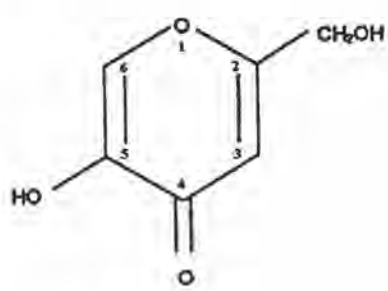
บทที่ 1

บทนำ

กรดโคจิก (kojic acid: $C_6H_6O_4$) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง มีชื่อทางเคมีว่า 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-ϒ-pyrone หรือ 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4H-pyrone หรือ 5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one (Prescott และ Dunn, 1959; Bajpai และคณะ, 1982a; Merck, 1989; Lokaj และคณะ, 1991; Pirselova และคณะ, 1996) มีการค้นพบกรดโคจิกเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1907 โดย Saito สามารถแยกกรดชนิดนี้ได้จากสายใยของ *Aspergillus oryzae* ที่เจริญอยู่บนข้าวนึ่ง และพบว่าเมื่อเติมเฟอร์ริกคลอไรด์ลงในสารละลายของกรดนี้จะเกิดสีแดงขึ้น อีกทั้งได้จำแนกกรดนี้ไว้ในกลุ่มกรดเบตา-รีซอซิลคาร์บอนิก (β-resocyl-carbonic acid) ต่อมาในปี ค.ศ. 1912 Yabuta ได้ทำการศึกษากรดที่ได้จาก Saito ค้นพบและตั้งชื่อว่า "กรดโคจิก" (อ้างถึงใน Gray, 1959) หลังจากนั้นอีก 2 ปี คือในปี ค.ศ. 1924 Yabuta ได้ศึกษาถึงโครงสร้างทางเคมีของกรดและตั้งชื่อทางเคมีว่า 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-ϒ-pyrone ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก

สมบัติทางเคมีและกายภาพของกรดโคจิก

1.ลักษณะโมเลกุลของกรด เป็นสารประกอบในกลุ่มไพโรนที่ขาดหมู่คาร์บอกซิล ดังนั้นสมบัติของกรดจึงเกิดจากหมู่อิโนลิก ไฮดรอกซิล (enolic hydroxyl group) (Casida, 1968) ซึ่งอยู่ตรงตำแหน่งคาร์บอนที่ 5 มีผลทำให้กรดโคจิกมีคุณสมบัติเป็นกรดอย่างอ่อน ซึ่ง ณ ตำแหน่งนี้

จะเป็นตำแหน่งที่อิออนของโลหะต่างๆมาทำปฏิกิริยาได้เป็นเกลือของกรด โดยโลหะที่สามารถทำปฏิกิริยาร่วมได้ เช่น โซเดียม แบเรียม แคลเซียม สตรอนเซียม โคบอลท์ ทองแดง นิเกิล เหล็ก แมงกานีส แคดเมียม พลวง สังกะสี อลูมิเนียม และอื่นๆ (Wiley และคณะ, 1942; Bryant และ Fernelius, 1954; อ้างถึงใน Bajpai และคณะ, 1982a.)

2. ลักษณะโครงสร้างทางเคมี ใน 1 โมเลกุลของกรดโคจิก ประกอบด้วย คาร์บอน 50.71 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจน 4.26 เปอร์เซ็นต์ และออกซิเจน 45.03 เปอร์เซ็นต์ (Merck, 1989)

3. ลักษณะเฉพาะโดยทั่วไป เป็นผลึกรูปเข็ม (primatic needle) ไม่มีสี ละลายได้ดีในน้ำ เอทธานอล เมธานอล อะซีโตน และเอทธิลอะซีเตต ละลายได้บ้างเล็กน้อยในเอทธิลอีเธอร์ ไพริดีน และคลอโรฟอร์ม ไม่สามารถละลายได้ในเบนซีน และ เฮกเซน จุดหลอมเหลว 153-154 องศาเซลเซียส ค่าการแตกตัวของกรด (pKa) 7.90, 8.03 (Yabuta, 1924; Morton และคณะ, 1945; Beelik, 1956 ; Prescott และ Dunn, 1959; Bajpai และคณะ, 1982a)

ประโยชน์ของกรดโคจิก

กรดโคจิกมีประโยชน์มากมายดังต่อไปนี้

1. ในอุตสาหกรรมพลาสติก โดยกรดโคจิกเป็นองค์ประกอบหนึ่งในการผลิตพอลิเมอร์คุณภาพสูง ซึ่งสามารถนำมาใช้ทำท่อส่งน้ำทะเล ถังเก็บเชื้อเพลิง ตู้บรรจุสินค้าเพื่อการขนส่ง และวัสดุก่อสร้าง (McCulloch, 1961; Crueger และ Crueger, 1990)

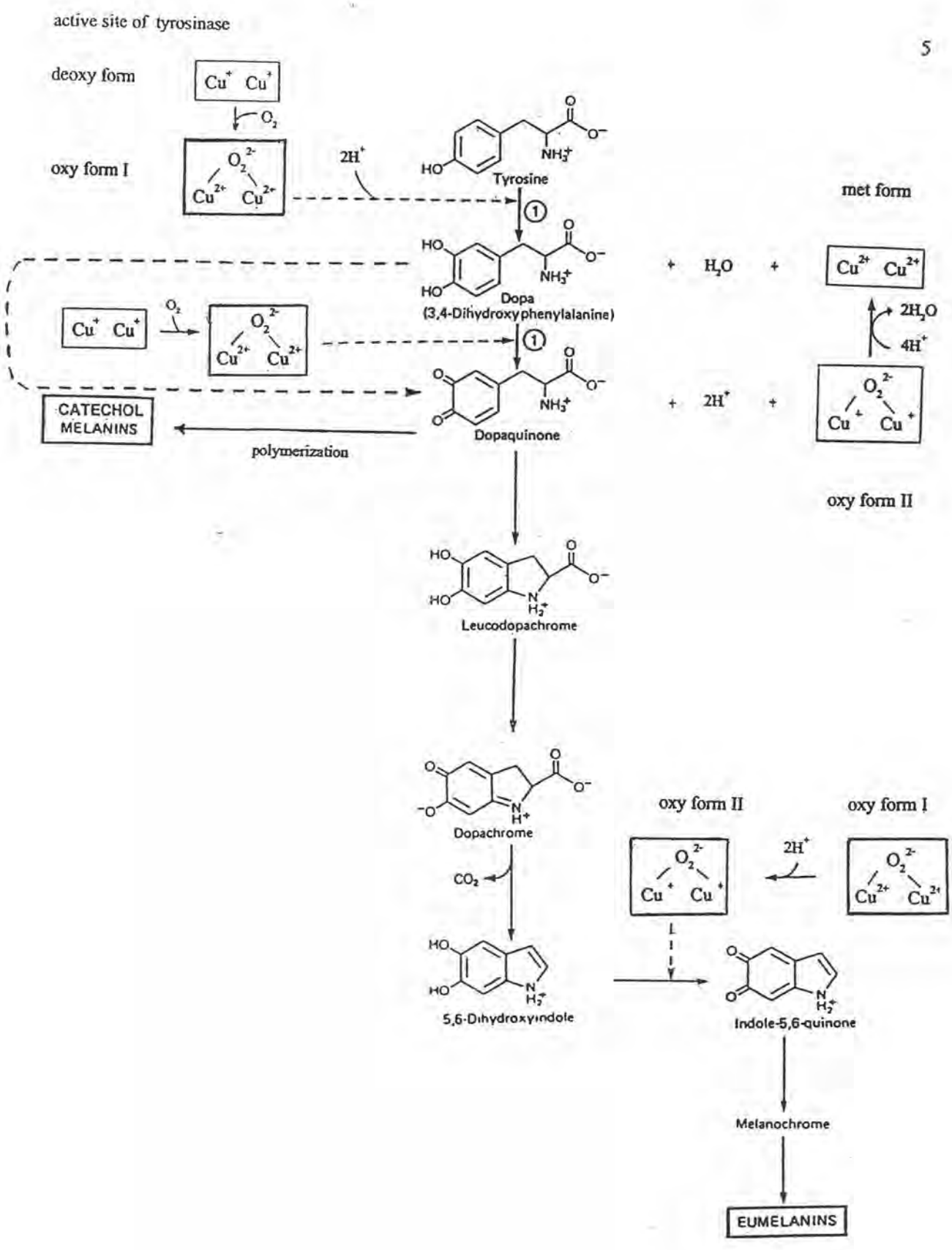
2. ในอุตสาหกรรมอาหาร กรดโคจิกใช้เป็นสารเริ่มต้นในการสังเคราะห์สารที่ช่วยเพิ่มหรือปรุงแต่งกลิ่นรสในอาหารและเครื่องดื่มเช่น มอลทอล และเอทธิลมอลทอล ซึ่งบริษัท Pfizer ได้ผลิตและขายในสหรัฐอเมริกาภายใต้ชื่อทางการค้าว่า " Vetol" และ "Vetol-Plus" การเติมมอลทอลและเอทธิลมอลทอลในอาหารโดยใช้ความเข้มข้นต่ำ 1 - 250 ส่วนต่ออาหารล้านส่วน จะทำให้เกิด "vevet mouth" ในอาหารนั่นคือทำให้รสชาติของอาหารดีขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารที่มีรสหวาน ส่วนการเติมในอาหารโดยใช้ความเข้มข้นสูงจะใช้สำหรับการผลิตลูกกวาด กลิ่นคาราเมล กลิ่นผลไม้ และยังสามารถใช้เพิ่มรสเบอร์รี่ สับปะรด และมะนาวได้ รวมทั้งสามารถกลบรสขมของน้ำตาล แซคคาริน แอสปาแตม อะซีซัลเฟมเค ไซคลาเมท และซูคราโลส ซึ่งเป็นสารให้ความหวานสังเคราะห์ โดยสารให้ความหวานเหล่านี้มักใช้เติมในเครื่องดื่มผลไม้ ไวน์ เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ ผลิตภัณฑ์นม อาหารหวานชนิดต่างๆ ผลิตภัณฑ์ขนมปังและลูกกวาดช็อคโกแลต สำหรับขนมปัง เค้กและแป้งนั้น มอลทอล

และเอทธิลมอลทอลสามารถเพิ่มกลิ่นรสให้ดีขึ้นได้ แต่จะต้องเติมในขั้นตอนสุดท้ายของการทำขนมปัง เนื่องจากสารประกอบดังกล่าวระเหยได้ง่าย (LeBlanc และ Akers, 1989; Bigelis และ Tsai, 1995) นอกจากนี้ยังมีการผสมกรดโคจิกในอาหารญี่ปุ่นเช่น เต้าหู้ ซีอิ๊ว และเหล้าสาเก โดยเชื่อว่าช่วยเสริมสุขภาพเนื่องจากสามารถลดระดับ reactive oxygen species (ROS) ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) อนุมูลอิสระของซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) และอนุมูลอิสระของไฮดรอกซิล (OH^-) ซึ่งเป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์โดยกรดโคจิกจะทำหน้าที่เป็นแอนตี้ออกซิแดนซ์ สามารถลดจำนวนของอนุมูลอิสระที่จะมีผลทำลายเนื้อเยื่อในร่างกายและเสริมการทำงานของเม็ดเลือดขาวโดยช่วยเพิ่มปริมาณของแคลเซียมอิออนในนิวโทรฟิลซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยเมื่อร่างกายถูกรบกวนจากสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพ เอนไซม์ NADPH oxidase ที่อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์จะถูกกระตุ้นให้ทำงานซึ่งผลของปฏิกิริยาจะได้ ROS ซึ่งเป็นพิษต่อทั้งจุลชีพ และเซลล์ของร่างกาย (Niwa และ Akamatsu, 1991) นอกจากนี้สามารถใช้กรดโคจิกเป็นส่วนผสมร่วมกับกรดแอสคอบิกและกรดซิตริกเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไธโรซิเนสซึ่งเป็นเอนไซม์เร่งการเกิดสีน้ำตาล อันเนื่องมาจากสารสีคาทีคอลเมลานิน (catechol melanins) ในอาหารประเภทพืช (เห็ด มันฝรั่ง และแอปเปิ้ล) และสารสียูเมลานิน (eumelanins) ในสัตว์ทะเลจำพวกกุ้ง ดังแสดงในรูปที่ 2ก (Cabanes และคณะ, 1987; Tanaka และคณะ, 1989; Chen และ, 1991a; Chen และคณะ, 1991b; Murray และคณะ, 1993; Kahn, 1995; Kahn และคณะ., 1995; Kahn และคณะ, 1997)

3. **ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง** มีการใช้กรดโคจิกเป็นส่วนประกอบสำคัญของเครื่องสำอางที่ช่วยทำให้ผิวขาวขึ้น (Hatae และ Nakashima, 1989; Hara, 1990; Hatae, 1990a; Cabanes และคณะ, 1994; Sakai และคณะ, 1995) ทั้งนี้เพราะกรดโคจิกสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไธโรซิเนสหรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเอนไซม์พอลีฟีนอลออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไธโรซิเนสไปเป็นเมลานิน โดยเป็นการยับยั้งแบบแย่งจับกับสารตั้งต้น (competitive inhibition) เนื่องจากกรดโคจิกจะมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับไธโรซีน (รูปที่ 2ข) ลักษณะโดยทั่วไปของเอนไซม์ไธโรซิเนสเป็นเอนไซม์ที่มีหมู่ คอปเปอร์ไอออน 2 อะตอมที่บริเวณ active site สามารถจำแนกรูปแบบของเอนไซม์ตามจำนวนประจุที่อยู่บน คอปเปอร์ไอออนได้ดังนี้ met form [Cu(II)Cu(II)] deoxy form [Cu(I)Cu(I)] และ oxy form 2 แบบ ได้แก่ [Cu(II)Cu(II)O_2] และ [Cu(I)Cu(I)O_2] มีไธโรซีนเป็นสารตั้งต้นในการสร้างยูเมลานินที่เป็นสาเหตุทำให้ผิวหนังเป็นจุดสีน้ำตาลดังแสดงในรูปที่2ก โดยเอนไซม์

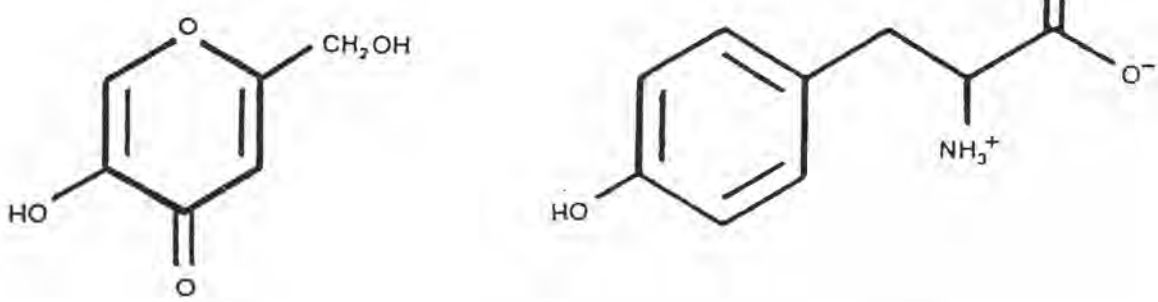
ไธโรซิเนสจะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนจากไธโรซีนไปเป็นโดปา แล้วเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนจากโดปาเป็นโดปาควิโนน หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีต่อไปโดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ได้สารตัวกลางต่างๆ และเอนไซม์จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาอีกครั้งโดยเปลี่ยนจาก 5, 6 - ไดไฮดรอกซีอินโดล เป็น อินโดล - 5, 6 - ควิโนน ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นยูเมลานิน (Cabanes และคณะ, 1987; Tanaka และคณะ, 1989; Chen และคณะ, 1991a; Chen และคณะ, 1991b; Murray และคณะ, 1993) นอกจากนี้ยังสามารถใช้กรดโคจิกเป็นส่วนผสมร่วมกับลิโพโซมซึ่งเป็นไขมันชนิดหนึ่งประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วและไม่มีขั้ว (amphipathic) และเมื่ออยู่ในของเหลวจะมีการจับตัวกันเป็นวงกลมเป็นชั้นของลิปิด (lipid bilayer) โดยหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำหันเข้าหากันทำให้ส่วนที่มีขั้วคือส่วนที่ชอบน้ำสัมผัสกับของเหลว และส่วนที่มีขั้วกลางโมเลกุลจะใช้หุ้มสารประกอบ เช่น กรดโคจิก หรือยาอื่นๆ จึงเหมาะสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมทางการแพทย์ และเครื่องสำอาง โดยเมื่อถูกหุ้มด้วยลิโพโซมจะทำให้กรดโคจิกหรือยาที่อยู่ภายในค่อยๆถูกปล่อยออกมาช้าๆทำให้อยู่ในร่างกายได้นานยิ่งขึ้น ซึ่งส่งผลให้กรดโคจิกหรือยาทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น และเนื่องจากผิวนอกของลิโพโซมเป็นส่วนที่มีขั้วจึงสามารถแทรกซึมผ่านผิวหนังที่เป็นชั้นไขมันได้ง่ายขึ้น (รูปที่ 3) โดยมีรายงานว่าความเข้มข้นของกรดโคจิกที่ใช้ในเครื่องสำอางคือ 0.5 - 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (Murray และคณะ, 1993; Meybeck,1994)

4. ทางด้านการแพทย์ บางอนุพันธ์ของกรดโคจิกเช่น อะราลคอกซี และเอริลออกซีอัลคอกซี สามารถใช้ในการรักษาโรคภูมิแพ้ (allergies) การอักเสบ (inflammatory conditions) และการตีบตัวของหลอดโลหิตในหัวใจ(coronary vasoconstriction) (Masateru และShone,1989) ทั้งสามารถใช้เป็นส่วนผสมของยาที่ลดอาการผิวหนังร้อนแดงเนื่องจากเลือดคั่ง (Hatae, 1990b) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบบางชนิด เช่น *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* และ *Eberthella typhosa* (Morton และคณะ, 1945; Beelik, 1956; Pirselova และคณะ, 1996)



รูปที่ 2ก วิถีการสังเคราะห์คาทีคอลเมลานินในพืช และยูเมลานินในสัตว์

(Murray และคณะ, 1993)

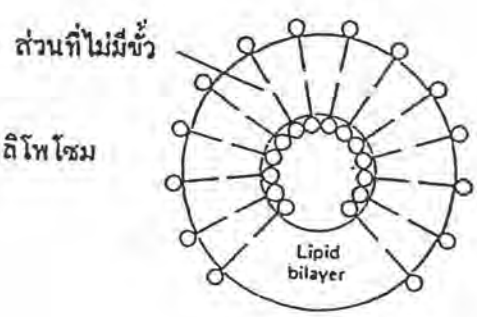


กรดโคจิก ไธโรซีน

รูปที่ 2ข เปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก และไธโรซีน

ส่วนที่มีขั้ว หรือส่วนที่ชอบน้ำ

ส่วนที่ไม่มีขั้ว หรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำ



รูปที่ 3 ลักษณะโมเลกุลของลิโพโซม (Murray และคณะ, 1993)

5.ทางด้านการเกษตร กรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรดโคจิกช่วยเพิ่มฤทธิ์ของสารฆ่าแมลงในกลุ่มของไพรีทรอย และคาร์บาเมทให้ดีขึ้น ทำให้ปริมาณการใช้สารฆ่าแมลงในกลุ่มดังกล่าวน้อยลงแต่ประสิทธิภาพดีขึ้นกว่าเดิม ซึ่งเป็นผลดีต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากกรดโคจิกสลายตัวได้ง่ายในธรรมชาติจึงช่วยลดปริมาณสารพิษตกค้างได้ (Dowd, 1990) นอกจากนี้ยังพบว่าอนุพันธ์เปปไทด์และกรดอะมิโนของกรดโคจิกมีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อรา *Pythium graminicola* *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคไหม้ในต้นกล้า (seedling blight) ทำให้เกิดโรคเหี่ยวที่เกิดจากรา *Fusarium sp.* และโรคไหม้ในกาบใบ (sheath blight) ตามลำดับ (Kayahara และคณะ, 1990)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิก

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้มีทั้งในกลุ่มของแบคทีเรีย และรา โดยเฉพาะอย่างยิ่งราในสกุล *Aspergillus* และ *Pencillium* ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ใช้ผลิตกรดโคจิกจะมีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นที่เป็นแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆได้แตกต่างกัน สำหรับการผลิตในอุตสาหกรรมมักจะผลิตโดยการหมักด้วยรา ซึ่งตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้

ชนิดของจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus oryzae	รพี โรจนอุไร, 2539; Yabuta, 1913; Yabuta, 1923; Yabuta, 1924; Tamiya, 1928; Challenger และคณะ, 1929; Tamiya และ Hida, 1930; Katagiri และ Kitahara, 1933; Sakaguchi และคณะ, 1948; Barnard และ Challenger, 1949; Arnstein และ Bentley, 1953; Ohara, 1954; Bentley, 1957; Parrish และคณะ, 1966; Kwak และ Rhee, 1992a; Kwak และ Rhee, 1992b; Ogawa และคณะ, 1995; Takamizawa และคณะ, 1996; Wakisaka และคณะ, 1998.

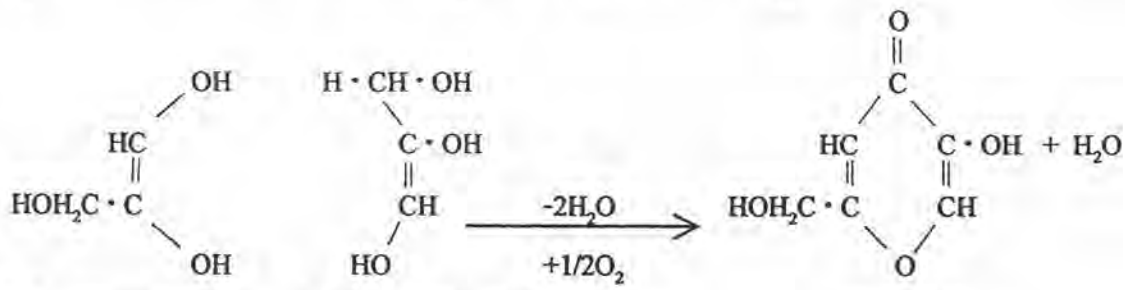
ตารางที่ 1 (ต่อ) ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิก

ชนิดของจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus flavus	Tamiya และ Hida, 1930; Arnstein และBentley, 1953; Bentley, 1957; Parrish และคณะ, 1966; Basappa และคณะ, 1970; Lin และคณะ, 1976; Bajpai และคณะ, 1982b; Horn และคณะ, 1996; Ariff และคณะ, 1996; Rosfarizan และคณะ, 1998a; Rosfarizan และคณะ, 1998b.
Aspergillus tamarii	Horn และคณะ, 1996; Ohara, 1954; Parrish และคณะ, 1966.
Aspergillus clavatus	Tamiya และ Hida, 1930; Parrish และคณะ, 1966.
Aspergillus candidus	Tamiya และ Hida, 1930; Wei และคณะ, 1991.
Aspergillus giganteus	Tamiya และHida, 1930
Aspergillus luteovirscens	Morton และคณะ, 1945.
Aspergillus ustus	Parrish และคณะ, 1966.
Aspergillus effusus	Parrish และคณะ, 1966.
Penicillium citrinum	Parrish และคณะ, 1966.
Penicillium griseofulvum	Parrish และคณะ, 1966.
Penicillium purpurogenum	Parrish และคณะ, 1966.
Gluconoacetobacter roseus	Ikeda, 1954.
Gluconoacetobacter opacus var. mobilis	Sakaguchi และคณะ, 1948.
Acetic bacteria	Takahashi และ Asai, 1933.

กระบวนการสังเคราะห์กรดโคจิกทางชีวภาพ

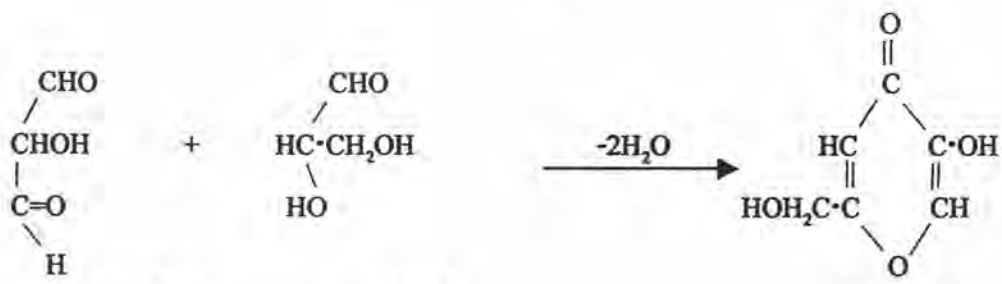
จุลินทรีย์สังเคราะห์กรดโคจิกจากแหล่งคาร์บอนได้หลากหลายชนิดโดยกระบวนการหมักที่ใช้ออกซิเจน จึงมีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ศึกษาวิถีการสังเคราะห์กรดโคจิกและเสนอทฤษฎีต่างๆมากมาย ดังนี้

1. การสังเคราะห์กรดโคจิกโดยใช้สารประกอบที่มีคาร์บอน 3 อะตอมเป็นสารตั้งต้น ในปี ค.ศ. 1931 Challenger และคณะ พบว่า *A. oryzae* และ *A. niger* สามารถใช้ไดไฮดรอกซีอะซีโตนและสารในกลุ่มกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ตามลำดับ โดยไดไฮดรอกซีอะซีโตนจะถูกดึงน้ำและเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้เป็นกรดโคจิก (รูปที่ 4ก) ในขณะที่ ถ้าใช้สารในกลุ่มกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนจะถูกดึงน้ำได้เป็นกรดโคจิก (รูปที่ 4ข)



ไดไฮดรอกซีอะซีโตน ไดไฮดรอกซีอะซีโตน กรดโคจิก

(ก)



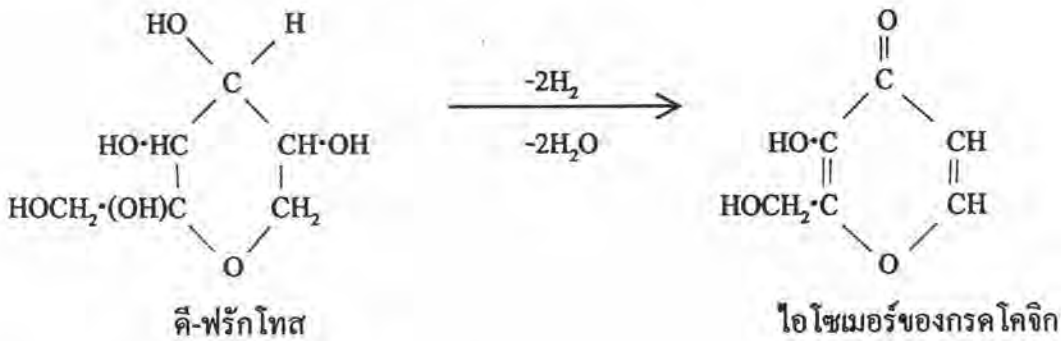
กลีเซอริกไดอัลดีไฮด์ กลีเซอรอลดีไฮด์ กรดโคจิก

(ข)

รูปที่ 4 การสังเคราะห์กรดโคจิกจากสารประกอบที่มีคาร์บอน 3 อะตอม

(Challenger และคณะ, 1931; อ้างถึงใน Gray, 1959)

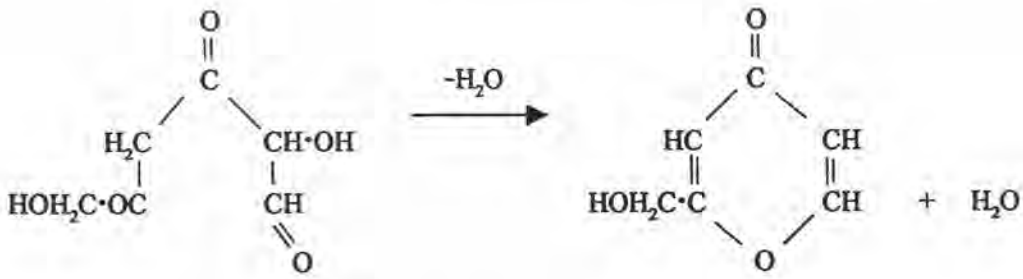
2. การสังเคราะห์กรดโคจิกโดยใช้น้ำตาลฟรักโทสเป็นสารตั้งต้น โดยจะถูกดึงน้ำและไฮโดรเจนได้เป็นกรดโคจิก (Corbellini และ Gregorini, 1933) ซึ่งแสดงดังรูปที่ 5



ดี-ฟรักโทส ไอโซเมอร์ของกรดโคจิก

รูปที่ 5 การสังเคราะห์กรดโคจิกจาก ดี-ฟรักโทส (Corbellini และ Gregorini, 1933)

3. การสังเคราะห์กรดโคจิกโดยใช้ 1-ไฮดรอกซีอะซีทิล-3-ฟอร์มิล-3-ไฮดรอกซีอะซีโตน โดยจะถูกดึงน้ำได้เป็นกรดโคจิก (อ้างถึงใน Prescott และ Dunn, 1959) แสดงดังรูปที่ 6

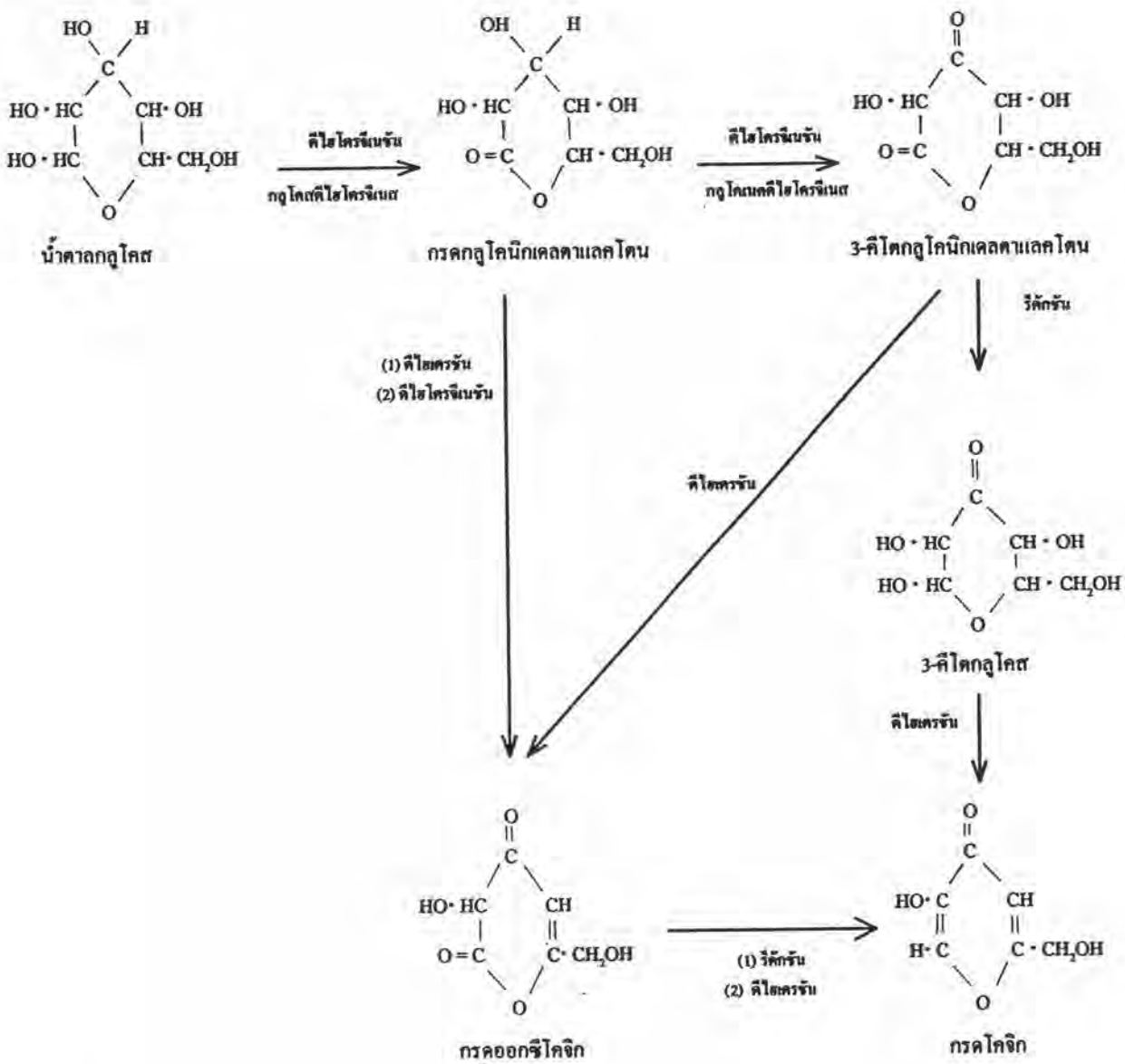


1-ไฮดรอกซีอะซีทิล-3-ฟอร์มิล-3-ไฮดรอกซีอะซีโตน กรดโคจิก

รูปที่ 6 การสังเคราะห์กรดโคจิกจาก 1-ไฮดรอกซีอะซีทิล-3-ฟอร์มิล-3-ไฮดรอกซีอะซีโตน (อ้างถึงใน Prescott และ Dunn , 1959)

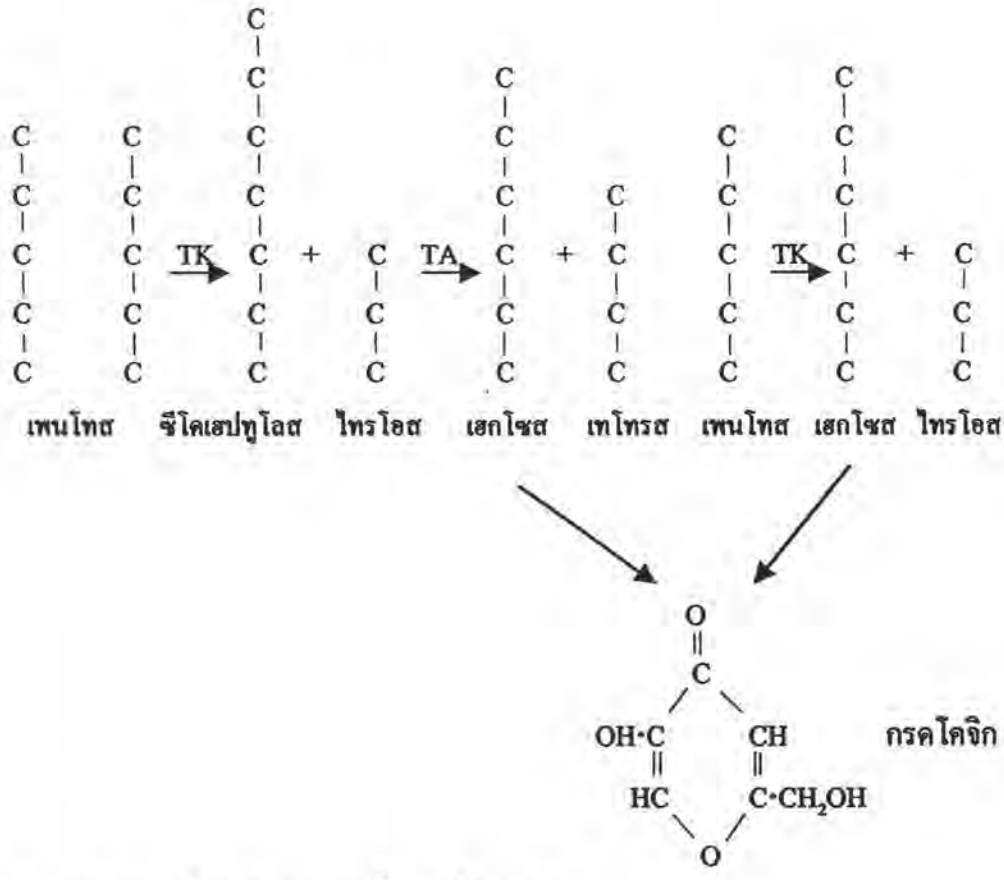
4. การสังเคราะห์กรดโคจิกโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น วิถีการสร้างนี้เป็นวิถีที่มีการยอมรับมากที่สุดโดยเป็นการสร้างกรดโคจิกที่ผ่านปฏิกิริยาต่างๆ โดยอาศัยเอนไซม์ (Yabuta,

1913; Kinoshita, 1927; Haworth, 1929 และ Arnstein และ Bentley, 1953) ซึ่ง Bajpai และคณะ (1981) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยรา *A. flavas* พบว่าทิศทางของปฏิกิริยามีด้วยกัน 3 ทาง โดยกลไกนี้จะอาศัยบทบาทของเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส และกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนสร่วมด้วย และมีกรดกลูโคนิกเคลตาแลคโตน 3-คีโตกลูโคนิกเคลตาแลคโตน 3-คีโตกลูโคส และ กรดออกซีโคจิก เป็นสารมัธยันต์ (intermediate) ในวิถีการสร้างกรดโคจิก ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 การสังเคราะห์กรดโคจิกจากน้ำตาลกลูโคส (Bajpai และคณะ, 1981)

5. การสังเคราะห์กรดโคจิกโดยใช้น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอมเป็นสารตั้งต้น เริ่มจากน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (เพนโทส) 2 โมเลกุล ถูกเปลี่ยนโดยมีเอนไซม์ทรานคีโตเลส (TK) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เป็นสารตัวกลางที่มีคาร์บอน 7 และ 3 อะตอม (ซีโดเฮปทูโลส และไทรโอส ตามลำดับ) แล้วสารทั้ง 2 ชนิดนี้จะทำปฏิกิริยาต่อโดยอาศัยเอนไซม์ทรานอัลโดเลส (TA) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 และ 4 อะตอม (เฮกโซส และ เทโทรส ตามลำดับ) ซึ่งน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมนี้จะเป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดโคจิกต่อไป ในขณะที่น้ำตาลที่มีคาร์บอน 4 อะตอม จะต่อกับน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม โดยอาศัยเอนไซม์ทรานคีโตเลสในการเร่งปฏิกิริยาได้เป็นน้ำตาล 6 และ 3 อะตอม (เฮกโซส และไทรโอส ตามลำดับ) ซึ่งน้ำตาล 6 อะตอม จะใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดโคจิกเช่นกัน (อ้างถึงใน Prescott และ Dunn, 1959) ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 การสังเคราะห์กรดโคจิกจากน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม

(อ้างถึงใน Prescott และ Dunn, 1959)

วิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้ผลิตผลิตภัณฑ์ทั่วไป

วิธีการที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักนั้น นิยมทำกัน 3 วิธีคือ

1. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว (submerged culture) เป็นการหมักโดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการให้อากาศและการปั่นกวน ซึ่งการหมักโดยวิธีนี้ต้องอาศัยปัจจัยต่างๆในการเพาะเลี้ยง (รพี โรจนอุไร, 2539; สมใจ ศิริโภค, 2539; Lin และคณะ, 1976; Bajpai และคณะ, 1982a; Stanbury และ Whitaker, 1984; Kwak and Rhee, 1992b; และ Ogawa และคณะ, 1995) เช่น

1. สูตรอาหาร องค์ประกอบต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อต้องเหมาะสม อันประกอบไปด้วยแร่ธาตุต่างๆ สารตั้งต้นที่จะใช้ในการผลิตและการเจริญของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน โดยแหล่งคาร์บอนส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของน้ำตาล ซึ่งน้ำตาลต่างชนิดกันจะส่งเสริมการเติบโตของจุลินทรีย์ต่างกันด้วย รวมทั้งปริมาณคาร์บอนต้องมีความเหมาะสมไม่น้อยจนทำให้ไม่เพียงพอต่อการผลิต และไม่มากจนเกิดแรงดันออสโมติกสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต้องมีสัดส่วนและปริมาณที่เหมาะสมกับคาร์บอนที่ใช้จึงส่งเสริมให้ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูง

2. ค่าความเป็นกรดด่าง มีความเกี่ยวโยงกับชนิดของสารตั้งต้น ผลิตภัณฑ์ที่จะผลิต และกลุ่มของจุลินทรีย์ เนื่องจากค่าความเป็นกรดด่างจะมีผลต่อระบบการทำงานของเอนไซม์ที่จะใช้เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์

3. อุณหภูมิ จะมีผลต่อการเติบโตและการผลิต โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการเติบโตแตกต่างกัน ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงควรเป็นอุณหภูมิที่ทำให้มีการเติบโตที่พอเหมาะสำหรับการผลิต ไม่ทำให้มีการเติบโตมากเกินไป

4. อายุและขนาดของหัวเชื้อ อายุของหัวเชื้อควรเป็นช่วงอายุที่จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพสูงได้แก่ ระยะที่มีอัตราการเจริญคงที่ (log phase) ส่วนขนาดของหัวเชื้อต้องมีขนาดที่พอเหมาะ โดยถ้าใช้ขนาดของหัวเชื้อน้อยเกินไปจะทำให้สร้างเซลล์เพื่อจะสร้างผลิตภัณฑ์น้อยทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้อย และถ้ามีขนาดของหัวเชื้อที่มากเกินไปจะทำให้มีการเติบโตของเซลล์มากจนทำให้ผลิตผลิตภัณฑ์ได้น้อย เช่นกัน

5. อากาศ ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่มีความจำเป็นต้องให้อากาศเพื่อให้จุลินทรีย์เติบโต โดยออกซิเจนในอากาศช่วยให้เกิดออกซิเดชันของสารตั้งต้นให้สมบูรณ์เพื่อใช้ในการเติบโตและผลิตผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการให้อากาศ (aeration) และ

การปั่นกวน (agitation) จึงมีความสำคัญต่อระบบการหมัก โดยการให้อากาศมีจุดประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ ส่วนการปั่นกวนมีจุดประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์และสารอาหารในถังหมักกระจายตัวอย่างทั่วถึง โดยทั่วไปการหมักในห้องปฏิบัติการจะให้อากาศโดยการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า (shake-flask technique) ส่วนการหมักในระดับขยายส่วนจะมีการใช้เครื่องปั่นกวน (stirrer) เหล็กกั้นหรือกระบัง (baffle) และระบบการให้อากาศ (aeration system) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีอยู่ในถังหมัก (fermenter) โดยการเลือกใช้ระบบการให้อากาศและการกวนในถังหมักแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของกระบวนการหมักด้วย ซึ่งการหมักโดยวิธีนี้จะต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการให้อากาศและการปั่นกวนสูง

2. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง (solid state culture) เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารแข็งในสภาพที่ไม่มีน้ำส่วนเกินที่ไม่ได้ดูดซับกับสารตั้งต้น มีการเติมน้ำเพียงเพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญและเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ซึ่งปัจจัยในการหมักโดยวิธีนี้คล้ายกับการหมักในอาหารเหลว แต่มีปัจจัยบางประการที่สำคัญอื่นๆ (สมใจ ศิริโภค, 2539; Bajracharya และ Mudgett, 1980; Moo-Yang และคณะ, 1983) เช่น

1. ชนิดของวัตถุดิบที่ใช้หมัก ส่วนใหญ่เป็นพวกธัญพืช ฟางข้าว หญ้า หรือผลิตภัณฑ์จากพืชหรือสัตว์ที่มีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีนสูง ซึ่งวัตถุดิบส่วนใหญ่ต้องมีการปรับสภาพ (pretreatment) เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ง่ายขึ้น

2. ขนาดของวัตถุดิบ เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากที่สุดจะต้องมีขนาดที่พอเหมาะ ควรมีขนาดชิ้นเล็กชนิดหยาบ เนื่องจากจะทำให้ได้ช่องว่างระหว่างอนุภาคเพื่อให้ออกซิเจนสามารถแพร่เข้าไป และมีผลต่อการสะสมความร้อนภายในระบบหมัก

3. ปริมาณความชื้น เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจะใช้ปริมาตรของน้ำต่อมวลของสารตั้งต้นต่ำ ถ้าความจุความชื้น (moisture content) สูงเกินไปจะทำให้ช่องว่างที่อากาศจะแพร่เข้าไปได้น้อยเพราะมีปริมาณน้ำอยู่ภายใน และในทางตรงกันข้ามถ้ามีความจุความชื้นน้อยเกินไปจะยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์

4. ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจนในการหมัก โดยวิธีนี้อาจเกิดความร้อนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สะสม ดังนั้นจึงต้องระบายอากาศไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างการเจริญเพื่อให้ก๊าซออกซิเจนเข้ามาแทนที่

5. อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่าง ในการเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารแข็ง การควบคุมจะเป็นไปได้ยาก แต่เนื่องจากเป็นการเพาะเลี้ยงที่คล้ายธรรมชาติดังนั้นการหมักส่วนใหญ่จะปล่อยไปตามธรรมชาติ

3. การเพาะเลี้ยงโดยให้จุลินทรีย์เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว (liquid surface culture) เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว วิธีนี้ไม่ต้องสิ้นเปลืองพลังงานและค่าใช้จ่ายมากนักเนื่องจากไม่มีการให้อากาศและการปั่นกวน ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่น่าสนใจที่จะใช้ในประเทศที่กำลังพัฒนา เนื่องจากใช้ต้นทุนต่ำ วิธีการในการผลิตง่าย และเป็นวิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ โดยมีปัจจัยบางประการคล้ายกับการหมักในอาหารเหลวดังกล่าวข้างต้น แต่ก็มีปัจจัยหลักที่ต้องคำนึงถึง (May และคณะ, 1931; Sakurai และคณะ, 1991; Mattey, 1992 และ Drysdale และ McKay, 1995) ดังนี้

1. สูตรอาหาร ต้องมีแร่ธาตุต่างๆที่จำเป็นต่อการเติบโตของจุลินทรีย์เนื่องจากเป็นการหมักแบบไม่มีการปั่นกวนทำให้ปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยกว่าการหมักในอาหารเหลว จึงต้องการปัจจัยเสริมช่วยในการเติบโต นอกจากนี้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมจะส่งเสริมการผลิตให้สูงขึ้นซึ่งอาจแตกต่างกันเมื่อผลิตโดยวิธีการอื่นๆ

2. พื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเป็นปัจจัยที่สำคัญมากสำหรับการหมัก โดยวิธีนี้ซึ่งคล้ายกับการหมักบนผิวหน้าอาหารแข็งที่ต้องใช้พื้นที่ผิวมาก สำหรับการหมักโดยให้จุลินทรีย์เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวนั้นด้านบนของจุลินทรีย์จะสัมผัสกับอากาศส่วนด้านล่างจะสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีความสำคัญต่อการใช้สารอาหารด้านล่างของจุลินทรีย์แต่ถ้าค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงที่มากเกินไปจะทำให้เกิดการระเหยของอาหารเหลวมาก และถ้าค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงต่ำอาจทำให้มีความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไปจุลินทรีย์ไม่สามารถใช้สารอาหารมาผลิตผลิตภัณฑ์ได้ทั้งหมด เนื่องจากเซลล์ไม่ได้สัมผัสกับสารอาหารทั้งหมด

3. ขนาดของหัวเชื้อต้องไม่มีขนาดที่มากหรือน้อยเกินไปเนื่องจากถ้ามีมากเกินไปจุลินทรีย์จะอัดตัวกันแน่นบนผิวหน้าทำให้ออกซิเจนแพร่เข้ามาได้ยาก และถ้ามีขนาดน้อยเกินไปจะทำให้ไม่เพียงพอต่อการผลิตผลิตภัณฑ์

4. การเป่าอากาศ เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่ง ถึงแม้ว่าวิธีการนี้ไม่จำเป็นต้องให้อากาศหรือปั่นกวน แต่มีนักวิจัยบางท่านได้ทำการศึกษาทดลองพบว่า ถ้ามีการเป่าอากาศเหนือ

ผิวหน้าอาหารเหลวจะทำให้ผลผลิตสูงขึ้น (Drysdale และ McKay, 1995) โดยการเป่าอากาศจะทำหน้าที่ 3 อย่างคือ การให้ออกซิเจน การระบายคาร์บอนไดออกไซด์ออกไปและระบายความร้อน นอกจากนี้พบว่าการเป่าอากาศที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในอัตราที่ต่ำจะป้องกันการปนเปื้อนระหว่างการงอกของสปอร์และการเจริญในช่วงแรก

5. อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่าง จะมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกันกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก

สำหรับการผลิตกรดโคจิกจากรายงานต่างๆ พบว่าวิธีการที่นิยมในการผลิตหรือที่นิยมใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดโคจิกนั้นทำกัน 2 วิธีคือการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวและบนผิวหน้าอาหารเหลว ดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว

รพี โรจนอุไร (2539) ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K13 ในระดับขวดเขย่า พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก คือ ขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมง ที่ความหนาแน่น 4 - 8 x 10^7 สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยน้ำตาลทรายขาว สารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมซัลเฟต ในปริมาณ 100 0.5 และ 0.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที พบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกได้ 40.03 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง

Coupland และ Niehaus (1987) ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน สังกะสี โซเดียมคลอไรด์ และโซเดียมอะซีเตต ต่อการผลิตกรดโคจิก โดย *A. parasiticus* ATCC 36537 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการทดลองคือ เปปโทน ไกลซีน อาจินีน และแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าการเติมไนโตรเจนในปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้ผลผลิตกรดน้อยลง โดยที่การเติมเปปโทนในปริมาณ 0.2 เปอร์เซ็นต์ จะเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก โดยให้ผลผลิตกรด 13 มิลลิโมลาร์ต่อกรัมของสายใยแห้งในชั่วโมงที่ 72 และพบว่าถ้ามีการเติมเปปโทนในช่วงระยะเวลาที่ราเริ่มผลิตกรดโคจิก (ประมาณชั่วโมงที่ 40) จะให้ผลผลิตกรดต่ำ แต่ถ้ามีการเติมหลังจากระยะนี้จะไม่มีผลต่อการผลิต และการเติมสังกะสีหรือฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่มีผลต่อ

การผลิต ส่วนการเติมโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณ 0.8 โมลาร์ และโซเดียมอะซีเตตในปริมาณ 0.05 โมลาร์ จะยับยั้งการผลิตกรด

Kwak และ Rhee (1992a) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยการควบคุมการเจริญของราโดยใช้สายใยตรึงของ *A. oryzae* NRRL 484 ในเม็ดเจลของแคลเซียมอัลจีเนตต่อการผลิตกรดโคจิก จากการทดลองพบว่าขนาดของเม็ดเจลที่ใช้ในการตรึงเซลล์ที่เหมาะสมคือขนาด 150 - 250 ไมโครเมตร และความเข้มข้นของไนโตรเจนยิ่งน้อยจะส่งเสริมการผลิตกรดโคจิก เนื่องจากขนาดของเม็ดเจลอนุภาคยิ่งเล็ก เส้นใยจะเจริญแพร่กระจายและถูกกักอยู่ทั่วเม็ดเจลซึ่งเป็นการจำกัดการเจริญทำให้ออกซิเจนสามารถแพร่เข้าไปได้ง่าย แต่ถ้าใช้ขนาดของเม็ดเจลใหญ่มาก สายใยจะเจริญเกาะกลุ่มเจริญอยู่บนผิวหน้าของเม็ดเจลทำให้สารอาหารและออกซิเจนแพร่เข้าไปข้างในได้น้อย เพราะการจัดตัวของสายใยหนาแน่นปิดทางอากาศเข้ามีผลทำให้การผลิตกรดน้อยลงด้วย

Kwak และ Rhee (1992b)ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยอิสระของ *A. oryzae* NRRL 484 และสายใยที่ตรึงในแคลเซียมอัลจีเนตเจลที่มีปริมาตรของเจลที่ใช้ตรึงต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:3 พบว่าทั้งสายใยอิสระและสายใยตรึงต่างก็สามารถใช้ในการผลิตกรดโคจิกได้ แต่สายใยตรึงจะให้ผลผลิตกรดสูงกว่าคือ 83 กรัมต่อลิตร แต่ใช้เวลานานกว่าคือ 23 วัน และในการหมักพบว่ามีผลึกของกรดโคจิกตกตะกอนลงมาจึงทำให้สามารถแยกผลผลิตได้ง่ายขึ้น ในขณะที่การใช้เซลล์อิสระจะผลิตกรดได้ 25 กรัมต่อลิตร ในเวลา 13 วัน เมื่อนำสายใยตรึงเดิมมาใช้ซ้ำโดยการเติมอาหารใหม่ลงไป พบว่าเมื่อผลิตซ้ำในครั้งที่ 3 การผลิตกรดโคจิกจะลดลง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากความหนาแน่นของสายใยที่เจริญรอบผิวเจลจะจำกัดการผ่านของสารอาหาร และออกซิเจน ภายในอนุภาคของเม็ดเจลจึงทำให้อัตราการผลิตลดลง

Ariff และคณะ (1996) ทำการทดลองเลี้ยงหัวเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงของ *A. flavus* Link 44-1 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการปั่นกวน 600 รอบต่อนาที คงที่ตลอดการทดลองเปรียบเทียบกับการทดลองที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลาย (Dissolve oxygen tension, DOT) ที่เปอร์เซ็นต์อิ่มตัวต่างๆ (30 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์) และการทดลองที่ไม่ได้ควบคุมค่า DOT แต่กำหนดให้มีการพ่นอากาศที่ 15 ลิตรต่อนาที พบว่าให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 5.7 (ที่อิ่มตัว 30 เปอร์เซ็นต์) 10.0 (ที่อิ่มตัว 50 เปอร์เซ็นต์) 14.6 (ที่อิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์) และ 15.8 กรัมต่อลิตร (ที่ไม่มีการควบคุม) และให้การเจริญของสายใยเท่ากับ 19.5 15.8 13.5 และ 13.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 384 384 288 432 ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองพบว่าในชุดที่ไม่ได้ควบคุม

ค่า DOT ในระยะการเจริญจะมีค่า DOT ลดลงต่ำมาก และจะเพิ่มขึ้นเป็น 65 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงเวลาการผลิต แสดงให้เห็นว่าการให้ออกซิเจนในระหว่างระยะการเจริญไม่เพียงพอให้ราเจริญได้เต็มที่ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่ดีเท่าที่ควร และยังแสดงให้เห็นอีกว่าในระหว่างการผลิตใช้ปริมาณออกซิเจนไม่มาก ดังนั้นจึงควรลดปริมาณออกซิเจนเมื่อเข้าสู่ระยะการผลิต นอกจากนี้การทดลองที่มีการควบคุมค่า DOT พบว่าน้ำหนักเซลล์ที่ได้น้อยเมื่อมีการใช้ค่า DOT ที่สูงขึ้นในขณะที่การผลิตกรดโคจิกจะเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อระดับค่า DOT สูงจะไปควบคุมการเจริญของรา และส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสร้างกรดโคจิก ดังนั้นเมื่อทดลองควบคุมค่า DOT ที่อิ่มตัว 80 เปอร์เซ็นต์ ในระยะการเจริญ และใช้ค่า DOT 30 เปอร์เซ็นต์ ในระยะการผลิตกรด พบว่าให้ผลผลิตกรดเพิ่มขึ้นเป็น 28.9 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 228 และเมื่อทดลองผลิตแบบ fed batch โดยเติมสารสกัดจากยีสต์ในระหว่างการผลิต พบว่าในภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนสูงจะมีการส่งเสริมให้มีการเจริญของสายใยมากกว่าการผลิตกรด

Takamizawa และคณะ (1996) หาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกด้วยการจำลองภาวะ (simulation) คำนวณร่วมกับการทำการทดลองจริงบางส่วนโดยใช้วิธีของ Box-Wilson ซึ่งประกอบด้วยการวิเคราะห์ผลการทดลองเบื้องต้น โดยการแปรความเข้มข้นเริ่มต้นของคาร์บอน (น้ำตาลกลูโคส) ไนโตรเจน (โพลีเปปโทน) และค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนต่อหน่วยปริมาตร (ค่า K_La) ที่ปริมาณต่างๆ ซึ่งจากการทดลองเบื้องต้นพบว่า ค่าK_La ที่มากกว่า 81.0 ต่อชั่วโมง ไม่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิก ในขณะที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลกลูโคส และโพลีเปปโทน มีผลต่อการผลิตกรดโคจิก และเมื่อนำผลที่ได้มาคำนวณโดยใช้ ANOVA (Analysis of varience) เพื่อวิเคราะห์อัตราการผลิตกรดที่ได้ พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและโพลีเปปโทนเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรดอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นทำการทดลองหาอัตราการผลิตกรดโคจิกโดยใช้ Factorial experimental design และแสดงผลการคำนวณในรูปของ response surface ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และโพลีเปปโทน 148 และ 4.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับจะเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก และเมื่อนำค่าที่ได้มาทดลองผลิตจริงในห้องปฏิบัติการซ้ำ 4 ครั้ง พบว่าจะให้อัตราการผลิตกรดเท่ากับ 4.36 กรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งใกล้เคียงกับผลผลิตกรดโคจิกที่ได้จากการคำนวณคือ 4.44 กรัมต่อลิตรต่อวัน

Rosfarizan และคณะ (1998b) ศึกษาความสามารถในการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนของ *A. flavus* ในระดับขวดเขย่าโดยใช้แป้งสุกชนิดต่างๆคือ แป้งมันฝรั่ง แป้งมันสำปะหลัง

แป้งข้าวโพด เปรียบเทียบการผลิตกรดกับอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณที่เท่ากันคือ 50 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าการใช้แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง และน้ำตาลกลูโคสให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 1.7 10.5 0.3 และ 12.1 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักสายใยเท่ากับ 12.5 13.1 12.7 และ11.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 360 384 360 และ 384 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าการใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตกรดโคจิกใกล้เคียงกับน้ำตาลกลูโคสจึงน่าจะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อแทนน้ำตาลกลูโคสได้เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก และเมื่อแปรความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดในปริมาณต่างๆ พบว่าที่ความเข้มข้น 75 กรัมต่อลิตรเหมาะสมที่สุดโดยจะให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 19.2 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 480 (วันที่ 20)

Rosfarizan และคณะ (1998a) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อลดต้นทุนของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ราสายพันธุ์ *A. flavus* 44-1 ทำการหมักทั้งในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมักขนาด 50 ลิตร โดยแปรชนิดของแหล่งคาร์บอน 3 ชนิดคือ น้ำตาลกลูโคส กลูโคสไฮโดรไลเสต (เป็นแหล่งคาร์บอนที่เกิดจากการย่อยแป้งสาคูด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มของอะไมโลไลติก ที่พบในช่วงการเติบโตของรา *A. flavus* 44-1) และแป้งสาคูสุกโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการทดลองใช้ปริมาณของคาร์บอนชนิดต่างๆ เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร พบว่าให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 31.5 27.9 และ 23.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับการผลิตกรดโคจิกในถังหมักขนาด 50 ลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกได้เท่ากับ 49.7 28.8 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้แป้งสาคูที่สุกแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนผลผลิตกรดที่เพาะเลี้ยงในถังหมักจะลดลง เนื่องจากเมื่อแป้งสุกจะทำให้เกิดความหนืดสูงส่งผลให้ออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อได้น้อยและการปั่นกวนในถังหมักเป็นไปได้ยากจึงผลิตกรดได้ต่ำ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แป้งสาคูสุกในปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร คือมีปริมาณลดลงครึ่งหนึ่งในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมัก พบว่าจะให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 12.4 และ 14.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผู้วิจัยได้คาดหวังว่าถ้ามีการปรับภาวะการให้อากาศและการปั่นกวนให้เหมาะสม แล้วทำการผลิตในระดับถังหมักจะทำให้ผลผลิตกรดสูงกว่าการผลิตกรดในระดับขวดเขย่า จึงน่าสนใจที่จะนำแป้งสาคูซึ่งมีราคาถูกมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสได้

จากงานวิจัยข้างต้นจะเห็นได้ว่าการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวแม้มีการเพิ่มปริมาณออกซิเจนละลาย แต่เวลาที่ใช้ในการผลิตค่อนข้างนานรวมทั้งต้องสิ้นเปลืองพลังงานในการปั่นกวนหรือเขย่า ซึ่งในบางครั้งความเร็วที่ใช้ในการปั่นกวนที่สูงเกินไปอาจมีผลต่อการฉีกขาดของเส้นใยทำให้โครงสร้างและคุณสมบัติของเอนไซม์ที่อยู่ภายในเส้นใยถูกทำลาย (Bajpai และคณะ, 1982a) นอกจากนี้การผลิตในอาหารเหลวยังมีค่าลงทุนตั้งต้นสูงมากต้องการผู้เชี่ยวชาญในวิธีการผลิตนี้และมีค่าดำเนินการแพง จึงได้มีผู้สนใจวิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเนื่องจากไม่สิ้นเปลืองพลังงานและลดค่าใช้จ่ายในแง่ของพลังงานและต้นทุนที่ใช้ในการปั่นกวนหรือเขย่ารวมทั้งยังเหมาะกับประเทศที่ไม่มีการพัฒนาเทคโนโลยีขั้นสูงได้ด้วยตนเอง

2. การเพาะเลี้ยงโดยให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว

Katagiri และ Kitahara (1933) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลมอลโตสโดย *A. oryzae* ซึ่งพบว่าสามารถใช้ผลิตกรดโคจิกได้และให้ผลผลิต 40.8 เปอร์เซ็นต์

Barnard และ Challenger (1949) ทำการทดลองผลิตกรดโคจิกโดยวิธีให้จุลินทรีย์เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว โดยเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้หัวเชื้อ 2 ชนิด คือ หัวเชื้อสปอร์แขวนลอย และการใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยของรา *A. oryzae* ที่เตรียมโดยให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 10 - 14 วัน จนราเจริญปิดผิวหน้าอาหารเหลว แล้วนำเส้นใยที่ได้มาล้างด้วยน้ำกลั่นจนไม่พบว่ามีกรดโคจิกเหลืออยู่แล้วจึงใช้เป็นหัวเชื้อชนิดสายใย นำหัวเชื้อทั้ง 2 ชนิดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ K-medium 300 มิลลิลิตรที่มีเอทธิลแอลกอฮอล์(1.3 - 2.1 เปอร์เซ็นต์) เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส นาน 6 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จากการทดลองพบว่าการใช้หัวเชื้อชนิดสายใยจะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงกว่าการใช้หัวเชื้อสปอร์แขวนลอย ซึ่งการหมักโดยใช้หัวเชื้อสปอร์แขวนลอยของราในอาหารที่มีเอทธิลแอลกอฮอล์ 1.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณของกรดโคจิกน้อยกว่าในชุดควบคุมโดยให้ปริมาณกรดโคจิกเท่ากับ 12.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้สายใยราที่เจริญแล้วเป็นหัวเชื้อในการเพาะเลี้ยงพบว่าจะให้ผลผลิตกรด 12 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าที่ความเข้มข้นของเอทธิลแอลกอฮอล์มากกว่า 2.1 เปอร์เซ็นต์ จะยับยั้งการเจริญของราในระบบหมักที่ใช้หัวเชื้อสปอร์แขวนลอย ส่วนการผลิตที่ใช้หัวเชื้อของสายใยราที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวแล้วพบว่าหลังจากเพาะเลี้ยง 14 วัน ไม่มีการสร้างกรดโคจิกเลยและสายใยของราเริ่มมีการเสียสภาพ

นอกจากนี้ยังศึกษาผลกระทบของปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตกรดโคจิก พบว่าในบรรยากาศที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 30 เปอร์เซ็นต์ ออกซิเจน 25 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน 45 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้มีการเจริญของราน้อยมากหรือไม่มีการเจริญรวมทั้งไม่มีการสร้างกรดโคจิก แต่เมื่อลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงคือกำหนดให้มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ ออกซิเจน 25 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน 65 เปอร์เซ็นต์ และใช้เอทธิลแอลกอฮอล์ 1.3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าราสามารถสร้างกรดได้ในวันที่ 14

May และคณะ (1931) ศึกษาหาสูตรอาหารและภาวะบางประการที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะลี้ยง *A. flavus* ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ทำการแปรชนิดของแหล่งไนโตรเจน โดยให้มีปริมาณไนโตรเจนรวมในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากันคือ 0.7 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และโซเดียมไนเตรต ผลการทดลองพบว่าแอมโมเนียมไนเตรตให้ผลผลิตกรดสูงสุดคือเท่ากับ 22.13 กรัมต่อลิตร และเมื่อแปรปริมาณแอมโมเนียมไนเตรต พบว่าปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 1.125 กรัมต่อลิตร โดยให้ผลผลิตกรด 34.8 กรัมต่อลิตร ส่วนการศึกษาแร่ธาตุต่างๆที่จำเป็นต่อการผลิตกรดโคจิก พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแมกนีเซียมซัลเฟต โปแตสเซียมคลอไรด์ และกรดฟอสฟอริก ในปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร 0.1 กรัมต่อลิตร และ 0.054 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ จะให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 64.4 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ต่อจากนั้นทำการแปรอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในช่วง 22 - 35 องศาเซลเซียล ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 30 - 35 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตกรดสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อแปรปริมาณของน้ำตาลกลูโคสในช่วง 15 - 33 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณน้ำตาลที่ 20 เปอร์เซ็นต์ให้ผลผลิตสูงสุดคือ เท่ากับ 69.33 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงและยังพบว่าถ้าใช้น้ำตาลกลูโคสมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์จะเกิดแรงดันออสโมติกสูงทำให้ผลิตกรดโคจิกได้น้อยลง ส่วนการแปรค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงในช่วง 0.22 - 1.0 พบว่าที่ค่าอัตราส่วน 0.3 - 0.5 เหมาะสมให้ผลผลิตกรดสูง 69.33 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง จะเห็นได้ว่าสูตรอาหาร ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ปริมาณของคาร์บอน อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงมีความสำคัญต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะลี้ยง *A. flavus* ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว

Basappa และคณะ (1970) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดย resting cell ของ *A. flavus* โดยทำการเพาะเลี้ยงสปอร์แขวนลอยให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสายใยที่ได้มาล้างด้วยน้ำปลอดประจุที่ฆ่าเชื้อแล้วและนำมาล้างด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้ resting mycelium ที่ปราศจากน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเรียกเส้นใยในขั้นตอนนี้ว่า resting mycelium นำมาปั่นตัดเป็นชิ้นๆในเครื่องปั่น (blender) นาน 30 วินาที และใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการทดลองในขั้นตอนการผลิต โดยศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 5 - 8 อุณหภูมิในช่วง 20 - 37 องศาเซลเซียส และอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 10 20 30 และ 40 มิลลิลิตร ซึ่งพบว่าที่ความเป็นกรดด่าง 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 20 มิลลิลิตร ในฟลาสค์ขนาด 100 มิลลิลิตร จะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 170 มิลลิกรัมต่อลิตร

Bajpai และคณะ (1982b) ทดลองเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยการใช้สายใยซ้ำของ *A. flavus* ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส และสารสกัดจากยีสต์ 200 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าวิธีการเพาะเลี้ยงแบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวจะให้ผลผลิตกรดสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า และเมื่อทดลองเปรียบเทียบผลผลิตจากการใช้สายใยซ้ำของทั้ง 2 วิธี พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวให้ผลผลิตสูงกว่าโดยให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 70.4 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 20.82 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

Wei และคณะ (1991)ทดลองผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. candidus* ATCC 44054 ในขวดเขย่าเทียบกับภาวะที่ไม่มีการเขย่า และแปรสูตรอาหารต่างๆกันดังนี้ โมดิฟายด์ซาเพคดอกซ์ ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส สารสกัดจากยีสต์ โซเดียมไนเตรต โปแตสเซียมฟอสเฟต โปแตสเซียมคลอไรด์ แมกนีเซียมซัลเฟต และเฟอริกซัลเฟต ในปริมาณ 100 1 2 1 0.5 0.5 และ 0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการทดลองภายใต้ภาวะที่ไม่มีการเขย่าผลิตกรดได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่มีการเขย่าคือให้ปริมาณกรด 37 - 38 และ 22 - 23 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์โดยให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน 3 สูตรคือ อาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายด์ซาเพคดอกซ์ (ซึ่งมีองค์ประกอบดังกล่าวข้างต้น) อาหารเลี้ยงเชื้อของ Tadera และคณะ ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส เปปโทน

โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ และเฟอริกคลอไรด์ ในปริมาณ 50 6 1 1 0.01 และ 0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์เอกซ์แทรกซูโครส ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส และสารสกัดจากยีสต์ ในปริมาณ 200 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสและสารสกัดจากยีสต์เป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวโดยให้ผลผลิตกรดสูงถึง 57 - 59 กรัมต่อลิตร ในเวลา 9 - 12 วัน จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าถ้าใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวกันผลิตผลิตภัณฑ์โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน จำเป็นต้องจัดสูตรอาหารให้เหมาะสมแตกต่างกันด้วย

Ogawa และคณะ (1995) ศึกษาผลของปริมาณไนโตรเจนและวิธีการที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* NRRL 484 เพื่อผลิตกรดโคจิก โดยการเปรียบเทียบวิธีการเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารเหลวที่มีเยื่อบางๆ SE 20 ซึ่งทำมาจากโพลีซัลโฟนที่มีขนาดของรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร (บริษัทฟูจิโฟโต้ฟิลม์ ประเทศญี่ปุ่น) เพื่อให้จุลินทรีย์เกาะ (membrane-surface liquid culture; MSLC) กับวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเขย่า ซึ่งจากการทดลองแปรปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ในช่วง 0.5 - 10.0 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ในช่วง 2.5 - 5.0 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก การเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี MSLC จะให้ผลผลิตสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า โดยให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 29.0 ในวันที่ 10 ของการผลิต แต่เมื่อลดปริมาณสารสกัดจากยีสต์อยู่ในช่วง 0.5 - 2.5 กรัมต่อลิตร พบว่าการผลิตในอาหารเหลวที่มีการเขย่าให้ผลผลิตดีกว่าคือให้ผลผลิต 20.6 กรัมต่อลิตร ใน วันที่ 9 ของการผลิต และเมื่อมีการเติมน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 กรัมต่อลิตร 2 - 3 ครั้งในระหว่างการผลิตโดยวิธี MSLC และในขวดเขย่า พบว่าการผลิตกรดโดยวิธี MSLC ให้ผลผลิตกรดสูงกว่าในขวดเขย่าคือ ให้ผลผลิตกรดโคจิก 100 และ 39 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 20 และ 22 วัน ของการผลิต ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทดลองผลิตกรดโคจิกด้วยสายใยเดิมซ้ำโดยวิธี MSLC และเติมอาหารเป็นช่วงๆ พบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกในแต่ละครั้งของการผลิตมากกว่าหรือเท่ากับ 75 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิธีการเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารเหลวโดยวิธี MSLC จะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่าโดยให้ผลผลิตมากกว่าถึง 1.5 เท่า และการที่การเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารเหลวใช้ไนโตรเจนมากกว่าเนื่องจากวิธีการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่ามีการผสมของสารอาหารทั่วถึงตลอดเวลาทำให้ราสามารถใช้สารอาหารได้ดี ในขณะที่การเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารเหลวรามีโอกาสสัมผัสสารอาหารด้านล่างน้อยและต้องการการ

เติบโตสูงจึงต้องการไนโตรเจนสูงกว่า สำหรับการผลิตโดยการเติมแหล่งคาร์บอนเป็นช่วงๆ 2 - 3 ครั้ง โดยวิธี MSLC ให้ผลผลิตกรดสูงกว่า 2.5 เท่า ซึ่งเป็นการแสดงว่าการเพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวราจะคงประสิทธิภาพในการผลิตกรดได้ดีกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า

Wakisaka และคณะ (1998) ศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* NRRL484 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่มีเยื่อบางๆ SE 20 เพื่อให้จุลินทรีย์เกาะกับการผลิตในระดับขวดเขย่า โดยทั้ง 2 วิธีจะเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยสารละลายของเกลืออนินทรีย์ต่างๆที่มีแหล่งคาร์บอนคือ น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนคือ สารสกัดจากยีสต์และ แอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 และ 0.75 กรัมต่อลิตร พบว่าการผลิตโดยวิธี MSLC ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 45 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การผลิตในขวดเขย่าให้ผลผลิตกรด 24 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งข้อดีของวิธีการผลิตโดยการใช้เมมเบรนนี้คือสายใยของราจะไม่ปนเปื้อนออกมาในอาหารเหลวแต่จะเกาะอยู่บนแผ่นเมมเบรน ดังนั้นอาหารเหลวที่ได้จะค่อนข้างใสทำให้สามารถแยกสายใยราออกมาได้ง่ายหลังจากการหมักสิ้นสุดลง และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous MSLC) โดยการเติมอาหารใหม่ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและสารสกัดจากยีสต์ เท่านั้น ที่ความเข้มข้น 10 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในปริมาตร 30 มิลลิลิตรต่อวัน ตลอดการทดลอง พบว่าให้ผลผลิตกรด 47 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งให้ผลการผลิตสูงกว่าและเร็วกว่าการผลิตแบบกะและเมื่อนำสายใยเดิมมาผลิตกรดโคจิกซ้ำในอาหารที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ความเป็นกรดด่าง 6.5) และน้ำตาลกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบ พบว่าการเพาะเลี้ยงโดยวิธี MSLC ยังคงให้ผลผลิตกรดสูงกว่าในขวดเขย่าคือ 16.7 และ 8.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง จะเห็นได้ว่าการใช้วิธีการเพาะเลี้ยงให้เจริญบนเมมเบรนที่อยู่บนผิวหน้าอาหารเหลวจะให้ผลผลิตกรดสูงกว่า อันจะเป็นการช่วยประหยัดพลังงานเนื่องจากไม่ต้องสิ้นเปลืองพลังงานในการปั่นกวนหรือเขย่า

การเก็บเกี่ยวและแยกกรดโคจิก

หลังจากการหมักจะทำการกรองแยกสายใยของราแล้วนำน้ำหมักที่ได้มาแยกกรดโคจิก ซึ่งวิธีการแยกกรดโคจิกนั้นมีหลายวิธี ดังนี้

1. การตกตะกอนในเกลือของทองแดง เช่น คอปเปอร์อะซีเตต หรือ คอปเปอร์ซัลเฟต (Yabuta, 1913; Barnard และ Challenger, 1949)

2. การสกัดด้วยเอทธิลอะซีเตต (อ้างถึงใน Beelik, 1956)

3. การสกัดด้วยอีเธอร์อย่างต่อเนื่อง (May และคณะ, 1931; Arnstein และ Bentley, 1953; Bentley, 1957)

4. การระเหยน้ำหมักให้มีปริมาตรลดลงจนได้ผลึกของกรดโคจิกหรือตกผลึกที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (Morton และคณะ, 1945)

5. การดูดซับด้วยผงถ่าน (actived carbon) โดยใช้บิวทิลอะซีเตตที่อิ่มตัวด้วยแอมโมเนียแห้ง เป็นตัวชะ แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือจะได้ปริมาณกรดโคจิกต่ำ (อ้างถึงใน Beelik, 1956; อ้างถึงใน Bajpai และคณะ, 1981)

สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด

เนื่องจากกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรดมีความสำคัญในระดับอุตสาหกรรมดังกล่าวข้างต้น จึงได้มีการศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรดมากขึ้น และทำการขึ้นทะเบียนจดสิทธิบัตร ซึ่งมีตัวอย่างดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด

ผู้จดและปีที่จดสิทธิบัตร	เรื่องที่จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร
Nagai และ Izumi, 1981	Cosmetic composition containing kojic ester	US Patent 4278656
Nagai และ Izumi, 1983	Cosmetic composition containing kojic ester	US Patent 4369174
Higa, 1987	Melanin inhibiting cosmetic composition	US Patent 4696813
Campbell และ Miyano,1989	Kojic acid ether-ester derivatives	US Patent 4812474
Masateru และ Shone, 1989	Aralkoxy and aryloxyalkoxy kojic acid derivatives	US Patent 4812584
Hatae และ Nakashima, 1989	Whiten cosmetic	US Patent 4847074
Hatae, 1990b	Method of minimizing erythema and elastosis	US Patent 4891361
Hatae, 1990a	Compositions for topical use having melanin synthesis inhibition activity	US Patent 4919921
Hara, 1990	Composition for external application	US Patent 4948577

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด

ผู้จดและปีที่จดสิทธิบัตร	เรื่องที่จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร
Dowd, 1990	Kojic acid and esters as insecticide synergists	US Patent 4956353
Motono, 1991	External preparations free of discoloration	US Patent 4985455
Oyama, 1991	Compositions for topical use having melanin synthesis - inhibiting activity	US Patent 4990330
Yamamoto, 1991	External preparations	US Patent 4990532
Meybeck, 1994	Pharmaceutical or cosmetic composition containing hydroquinone and kojic acid	US Patent 5279834
Kouno และ Suzuoki, 1994	Acid dye staining method	US Patent 5284560
Sakai และคณะ, 1995	Whitening embellisher	US Patent 5427775
Shigetaka และคณะ, 1995	Production of kojic acid glucoside and production of kojic acid monoglucoside	JP Patent 7236496A
Koji และ Akiyoshi, 1997	Cultivation of kojic acid - producing bacterium	JP Patent 9220095A
Junko และคณะ, 1998	Synthetic medium for production of kojic acid	JPPatent 10165172A

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกโดยกระบวนการหมัก

1. ชนิดของจุลินทรีย์และวิธีการผลิต การคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์มีความสำคัญมากสำหรับการผลิตกรดโคจิก ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน สารประกอบอื่นๆในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกได้แตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง ใช้ภาวะไม่ยุ่งยาก เพาะเลี้ยงง่าย นอกจากนี้ชนิดของจุลินทรีย์ยังสัมพันธ์กับวิธีการผลิตอีกด้วย จุลินทรีย์บางสายพันธุ์เหมาะกับการผลิตด้วยวิธีหนึ่งแต่ไม่เหมาะกับอีกวิธีหนึ่ง ตัวอย่างเช่น การทดลองของ Wei และคณะ (1991) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดย *A. candidus* พบว่า การเพาะเลี้ยง *A. candidus* ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว

เป็นวิธีการที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่าคือเท่ากับ 57 - 59 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 - 12 ของการเพาะเลี้ยง

2. แหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดโคจิกสามารถใช้แหล่งอาหารที่เป็นคาร์โบไฮเดรตได้หลากหลายชนิดเพื่อสร้างกรดโคจิกดังตารางที่ 3 ซึ่งความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้เพื่อผลิตกรดโคจิกสูงสุดจะอยู่ระหว่าง 5 - 30 เปอร์เซ็นต์ (อ้างถึงใน Prescott and Dunn, 1959) นอกจากนี้ Crueger และ Crueger (1990) รายงานว่า 70 - 90 เปอร์เซ็นต์ ของรายงานการทดลองหาแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกโดยใช้รา *A. flavus* และ *A. oryzae* ในการหมักพบว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต ในขณะที่ Wei และคณะ (1991) ได้รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *A. candidus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน 3 สูตร พบว่าในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนจะเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก ซึ่งจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการแหล่งคาร์บอนในการผลิตที่แตกต่างกันดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถใช้เพื่อผลิตกรดโคจิก

แหล่งคาร์บอน	เอกสารอ้างอิง
เอทธานอล	Barnard และ Challenger, 1949; Ohara, 1954; Basappa และคณะ, 1970.
กลีเซอรอล	Sakaguchi และคณะ, 1948; Ohara, 1954.
อะซีเตต	Basappa และคณะ, 1970.
ไดไฮดรอกซีอะซีโตน	Challenger และคณะ, 1931 ; Katagiri และ Kitahara, 1933.
อะราบิโนส	Challenger และคณะ, 1929; Ohara, 1954.
ไซโลส	Ohara, 1954; Basappa และคณะ, 1970.
กาแลคโทส	Sakaguchi และคณะ, 1948; Ohara, 1954.
กลูโคส	รพี โรจนอุไร, 2539; Challenger และคณะ, 1931; May และคณะ, 1931; Katagiri และ Kitahara, 1933; Morton และคณะ, 1945; Arnstein และ Bentley, 1953; Sakaguchi และคณะ, 1948; Ohara, 1954; Bentley,1957 ; Parrish และคณะ, 1966; Basappa และคณะ, 1970; Bajpai และคณะ, 1981; Coupland และ Niehaus, 1987; Wei และคณะ, 1991; Kwak และ Rhee, 1992a; Kwak และ Rhee, 1992b; Ogawa และคณะ, 1995; Takamizawa และคณะ, 1996; Rosfarizan และคณะ, 1998a; Rosfarizan และคณะ, 1998b; Wakisaka และคณะ, 1998.

ตารางที่ 3 (ต่อ) แหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์สามารถใช้เพื่อผลิตกรดโคจิก

แหล่งคาร์บอน	เอกสารอ้างอิง
ฟรักโทส	รพี โรจนอุไร, 2539; Challenger และคณะ, 1931; Sakaguchi และคณะ, 1948; Ikeda, 1954; Ohara, 1954.
แมนนิทอล	Ohara, 1954.
แมนโนส	Ohara, 1954.
ซูโครส	รพี โรจนอุไร, 2539; Ohara, 1954; Lin และคณะ, 1976; Bajpai และคณะ, 1982a; Wei และคณะ, 1991; Ariff และคณะ, 1996; Ariff และคณะ, 1997.
มอลโทส	รพี โรจนอุไร, 2539; Ohara, 1954.
แลคโทส	Ohara, 1954.
ราฟิโนส	Ohara, 1954.
เดกซ์ทริน	Ohara, 1954.
อินนูลิน	Challenger และคณะ, 1931 ; Ohara, 1954.
แป้ง	Ohara,1954; Rosfarizan และคณะ,1998a; Rosfarizan และคณะ, 1998b

3. แหล่งไนโตรเจน จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดโคจิกสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นทั้งอินทรีย์สารและอนินทรีย์สารได้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ (ตารางที่ 4) ได้มีรายงานว่าแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยจะให้ผลผลิตกรดและการเติบโตสูง (May และคณะ, 1931; Prescott และ Dunn, 1959; อ้างถึงใน Casida, 1968) นอกจากนี้ยังมีแหล่งไนโตรเจนอื่นที่นิยมใช้ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต เปปโทน สารสกัดจากยีสต์ และ โคบาลทามีน เป็นต้น (รพี โรจนอุไร, 2539; May และคณะ, 1931; Katagiri และ Kitahara, 1933; Bajpai และคณะ, 1982a; Kwak และ Rhee; 1992a; Wakisaka และคณะ, 1998)

ตารางที่ 4 แหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์สามารถใช้เพื่อผลิตกรดโคจิก

แหล่งไนโตรเจน	เอกสารอ้างอิง
โคบาทามีน	Bajpai และคณะ, 1982a.
โซเดียมไนเตรต	May และคณะ, 1931; Arnstein และ Bentley, 1953; Bentley, 1957.
เปปโทน	Bajpai และคณะ, 1982a; Coupland และ Niehaus, 1987; Wei และคณะ, 1991; Takamizawa และคณะ, 1996; Rosfarizan และคณะ, 1998a.
สารสกัดจากยีสต์	รพี โรจนอุไร, 2539; Arnstein และ Bentley, 1953; Bentley, 1957; Lin และคณะ, 1976; Bajpai และคณะ, 1982a; Bajpai และคณะ, 1982b; Kwak และ Rhee, 1982a; Wei และคณะ, 1991; Ogawa และคณะ, 1995; Ariff และคณะ, 1996; Rosfarizan และคณะ, 1998; Wakisaka และคณะ, 1998.
แอมโมเนียมซัลเฟต	รพี โรจนอุไร, 2539; May และคณะ, 1931; Kwak และ Rhee, 1982a; Junko และคณะ, 1998; Wakisaka และคณะ, 1998.
แอมโมเนียมไนเตรต	May และคณะ, 1931; Prescott และ Dunn, 1959; Casida, 1968; Bajpai และคณะ, 1982a; Ariff และคณะ, 1997; Junko และคณะ, 1998; Rosfarizan และคณะ, 1998a; Rosfarizan และคณะ, 1998b.

4. อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน จำเป็นต้องมีสัดส่วนที่สมดุลย์ ถึงแม้ไนโตรเจนเป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับจุลินทรีย์ในการสร้างองค์ประกอบของเซลล์เช่นกรดนิวคลีอิกและไคติน แต่แหล่งคาร์บอนจะต้องนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน และวัตถุดิบในการผลิต

ผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้สัดส่วนที่ใช้ก็ไม่ควรให้มากหรือน้อยเกินไป โดยถ้าปริมาณไนโตรเจนน้อยเกินไปไม่เหมาะสมกับปริมาณคาร์บอนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อก็ทำให้ไม่เพียงพอต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ทำให้มีเซลล์เพื่อการผลิตน้อยทำให้ผลผลิตน้อยลง และถ้าปริมาณไนโตรเจนสูงเกินไปก็อาจทำให้จุลินทรีย์ไปสร้างกิจกรรมเกี่ยวกับการเติบโตแทนทำให้ผลผลิตกรดลดลงเช่นกัน โดยถ้าผลิตภัณฑ์ที่จะผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของคาร์บอนหรือมีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล เช่น กรดอินทรีย์ จะต้องจัดปริมาณคาร์บอนให้สูง และให้มีปริมาณของไนโตรเจนให้พอเหมาะแก่การเจริญของจุลินทรีย์ เพราะถ้ามากเกินไปอาจทำให้จุลินทรีย์มีกิจกรรมเกี่ยวกับการเจริญมากกว่าการผลิต แต่ถ้าชนิดของผลิตภัณฑ์มีส่วนประกอบของไนโตรเจนในโมเลกุล เช่น กรดอะมิโน ก็จะต้องจัดให้มีไนโตรเจนเพียงพอต่อการผลิต และมีสัดส่วนสมดุลย์กับคาร์บอน จึงจะให้ผลผลิตและการเติบโตที่เหมาะสม ไม่สูญเสียสารอาหารไปโดยไม่จำเป็น ดังนั้นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนจึงสำคัญต่อเทคโนโลยีการหมักด้วย (รพี โรจนอุไร, 2539; Coupland และ Niehaus, 1987; Carlile และ Watkinson, 1994; Ogawa และคณะ, 1995; Ariff และคณะ, 1996) นอกจากนี้ รพี โรจนอุไร (2539) ได้ทำการทดลองหาอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวโดย *A. oryzae* K13 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้พบว่ามีค่าเท่ากับ 840:2 โดยใช้แหล่งคาร์บอนคือน้ำตาลทรายขาว และใช้แหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด คือสารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมซัลเฟต ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดถึง 40.03 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง แต่ May และคณะ (1931) ได้ทำการแปรผันชนิดและปริมาณของไนโตรเจนเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของคาร์บอนและไนโตรเจน โดยการเพาะเลี้ยง *A. flavus* ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว พบว่าเมื่อใช้คาร์บอน 200 กรัมต่อลิตร จะต้องใช้แอมโมเนียมไนเตรต 1.125 กรัมต่อลิตร ซึ่งความเหมาะสมแตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาเจาะจงสำหรับจุลินทรีย์สายพันธุ์นั้นๆ

5. แร่ธาตุ นอกจากแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่จำเป็นต่อการผลิตกรดโคจิกแล้ว ยังพบว่าประสิทธิภาพในการผลิตจะดีขึ้นเมื่อมีการเติมเกลืออนินทรีย์เพียงเล็กน้อยแต่ถ้ามากเกินความจำเป็นจะไปส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์แทนส่งผลให้การสร้างกรดโคจิกน้อยลง (Coupland และ Niehaus, 1987; Prescott และ Dunn, 1959; Ogawa และคณะ, 1995) โดยทั่วไปเกลืออนินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกมีหลายชนิด เช่น โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต กรดฟอสฟอริก จะมีหมู่ฟอสเฟตที่ช่วยในการเจริญของรา (Bajpai และคณะ, 1982a) แต่การเติม

เกลืออนินทรีย์บางชนิดก็มีผลการยับยั้งการผลิตกรดโคจิก ดังเช่นการทดลองของ Coupland และ Niehaus (1987) ที่ศึกษาผลของเกลืออนินทรีย์ต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *A. parasiticus* ATCC 36573 พบว่าถ้ามีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 0.8 โมลาร์ และโซเดียมอะซีเตต 0.05 โมลาร์ จะมีผลยับยั้งการผลิตกรดโคจิก อีกทั้งยังมีรายงานอีกว่า โซเดียมแลคเตต และโซเดียมไพรูเวท ก็มีผลยับยั้งการผลิตกรดโคจิก (Sakaguchi และคณะ, 1948) และจากผลการทดลองของ May และคณะ (1931) ศึกษาผลของเกลืออนินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีการเติมสารละลายของเกลืออนินทรีย์ที่แตกต่างกัน 2 ชุดการทดลอง พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่ 1 ที่มีโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร กรดฟอสฟอริก 0.054 มิลลิลิตรต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 64.4 กรัมต่อลิตร และให้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 4.23 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อชุดที่ 2 ที่มีโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 2.0 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรด 62.93 กรัมต่อลิตร และให้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 6.81 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง จะเห็นได้ว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลืออนินทรีย์ทั้ง 2 ชุด จะให้ผลผลิตกรดใกล้เคียงกัน แต่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวชุดที่ 2 จะให้น้ำหนักสายใยแห้งมากกว่า และพบว่าร้อยละของการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตกรดโคจิกต่างกันคือ การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวชุดที่ 1 มีค่าเท่ากับ 61.1 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวชุดที่ 2 มีค่าเท่ากับ 49.5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการใช้สารละลายเกลืออนินทรีย์ในชุดที่ 1 จะเหมาะสมกว่า เนื่องจากราใช้น้ำตาลไปในการผลิตกรดมากกว่าและให้การเติบโตที่พอเหมาะ ซึ่งตรงกันข้ามกับการเพาะเลี้ยงในชุดที่ 2 ที่ใช้น้ำตาลไปในการสร้างสายใยมากกว่า

6. อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตกรดโคจิกของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักกรดโคจิกคือ 29 - 35 องศาเซลเซียส (Prescott และ Dunn, 1959) May และคณะ (1931) พบว่าที่อุณหภูมิ 30 - 35 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. flavus* ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว รพี โรจนอุไร(2539) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K13 ในระดับขวดเขย่าที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปคือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (May และคณะ, 1931; Kwak และ Rhee, 1992a; Kwak และ Rhee,

1992b;Ogawa และคณะ, 1995; Ariff และคณะ, 1996; Ariff และคณะ, 1997; Rosfarizan และคณะ, 1998a)

7. ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญของรา และการผลิตกรดโคจิก โดยพบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเติบโตนั้นจะสูงกว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิต ดังเช่น Katagiri และ Kitahara (1933) พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 จะส่งเสริมการเจริญของรา *A. oryzae* แต่ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 2.4 จะเหมาะสมต่อการสร้างกรดโคจิก และได้มีรายงานว่าช่วงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆในการผลิตกรดโคจิกคือ 2 - 5 (อ้างถึงใน Prescott และ Dunn, 1959)

8. ขนาดของหัวเชื้อ นอกจากชนิดของสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรดโคจิกแล้ว ขนาดของหัวเชื้อมีผลต่อการผลิตเช่นกัน โดยถ้าใช้ขนาดของหัวเชื้อน้อยเกินไปก็จะทำให้ปริมาณของสายใยที่ใช้ผลิตกรดน้อย มีผลทำให้มีการสร้างกรดโคจิกน้อยไปด้วย แต่ถ้าใช้ขนาดของหัวเชื้อมากเกินไปจะทำให้มีการเติบโตของสายใยมากทำให้ผลผลิตกรดน้อยลงเช่นกัน (รพี โรจนอุไร, 2539) ขนาดของหัวเชื้อที่นิยมใช้ในการผลิตกรดโคจิกมีหลายขนาดขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆอย่างเช่น สารตั้งต้นที่ใช้ ชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของกระบวนการหมัก เป็นต้น โดยส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงระหว่าง 10^6 - 10^9 สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร (Lin และคณะ, 1976; Bajpai และคณะ, 1982a; Coupland และ Niehaus, 1987; Ariff และคณะ, 1996; Takamizawa และคณะ, 1996; Ariff, 1997; Rosfarizan และคณะ, 1998a)

9. การให้อากาศ การหมักกรดโคจิกเป็นการหมักที่ต้องใช้อากาศ (aerobic fermentation) (Ariff และคณะ, 1996.) ดังนั้นอัตราการให้อากาศจึงจำเป็นต่อการหมักโดยจะส่งเสริมการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรดโคจิก เช่น เอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส เฮกโซไคเนส และกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส (Bajpai และคณะ, 1982a.) อย่างไรก็ตามช่วงระยะการหมักกรดโคจิกจะต้องการใช้ออกซิเจนน้อยลง ซึ่ง Ariff และคณะ (1996) ได้ศึกษาหาค่า dissolved oxygen tension (DOT) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีการกวน พบว่าการหมักที่มีการให้อากาศ 2 ช่วง คือให้อากาศที่ระดับสูง (80% saturation) ในระหว่างระยะการเจริญของรา *A. flavus* Link 44-1 และลดระดับการให้อากาศ (30% saturation) ในระยะการผลิตกรดโคจิก ทำให้ปริมาณของการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นมากกว่าระบบหมักที่ไม่มีการควบคุมการให้อากาศ และการหมักที่มีการควบคุมการให้อากาศเพียงระดับเดียว

สำหรับการหมักโดยให้จุลินทรีย์เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว การให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยลดการสะสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จึงทำให้มีการผลิตกรดโคจิกสูงขึ้น (Barnard และ Challenger, 1949) นอกจากนี้การผลิตโดยวิธีนี้เมื่อจัดให้อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงที่เหมาะสมคือ มีพื้นที่กว้าง ความสูงไม่มากนัก จะทำให้จุลินทรีย์ได้รับอากาศมากขึ้นจึงทำให้ผลิตกรดได้สูงขึ้น (May และคณะ, 1931)

จะเห็นได้ว่าการเลือกวิธีการผลิต การจัดภาวะในการผลิตให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตจะทำให้ได้ผลผลิตสูงและลดค่าใช้จ่ายในการผลิตได้ สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกซึ่งไม่มีการปั่นกวนหรือเขย่านั้นก็มีรายงานว่าให้ผลผลิตกรดสูงเป็นที่น่าสนใจเช่นกัน เมื่อได้เลือกใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มผลผลิตกรดได้ดี และไม่ต้องใช้เทคโนโลยีสูงจึงสามารถนำไปใช้ในประเทศที่กำลังพัฒนาได้จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 (คัดเลือกโดย เพชรรุ่ง พันธ์พิริยะ, 2537) ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว โดยศึกษาหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตกรดสูง และศึกษาหาภาวะเหมาะสมบางประการที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกโดยวิธีดังกล่าว

วัตถุประสงค์การทดลอง

เพื่อหาสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และภาวะบางประการที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K13 ที่เลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1.หาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว

2.หาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน และปริมาณของคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิก

3.หาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเพื่อผลิตกรดโคจิก

4.หาภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการผลิตกรดโคจิกเช่น ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสม ผลของการให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก