
8) แมนนิทอล	Tamiya, 1928; Takahashi และ Asia, 1933; Ohara, 1954
9) อะราบิโนส	Challenger และคณะ, 1929; Ohara, 1954
10) ราฟีโนส	Ohara, 1954
11) เอทธานอล	Sakagushi และคณะ, 1948; Ohara, 1954; Basappa และคณะ, 1970
12) กลีเซอรอล	Sakagushi และคณะ, 1948
13) ไดไฮดรอกซีอะซิโตน	Katagiri และ Kitahara, 1933
14) อะซิเตต	Basappa และคณะ, 1970
15) เดกซ์ตริน	Ohara, 1954
16) อินนูลิน	Challenger และคณะ, 1929, Ohara, 1954
17) แป้ง	Ohara, 1954; Rosfarizan และคณะ, 1998; Rosfarizan และคณะ, 1998

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์สามารถใช้ผลิตกรดโคจิก

แหล่งไนโตรเจน	เอกสารอ้างอิง
สารสกัดจากยีสต์	รพี โรจนอุไร, 2539; Arnstein และ Bentley, 1957; Bajpai และคณะ, 1982; Kwak และ Rhee, 1992a; Ogawa และคณะ, 1995; Ariff และคณะ, 1996; Rosfarizan และคณะ, 1998; Rosfarizan และคณะ, 1998
เปปโตน	Bajpai และคณะ, 1982a; Coupland และ Niehaus, 1987; Wei และคณะ, 1991, Rosfarizan และคณะ, 1998
โคบาทามีน	Bajpai และคณะ, 1982a
อาจีนีน	Coupland และ Niehaus, 1987
ไกลซีน	Coupland และ Niehaus, 1987
โซเดียมไนเตรต	May และคณะ, 1931; Arnstein และ Bentley, 1953; Bentley, 1957
แอมโมเนียมซัลเฟต	รพี โรจนอุไร, 2539; May และคณะ, 1931; Kwak และ Rhee, 1992a; Wakisaka และคณะ, 1998
แอมโมเนียมไนเตรต	กนิษฐา ภูวนารถนรานุบาล, 2542; May และคณะ, 1931; Prescott และ Dunn, 1959; Casida, 1968; Bajpai และคณะ, 1982a; Rosfarizan และคณะ, 1998; Rosfarizan และคณะ, 1998

คณะ, 1931) ในขณะที่กรดออกซาลิก กรดซิตริก กรดฟอร์มิก กรดไฮโดรคลอริก และกรดไนตริก มีผลยับยั้งการผลิตกรดโคจิกของจุลินทรีย์ได้ (Barham และ Smit, 1936) แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแคลเซียมเฮกโซสไดฟอสเฟต หรือแมกนีเซียมโมโนฟอสเฟต จะไม่มีการผลิตกรดโคจิกเลย (Katagiri และ Kitahara, 1933)

3. ปริมาณของหัวเชื้อ

ปริมาณของหัวเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึงโดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนผิวหน้าอาหารเหลว เนื่องจากถ้าใช้ปริมาณหัวเชื้อมากเกินไป จุลินทรีย์จะเจริญอัดตัวกันหนาแน่นบนผิวหน้าอาหารเหลวทำให้ออกซิเจนผ่านเข้าไปได้ยาก ขณะที่ถ้าใช้ปริมาณของหัวเชื้อน้อยเกินไปจะทำให้ปริมาณสายใยราที่ใช้ผลิตกรดน้อย ทำให้ผลผลิตของกรดต่ำด้วย การเลือกใช้ปริมาณของหัวเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของกระบวนการหมัก ชนิดของสารตั้งต้นที่ใช้ เป็นต้น โดยส่วนใหญ่จะใช้ปริมาณของหัวเชื้ออยู่ระหว่าง 10^6 - 10^9

สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร (Lin และคณะ, 1976; Bajpai และคณะ, 1982a; Ariff และคณะ, 1996; Ariff และคณะ, 1997; Rosfarizan และคณะ, 1998)

4. อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับการผลิตกรดโคจิกบนผิวหน้าอาหารเหลวนั้น อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลกระทบโดยตรงต่อปริมาณกรดโคจิก เนื่องจากการหมักโดยวิธีนี้ ด้านบนของจุลินทรีย์จะสัมผัสกับอากาศ ส่วนด้านล่างจะสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีความสำคัญต่อการใช้สารอาหารด้านล่างของจุลินทรีย์ ถ้าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไป จะทำให้เกิดการระเหยของอาหารเหลวมาก แต่ถ้าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยเกินไป จะทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถสัมผัสกับอาหารได้ทั้งหมดจึงทำให้เซลล์มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโคจิกลดลง (อ้างถึงใน กนิษฐา ภูวนารถนรานุบาล, 2542)

5. การเป่าอากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว

การหมักกรดโคจิกเป็นการหมักที่ต้องใช้อากาศ (aerobic fermentation) ดังนั้น อัตราการให้อากาศจึงมีความสำคัญมากซึ่งจะส่งเสริมการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก เช่น เอนไซม์กลูโคส - 6 - ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส เฮกโซไคเนส และกลูโคเนต ดีไฮโดรจีเนส (Bajpai และคณะ, 1982a) ซึ่ง Ariff และคณะ (1996) ได้ศึกษาหาค่า dissolved oxygen tension (DOT) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการกวนพบว่า การหมักที่มีการให้อากาศ 2 ช่วง คือให้อากาศที่ระดับสูง (80% saturation)ในระหว่างระยะการเจริญของรา *Aspergillus flavus* Link 44 - 1 และลดระดับการให้อากาศ (30% saturation)ในระยะการผลิตกรดโคจิก ทำให้ได้ปริมาณกรดโคจิกเพิ่มขึ้นมากกว่าระบบการหมักที่ไม่มีการควบคุมการให้อากาศและการหมักที่มีการควบคุมการให้อากาศเพียงระดับเดียว

สำหรับการหมักกรดโคจิกโดยให้จุลินทรีย์เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว การให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยลดการสะสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์รวมถึงความร้อนที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิสมของรา จึงทำให้มีการผลิตกรดโคจิกสูงขึ้น (Barnard และ Challenger, 1949) นอกจากนี้ การเป่าอากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราที่ต่ำจะป้องกันการปนเปื้อนระหว่างการงอกของสปอร์และการเจริญในช่วงแรกของจุลินทรีย์ (กนิษฐา ภูวนารถนรานุบาล, 2542; Drysdale และ McKay, 1995)

6. อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่าง

ทั้งสองปัจจัยมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคจิก ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการผลิตกรดโคจิกควรเป็นอุณหภูมิที่ทำให้มีการเติบโตที่เหมาะสม และอุณหภูมิที่จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโคจิก โดยทั่วไปจะมีค่าประมาณ 29 - 35 องศาเซลเซียส (อ้างถึงใน Prescott และ Dunn, 1959) ส่วนค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกมีค่าประมาณ 2.5 โดยที่ค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 5.0 จะเหมาะสมต่อการเติบโตของ *Aspergillus oryzae* ขณะที่ค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 2.0 จะเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของรา (Katakiri และ Kitahara, 1933) ขณะที่ Barham และ Smiths (1936) พบว่าช่วงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีค่าระหว่าง 2.0 - 3.5 ซึ่งจะเห็นได้ว่าช่วงค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกมีค่าต่ำจึงไม่มีต้องใส่บัฟเฟอร์ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สามารถลดต้นทุนในการผลิตและช่วยทำให้กระบวนการผลิตง่ายขึ้น

การขยายส่วนการผลิตโดยกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรม

(Elander, 1979)

ขั้นตอนการพัฒนากระบวนการผลิตสู่ระดับอุตสาหกรรม มี 3 ขั้นตอน

1) การวางแผนการทำงานในระดับห้องปฏิบัติการ
2) การขยายส่วนการผลิตในระดับโรงงานต้นแบบ
3) การปรับปรุงและพัฒนากระบวนการผลิต เพื่อเข้าสู่ระดับอุตสาหกรรม

1) การวางแผนการทำงานในระดับห้องปฏิบัติการ

ผลสำเร็จในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ในระดับห้องปฏิบัติการ จะเป็นพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป ดังนั้น การวางแผนการทำงานในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่ถูกต้องและแม่นยำ จึงมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งที่จะนำไปใช้ในการขยายส่วนการผลิตในระดับที่สูงขึ้นต่อไป

ลำดับการวางแผนการทำงานในระดับห้องปฏิบัติการ

ก. การเลือกวิธีการเก็บรักษาสายพันธุ์ให้เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาเกี่ยวกับการกลายพันธุ์และการคงประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ให้มีความสามารถในการผลิตผลิตภัณฑ์อย่างสม่ำเสมอ แม้ช่วงเวลาในการเก็บรักษาสายพันธุ์จะยาวนาน

ข. การถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เป็นอีกหนึ่งขั้นตอนที่มีความสำคัญในกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่ต้องมีความระมัดระวังไม่ให้ถูก

ปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ มีรายงานการวิจัยพบว่า ขั้นตอนการถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นอย่างมาก เนื่องจากถ้าวิธีการไม่ดีพอจะมีการปนเปื้อนเกิดขึ้น ทำให้ผลผลิตจะลดลงถึง 40 เปอร์เซ็นต์ (อ้างถึงใน Bohumull, 1983) โดยมากการเพิ่มปริมาณหัวเชื้อสปอร์งอกในระดับห้องปฏิบัติการ จะเพาะเลี้ยงในขวดเขย่าและเลือกช่วงอายุที่เหมาะสมของหัวเชื้อ เพื่อลดระยะที่มีการเจริญเติบโตน้อย (lag phase) หลังจากการถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ จะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิตลงไปได้มาก

ค. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอกและอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์ โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอกจะต้องมีปริมาณสารอาหารที่เพียงพอสำหรับการเจริญของสายใยหลังการงอกของสปอร์ให้ได้ในช่วงเวลาและปริมาณที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่อไป ส่วนองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์มักเป็นปัจจัยแรกที่ต้องศึกษาหาปริมาณสารอาหารที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อในสัดส่วนที่เหมาะสม ซึ่งจะมีปริมาณแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์นั้นๆ โดยมากจะคำนึงถึงปริมาณผลผลิตที่จะได้รับ ราคาและคุณภาพของวัตถุดิบที่นำมาใช้ วิธีการฆ่าเชื้อวัตถุดิบก่อนนำมาใช้และความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วย

ง. การเลือกวิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์มีหลายวิธี เช่น การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนผิวหน้าอาหารเหลว การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนผิวหน้าอาหารแข็ง ซึ่งแต่ละวิธีจะมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป ดังนี้

วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนผิวหน้าอาหารเหลว (Liquid surface Culture)
(อ้างถึงใน กนิษฐา ภูวนารถนรานุบาล, 2542; Bajpai และคณะ, 1982b; Ogawa และคณะ, 1995; Wakisaka และคณะ, 1998)

ข้อดี
- วิธีการผลิตง่าย ให้ผลผลิตสูง
- ลดค่าใช้จ่ายและพลังงานในการผลิต เนื่องจากไม่มีการเขย่าหรือปั่นกวน
- ไม่ต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูง จึงสามารถนำมาใช้ในประเทศที่กำลังพัฒนาได้ดี
- การแยกผลิตภัณฑ์ออกจากกระบวนการหมักสามารถกระทำได้ง่าย

ข้อเสีย
- ใช้พื้นที่ในการผลิตมาก

วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว (Submerged Culture)

(อ้างถึงใน รพี โรจนอุไร, 2539; Kwak และ Rhee, 1992a; Kwak และ Rhee, 1992b; Ariff และคณะ, 1996; Rosfarizan และคณะ, 1998)

ข้อดี - ใช้พื้นที่ในการผลิตน้อย

- สามารถนำเทคโนโลยีใหม่ๆ เข้ามาใช้เป็นอุปกรณ์ในถังหมักได้

ข้อเสีย - สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการปั่นกวนให้อากาศสูง

- ต้องการผู้ที่มีความชำนาญมาควบคุมกระบวนการในถังหมัก (fermentor)
- อุปกรณ์และถังหมักมีราคาสูง
- การแยกผลิตภัณฑ์ออกจากกระบวนการหมักสามารถกระทำได้ยากกว่าวิธีแรก เนื่องจากต้องมีขั้นตอนการแยกสายใยที่กระจายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนผิวหน้าอาหารแข็ง (Solid state Culture)

(Aidoo และคณะ, 1982)

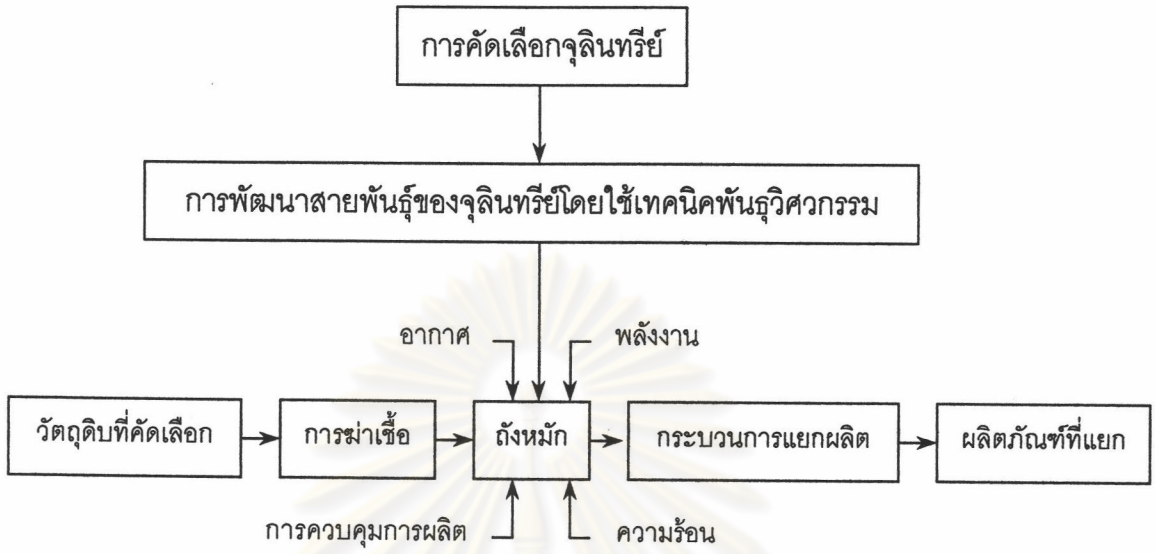
ข้อดี - วิธีการผลิตง่าย เป็นการเพาะเลี้ยงที่ใกล้เคียงภาวะธรรมชาติมากที่สุด

- วัตถุดิบที่ใช้มีราคาถูก

ข้อเสีย - ต้องมีการปรับสภาพวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมัก (pretreatment)

- ต้องมีการเติมน้ำให้เหมาะสมระหว่างกระบวนการผลิต เนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้เป็นของแข็ง
- มักเกิดความร้อนและการสะสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
- การควบคุมอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างเป็นไปได้ยาก
- การแยกผลิตภัณฑ์ออกจากกระบวนการหมักสามารถกระทำได้ยาก อาจแยกได้ไม่หมดเพราะต้องทำการสกัดผลิตภัณฑ์ออกจากอาหารแข็ง จึงเป็นการเพิ่มขั้นตอนอีก 1 ขั้นตอน

จุดประสงค์หลักของการทำงานระดับห้องปฏิบัติการ คือ การรวบรวมข้อมูลที่เป็นจริงและแม่นยำเพื่อที่จะใช้เป็นพื้นฐานในการขยายส่วนการผลิตในระดับที่สูงขึ้น (Hockenhull, 1975) ดังนั้น การวางแผนและการพัฒนาการทำงานในระดับห้องปฏิบัติการให้ได้ผลที่ดีและถูกต้องจะสามารถนำไปใช้ได้จริงสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป



รูปที่ 9 กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ในระดับห้องปฏิบัติการ (อ้างถึงใน Justin, 1989)

2) การขยายส่วนการผลิตในระดับโรงงานต้นแบบ

การขยายส่วนการผลิตจากระดับห้องปฏิบัติการเข้าสู่ระดับโรงงานต้นแบบ มีปัจจัยมากมายที่ต้องคำนึงถึง เช่น การให้อากาศและการปั่นกวน สัดส่วนของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ปริมาณหัวเชื้อที่ใช้เนื่องจากจะมีผลต่อลำดับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยปริมาณหัวเชื้อของจุลินทรีย์ต้องสัมพันธ์กันกับปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ การเลือกช่วงอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมจะยังผลให้ได้ปริมาณผลผลิตมากที่สุด ในระยะเวลาที่สั้นที่สุดด้วย (Hockenhull, 1975)

การทดลองผลิตผลิตภัณฑ์ในระดับโรงงานต้นแบบก่อนนำไปผลิตจริงในระดับอุตสาหกรรม จะทำให้ทราบถึงความเป็นไปได้ในกระบวนการผลิต ปัญหาที่มักจะเกิดควบคู่ไปกับการขยายส่วนการผลิต คือ การลดลงของผลผลิต อันเนื่องมาจากสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนไป ทั้งการให้อากาศ การปั่นกวน ปริมาณหัวเชื้อ ชนิดของวัสดุที่นำมาใช้ทำถังหมัก และการใช้สารกำจัดฟอง โดยเฉพาะการใช้สารกำจัดฟองจะมีผลกระทบอย่างมากต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ ซึ่งในการขยายส่วนการผลิตในระบบการเพาะเลี้ยงที่มีการปั่นกวนและให้อากาศ จะทำให้เกิดฟองอากาศมาก ทำให้ต้องใช้ปริมาณสารกำจัดฟองมากตามไปด้วย แต่กรณีที่ใช้วิธีเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนผิวหน้าอาหารเหลวจะลดปัญหาดังกล่าวได้ เนื่องจากเป็นวิธีการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการปั่นกวนให้อากาศ จึงไม่มีปัญหาเกี่ยวกับฟองและไม่จำเป็นต้องใช้สารกำจัดฟองด้วย (Herold and Necasek, 1959)

หลักการการทำงานในระดับโรงงานต้นแบบ ประกอบด้วย

1. นำผลการทดลองจากระดับห้องปฏิบัติการมาวางแผนการทำงานในระดับโรงงานต้นแบบ ผลการทดลองที่ถูกต้องและแม่นยำในระดับห้องปฏิบัติการจะเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อการทำงานในระดับที่สูงขึ้น เมื่อวิเคราะห์ผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตระดับโรงงานต้นแบบ หาแนวทางการแก้ปัญหาที่จะเกิดขึ้น และวางแผนการทำงานเป็นขั้นตอนอย่างเหมาะสม จะทำให้การทำงานสะดวก รวดเร็ว และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้น

2. การปรับปรุงกระบวนการการฆ่าเชื้อ โดยเฉพาะการฆ่าเชื้อในอาหารและอากาศที่จะใช้เติมจะช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่จะมาแย่งใช้สารตั้งต้นอันเป็นสาเหตุให้ผลผลิตลดลง นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดลองพบว่า การเป่าให้อากาศในอัตราเร็วที่ต่ำในกระบวนการหมักแบบกะ จะป้องกันการปนเปื้อนระหว่างการงอกของสปอร์และการเจริญในช่วงแรกของจุลินทรีย์ด้วย (Drysdale และ McKay, 1995)

3. การวิเคราะห์และการรายงานผลการทดลองในระดับโรงงานต้นแบบเพื่อใช้เป็นพื้นฐานการทำงานในระดับอุตสาหกรรม

3) การปรับปรุงและพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อเข้าสู่ระดับอุตสาหกรรม

เมื่อการขยายส่วนการผลิตในระดับโรงงานต้นแบบประสบความสำเร็จแล้ว กระบวนการผลิตดังกล่าวจะถูกนำไปใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป ซึ่งจะพบปัญหาเช่นเดียวกับการขยายส่วนการผลิตจากระดับห้องปฏิบัตการสู่ระดับโรงงานต้นแบบ นั่นคือ สภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนไปส่งผลให้กรดโคจิกลดลง การปรับปรุงและพัฒนากระบวนการผลิตให้เหมาะสม เป็นอีกหนทางหนึ่งที่จะแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ โดยเป้าหมายของการปรับปรุงและพัฒนากระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมให้ได้ผลสำเร็จ มีดังนี้

1. เพื่อความคุ้มค่าในการผลิตผลิตภัณฑ์ในแต่ละรอบการผลิต สามารถกระทำได้ ดังนี้
   - 1.1 ลดค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับการใช้วัตถุดิบ
   - 1.2 ลดค่าใช้จ่ายในการเตรียมการผลิตแต่ละครั้ง
   - 1.3 ลดระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต
   - 1.4 เพิ่มปริมาณผลผลิตที่ได้ในแต่ละรอบของการผลิต
2. การประยุกต์ใช้อุปกรณ์ที่จะช่วยเพิ่มผลผลิต ตัวอย่างเช่น การออกแบบอุปกรณ์สำหรับเป่าไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เหนือผิวหน้าอาหารเหลวจากกระบวนการเมตาบอลิสมของรา *Aspergillus oryzae* ที่ใช้ผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว จะช่วยเพิ่มผลผลิตกรดให้สูงขึ้น เนื่อง

จากมีรายงานการทดลองพบว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศจากกระบวนการเมตาบอลิสมของรา *Aspergillus oryzae* ในการผลิตกรดโคจิกบนผิวหน้าอาหารเหลว มีผลยับยั้งการผลิตกรดโคจิกเนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของรา ทำให้ปริมาณกรดโคจิกที่ราผลิตขึ้นน้อยไปด้วย (Barnardและ Challenger, 1949)

กระบวนการหมักโดยมีการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิต

(Croeger และ Croeger, 1990)

มีเทคนิคมากมายในกระบวนการพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก ทั้งในรูปการผลิตแบบกะ แบบกึ่งกะ และแบบต่อเนื่อง การผลิตแบบกึ่งกะเป็นการผลิตที่มีการเติมสารอาหารในระหว่างกระบวนการผลิต โดยไม่มีการถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าออกจากถังหมัก สารอาหารที่ใช้เติมโดยมากเป็นสารอาหารที่ควบคุมการเจริญเติบโต (growth - limiting substrate) สารเติมแต่ง เช่น สารตั้งต้น (precursor) และ สารอาหารที่มีผลต่อกลไกการผลิตผลิตภัณฑ์ เป็นต้น

การนำวิธีการเติมสารอาหารในระหว่างกระบวนการหมักมาใช้ เริ่มเมื่อปี ค.ศ. 1915 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่มีข้าวมอลล์มากเกินไป จะมีผลทำให้ยีสต์เจริญได้มากและใช้ออกซิเจนเป็นปริมาณมาก ยังผลให้เกิดสภาพไร้ออกซิเจนขึ้นภายในถังหมัก ผลที่ตามมาก็คือ จะมีการสร้างเอทธานอลขึ้นแทนการผลิตเซลล์ยีสต์ แต่เมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารเจือจางหรือมีการเติมสารอาหารลงไปในอัตราน้อยกว่าที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ได้ จะทำให้ได้ปริมาณเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้นโดยไม่มีการผลิตเอทธานอล ในปี ค.ศ. 1940 มีการผลิตกลีเซอรอล บิวทานอล อะซิโตน และกรดอินทรีย์ โดยใช้กระบวนการหมักที่มีการเติมสารอาหารเป็นระยะๆ พบว่าให้ผลผลิตสูงเป็นที่น่าพอใจ นอกจากนี้ยังมีการนำวิธีการผลิตดังกล่าวมาใช้ผลิตยาปฏิชีวนะ (เช่น เพนนิซิลิน จี) วิตามิน กรดอะมิโน เอนไซม์ และฮอร์โมนสำหรับการเจริญเติบโตอีกด้วย

วิถีทางของกระบวนการหมักที่มีการเติมสารอาหารในระหว่างกระบวนการผลิต แบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงการเจริญเติบโต และช่วงการผลิตผลิตภัณฑ์ ถ้ามีการควบคุมวิถีเมตาบอลิสมของจุลินทรีย์ให้เหมาะสม จะมีผลดีอย่างยิ่งสำหรับผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นไม่พร้อมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (non - growth associated products) อย่างไรก็ตามควรคำนึงถึงแหล่งพลังงานและปริมาณออกซิเจนให้เพียงพอต่อการดำรงชีวิตและการสังเคราะห์สารทั้ง 2 ช่วงด้วย

ข้อดีของกระบวนการหมักที่มีการเติมสารอาหารระหว่างการผลิต

1. สามารถควบคุมการใช้แหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์และช่วยรักษาปริมาณออกซิเจนในถังหมัก

2. ควบคุมไม่ให้สารพิษที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ เช่น ในการผลิตเพนนิซิลินจะมีโซเดียมเฟนนิลอะซิเตต (sodium phenylacetate) เป็นสารตั้งต้นของโมเลกุลเพนนิซิลิน สารนี้จะเป็นพิษต่อรา ดังนั้นในระหว่างกระบวนการหมักจะต้องให้โซเดียมเฟนนิลอะซิเตตอยู่ในระดับต่ำจนไม่มีผลยับยั้งการเจริญของรา โดยการเติมสารนี้ลงไปทีละน้อย หรือเติมลงไปอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา
3. สำหรับการผลิตสารทุติยภูมิ ซึ่งจะมีการผลิตขึ้นเมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วงอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย การเติมสารอาหารในระหว่างกระบวนการผลิตจะช่วยควบคุมการเจริญและปริมาณเซลล์ของจุลินทรีย์ กรณีนี้แม้เซลล์จะเข้าสู่ช่วงอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตายแล้ว แต่ยังคงมีปริมาณสารตั้งต้นเหลือเพียงพอสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ต่อไป
4. ช่วยลดความหนืดในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่นในการผลิตกาวแซนแทน และ เด็กซ์แทรนซ์ เป็นต้น
5. ลดปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ การกลายพันธุ์ และความไม่เสถียรของพลาสมิด ซึ่งพบมากในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

การใช้สายใยซ้ำในกระบวนการหมักเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์โดยจุลินทรีย์

มีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านที่ศึกษากระบวนการผลิตแบบต่างๆ เพื่อเพิ่มความคุ้มค่าในการผลิตผลิตภัณฑ์ กระบวนการหมักโดยใช้สายใยซ้ำ (repeated batch fermentation) เป็นอีกหนึ่งวิธีการที่ช่วยเพิ่มความคุ้มค่าในกระบวนการผลิตเป็นอย่างมาก ทั้งเพิ่มปริมาณผลผลิต ลดระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต ลดค่าใช้จ่ายและแรงงานเกี่ยวกับการเตรียมงานในกระบวนการผลิต และลดปริมาณของเสียในกระบวนการผลิตอีกด้วย ตัวอย่างเช่น ปี ค.ศ. 1938 Gastrock ได้ศึกษาการผลิตกรดกลูโคนิกโดยรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ 67 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ให้ปริมาณกรดกลูโคนิกสูงถึง 97 เปอร์เซ็นต์ (คิดจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น) และเมื่อใช้สายใยซ้ำจากราสายพันธุ์เดิมโดยใช้สภาวะเดิมในการผลิต พบว่า สามารถใช้สายใยราที่กรองจากการผลิตครั้งก่อนในการผลิตกรดกลูโคนิกต่อได้อีกถึง 3 ซ้ำ โดยผลผลิตของกรดไม่ลดลง ปี ค.ศ. 1940 Porges ได้ใช้สายใยซ้ำในกระบวนการผลิตกรดกลูโคนิก โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสายใยราเจริญอยู่มาผลิตโดยไม่กรอง พบว่า สามารถผลิตกรดกลูโคนิกซ้ำได้ถึง 13 ครั้ง โดยผลผลิตของกรดไม่ลดลง ปี ค.ศ. 1991 Garg และคณะ ทำการผลิตกรดซิตริกบนผิวหน้าอาหารแข็งโดยใช้สายใยซ้ำของ *Aspergillus niger* KCU 520 พบว่า ราสามารถผลิตกรดซิตริกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ถึง 6 ครั้ง และปริมาณของกรดซิตริกที่ได้จากซ้ำที่ 1 สูงกว่าในรอบแรกหนึ่งเท่า (รอบแรกได้ปริมาณกรดซิตริก 45.6 กรัมต่อลิตร ส่วนในซ้ำที่ 1 ได้ปริมาณกรดโคจิก 98.4 กรัมต่อลิตร)

สำหรับการผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำมีรายงานการทดลองน้อยมาก โดยการผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำจะช่วยลดระยะเวลาที่ราต้องใช้ในการเจริญเติบโตทำให้ผลผลิตรวมในแต่ละครั้งมีปริมาณสูง ดังในรายงานการทดลองของ Ariff และ Rosfarizan (1997) ได้ผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำของ *Aspergillus flavus* Link 44 - 1 พบว่า สามารถเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดโคจิกได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพียงน้ำตาลกลูโคสกับซิเตรตบัฟเฟอร์เป็นองค์ประกอบโดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสภาวะดังกล่าวนี้ราสามารถผลิตกรดโคจิกได้นานถึง 600 ชั่วโมง โดยผลผลิตของกรดไม่ลดลง แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิกโดยราสายพันธ์ที่มีความคงตัวสูงจะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโคจิกได้ยาวนาน ดังรายงานการวิจัยของ Bajpai และคณะ (1981) ที่ศึกษาแล้วพบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus flavus* จะคงประสิทธิภาพการผลิตกรดโคจิกได้นานถึง 240 ชั่วโมงในบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์

การเก็บเกี่ยวผลผลิตกรดโคจิก

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักกรดโคจิกแล้ว จะทำการแยกกรดโคจิกที่อยู่ในน้ำหมัก ซึ่งมีหลายวิธี ดังนี้

1. การสกัดด้วยเอทธิลอะซิเตต (อ้างถึงใน Beelik, 1956)
2. การสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้อีเธอร์ (May และคณะ, 1931; Arnstein และ Bentley, 1953; Bentley, 1957)
3. การตกผลึกโดยลดปริมาตรน้ำหมัก หรือ ตกผลึกที่อุณหภูมิเยือกแข็งของน้ำ (0 องศาเซลเซียส) (Morton และคณะ, 1945)
4. การตกตะกอนในรูปเกลือทองแดง (Yabuta, 1913; Barnard และ Challenger, 1949)
5. การดูดซับด้วยผงถ่าน แล้วชะด้วยบิวทิลอะซิเตตที่อิ่มตัวด้วยแอมโมเนียมแห้ง (อ้างถึงใน Beelik, 1956; อ้างถึงใน Bajpai และคณะ, 1981)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กนิษฐา ภูวนารถนรานุบาล (2542) ศึกษาหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K13 บนผิวหน้าอาหารเหลว พบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกจะมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.75 ซึ่งมีองค์

ประกอบต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ประกอบด้วย กลูโคส 100 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัม แอมโมเนียมไนเตรต 1.814 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัม กรดฟอสฟอริก 0.054 มิลลิลิตร สำหรับภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิก คือ ใช้ปริมาณของหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) มีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 1 โดยตลอดการทดลองมีการเป่าอากาศในอัตราเร็ว 176 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาทีขณะเพาะเลี้ยง ด้วยสูตรอาหารและภาวะดังกล่าว จะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงถึง 30.35 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง

Barnard และ Challenger (1949) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกบนผิวหน้าอาหารเหลวของ *A. oryzae* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ K. medium 300 มิลลิลิตร ที่มีเอทธิลแอลกอฮอล์ 1.3 - 2.1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้หัวเชื้อในการผลิต 2 ชนิด คือ หัวเชื้อสปอร์แขวนลอย และหัวเชื้อที่เป็นสายใยของราที่เตรียมจากการเลี้ยง *A. oryzae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีในน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน จนกระทั่งราเจริญเต็มผิวหน้าอาหารเหลว จากนั้นนำสายใยที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่น จนไม่มีกรดโคจิกเหลืออยู่ แล้วจึงนำมาใช้เป็นหัวเชื้อชนิดสายใย นำหัวเชื้อทั้ง 2 ชนิดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ K - medium 300 มิลลิลิตรที่มีเอทธิลแอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การผลิตกรดโคจิกที่ใช้หัวเชื้อชนิดสายใยจะให้ผลผลิตกรดสูงกว่าการใช้หัวเชื้อสปอร์แขวนลอย และการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกมากกว่าการใช้เอธิลแอลกอฮอร์เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งในงานทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นของเอทธิลแอลกอฮอล์มากกว่า 2.1 เปอร์เซ็นต์ จะยับยั้งการเจริญของราเมื่อใช้หัวเชื้อสปอร์แขวนลอยเป็นหัวเชื้อในการผลิตกรดโคจิก นอกจากนี้ ยังศึกษาผลกระทบของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ต่อการผลิตกรดโคจิก พบว่า ถ้าในบรรยากาศมีปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ 30 เปอร์เซ็นต์ ออกซิเจน 25 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน 45 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้รามีการเจริญน้อยมาก รวมทั้งไม่มีการสร้างกรดโคจิก แต่เมื่อลดปริมาณ คาร์บอนไดออกไซด์ลงจนเหลือ คาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ 10 เปอร์เซ็นต์ ออกซิเจน 25 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน 65 เปอร์เซ็นต์ พบว่าราสามารถสร้างกรดโคจิกได้ในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง

Bassappa (1970) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดย resting cell ของ *A. flavus* โดยทำการเพาะเลี้ยงสปอร์แขวนลอยให้บนผิวหน้าอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสายใยราที่ได้มาล้างด้วยน้ำปลอดประจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อและนำมาเพาะเลี้ยงต่อเพื่อให้ได้ส่วนของสายใยที่เรียกว่า resting mycelium จากนั้นมาปั่นเป็นชิ้นๆ ในเครื่องปั่น แล้วจึงนำไปใช้เป็นหัวเชื้อทดลองสำหรับการผลิตกรดโคจิก ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างโดยแปรผันให้อยู่ในช่วง 5 - 8 อุณหภูมิในช่วง 20 - 37 องศาเซลเซียส และอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของ

อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งแปรผันความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 10 20 30 และ 40 มิลลิลิตร พบว่า ที่ความเป็นกรดด่าง 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร จะได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 170 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการผลิต นั่นแสดงให้เห็นว่า แม้จะใช้ส่วนของสายใยมาเป็นหัวเชื้อในการผลิตกรดโคจิก แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในภาวะที่เหมาะสม เช่น ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิและอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้ราสามารถผลิตกรดโคจิกได้

Bajpai (1982b) เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำของ *A. flavus* เมื่อเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารเหลวกับการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครส 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าวิธีการเพาะเลี้ยงราให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว จะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า โดยให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 70.4 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าให้ผลผลิตเท่ากับ 20.92 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน

Garg และ Sharma (1991) ได้ศึกษาผลิตกรดซิตริกโดยใช้สายใยซ้ำของ *A. niger* KCU520 ที่เพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารเหลว โดยมีน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ราจะใช้เวลา 5 วัน สำหรับการเติบโตหลังจากนั้นจะเริ่มผลิตกรดซิตริก ซึ่งน้ำตาลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดซิตริกได้ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาณกรด 45.6 กรัมต่อลิตร) จากนั้นทำการผลิตกรดต่อโดยใช้สายใยซ้ำโดยถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าออกไม่ให้กระทบกระเทือนบนผิวหน้าของรา แล้วใส่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิมลงไปเพื่อผลิตกรดซิตริกต่อ พบว่าในซ้ำที่ 1 ของการผลิตนี้ ราสามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดซิตริกได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 5 วัน(ปริมาณกรดซิตริก 98.4 กรัมต่อลิตร) จากนั้นทำการผลิตกรดซิตริกโดยใช้สายใยซ้ำเดิม พบว่าสามารถผลิตกรดซิตริกได้อีก 2 - 4 ซ้ำ โดยการผลิตในซ้ำที่ 2 - 3 จะให้เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดซิตริกมีค่าประมาณ 75 - 80 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดซิตริกเท่ากับ 96.0 และ 90 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนในซ้ำที่ 4 ของการผลิต จะให้ปริมาณกรดซิตริกเท่ากับ 58 กรัมต่อลิตร และเมื่อผลิตกรดซิตริกต่อเป็นซ้ำที่ 5 ปริมาณกรดซิตริกที่ราผลิตได้ลดลงเหลือ 48 กรัมต่อลิตร คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลที่ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดซิตริกมีค่าเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ราสามารถผลิตกรดซิตริกโดยใช้สายใยซ้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถผลิตกรดซิตริกได้ถึง 5 ซ้ำให้ผลผลิตรวมถึง 447.6 กรัมต่อลิตร

Ogawa (1995) ทดลองผลิตกรดโคจิกจาก *A. oryzae* NRRL484 โดยวิธีเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารเหลวที่มีเยื่อบางๆ SE 20 ซึ่งทำจากโพลีซัลโฟนที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร เป็นพาหะสำหรับให้จุลินทรีย์เกาะ (membrane surface liquid culture; MSLC) เทียบกับการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวที่มีการเขย่า โดยแปรผันปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในช่วง

0.5 - 10 กรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ในช่วง 2.5 - 5.0 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิก การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยวิธี MSLC จะให้ผลผลิตสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า โดยให้ผลผลิตกรด 29.0 กรัมต่อลิตรในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง แต่เมื่อลดปริมาณสารสกัดจากยีสต์ให้อยู่ในช่วง 0.5 – 2.5 กรัมต่อลิตร พบว่า การผลิตในอาหารเหลวที่มีการเขย่าให้ผลผลิตดีกว่า คือให้ผลผลิต 20.6 กรัมต่อลิตรในวันที่ 9 ของการผลิต และเมื่อทดลองเติมน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 กรัมต่อลิตร ประมาณ 2 - 3 ครั้ง ระหว่างการผลิต จะให้ปริมาณกรดโคจิกสูงมากทั้งในการเพาะเลี้ยงโดยวิธี MSLC และในขวดเขย่า โดยจะให้ผลผลิตกรดโคจิก 100 และ 39 กรัมต่อลิตรในวันที่ 20 และ 22 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ และเมื่อทดลองผลิตกรดโคจิกแบบ MSLC ที่มีการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิตโดยใช้สายใยซ้ำ (repeated fed batch) พบว่า เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตของทั้ง 3 วิธีซึ่งได้แก่ การผลิตในอาหารเหลว (liquid medium) การผลิตแบบกวน (batch MSLC) และ repeated fed batch MSLC ให้อัตราการผลิตเป็น 1.6 2.9 และ 14.2 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ

Ariff (1996) เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกของรา *Aspergillus flavus* Link 44 - 1 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Dissolve oxygen tension, DOT) โดยมีเปอร์เซ็นต์การอิ่มตัวของออกซิเจน 30 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ กับชุดการทดลองที่ไม่มีการควบคุมปริมาณ DOT พบว่า ที่เปอร์เซ็นต์การอิ่มตัวของออกซิเจน 30 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 5.7 10.0 และ 14.6 กรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 19.5 15.8 และ 13.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่การทดลองในชุดที่ไม่มีการควบคุมค่า DOT จะให้ปริมาณกรดโคจิกเท่ากับ 15.8 กรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 13.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นว่า การทดลองในชุดที่ไม่มีการควบคุมค่า DOT ให้ปริมาณกรดสูงกว่าในชุดที่มีการควบคุม แต่เมื่อเปลี่ยนระบบการควบคุมปริมาณ DOT เป็น 2 ช่วง คือ ให้ค่า DOT ในช่วงการเจริญเติบโตของราเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และช่วงการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ จะให้ผลผลิตของกรดโคจิกสูงถึง 28.9 กรัมต่อลิตร โดยมีน้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 13.0 กรัมต่อลิตร เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากในช่วงของการเจริญเติบโต ราต้องการปริมาณออกซิเจนสูงเพื่อที่จะนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิสมของเซลล์ แต่ในช่วงของการผลิตกรดโคจิก ถ้ามีปริมาณออกซิเจนมากเกินไปจะมีผลไปยับยั้งประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการผลิตกรดโคจิก นอกจากนี้ เมื่อทดลองใช้ระบบหมักแบบกึ่งกะมาผลิตกรดโคจิกที่มีการควบคุมค่า DOT เป็น 2 ช่วง พบว่ากลับให้ผลผลิตกรดต่ำกว่าระบบการหมักแบบกะ โดยผลผลิตกรดโคจิกจากกระบวนการหมักแบบกึ่งกะจะลดลงจากกระบานการหมักแบบกะที่มีการควบคุมค่า DOT เป็น 2 ช่วงถึง 34.25 เปอร์เซ็นต์ แต่กลับมีปริมาณเซลล์ราเพิ่มขึ้น 20 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากว่าการใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะโดยมีปริมาณ DOT ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเพียงพอ จะทำให้เซลล์ราอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการ

เจริญเติบโต ราจึงใช้สารตั้งต้นไปในการเติบโตมากขึ้น ทำให้เหลือสารตั้งต้นที่จะใช้ผลิตกรดโคจิกน้อยลง ผลผลิตของกรดจึงลดลงไปด้วย ดังนั้น ถ้านำกระบวนการหมักแบบกึ่งกะมาใช้ในการผลิตกรดโคจิกโดยให้จุลินทรีย์เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่มีค่า DOT ในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเหมาะสม น่าจะทำให้ได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงขึ้น

Ariff และ Rosfarizan (1997) ได้ทดลองผลิตกรดโคจิกโดยใช้รา *A. flavus* Link 44 - 1 โดยในงานวิจัยจะมุ่งเน้นที่จะใช้แบบจำลองที่อ้างอิงจากสมการทางคณิตศาสตร์มาอธิบายลักษณะการเติบโต การใช้สารตั้งต้น และการผลิตกรดโคจิกจากจุลินทรีย์ของสายพันธุ์ดังกล่าวในการหมักแบบกะที่มีการใช้สายใยซ้ำ (resuspended cell system fementation) แบบจำลองนี้ได้แสดงให้เห็นว่ากรดโคจิกเป็นผลิตผลทุติยภูมิ เมื่อใช้ระบบการหมักแบบใช้สายใยซ้ำ พบว่าจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดโคจิกได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพียงน้ำตาลกลูโคสกับซิเตรตบัฟเฟอร์ (citrate buffer) เป็นองค์ประกอบ มีค่าความเป็นกรดด่าง 3.5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยวิธีนี้สามารถผลิตกรดโคจิกได้นานถึง 600 ชั่วโมง เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักสายใยเปียก 19.2 กรัมต่อลิตร หรือน้อยกว่า โดยมีค่าคงที่ของอัตราการสร้างกรดโคจิกที่ไม่ควบคู่กับการเติบโต (non - growth associate rate constant for kojic acid formation, n) เท่ากับ 0.011 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมของเซลล์ต่อชั่วโมง แต่พบว่าค่าคงที่นี้จะลดลงเมื่อมีปริมาณสายใยเท่ากับ 26.1 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามการใช้น้ำตาลกลูโคสค่อนข้างจะใกล้เคียงกันในทุกค่าของปริมาณสายใยที่ใช้ในการทดลอง อยู่ที่ 0.45 กรัมต่อลิตร

Rosfarizan และ Ariff (2000) ได้ศึกษาเกี่ยวกับจลศาสตร์ของการผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *A. flavus* Link 44 - 1 ในอาหารเหลวโดยอาศัยสมการของ Luedeking - Piret พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด คือน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 100 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด 39.9 กรัมต่อลิตรในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจะเป็นอินทรีย์ไนโตรเจนคือ สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร และการเติมสารสกัดจากยีสต์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวจะมีผลส่งเสริมการเติบโตของเซลล์ และยับยั้งการผลิตกรดโคจิก อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมมีค่าเท่ากับ 93.3 และเมื่อหาค่า K_m และ V_{max} จากปฏิกริยาการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิกโดยอาศัยสมการของ Michaelis - Menten มีค่าเท่ากับ 18.47 กรัมต่อลิตรของกลูโคส และ 0.154 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

จากรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องหลายชิ้นแสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกซึ่งไม่มีการปั่นกวนหรือเขย่าให้ผลผลิตกรดสูงเป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากไม่ต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูงซึ่งเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในประเทศที่กำลังพัฒนาได้ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจที่จะนำมาขยายส่วนการผลิต เพื่อศึกษาแนวโน้มความเป็นไปได้ที่จะนำ

ไปใช้ผลิตจริงในระดับอุตสาหกรรม โดยต้องเลือกใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและศึกษาภาวะบางประการที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ เพื่อให้จุลินทรีย์คงประสิทธิภาพในการผลิตกรดโคจิก ให้ผลผลิตกรดโคจิกไม่ลดลงจากการผลิตกรดโคจิกในระดับห้องปฏิบัติการ ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงมุ่งที่จะขยายส่วนการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K13 (คัดเลือกโดยเพชรรุ่ง พันธ์พิริยะ, 2537) ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว โดยศึกษาหาขนาดของถาดตื้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิก (ขนาดความจุของอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ถึง 4 ลิตร) และศึกษาการผลิตแบบที่มีการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิตและการใช้สายใยซ้ำในการผลิต

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกในระดับขยายส่วน โดยเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวในถาดตื้นความจุ 1 ถึง 4 ลิตร และศึกษาการผลิตแบบที่มีการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิตและการใช้สายใยซ้ำ

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. หาขนาดของถาดตื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว

2. หาภาวะบางประการที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกในระดับขยายส่วน เช่น ปริมาณของหัวเชื้อที่เหมาะสม และ การเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวในอัตราเร็วที่เหมาะสม

3. ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดโคจิกโดยใช้กระบวนการหมักที่มีการเติมสารอาหารในระหว่างการเพาะเลี้ยง

4. ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำของ *Aspergillus oryzae* K13 ในการผลิตกรดโคจิก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย