การผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลทรายโดย *Aspergillus oryzae* K 13 ในถังหมัก

นางสาว อุษา สรรค์วัฒนา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-131-080-3

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

KOJIC ACID PRODUCTION FROM CANE SUGAR BY *Aspergillus oryzae* K 13 IN A JAR FERMENTER

Miss Usa sarnwattana

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2000

ISBN 974-131-080-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลทรายโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในถังหมัก
โดย	นางสาว อุษา สรรค์วัฒนา
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุษา สรรค์วัฒนา : การผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลทรายโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในถังหมัก. (KOJIC ACID PRODUCTION FROM CANE SUGAR BY *Aspergillus oryzae* K-13 IN A JAR FERMENTER) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.กรรณิกา จันทรสอาด, 155 หน้า. ISBN 974-131-080-3

ได้ศึกษาถึงการผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลทราย โดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในถังหมักภายใต้การแปรภาวะบางประการ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อและค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตนั้นแตกต่างกัน เพื่อการเติบโตที่ดีจึงจัดค่าออกซิเจนละลาย และค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 80% ของอากาศอิ่มตัว และ 5.0 ตามลำดับเป็นเวลา 54 ชั่วโมง และเพื่อให้มีการผลิตกรดโคจิกที่มากที่สุดจึงลดปริมาณออกซิเจนละลายลงเป็น 50% ของอากาศอิ่มตัว และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.5 โดยขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมคือ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ภายใต้ภาวะดังกล่าวทำให้ได้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 20.80 กรัมต่อลิตร ภายใน 17 วัน และมีค่าอัตราการผลิตเท่ากับ 0.351 กรัมต่อลิตรต่อวัน การเติมแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นในระหว่างการผลิตและการผลิตโดยใช้สายใยซ้ำทำให้เพิ่มผลผลิตได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2543

4072473123 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: KOJIC ACID / CANE SUGAR / DISSOLVED OXYGEN / pH / FERMENTER

USA SARNWATTANA : THESIS TITLE. (KOJIC ACID PRODUCTION FROM CANE SUGAR BY *Aspergillus oryzae* K-13) THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. KANNIKA CHUNTARASA-ARD, 148 pp. ISBN 974-131-080-3.

Kojic acid production from cane sugar by *Aspergillus oryzae* K-13 in a jar fermenter under some varying conditions was studied. The results showed that the optimal pH of medium and dissolved oxygen for growth and for kojic acid production were different. The maximum growth was observed at 80% air saturation of DO and pH at 5.0, the highest kojic acid yield was obtained with lower DO value at 50% air saturation and gradually reduce pH to 2.5 . The optimal inoculum size was 10% (V/V). Under conditions mentioned above, the yield of kojic acid was 20.80 g/l with in 17 days and the production rate was 0.351 g/l/d. The addition of more carbon source during cultivation and reused of mycilia could increase the kojic acid yield.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department MICROBIOLOGY Student's signature ……..
Field of study INDUSTRIAL MICROBIOLOGY Advisor's signature ……..
Academic year 2000

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีจากความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำ ตักเตือน และแนะแนวทางในการทำงานวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขและสนับสนุนในด้านต่างๆจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณประธานกรรมการ และคณะกรรมการทุกท่าน ที่กรุณาตรวจสอบและแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

ความดีของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขอมอบแด่คุณแม่ และคุณพ่อ ที่ให้การสนับสนุนทุกด้าน ทั้งด้านกำลังใจ กำลังทรัพย์ และที่คอยให้การช่วยเหลือจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณ ธีระพงษ์ ภัทรายุตวรรตน์ ที่คอยให้กำลังใจและคอยช่วยเหลือในทุกทางที่จะทำได้ ขอขอบคุณเพื่อนๆในภาควิชาจุลชีววิทยา และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การช่วยเหลืออำนวยความสะดวกให้จนวิทยานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์

อุษา สรรค์วัฒนา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ .....ช
สารบัญตาราง ..... ซ
สารบัญรูป .....ฌ
สัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฑ
บทที่
1. บทนำ 1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย 35
3. ผลการวิจัย 51
4. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย 109
รายการอ้างอิง 125
ภาคผนวก 137
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 138
ภาคผนวก ข วิธีเตรียมสารเคมีที่สำคัญที่ใช้ในการทดลอง 140
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน 142
ประวัติผู้เขียน 148

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิก 10
2. ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด 26
3. แสดงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิก 29
4. ค่าความเติบโตจำเพาะสูงสุด เวลาที่เข้าสู่ภาวะการเติบโตคงที่ น้ำหนักแห้งที่เวลาที่การเติบโตคงที่ น้ำหนักแห้งสูงสุดในการเพาะเลี้ยง และ เวลาที่สลายน้ำตาลทรายหมดของการหาค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะกับการเติบโต 66
5. ค่าความเติบโตจำเพาะสูงสุด เวลาที่สู่ภาวะการเติบโตคงที่ น้ำหนักแห้งที่เวลาที่การเติบโตคงที่ และเวลาที่ใช้ในการสลายน้ำตาลทรายหมด ของการหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโต 76
6.อัตราการผลิตกรดโคจิก กรดโคจิกสูงสุด วันที่ทีการผลิตกรดสูงสุด เวลาที่ใช้ในการสลายน้ำตาลทราย และ น้ำตาลรีดิวซ์เหลือในวันสิ้นสุด การทดลองของการหาค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตกรดโคจิก 91
7. อัตราการผลิตกรดโคจิก กรดโคจิกสูงสุด วันที่ทีการผลิตกรดสูงสุด เวลาที่ใช้ในการสลายน้ำตาลทราย และ น้ำตาลรีดิวซ์เหลือในวันสิ้นสุดการทดลองเมื่อแปรผันขนาดของหัวเชื้อต่างๆกัน 101
8. อัตราการผลิตกรดโคจิก กรดโคจิกสูงสุด วันที่มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด เวลาที่ใช้ในการสลายน้ำตาลทราย และ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันสิ้นสุด การทดลอง การผลิตกรดโคจิกในภาวะต่างๆ 111

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

1. สูตรโครงสร้างของกรดโคจิก 1
2. กลไกการสร้าง melanin โดยการทำงานของไทโรซิเนส 3
3. แสดงโครงสร้างเคมีของ มอลทอล 7
4. การสังเคราะห์กรดโคจิกจากน้ำตาลกลูโคส 12
5. การสังเคราะห์กรดโคจิกจาก ดี-ฟรัคโตส 12
6. ปฏิกิริยาการสร้างกรดโคจิกจากน้ำตาลเพนโทส 13
7. ปฏิกิริยาการสร้างกรดโคจิกจากคาร์บอน 3 อะตอม 13
8.ปฏิกิริยาการสร้างกรดโคจิกจาก1-ไฮดรอกซีอะเซทิล-3-ฟอร์มิล-3-ไฮดรอกซีอะซิโตน 14
9.ปฏิกิริยาการสร้างกรดโคจิกจากไดไฮโดรออกซีอะซีโตน 14
10. เครื่องควบคุมและตรวจวัด ค่าความเป็นกรดด่าง ค่าออกซิเจนละลายและระดับฟอง 40
11.การผลิตกรดโคจิกในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยมีการใช้เครื่องควบคุมและตรวจวัดค่าความเป็นกรดด่างค่า ออกซิเจนละลาย ระดับฟอง และอุปกรณ์เสริมชุดควบคุม.....40
12. ลักษณะของขวดเขย่าปกติและในขวดเขย่าก้นบุบ 44
13. ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์และค่าความเป็นกรดด่าง ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกเมื่อทดลองผลิตในถังหมัก 52
14. การเปลี่ยนแปลงกรดโคจิกและน้ำหนักแห้งสายใยเมื่อผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าปกติและขวดเขย่าก้นบุบ 54
15.การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าปกติและขวดเขย่าก้นบุบ 56

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

16. เปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิก
ในขวดเขย่าปกติและขวดเขย่าก้นบุบ 57
17. น้ำหนักสายใยเพื่อการเติบโตในถังหมัก
โดยมีการแปรค่าออกซิเจนละลายค่าต่างๆ 59
18.การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งสายใยและค่าออกซิเจนละลาย
เมื่อมีการแปรค่าออกซิเจนละลายต่างๆกัน 60
19. การเปลี่ยนแปลง น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด โดยให้ค่าออกซิเจนละลาย
เท่ากับ 40%ของอากาศอิ่มตัว 62
20. การเปลี่ยนแปลง น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด โดยให้ค่าออกซิเจนละลาย
เท่ากับ 60%ของอากาศอิ่มตัว 63
21. การเปลี่ยนแปลง น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งโดยให้ค่าออกซิเจนละลาย
เท่ากับ 80%ของอากาศอิ่มตัว 64
22. การเปลี่ยนแปลง กรดโคจิก โดยมีการแปรค่าออกซิเจนละลายค่าต่างๆ.....65
23. การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างและน้ำหนักแห้ง เมื่อแปรผันค่า
ความเป็นกรดด่างค่าต่างๆ 68
24. การเปลี่ยนแปลง น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด โดยให้ภาวะ
ความเป็นกรดด่างที่ 4.0 69
25. การเปลี่ยนแปลง น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งโดยให้ภาวะ
ความเป็นกรดด่างที่ 4.5 70
26. การเปลี่ยนแปลง น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด โดยให้ภาวะ
ความเป็นกรดด่างที่ 5.0 71
27. การเปลี่ยนแปลง น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด โดยให้ภาวะ
ความเป็นกรดด่างที่ 5.5 72

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

28. การเปลี่ยนแปลง น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด โดยให้ภาวะ
ความเป็นกรดด่างที่ 6.0 73
29. ปริมาณกรดโคจิก เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13เมื่อแปรผัน
ค่าความเป็นกรดด่างค่าต่างๆ 75
30. ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์
ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย เมื่อควบคุมค่า
ออกซิเจนละลายและความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโตคือ
80%ของค่าอากาศอิ่มตัวและ 5.0 ตลอดการเพาะเลี้ยง 78
31. ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์
ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย เมื่อควบคุมค่าออกซิเจน
ละลายเท่ากับ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัวและจัดค่าความเป็น
กรดด่างตั้งต้นเท่ากับ 5.0 80
32. ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์
ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย มื่อควบคุมค่าออกซิเจน
ละลายและความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโต(ค่าออกซิเจนละลาย
เท่ากับ80%ของค่าอากาศอิ่มตัว,ความเป็นกรดด่าง 5.0) เป็นเวลา 54 ชั่วโมง
หลังจากนั้นปรับภาวะการให้อากาศเป็น 30%ของค่าอากาศอิ่มตัว
ความเป็นกรดด่างเป็น 2.5 ทันที 83
33. ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์
ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย เมื่อควบคุมค่าออกซิเจน
ละลายและความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโต
(ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ80%ของค่าอากาศอิ่มตัว,ความเป็นกรดด่าง 5.0)
เป็นเวลา 54 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับภาวะการให้อากาศเป็น
30%ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่อยๆปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น
2.5 ภายใน 48ชั่วโมง.....85

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

34. ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย เมื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลายและความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโต (ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ80%ของค่าอากาศอิ่มตัว,ความเป็นกรดด่าง 5.0) เป็นเวลา 54 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับภาวะการให้อากาศเป็น 50% ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่อยๆปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2.5 ภายใน 48ชั่วโมง 87

35. ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย เมื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลายและความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกคือ 50%ของค่าอากาศอิ่มตัว ตลอดการเพาะเลี้ยง ค่อยๆปรับค่าความเป็นกรดด่างลงเป็น 2.5 ใน 48 ชั่วโมง 90

36. กรดโคจิก และน้ำหนักแห้งสายใย ที่มีภาวะเหมาะกับการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิต เมื่อแปรปริมาณหัวเชื้อสปอร์งอกต่างๆกัน 93

37. ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย ที่ภาวะที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้ขนาดหัวเชื้อ 5% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ 94

38. ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย ที่ภาวะที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้ขนาดหัวเชื้อ 10% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....95

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

39. ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย ที่ภาวะที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้ขนาดหัวเชื้อ 15% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ 96
40. น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ กรดโคจิก ที่ภาวะที่เหมาะกับการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิต โดยมีการแปรปริมาณหัวเชื้อสปอร์งอกต่างๆกัน 97
41. น้ำหนักแห้งสายใยที่ภาวะที่เหมาะกับการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิต โดยมีการแปรปริมาณหัวเชื้อสปอร์งอกต่างๆกัน 99
42. ปริมาณกรดโคจิกที่ภาวะที่เหมาะกับการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิต โดยมีการแปรปริมาณหัวเชื้อสปอร์งอกต่างๆกัน 100
43. ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิก เมื่อจัดภาวะให้เหมาะสมต่อทั้งการเติบโตและการผลิต.....102
44. ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่างและค่าออกซิเจนละลายเมื่อผลิตกรดโคจิก ในขวดเขย่าด้วยวิธีการเติมแหล่งคาร์บอนระหว่างการผลิต.....104
45. ลักษณะสายใยที่เติบโตจนจับตัวเป็นก้อนเมื่อเพาะเลี้ยงโดยมีการใช้สายใยซ้ำในการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่า.....106
46. ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่างและค่าออกซิเจนละลาย เมื่อผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าด้วยวิธีการใช้สายใยซ้ำ.....107
47. โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ที่สร้างโดย *A. oryzae* K-13 เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ Zorbax-C8 108

สัญลักษณ์และคำย่อ

% = เปอร์เซ็นต์

g/l = กรัมต่อลิตร

g/g = กรัมต่อกรัม

g/l/d = กรัมต่อลิตรต่อวัน

hr^{-1} = ต่อชั่วโมง

pH = ค่าความเป็นกรดด่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

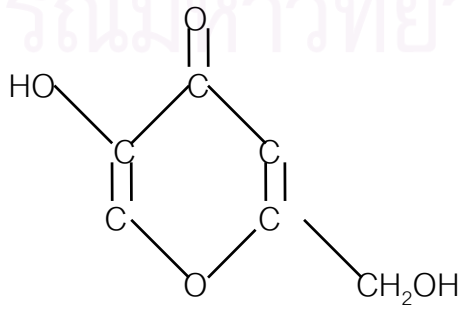
บทที่ 1
บทนำ

กรดโคจิก (kojic acid, $C_6H_6O_4$) คือกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง มีชื่อทางเคมีว่า 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-γ-pyrone (Bajpai, P., Agrawala, K. และ Vishwanathan, L. 1982(a)) หรือ 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4-pyrone (Merck, 1989) หรือ 5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one (Lokaj และคณะ, 1991) มีการค้นพบกรดโคจิกครั้งแรกในปี 1907 โดย Saito ซึ่งสามารถแยกผลึกที่เกิดจากสายใยของ *Aspergillus oryzae* ที่เติบโตบนข้าวนึ่ง ต่อมา Yabuta ได้ศึกษาสมบัติทางเคมี และตั้งชื่อว่า กรดโคจิก (อ้างถึงใน Bajpai และคณะ, 1982 (a))

สมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของกรดโคจิก

1. **สมบัติทางกายภาพ** มีลักษณะทั่วไปเป็นผลึกรูปเข็มสีขาว (Cole และ Cox , 1981) หรืออาจจะไม่มีสี มีจุดหลอมเหลว 152-154 องศาเซลเซียส ค่าการแตกตัวของกรด 7.90-8.30 (pKa) ละลายได้ดีในน้ำ เอธานอล เมธานอล อะซิโตน และ เอธิลอะซิเตต และถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นการละลายก็จะมากขึ้น ละลายได้น้อยในเอธิลอีเธอร์ ไพริดีน และ คลอโรฟอร์ม ไม่สามารถละลายได้ใน เบนซิน และเฮกเซน (Yabuta, 1913 ; Presscott และ Dun, 1959 ; Bajpai และคณะ, 1982(a) ; Merck,1989)

2.สมบัติทางเคมี กรดโคจิกมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 142.0266 (Cole และ Cox,1981) กรดชนิดนี้มีโครงสร้างที่มี γ-pyrone เป็นศูนย์กลางของโมเลกุลของกรด ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของกรดโคจิก (Merck,1989)

ภายในโครงสร้างโมเลกุลของกรดโคจิก มีตำแหน่งต่างๆซึ่งมีผลต่อสมบัติทางเคมีของกรดโคจิก ดังนี้

หมู่ไฮดรอกซิล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ทำให้โมเลกุลมีลักษณะเป็นกรดอ่อนๆ สามารถถูกแทนที่ได้ด้วยโลหะหลายชนิด และตำแหน่งนี้สามารถถูกแทนที่ทำให้เกิดอนุพันธ์ของกรดโคจิกได้มากมาย (Bajpai และคณะ, 1982 (a))

คาร์บอนตำแหน่งที่ว่าง ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 6 ไม่มีหมู่ใดมาแทนที่ (Bajpai และคณะ, 1982 (a)) โดยเฉพาะตำแหน่งที่ 6 จะไวต่อปฏิกิริยาและทำให้เกิดอนุพันธ์ได้มากกว่าตำแหน่งที่ 3

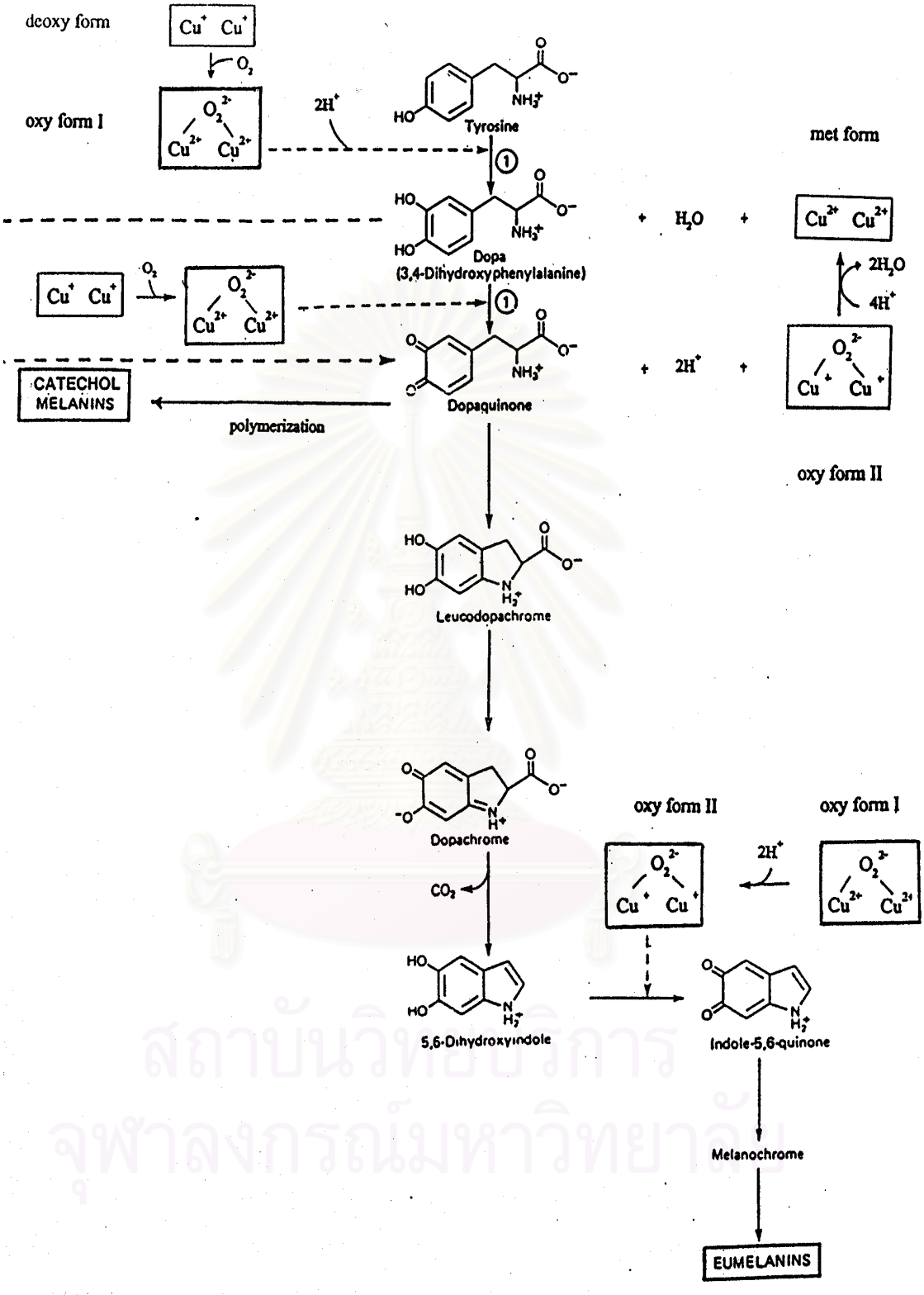
หมู่คาร์บอนิล โดยปกติมักไม่ทำปฏิกริยากับสารประกอบประเภทคาร์บอนิล แต่จะทำปฏิกริยากับโพแทสเซียมไซยาไนด์ ซึ่งจะทำให้กรดโคจิกอยู่ในรูปของเหลว (Bajpai และคณะ, 1982(a))

ตำแหน่งพันธะคู่ สามารถที่จะเติมไอโอดีนและโบรมีนเข้าไปทำปฏิกริยากับพันธะคู่เพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่มีสมบัติที่แตกต่างออกไป (Bajpai และคณะ, 1982(a))

3. **สมบัติทางชีวภาพ** ได้แก่

3.1 **มีสมบัติต่อการทำงานของไทโรซิเนส(Tyrosinase)** ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไทโรซีน (tyrosine) ไปเป็นเมลานิน (melanin) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดสีในผิวหนังและในเนื้อเยื่อผักชนิดต่างๆ เนื่องจากกรดโคจิกมีโครงสร้างตามที่ได้กล่าวแล้ว ซึ่งโครงสร้างของกรดโคจิกนี้เองจะคล้ายกับโครงสร้างของไทโรซิเนส หรือโพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase) จึงเกิดการแย่งจับกับสารตั้งต้นแบบแข่งขัน (Competitive inhibition) (Chen และคณะ, 1991) กรดโคจิกจะเข้าไปแย่งจับสารตั้งต้นในขั้นตอนต่างๆ ในการผลิตเมลานินดังแสดงภาพกลไกการสร้างเมลานิน (รูปที่ 2)

3.2 **มีสมบัติยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์** โดยในปี ค.ศ. 1913 Yabuta ค้นพบว่ากรดโคจิกปริมาณมากกว่า 0.5% สามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียได้ กรดโคจิกในรูปโซเดียมโคเจตจะมีประสิทธิภาพในการหยุดการเติบโตของแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบจะไวต่อ (Foster และ Karow,1945) แต่โซเดียมโคเจต จะเพียงแค่ยับยั้งการเติบโตไม่ได้ทำลายแบคทีเรียนอกจากนี้กรดโคจิกยังมีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อรา แต่กรดโคจิกนี้ไม่สามารถต้านไวรัสได้



รูปที่ 2 กลไกการสร้างเมลานินโดยการทำงานของไทโรซิเนส (Murray และคณะ, 1993)

3.3 **มีความเป็นพิษ** มีการพบว่ากรดโคจิกจะมีพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น สุนัข เมื่อฉีดเข้าเส้นเลือดดำในปริมาณ 0.5 กรัมต่อกิโลกรัมของร่างกาย และพบว่ามีปริมาณที่ทำให้สุนัขตาย (lethal dose) ประมาณ 1 กรัมต่อน้ำหนัก (กิโลกรัม) ของร่างกาย (Bajpai และคณะ, 1982 (a)) ซึ่งจะมีอาการน้ำลายไหล อาเจียน ถ่ายอุจจาระอย่างรุนแรง ซึ่งอาการเหมือนที่พบในกระต่ายและในหนู (Cole และ Cox, 1981) นอกจากนั้นยังพบว่า โซเดียมโคเจตที่เข้มข้น 1 % สามารถทำลายเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ได้ภายใน 3 ชั่วโมง ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6-8 และ Bajpai (1982(a)) ได้รายงานอีกว่า กรดโคจิกมีสมบัติเป็นพิษต่อหัวใจ (cardiotoxic) และ สารบำรุงหัวใจ (cardiotonic) ได้ปานกลาง

อนุพันธ์ต่างๆของกรดโคจิก มีสมบัติในทางชีวภาพที่หลากหลายมากมาย ไม่สามารถนำมากล่าวไว้ในที่นี้ได้หมด เช่น อนุพันธ์ของโคจิกในรูปเอสเทอร์-อีเทอร์ เช่น เอซิโลซิลเบนโซฟีโนน (acyloxyl benzophenones) และ เอซิโลซิล-4-ไพโรน (acyloxyl-4-pyrones) จะช่วยลดการทำงานของเอนไซม์ที่กระตุ้นการสลายกล้ามเนื้อ (elastase) (Miyano, 1988) อนุพันธ์เปปไทด์ของกรดโคจิกมีความสามารถในการต่อต้านเชื้อราได้ (Kayahara และคณะ, 1990) และอนุพันธ์เปปไทด์บางตัว เช่น 6 เอ็น-คาโบเบนโซซิล (6 N-carbobenzozyl amino acid) ก็สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งไทโรซิเนสได้ (Kobayashi และคณะ, 1995) และกรดโคจิกยังสามารถช่วยลดอนุมูลอิสระที่เกิดจากการสร้างของนิวโทรฟิล (neutrophil) ที่เกินความจำเป็น ซึ่งเป็นสาเหตุของการผิดปกติของร่างกายมนุษย์ เช่น โรคชรา และไปเพิ่มความสามารถของเม็ดเลือดขาว (leukocyte) โดยจะส่งผลให้ร่างกายมีความต้านทานมากขึ้น (Niwa และ Akamatsu, 1991)

ประโยชน์ของกรดโคจิก

1.ด้านการแพทย์

1.1) เป็นสารปฏิชีวนะ (antibiotics) มีการศึกษาถึงสมบัติการเป็นสารปฏิชีวนะของกรดโคจิกมามากมาย พบว่ากรดโคจิกมีฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะอย่างอ่อนๆ (Morton และคณะ, 1945) จากการศึกษาของ Kavanagh(1947) พบว่า กรดโคจิกเป็นหนึ่งในสารยับยั้งแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้บางชนิดเช่น *Bacillus subtilis* *Bacillus mycoides* *Staphylococus aureus* *Escherichia coli*

Klebsiella pnuemoniae *Pseudomonas aeruginosa* หลังจากนั้นได้มีผู้ศึกษาถึงสมบัติการเป็นสารปฏิชีวนะของกรดโคจิกอีกมากมายเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นยาปฏิชีวนะเพราะกรดโคจิกมีความเป็นพิษต่ำและปลอดภัยในการใช้กับมนุษย์ นอกจากนี้อนุพันธ์ของกรดโคจิกหลายชนิดก็มีสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะได้ดี เช่น อนุพันธ์โลหะของมอลทอล (moltol ; 3-hydroxy-2-methylpyran-4-one) มีสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะที่มีความคงตัวสูง(Bhatia., Kaushik และ Sodhi,1988) และมีการใช้มอลทอลเป็นตัวเพิ่มประสิทธิภาพให้กับยาปฏิชีวนะตัวอื่นในการทำลายแบคทีเรีย (Schved และคณะ, 1996)

1.2) **ช่วยลดอาการเสื่อมของกล้ามเนื้อและโรคที่เกิดจากอีลาสเทส (elastase)**เพราะอนุพันธ์ของกรดโคจิกพวกอะไคลอกซิล-4-ไพโรน (acyloxy-4-pyrone) จะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของนิวโทรฟิลอีลาสเทสของมนุษย์ (human neutrophil elastase) ที่เป็นสาเหตุของการทำลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น การเสื่อมของกล้ามเนื้อปอด ทำให้เกิดอาการอักเสบจากการคั่งของโลหิต (erythoma) มีผลทำให้เกิดโรคปวดบวมตามข้อตามกล้ามเนื้อ (rheumatoid) และอาจทำให้มีการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งได้ (Miyano และคณะ, 1988 ; Hatae, 1990 (a) ; Campbell และ Miyano, 1989)

1.3)**ลดอาการของโรคที่เกิดจากการมีอนุมูลอิสระมากเกินไป** กรดโคจิกสามารถจะไปขับไล่อนุมูลอิสระประเภทรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชี่ (reactive oxygen specie; ROS) ที่มากเกินความจำเป็นได้ ซึ่งถ้ามีอนุมูลอิสระประเภทนี้มากเกินไปจะทำให้เกิดโรคต่างๆ เช่น โรคที่เกิดจากการมีอายุมากขึ้น โรคที่ไม่สามารถควบคุมได้โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากความชรา เดิมมีผู้ใช้สารประเภทต่อต้านอนุมูลอิสระในการรักษา แต่การใช้ยาประเภทนี้มากๆจะทำให้ร่างกายขาดภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อโรค จึงมีผู้หันมาใช้กรดโคจิกเป็นยารักษาแทน (Niwa และ Akamatsu, 1991)

กรดโคจิกทำลายอนุมูลอิสระได้โดยไปทำให้มีการกระตุ้นในเซลล์เนื้อเยื่อและเลือด นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเม็ดเลือดขาวทำให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันมากขึ้นด้วยเพราะกรดโคจิกจะทำให้ปริมาณแคลเซียมในเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นทำให้ทำงานมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Niwa และ Akamatsu, 1991)

1.4) **ใช้รักษาโรคภูมิแพ้** อนุพันธ์ของกรดโคจิก ที่ชื่อว่า อะรอลคอกซี่ (aralkoxy) และ อะริลออกซี่ อัลคอกซี่ (aryloxy alkoxy) สามารถใช้รักษาอาการแพ้

(allergies) ภาวะอักเสบและการตีบตันของหลอดโลหิตในหัวใจ (coronary vasconstraction) (Masateru และ Shone, 1989)

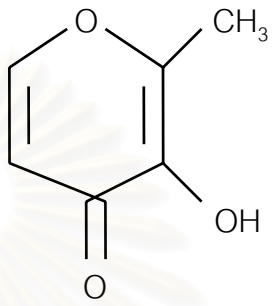
1.5) **ใช้ในการศึกษาการเกิดเนื้องอกในต่อมไทรอยด์** มีรายงานวิจัยหลายงานที่ค้นพบว่ากรดโคจิกสามารถจะเหนี่ยวนำให้เกิดแผลขึ้นที่ต่อมไทรอยด์ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดเนื้องอกขึ้นได้ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสาเหตุที่เกิดเหตุการณ์ดังกล่าวเกิดจากการกระตุ้นฮอร์โมน (thyriod - stimulating hormone, TSH) (Fujimoto และคณะ, 1998 และ Mitsumori และคณะ, 1999) นอกจากนี้ยังมีผู้ค้นพบรายละเอียดต่อไปว่า กรดโคจิกมีผลต่อการรับไอโอดีนเข้าสู่ต่อมไทรอยด์ได้น้อยลงซึ่งส่งผลให้เกิดความผิดปกติในต่อมไทรอยด์นำไปสู่การเกิดเนื้องอกได้ จากสมบัติดังกล่าวของกรดโคจิกจึงถูกนำมาเป็นสารที่ใช้กระตุ้นให้เกิดเนื้องอกเพื่อใช้ในการศึกษาในแง่มุมต่างๆของการเกิดเนื้องอกในต่อมไทรอยด์ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทางการแพทย์ (Tamura และคณะ, 1999)

1.6) **ประโยชน์ทางการแพทย์ด้านอื่น ๆ** รายงานของ Caravan และคณะ (1995) แสดงให้เห็นว่าอนุพันธ์ของกรดโคจิกพวก บิส(มอลทอลาโท)ออกโซวานาเดียม (Bis(maltolato)oxovanadium (IV)) อาจจะเป็นสารที่ใช้แทนอินซูลินที่มีประสิทธิภาพดีได้ และมีการค้นพบว่ากรดโคจิกและมอลทอลสามารถเป็นลิแกนด์ (ligand) ที่จะไปติดกับออกโซแวนเดียม(IV)คีเลต (oxovandium(IV)chelates) เพื่อเป็นยารักษาความดันสูง โรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคในระบบเลือด และโรคที่เกิดจากการรับประทานที่ผิดปกติ นอกจากนี้การที่กรดโคจิกมีสมบัติในการเป็นสารต่อต้านเชื้อรา เป็นสารปฏิชีวนะ และมีความสามารถในการเป็นลิแกนด์ให้สารประเภทโลหะได้ดี จึงทำให้กรดโคจิกเป็นสารที่ได้รับความสนใจใช้เป็นสารในการทดสอบหาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Mc Neill, 1996)

2. ด้านอาหาร

อนุพันธ์ของกรดโคจิกที่มีชื่อว่า มอลทอล (maltol ; 3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone) รูปที่ 3 และ เอทิลมอลทอล (ethylmaltol ; 3-hydeoxy-2-ethyl-4-pyrone) ซึ่งมีการค้นพบครั้งแรกโดยแยกได้จากต้นลาช (larch) อนุพันธ์ดังกล่าวเป็นสารประกอบที่มีอยู่ตามธรรมชาติในอาหารและเครื่องดื่ม สารประเภทนี้มีสมบัติหลักๆ คือ เป็นสารช่วยเพิ่มกลิ่น รส ให้ดีขึ้น โดยบริษัท Phizer เป็นผู้ผลิตมอลทอลและเอทิลมอลทอล ขายในสหรัฐอเมริกา ออกมาเป็นสินค้าที่มีชื่อว่า วีทอล (vetol) และ วีทอล พลัส (vetol plus) ตามลำดับ (Le Blanc และ Aker, 1989) เพราะฉะนั้นจึงใช้มอลทอลและเอทิลมอลทอล

ในอุตสาหกรรมอาหารหลายด้าน เมื่อเปรียบเทียบกับสารเพิ่มรสชาติที่ใช้อยู่ในอดีต พวกคูมาลิน (coumarin) ซึ่งต้องใช้ในปริมาณมากและมีความเป็นพิษสูงเกินมาตรฐานของ FDA พบว่ามอลทอลใช้ในปริมาณที่ต่ำกว่า 4 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าเอทิลมอลทอลมีประสิทธิภาพที่ดีกว่ามอลทอลถึง 2-6 เท่าและยังมีราคาถูกกว่า เพราะฉะนั้นจึงเป็นที่นิยมมากกว่าในเชิงการค้า



รูปที่ 3 โครงสร้างเคมีของมอลทอล (Le Blanc และ Aker, 1989)

ประเภทของอาหารที่ใช้มอลทอลและเอทิลมอลทอล เป็นตัวเพิ่มกลิ่น รส ได้แก่ พวกอาหารที่ต้องการกลิ่นผลไม้ประเภทเบอร์รี่ เช่น เครื่องดื่ม ลูกกวาดกลิ่นผลไม้ต่างๆ และยังช่วยลดความขมของน้ำตาลแซกคารีน ช่วยเพิ่มกลิ่นรสที่ดีและให้กลิ่นของคาราเมล เครื่องดื่มต่างๆ เช่น ไวน์ เหล้า เบียร์ น้ำผลไม้ น้ำมะเขือเทศ อาหารหวานพวกเจลาตินและไอศครีม ซึ่งจะช่วยเพิ่มเนื้อสัมผัสและจะไปเพิ่มความรู้สึกเป็นครีมเข้มข้นในขนมปัง เพราะช่วยลดกลิ่นยีสต์และช่วยให้มีกลิ่นความสดของขนมปัง โดยเฉพาะกลิ่นผลไม้ที่ต้องการใส่ในขนมปังจะช่วยเพิ่มความเข้มข้น และทำให้มีความนุ่มมากขึ้นและช่วยเพิ่มกลิ่นและรสชาติของชอคโกแลตในชอคโกแลตเทียมด้วย สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการความหอมและต้องกำจัดกลิ่นที่ไม่ต้องการออก เช่น น้ำหอม โคโลญจ์ แป้ง แชมพู เทียนหอม โลชั่น มักผสมกรดโคจิกเนื่องจากสามารถกำจัดกลิ่นที่ไม่ต้องการเหล่านั้นได้ นอกจากนี้สามารถใช้มอลทอลลดปริมาณการใช้น้ำตาลได้ 5-15% โดยไม่สูญเสียความหวาน และใช้ร่วมกับสารที่ให้ความหวานสูงเช่น แอสปาแตม ซูคราโลส เพื่อลดปริมาณของสารให้ความหวานได้ นอกจากนี้ในอาหารประเภทแป้งและเส้นก๋วยเตี๋ยวใช้กรดโคจิกเป็นสารที่ช่วยป้องกันการเกิดสีน้ำตาลระหว่างการหมักแป้ง ซึ่งเกิดจากกลไกของการลดการทำงานของไทโรซิเนส (Uchino และคณะ , 1998) มีการศึกษาถึงผลิตภัณฑ์อาหารใหม่ๆที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ เช่น ซีอิ๊วญี่ปุ่น

โดยกรดโคจิกจะช่วยเพิ่มความหอมของซีอิ๊ว (Ishihara และคณะ, 1996) นอกจากนี้พบว่ามอลทอลเป็นส่วนประกอบหนึ่งในโสมเกาหลี (Korean ginseng) (Suh, Han และ Han, 1996)

นอกจากนี้ยังใช้กรดโคจิกในการถนอมอาหารประเภทอาหารแช่แข็ง ประเภทอาหารทะเลเพื่อป้องกันไม่ให้สีเปลี่ยนระหว่างการขนส่ง แต่เมื่อไม่นานมานี้มีการค้นพบว่า ถ้าใช้กรดโคจิกมากอาจมีผลในการทำให้เกิดเนื้องอกได้ ซึ่งสามารถที่จะลดปริมาณความเข้มข้นได้โดยการต้ม (Sato และคณะ, 2000)

3. ด้านการเกษตร

กรดโคจิกและอนุพันธ์ในรูปเอสเทอร์มีสมบัติที่จะเป็นสารช่วยเสริมประสิทธิภาพของยาฆ่าแมลง (insecticide synergists) ประเภท ไพรีธรอยด์ (pyrethroid) และ คาร์บาเมท (carbamate) และเป็นสารเสริมประสิทธิภาพยากันยุงได้ (Down, 1990) อนุพันธ์ของกรดโคจิกประเภทกรดอะมิโนและเปปไทด์สามารถจะทำลายเชื้อรา เช่น *Pythium graminicola* และ *Fusarium oxyaporun* ที่ก่อโรคแห้งและโรคฝักด่าง (Kayahara และคณะ, 1990)

4. ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์

ในปัจจุบันกรดโคจิกเป็นองค์ประกอบสำคัญในเครื่องสำอางค์ที่ทำให้ผิวขาว เพราะกรดโคจิกจะไปลดการทำงานของไทโรซิเนสซึ่งเร่งปฏิกิริยาการสร้างเม็ดสีเมลานิน ทำให้มีการสร้างเมลานินน้อยลงผิวจึงขาวขึ้นได้ (Hatae และ Nalashima , 1989 ; Hara,1990 ; Cabanes และคณะ ,1994 ; Itaru, 1995) นอกจากนั้นอนุพันธ์ของกรดโคจิกสามารถลดการผลิตเม็ดสีได้เช่นกัน (Hatae, 1990(b)) บางอนุพันธ์ของกรดโคจิกที่มีกรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบ เช่น เอ็น-คาโบเบนโซซิล จะให้ประสิทธิภาพในการลดการเกิดเม็ดสีเมลานินดีกว่ากรดโคจิก เนื่องจากประสิทธิภาพในการลดการผลิตเม็ดสีได้ดีจึงมีการนำมาใช้ทดแทนวิตามินซีที่นิยมใช้อยู่เดิมได้ (Morisaki และ Ozaki, 1996) จากความสามารถของกรดโคจิกนี้ จึงมีการนำมาใช้เป็นองค์ประกอบสำคัญในครีมที่ทำให้ขาว และเป็นสารป้องกันการเกิดสีผิวที่เข้มเนื่องจากแสงแดด (Hatae, 1990(b) ; Oyama, 1991 ; Itaru, 1995) และมีผู้ศึกษาเพื่อหาอนุพันธ์รูปแบบต่างๆของกรดโคจิกที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ปัจจุบันกรดโคจิกก็ยังเป็นที่นิยมใช้เป็นสารเพิ่มความขาว ลดการผลิตเม็ดสีใต้ผิวหนังที่ปลอดภัย และใช้มากในอุตสาหกรรม

เครื่องสำอางค์อยู่ ถึงแม้จะมีการค้นพบสารที่มีประสิทธิภาพอย่างเดียวกัน เช่น ชาเขียว ก็ตาม (No และคณะ, 1999) และยังมีงานวิจัยที่กล่าวถึงประโยชน์ของกรดโคจิกในการช่วยลดกระเนื้อใต้ผิวหนังได้ด้วย แต่อาจจะมีผลกระทบทำให้มีผื่นแดงเล็กน้อยซึ่งจะหายได้เองภายใน 3 อาทิตย์ (Lim, 1999) และสมบัติอื่นของกรดโคจิกคือ กรดโคจิกสามารถช่วยป้องกันริ้วรอยบนผิวหน้าที่เกิดจากกาลเวลาได้ดีอีกด้วย (Gagnebien, 1993)

5. ในอุตสาหกรรมเคมี

ใช้กรดโคจิกเป็นส่วนประกอบของโพลีเมอร์ เพื่อใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ภาชนะบรรจุของทั่วไป วัสดุก่อสร้าง ถังเก็บเชื้อเพลิง (Mcculloch, 1961) และใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมพลาสติก (Crueger และ Crueger, 1990) นอกจากนี้กรดโคจิกเป็นส่วนผสมในสีย้อม ซึ่งผลิตจากบริษัท Wako pure chemical industry Ltd. (Kouno และ Suzuki, 1994) และกรดโคจิกยังใช้เป็นสารทำให้คงตัว (stabilizing agent) ในน้ำมันกรดที่ผสมอยู่กับน้ำในรูปอีมัลชั่นซึ่งมีฤทธิ์เป็นกรดสูงมาก การผสมกรดโคจิกจะช่วยทำให้ลดมลภาวะจากความเป็นกรดลงได้ (Griat, 1996) และกรดโคจิกมีประสิทธิภาพในการเป็นตัวกระตุ้นไลเปสซึ่งสามารถย่อยสลายไขมันได้ โดยพบว่าเมื่อทำให้กรดโคจิกอยู่ในรูปอนุพันธ์เอสเทอร์จะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของกรดโคจิกได้ (Liu และ Shaw, 1998)

เนื่องจากกรดโคจิกมีประโยชน์มากมายในหลายด้าน เพราะฉะนั้นจึงมีผู้คิดค้นรูปแบบหรือเครื่องมือในการติดตามปริมาณกรดโคจิกและผลของกรดโคจิกต่อปฏิกิริยาที่ศึกษาด้วย ตัวอย่างเช่น การใช้เครื่องตรวจหาโดยประจุบวก (preanodized screen-printed carbon electrode) เพื่อตรวจหากรดโคจิกในเครื่องสำอางค์ โดยอาศัยการวัดกระแสไฟฟ้า (Shih และ Zen, 1999)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิก

มีผู้ค้นพบจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้มากมาย โดยในปีค.ศ.1907 Saito ซึ่งเป็นคนแรกที่ค้นพบว่า ราสามารถผลิตกรดโคจิก (อ้างถึงใน Presscott และ Dunn ,1959) ซึ่งต่อมาได้มีผู้ทำการศึกษาเพิ่มมากขึ้น ทำให้พบว่ามีเชื้อราหลายชนิดที่ผลิตกรดโคจิกได้ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิก

ชื่อจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus albus	Cole และ Cox,1981
Aspergillus alloaceus	Cole และ Cox,1981
Aspergillus awamori	Cole และ Cox,1981
Aspergillus candidus	Cole และ Cox,1981
	Wei และคณะ. ,1991
Aspergillus clavatus	Cole และ Cox,1981
Aspergillus effusus Tirabschi	Cole และ Cox,1981
Aspergillus flavus	Arnstein และคณะ,1953
	Bajpai และคณะ ,1981
	Bajpai และคณะ ,1982(a)
	Cole และ Cox,1981
Aspergillus fumigatus	Cole และ Cox,1981
Aspergillus glauvus	Cole และ Cox,1981
Aspergillus gymnosarde	Cole และ Cox,1981
Aspergillus lutecens	Cole และ Cox,1981
Aspergillus luteo-virescens	Cole และ Cox,1981
Aspergillus nidulans	Cole และ Cox,1981
Aspergillus oryzae	Arnstein และ Bently,1953
	Cole และ Cox,1981
	Kwak และ Joon,1992
	Crueger และ Crueger,1990
	Bently,1957
	Ogawa และ Niwa,1995(b)
	Ushijima และคณะ ,1990
Aspergillus parasitivus	Cole และ Cox,1981
Aspergillus tamarii	Cole และ Cox,1981

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชื่อจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Penicillium citrinum	Cole และ Cox,1981
Penicillium deleae	Cole และ Cox,1981
Penicillium griseofulvum	Cole และ Cox,1981
Penicillium purpurogenum	Cole และ Cox,1981
Penicillium rubrum	Cole และ Cox,1981
Leuconostoc misinteroids	Kitao และ Sekine,1994
Acetic acid bacteria	Kondo,1949

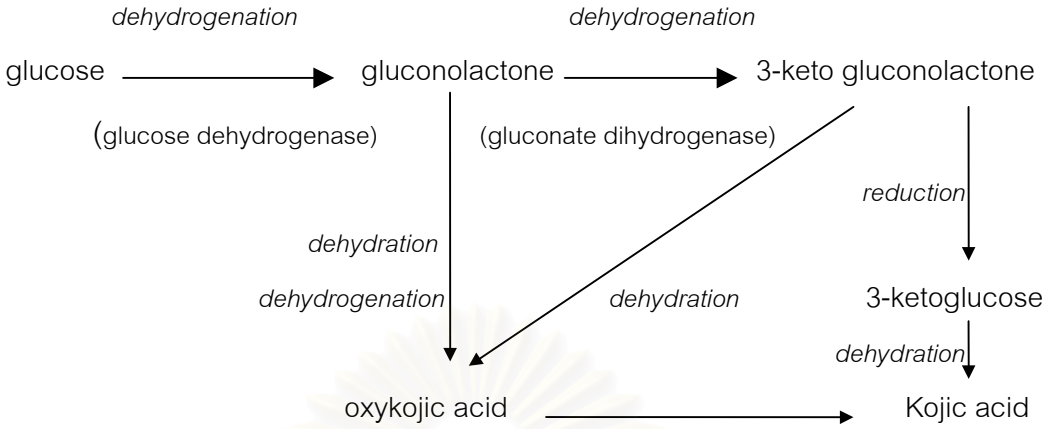
สำหรับจุลินทรีย์ ที่นิยมนำมาใช้ผลิตกรดโคจิกในระดับอุตสาหกรรมเพื่อใช้ในทางการค้า คือ *Aspergillus oryzae* (Baregaard และคณะ , 1992)

กระบวนการสังเคราะห์กรดโคจิก

กรดโคจิกเป็นสารมัธยันต์ (metabolite) จากจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในขณะที่มีการเติบโตเต็มที่แล้ว คือการเติบโตอยู่ในช่วงการเติบโตคงที่ (stationary state) ซึ่งหมายความว่า กรดโคจิกเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) (Bajpai และคณะ, 1982(a)) และกระบวนการสังเคราะห์กรดโคจิกมีวิธีการได้หลายวิธีจากสารตั้งต้นหลายชนิด ซึ่งจะแสดงดังต่อไปนี้

1.สารตั้งต้นเป็นกลูโคส

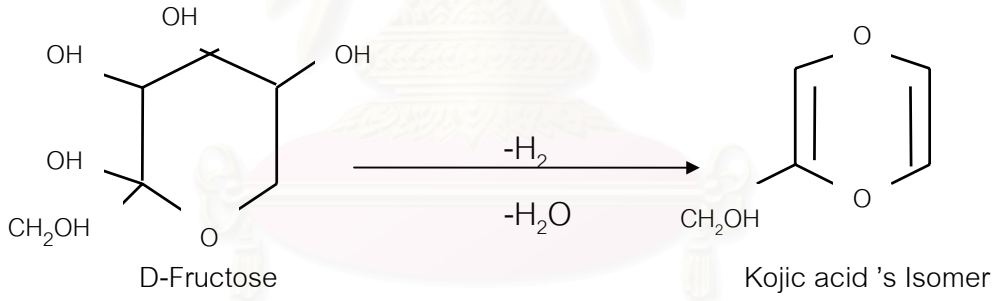
Bajpai และคณะ (1981) ได้ศึกษากระบวนการการสังเคราะห์กรดโคจิกจากกลูโคสโดย *A.flavus* พบว่ากรดโคจิกถูกสังเคราะห์โดยเกิดปฏิกิริยาการดึงไฮโดรเจนออก (dehydrogenation) และ ปฏิกิริยารีดักชั่น (reduction) ซึ่งมีทิศทางความเป็นไปของปฏิกิริยาได้ 3 ทาง ดังรูปที่ 4 เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญได้แก่ กลูโคสดีไฮโดรจีเนส และกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส และมี 3-คีโตกลูโคนิคแอซิดแลคโทน (3-ketogluconic acid lactone) 3-คีโตกลูโคส (3-ketoglucose) และออกซีโคจิก (oxykojic) เป็นสารมัธยันต์ในวิถีการสร้างกรดโคจิกจากกลูโคส (Bajpai และคณะ, 1981)



รูปที่ 4 การสังเคราะห์กรดโคจิกจากกลูโคส (อ้างถึงใน Bajpai และคณะ, 1982(a))

2.สารตั้งต้นเป็นฟรัคโตส

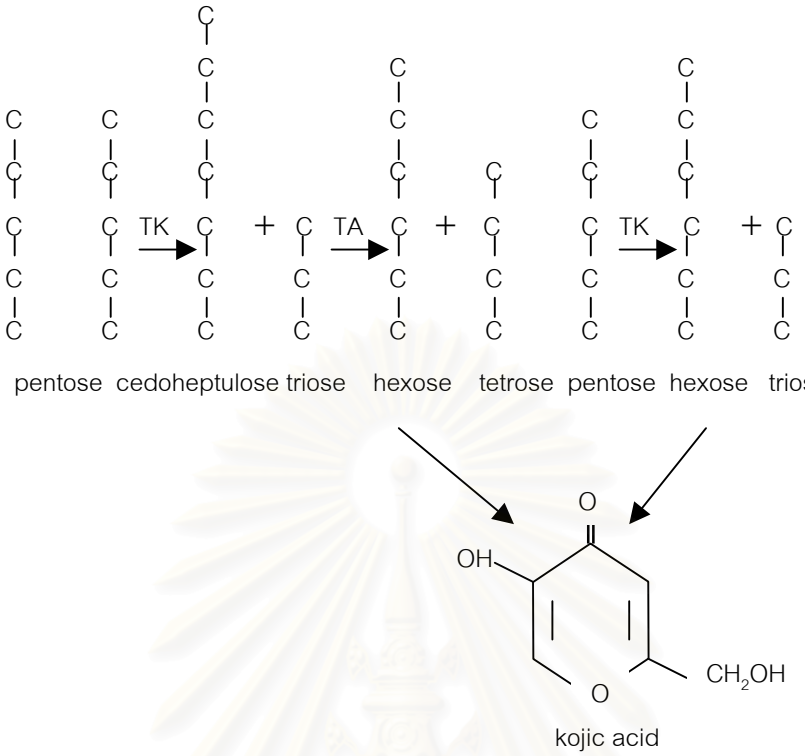
เกิดจากปฏิกิริยาการดึงน้ำ และ ไฮโดรเจน (Bajpai และคณะ, 1982(a)) ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 การสังเคราะห์กรดโคจิกจาก ดี-ฟรัคโตส (Bajpai และคณะ, 1982(a))

3.สารตั้งต้นเป็นเพนโทส

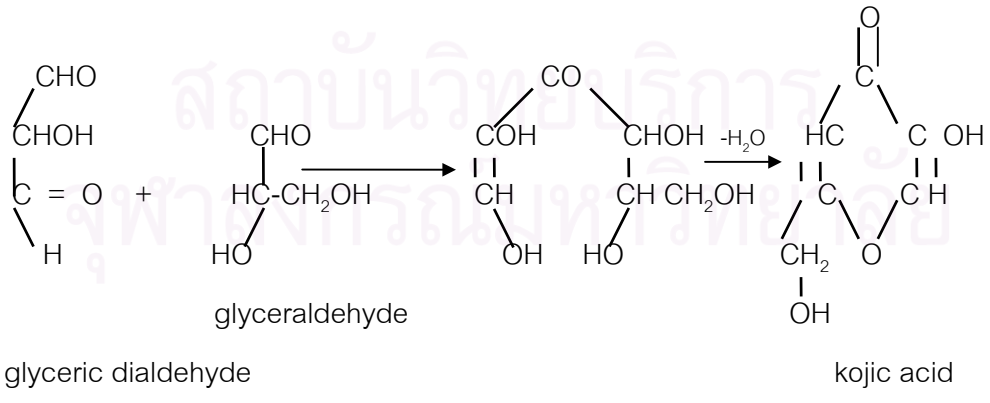
มีการเร่งปฏิกิริยาโดยทรานสคีโตเลส (transketolase) และทรานสอัลโดเลส (transaldolase) ซึ่งการสร้างกรดโคจิกจะเริ่มจากน้ำตาลเพนโทส (Turner, 1971) ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 การสังเคราะห์กรดโคจิกจากน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม (เพนโตส)(Turner, 1971)

4.สารตั้งต้นเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 3 อะตอม

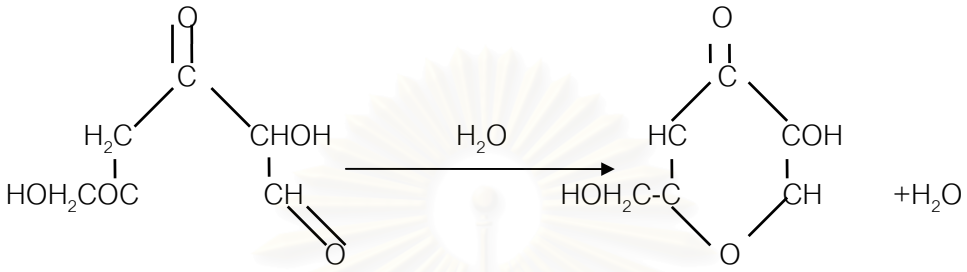
สารประกอบที่มีคาร์บอน 3 อะตอม 2 โมเลกุล เช่น กลีเซอริกไดอัลดีไฮด์ (glyceric dialdehyde) , กลีเซอรอลดีไฮด์ (glyceraldehyde)เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์กรดโคจิกได้ โดยเกิดปฏิกิริยาการดึงน้ำ (dehydration) ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดโคจิกจากสารประกอบที่มีคาร์บอน 3 อะตอม (Gray และคณะ,1959)

5. สารตั้งต้นเป็น 1-ไฮดรอกซีอะเซทิล-3-ฟอร์มิล-3-ไฮดรอกซีอะซิโตน (1-hydroxyacetyl-3-formyl-3-hydroxyacetone)

โดยเกิดปฏิกิริยาเติมน้ำ (hydration) (อ้างถึงใน Presscott and Dunn, 1959) ดังแสดงในรูปที่ 8

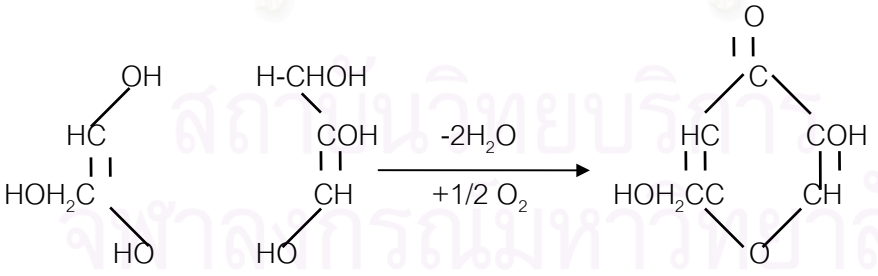


1-hydroxyacetyl-3-formyl-3-hydroxyacetone kojic acid

รูปที่ 8 ปฏิกิริยาการสร้างกรดโคจิกจาก 1-ไฮดรอกซีอะเซทิล-3-ฟอร์มิล-3-ไฮดรอกซีอะซิโตน (อ้างถึงใน Presscott และ Dunn, 1959)

6.สารตั้งต้นเป็น ไดไฮดรอกซีอะซิโตน (dihydroxyacetone)

โดยเกิดปฏิกิริยาการออกซิเดชั่นและการสูญเสียน้ำ (อ้างถึงใน Presscott และ Dunn, 1959)



dihydroxyacetone kojic acid

รูปที่ 9 ปฏิกิริยาการสร้างกรดโคจิกจากไดไฮดรอกซีอะซีโตน (อ้างถึงใน Presscott และ Dunn, 1959)

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดอินทรีย์

วิธีการที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการผลิตกรดอินทรีย์ ส่วนใหญ่นิยม 3 วิธี ดังนี้

1. **การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง** (solid state culture) เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง มีการเติมน้ำเพียงเพื่อให้เหมาะสำหรับการเติบโตและให้มีเมตาบอลิซึมเท่านั้น การหมักด้วยวิธีนี้จำเป็นที่ต้องอาศัยปัจจัยต่างๆในการเพาะเลี้ยงดังนี้คือ (Barhracharya และ Mudgett, 1980)

1.วัตถุดิบที่ใช้หมัก มักจะใช้เป็นพวกธัญพืช ฟางข้าว หญ้า หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้มาจากสัตว์หรือพืชที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีนสูง ซึ่งวัตถุดิบส่วนใหญ่ต้องผ่านการปรับสภาพ เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถนำสารอาหารไปใช้ได้ง่ายขึ้น

2.ขนาดของวัตถุดิบ มีความสำคัญมากในการเพาะเลี้ยงเพราะต้องมีขนาดที่เหมาะสม ควรมีขนาดชิ้นเล็ก ผิวหยาบ เนื่องจากจะทำให้มีช่องว่างระหว่างอนุภาคเพื่อให้ออกซิเจนสามารถแพร่เข้าไปได้ลึก และขนาดของวัตถุดิบจะมีผลต่อการสะสมความร้อนในระบบหมัก

3.ปริมาณความชื้น เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยจะใช้ปริมาตรของน้ำต่อมวลของสารตั้งต้นต่ำ ถ้าปริมาณความชื้น (moisture content) สูงเกินไปจะทำให้ช่องว่างที่อากาศจะแพร่เข้าไปได้น้อยเพราะมีปริมาณน้ำอยู่ภายในและในทางตรงกันข้ามถ้ามีปริมาณความชื้นน้อยเกินไปจะยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์

4.ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และออกซิเจน ในการหมักโดยเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง อาจทำให้เกิดความร้อนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สะสมขึ้นได้ ดังนั้นจึงต้องมีการระบายอากาศเพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แล้วให้ก๊าซออกซิเจนเข้ามาแทนที่เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดอินทรีย์ต่อไปได้

5.อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่าง ในการหมักด้วยวิธีนี้การควบคุมปัจจัยดังกล่าวจะทำได้ยาก ดังนั้นจึงมักนิยมปล่อยตามธรรมชาติมากกว่าการควบคุม

2. **การเพาะเลี้ยงโดยให้จุลินทรีย์เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว** (liquid surface culture) เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เติบโตบนผิวหน้าของอาหารเหลว วิธีนี้ไม่มีการให้อากาศและการกวนจะปล่อยให้มีการเติบโตอย่างธรรมชาติ ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักด้วยวิธีนี้คือ

1.สูตรอาหาร ต้องมีแร่ธาตุในการเติบโตเนื่องจากเป็นการหมักแบบไม่มีการกวนจึงทำให้มีปริมาณของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อย ทำให้ต้องการปัจจัยเสริมช่วยในการเติบโต และต้องมีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมจึงจะช่วยส่งเสริมการผลิตให้สูงขึ้น

2.พื้นที่ผิวต่อความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ จำเป็นต้องอาศัยพื้นที่ผิวมากพอในการหมักเพื่อเพิ่มผลผลิต สำหรับวิธีการนี้จุลินทรีย์ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารจะสัมผัสกับอากาศ ส่วนด้านล่างจะสัมผัสอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นถ้าพื้นที่ผิวมากจุลินทรีย์จะเจริญได้มากแต่อย่างไรก็ตามต้องไม่มากจนเกินไป

3.ขนาดหัวเชื้อ ต้องไม่มีขนาดมากหรือน้อยเกินไป เพราะถ้ามากเกินไปจะทำให้จุลินทรีย์อัดตัวกันแน่นออกซิเจนแพร่เข้าไปได้ยาก แต่ถ้าน้อยไปจะทำให้การผลิตไม่เพียงพอ

4.การเป่าอากาศ เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง เพราะวิธีนี้จะไม่มีการกวน ดังนั้นต้องอาศัยการเป่าอากาศซึ่งจะทำหน้าที่ 3 อย่างคือ การให้ออกซิเจน การระบายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และการระบายความร้อน ซึ่งอาจจะช่วยป้องกันการปนเปื้อนระหว่างการงอกของสปอร์และการเติบโตในช่วงแรกได้

5.อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่าง เป็นปัจจัยที่สำคัญแต่เนื่องจากการผลิตกรดในรูปแบบนี้ไม่สามารถปรับสภาพความเป็นกรดด่างให้เท่ากันทั้งระบบได้ เพราะการกวนจะทำให้สายใยที่เจริญบนผิวอาหารถูกทำลายได้ จึงต้องปรับค่าความเป็นกรดด่างแค่ช่วงเริ่มต้นเท่านั้น ส่วนอุณหภูมิสามารถควบคุมได้โดยให้ระบบการผลิตนี้อยู่ในภาวะของอุณหภูมิที่กำหนด เช่น ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ

3. **การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลว** (submerged culture) คือการหมักโดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการให้อากาศและการกวน ซึ่งการหมักด้วยวิธีนี้ต้องอาศัยปัจจัยต่างๆในการเพาะเลี้ยง (รพี โรจนอุไร, 2539 ; Lin และคณะ, 1976 ; Bajpai และคณะ, 1982(a) ; Kwak และ Joon, 1992) ดังนี้

1.**องค์ประกอบสารอาหารเลี้ยงเชื้อ** ต้องเหมาะสมซึ่งประกอบไปด้วยแร่ธาตุต่างๆ สารตั้งต้นที่จะใช้ในการผลิตและการเติบโตของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยแหล่งคาร์บอนส่วนใหญ่อยู่ในรูปของน้ำตาลซึ่งน้ำตาลต่างชนิดกันจะส่งเสริมการเติบโตของจุลินทรีย์ต่างกันด้วยรวมทั้งปริมาณคาร์บอนต้องมีปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิต ส่วนชนิดของแหล่งไนโตรเจนต้องมีสัดส่วนและปริมาณที่เหมาะสมกับคาร์บอนที่ใช้จึงจะทำให้ได้ปริมาณผลิตภัณฑ์สูง

2.**ค่าความเป็นกรดด่าง** มีความสัมพันธ์กับชนิดของสารตั้งต้น ผลิตภัณฑ์ที่ผลิต และกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ใช้ เพราะเนื่องจากค่าความเป็นกรดด่างมีผลต่อระบบการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

3.**อุณหภูมิ** จะมีผลต่อการเติบโตและการผลิตกรดโคจิก เพราะจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการอุณหภูมิที่ต่างกันไป ถ้าอุณหภูมิไม่เหมาะสมอาจทำให้มีการเติบโตมากหรือน้อยเกินไป โดยอุณหภูมิที่เหมาะกับการผลิตต้องไม่ทำให้มีการเติบโตของจุลินทรีย์มากจนเกินไป

4.**อายุและขนาดของหัวเชื้อ** ลักษณะของหัวเชื้อที่จะทำให้มีการผลิตที่สูง จะต้องเป็นช่วงที่จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพสูง คือ เป็นช่วงที่มีการเติบโตมากและรวดเร็ว (log phase) ส่วนขนาดของหัวเชื้อต้องมีขนาดที่พอเหมาะ ถ้าใช้น้อยเกินไปจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้อย และถ้ามากเกินไปจะทำให้มีการเติบโตของเซลล์มากจนทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้อยด้วยเช่นกัน

5. **อากาศ** ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดอินทรีย์ต้องมีการให้อากาศเพื่อการเติบโต เพราะออกซิเจนในอากาศทำให้มีการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ได้สมบูรณ์ขึ้น และมีการเติบโตที่มากขึ้นด้วย ดังนั้นในการหมักแบบนี้ การให้อากาศ (aeration) และ การปั่นกวน (agitation) จึงมีความสำคัญ โดยการให้อากาศมีจุดประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้

รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ ส่วนการปั่นกวนมีจุดประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์ สารอาหาร รวมถึงอากาศในถังหมักกระจายตัวอย่างทั่วถึง โดยทั่วไปการหมักในห้องปฏิบัติการจะให้อากาศโดยการเพาะเลี้ยงแบบเขย่า ส่วนการหมักในระดับขยายส่วนจะมีการใช้เครื่องปั่นกวน (stirrer) เหล็กกั้น (baffle) และระบบการให้อากาศ ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีอยู่ในถังหมัก โดยการเลือกใช้ระบบการให้อากาศและการกวนในถังหมักแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของกระบวนการหมักด้วย ซึ่งการหมักโดยวิธีนี้จะต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการให้อากาศและการปั่นกวนสูง

งานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตกรดโคจิกโดยการหมัก

มีการศึกษาการพัฒนาการผลิตโคจิกมาอย่างต่อเนื่องตั้งแต่มีการค้นพบโดย Saito ในปี ค.ศ. 1907 โดยมีการพัฒนาการผลิตในรูปแบบต่างๆ ตั้งแต่การผลิตอย่างง่ายๆ ที่ผลิตบนข้าวนึ่ง มาผลิตในระดับขวดเขย่า และพัฒนามาจนถึงการผลิตระดับถังหมักในห้องปฏิบัติการ ดังจะเสนอต่อไปนี้

ในปี ค.ศ. 1907 หลังจากที่ Saito ได้ พบกรดโคจิกเป็นครั้งแรกได้ทำการทดลองผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีองค์ประกอบดังนี้ คือ ข้าวนึ่ง 150 กรัม และเชื้อ *Aspergillus oryzae* แล้วนำไปบ่มเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส 2-3 สัปดาห์ โดยจะมีการเขย่าอย่างสม่ำเสมอ ทำให้เขาค้นพบกรดชนิดใหม่ คือ กรดโคจิกนั่นเอง

ในปี ค.ศ. 1913 Yabuta และคณะ ได้รายงานว่า สามารถเลี้ยง *A. oryzae* ได้บนสารอาหารที่สกัดมาจากโคจิ (koji extract) โดยกรดโคจิกนี้จะสร้างเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่ประกอบด้วย ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวไรน์ ข้าวโอ๊ต ข้าวฟ่าง มันฝรั่งหวาน

ในปี ค.ศ. 1916 Yabuta และคณะ ได้ศึกษาเพิ่มเติมพบว่า *A. oryzae* สามารถผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณมาก เมื่อเลี้ยงบนข้าวนึ่ง (Koji) หรือ สารละลายเดกโตส 10% ที่มีเกลือแร่

ในปี ค.ศ. 1928 Tamiya เพาะเลี้ยง *A. oryzae* โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการผลิตกรดโคจิกจะเติบโตสูงสุดเมื่อระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 และพบว่ากรดอิสระจะยับยั้งการเติบโตของเชื้อแต่เกลือของกรดจะเร่งการเติบโตได้ โดยพบว่าการผลิตกรดโคจิกจะลดลงมากถ้าเติมกรดออกซาลิก กรดซิตริก กรดฟอร์มิก กรดไฮโดรคลอริก หรือ กรดไนตริก ลงไป และพบว่าการผลิตกรดโคจิกจะสูงขึ้นเมื่อเติม กรดฟอสเฟอริก, กรดแลคติก หรือ กรดไพรูวิก ลงในอาหารเพื่อการผลิตกรด

ในปี ค.ศ. 1929 Challenger และคณะได้ศึกษาถึงการผลิตกรดโคจิกจากเพนโตสโดย *A. oryzae* น้ำตาลที่ใช้ได้แก่ ไซโลส และ อราบิโนส โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ขาดแหล่งคาร์บอน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ประกอบด้วย โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 กรัม และ แอมโมเนียมไนเตรต 0.04 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร จากการทดลองเพื่อหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิก พบว่าการทดลองที่ให้ผลผลิตสูงสุดคือ การผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้ไซโลสเท่ากับ 5.0 กรัม

ในปี ค.ศ. 1933 Katakiri และ Kitahara ศึกษาถึงการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* จากแหล่งคาร์บอนต่างๆ 17 ชนิดและใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อจะเติบโตและให้ผลผลิตดีเมื่อใช้ 2% ไดไฮดรอกซีอะซิโตนเป็นแหล่งคาร์บอน และความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิต คือ 2.1 และพบว่าผลผลิตเฉลี่ยสูงสุดจะเท่ากับ 65% จากแหล่งคาร์บอนตั้งต้นเมื่อใช้กลูโคส และเท่ากับ 55% จากแหล่งคาร์บอนตั้งต้นเมื่อใช้ไดไฮดรอกซีอะซิโตน

ในปี ค.ศ. 1933 Takahashi และ Toshinobu ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตกรดโคจิกและฟรัคโตสจากแมนนิทอลโดยแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดอะซิติก พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกและฟรัคโตสคือ 5.79 - 6.25 และ 6.95 - 7.54 ตามลำดับ และพบว่าในขั้นแรกของการหมักจะมีการผลิตฟรัคโตสออกมา ส่วนกรดโคจิกจะถูกสร้างในเวลาต่อมาโดยพบว่าเชื้อสามารถใช้ฟรัคโตสที่สร้าง

ในขั้นแรกในการผลิตกรดโคจิกที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6.28-6.46 แต่ทั้งนี้จะต้องมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเข้าไปในกระบวนการผลิตด้วย

ในปี ค.ศ. 1937 MAY และคณะได้ศึกษาถึงผลของปัจจัยต่างๆต่อการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *A. oryzae* โดยใช้เดกซ์โตรสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิ แร่ธาตุ ความเข้มข้นของเดกซ์โตรสและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ ใช้แอมโมเนียมไนเตรต 2.25 g/l เป็นแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของเดกซ์โตรสเท่ากับ 20% ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีอัตราส่วนของพื้นที่ผิว (surface area) ของสายใยต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 0.3-0.5 ตารางเซนติเมตร ทำให้ได้ผลผลิตของกรดสูงสุดโดยใช้เวลาในการผลิต 12-17 วัน ให้ผลผลิตกรด 170 g/l

ในปี ค.ศ. 1948 Sakagushi และคณะศึกษาถึงการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *A. oryzae* จากแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรัคโตส กาแลคโตส และ กลีเซอรอล พบว่าถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมี โมโนไอโอโดอะซีเตท (monoiodoacetate) โซเดียมอาซีไนท์ (sodiumarsenite) โซเดียมฟลูโอไรด์ จะมีผลในการยับยั้งการสร้างกรดโคจิกจากกลูโคสและแหล่งคาร์บอนอื่นๆที่ทดลอง

ในปี ค.ศ. 1966 Parrish และคณะ ค้นพบว่าการผลิตกรดโคจิกมีการผลิตอัลฟ่าทอกซินออกมาระหว่างการผลิตกรดโคจิกซึ่งส่งผลให้มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาอัลฟ่าทอกซินจากการผลิตกรดโคจิกต่อมา

ในปี ค.ศ. 1970 Bentley กล่าวว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลว จาก *A. flavus-oryzae* มีส่วนประกอบดังนี้ คือ โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.05 % โซเดียมไนเตรต 0.2 % โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 % แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 % เฟอริกซัลเฟต 0.001 % สารสกัดจากยีสต์ 0.1 % และ น้ำตาลกลูโคส 10%

น้ำหนักต่อปริมาตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28-31 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิต 7.5-10 g/l ในเวลา 10 วัน

ในปี ค.ศ. 1970 Imose และคณะ ศึกษาถึงกระบวนการของการผลิตกรดโคจิกโดย *Arthrobacter urefaciens* พบว่าโคจิกออกซิเดสจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการดึงไฮโดรเจนของกรดโคจิกโดยอะตอมเหล็กในเอนไซม์จะเป็นตัวรับไฮโดรเจนที่ปล่อยออกมาจากกรดโคจิก และพบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของการทำงานของเอนไซม์คือ 7.75 และเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55,000 โดยเป็นเอนไซม์ที่ไม่ทนต่อความร้อน โดยใน 1 โมเลกุลของเอนไซม์จะมีเหล็กอยู่ 2 อะตอม

ในปี ค.ศ. 1971 Gupta และคณะได้ศึกษาถึงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกจาก *A. flavus* โดยพบว่า สูตรอาหารที่มีซูโครสเป็นส่วนประกอบ คือ สูตรอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์และซูโครส (yeast extract sucrose,YES) ทำให้มีการผลิตกรดโคจิกสูงขึ้นได้

ในปี ค.ศ. 1982 Bajpai และคณะได้ศึกษาถึงการผลิตกรดโคจิกโดยวิธีการใช้สายใยซ้ำ โดยใช้ *A. oryzae* โดยขั้นแรกได้เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากยีสต์และซูโครส (YES) และนำมาแขวนลอยอีกครั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม และในบัฟเฟอร์ที่มีแต่กลูโคสหรือซูโครสเพียงอย่างเดียว แล้วนำทั้งหมดไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรนี้และในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี 20% กลูโคสหรือซูโครส จะได้ผลผลิตใกล้เคียงกันมากคือประมาณ 81.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าการผลิตกรดโคจิกสามารถผลิตได้เมื่อมีแต่แหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว

ในปี ค.ศ. 1991 Wei และคณะ ได้ทดสอบการผลิตกรดโคจิก โดยใช้ *A. candidus* โดยไม่มีการเขย่าพบว่าผลิตกรดโคจิกได้มากกว่าในอาหารเหลว จึงทำให้มีความสนใจที่จะศึกษาการผลิตกรดโคจิกแบบไม่มีการเขย่าต่อมา

ในปี ค.ศ. 1992 Kwak และ Joon ได้ศึกษาการผลิตกรดโดยการตรึงสายใย พบว่าในช่วงแรกที่ทำการผลิตการตรึงสายใยจะทำให้ผลิตกรดได้ดีกว่าการใช้สายใยอิสระ โดยในการทดลองนี้ใช้การผลิตในขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตร 120 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 3.0

ในปี ค.ศ. 1995 El-Sharkawy ได้ผลิตกรดโคจิกโดยใช้น้ำโกโก้เป็นแหล่งคาร์บอน และคัดเลือกสายใย *Aspergillus sp.* 16 สายพันธุ์ เพื่อหาสายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุด พบว่า *A. flavus* ATCC 9179 ที่ตรึงบนแคลเซียมอัลจีเนต(Ca-alginate) เลี้ยงเชื้อในภาวะค่าความเป็นกรดด่าง 3.5 ความเร็วในการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยมีการเติมน้ำโกโก้ 50% ทุกๆ 96 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดที่ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ในปี ค.ศ. 1995 Ogawa และ Niwa ใช้ *A. oryzae* ผลิตกรดโคจิกโดยใช้การผลิตแบบผิวหน้าอาหารเหลว (membrane surface liquid culture ; MSLC) โดยเป็นการผลิตแบบเติมสารอาหารระหว่างการผลิต โดยมีการเติมกลูโคส พบว่ากรดโคจิกเพิ่มเป็น 50 เท่า เมื่อเทียบกับการทดลองแบบขวดเขย่า

ในปี ค.ศ. 1996 Ariff และคณะ ทดลองเลี้ยง *A. flavus* link เพื่อการผลิตกรดโคจิก โดยต้องการดูผลของการให้อากาศต่อการเติบโตของเชื้อราและการผลิตกรดโคจิกโดยทำการเพาะเลี้ยงสายใย *A. flavus* link ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนและสารอาหารอื่นๆที่เหมาะสมลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอุปกรณ์ควบคุมและตรวจวัดปัจจัยต่างๆในการผลิต เช่น ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และค่าออกซิเจนละลาย โดยควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง 3.5 ตลอดการทดลอง อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และมีการควบคุมค่าออกซิเจนละลายตลอดการทดลอง (single phase) โดยแปรค่าออกซิเจนละลายที่ 30% 50% และ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัว เมื่อมาเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่ไม่ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลาย พบว่าการไม่ควบคุมค่าออกซิเจนละลายจะให้การผลิตกรดโคจิกมาก

กว่า (13.5 g/l) ซึ่งการให้ค่าออกซิเจนละลายที่ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัวจะให้การผลิตกรดโคจิกใกล้เคียงกัน แต่ที่ค่าออกซิเจนละลายที่น้อยกว่า 80% ของค่าอากาศอิ่มตัวแทบจะไม่มีการผลิตกรดโคจิกถึงแม้ว่าการเติบโตจะเพิ่มขึ้นก็ตาม จากการสังเกตุการใช้ออกซิเจนในช่วงการเติบโตและการผลิตพบว่ามีการใช้ออกซิเจนมากในช่วงเติบโตแต่ใช้น้อยมากในช่วงผลิตกรดโคจิก จึงมีการทดลองแบ่งการให้ค่าออกซิเจนละลายเป็น 2 ช่วง ช่วงการเติบโตให้ออกซิเจนละลายที่ 80 %ของค่าอากาศอิ่มตัว หลังจากนั้นในช่วงการผลิตจะลดลงมาที่ 30% ของค่าอากาศอิ่มตัว พบว่ามีการผลิตกรดโคจิกสูงขึ้น (28.9 g/l) เป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับการผลิตที่ไม่มีการควบคุมค่าออกซิเจนละลาย นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมสารสกัดจากยีสต์เพื่อเพิ่มปริมาณสายใยอย่างต่อเนื่องในการทดลองที่ทำการแบ่งการให้ออกซิเจนละลายเป็น 2 ช่วง ไม่ทำให้ผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นได้ จึงสรุปได้ว่าการให้ค่าออกซิเจนละลายมากในช่วงการเติบโตและลดลงเมื่อเริ่มมีการผลิตกรดโคจิกโดยไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนระหว่างการผลิตจะทำให้ได้ปริมาณกรดโคจิกสูงขึ้นได้

ในปี ค.ศ. 1996 Takamizawa และคณะ ผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* และพบว่าสามารถใช้ Box-Wilson Model ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้การคำนวณร่วมกับการทดลองในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกได้ โดยให้ผลใกล้เคียงกับการทดลองจริงและจาก Box-Wilson Model พบว่าปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ กลูโคส 148 g/l โพลีเปปโตน 4.8 g/l ทำให้มีอัตราการผลิตกรดโคจิกได้ถึง 44.4 g/l/d

ในปี พ.ศ. 2539 รพี โรจนอุไร ได้ทำการศึกษาถึงการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าเพื่อต้องการหาภาวะและสูตรอาหารที่เหมาะสมเมื่อใช้ *A.oryzae* K-13 ซึ่งเป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกจากดินในประเทศไทย (เพชรรุ่ง พันธ์พิริยะ, 2536) โดยทำการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อหาอาหารสูตรต่างๆ และผลการทดลองพบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ น้ำตาลทราย 100 g/l แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือสารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตราส่วนน้ำหนัก 0.5 : 0.24 โดยมีอัตราส่วนระหว่างปริมาณ

คาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ 840 : 0.24 และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกมีค่าเท่ากับ 4.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส และเมื่อผลิตกรดโคจิกภายใต้ภาวะที่เหมาะสมจะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดถึง 40.03 g/l ในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง

ในปี ค.ศ. 1997 Ariff และคณะได้ทำการศึกษาโดยทำการทดลองเพื่อหาผลทางด้านจลน์ศาสตร์ของการผลิตกรดโคจิกโดย *A.flavus* 44-1 ในการเลี้ยงแบบกะและการใช้สายใยซ้ำ โดยหาค่าตัวแปรทางจลน์ศาสตร์ในการผลิตกรดโคจิกเพื่อเป็นการยืนยันและอธิบายรูปแบบการผลิตในถังหมักและในขวดเขย่า การทดลองในขวดเขย่าทำการเลี้ยงเชื้อที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3.0 ใช้ปริมาณหัวเชื้อสปอร์งอกที่ 10% ปริมาตรต่อปริมาตร ที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 250 รอบต่อนาที ส่วนในถังหมักทำการเลี้ยงเชื้อในถังขนาด 2 ลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 3.0 ตลอดการทดลอง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณหัวเชื้อสปอร์งอก 10% ปริมาตรต่อปริมาตร มีการปรับค่าออกซิเจนละลายในช่วงของการเติบโตที่ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัว หลังจากการเติบโตคงที่ปรับเป็น 30% ของค่าอากาศอิ่มตัว จากผลการทดลองยืนยันได้ว่าการผลิตกรดโคจิกเป็นกระบวนการที่ไม่เกิดในช่วงการเติบโต (Non-growth associated) และพบว่าการผลิตแบบกะจะให้ผลการผลิตกรดโคจิกและปริมาณสายใย 32.5 g/l และ 11.8 g/l ตามลำดับ เมื่อให้ค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะสมพบว่าการผลิตแบบกะในถังหมักจะให้ผลผลิตไม่แตกต่างจากผลที่ได้จากการผลิตในขวดเขย่าซึ่งให้ผลผลิตกรดโคจิกและการเติบโต 36.5 g/l และ 12.3 g/l ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามผลจากการคำนวนทางจลน์ศาสตร์กลับพบว่าการใช้การผลิตแบบกะในถังหมักจะให้ค่าการผลิตสูงกว่าแบบขวดเขย่าถึง 2-3 เท่า หลังจากทำการเลี้ยงเชื้อให้เติบโตแบบกะในถังหมัก Ariff และคณะ ได้แปรปริมาณสายใยที่ 3.36 7.39 19.2 และ 26.1 g/l เพื่อนำมาผลิตกรดโคจิกแบบใช้สายใยซ้ำ และนำมาผลิตในขวดเขย่าปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 150 มิลลิลิตร โดยมีการให้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ทำการผลิตที่ภาวะค่าความเป็นกรดด่าง 3.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่าการเติมกลูโคสเพียงอย่างเดียวที่ปริมาณสายใย

19.2 g/l อัตราการผลิตกรดโคจิกจะไม่ลดลงและจะคงที่อยู่ที่ 0.011 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของสายใยต่อชั่วโมง แต่อัตราการผลิตกรดโคจิกกลับลดลงเมื่อปริมาณสายใยมากขึ้น โดยที่การใช้กลูโคสของทุกปริมาณของสายใยมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อมีปริมาณสายใยมากกลูโคสกลับถูกนำไปใช้ในการเติบโตมากกว่าการผลิต และจากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่าการผลิตกรดโคจิกในระดับถังหมักใกล้เคียงกับในขวดเขย่า ถึงแม้ว่าผลทางจลน์ศาสตร์ของการผลิตในถังหมักมีค่ามากกว่าในขวดเขย่าก็ตาม ดังนั้นจึงเป็นจุดที่น่าสนใจในการทำการทดลองเพื่อหาคำตอบต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้สายใยซ้ำจากถังหมักในขวดเขย่าโดยให้แหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว *A.flavus* 44-1 ยังคงสามารถผลิตกรดโคจิกได้

ในปี ค.ศ. 1998 Rosfaizan และคณะ ต้องการศึกษาหาแหล่งคาร์บอนใหม่ๆเพื่อการผลิตกรดโคจิก โดยทำการเพาะเลี้ยง *A.flavus* จากแป้งสาคูที่ผ่านการย่อยแล้วเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิกพบว่าต้องมีการย่อยแป้งสาคูให้เป็นกลูโคสก่อนแล้วจึงนำไปผลิตกรดโคจิก เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างการผลิตในขวดเขย่าและในถังหมัก พบว่าเมื่อใช้แป้งสาคูเป็นแหล่งคาร์บอน การผลิตในถังหมักจะมีปริมาณต่ำมาก เนื่องจากปริมาณอากาศไม่เหมาะสมเพราะเนื้อแป้งเข้มข้นและหนืดทำให้อากาศละลายได้ไม่ดี จึงเห็นได้ว่าการให้อากาศมีผลต่อการผลิตอย่างมาก

ในปี ค.ศ. 1999 Naranong และ Saithi ได้รายงานว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *A. oryaze* NRRL 484 โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าและในถังหมักพบว่าในขวดเขย่ามีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดที่ 34 g/l ในวันที่ 14 ของการผลิตบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และในถังหมักขนาด 2 ลิตร ซึ่งได้ทำการศึกษาการให้อากาศและการกวนต่อการผลิตกรดโคจิกพบว่าเมื่อแปรค่าการให้อากาศและการกวน ปริมาณกรดโคจิกที่ได้สูงสุดคือ 37 g/l ในวันที่ 14 ของการผลิต โดยมีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 15 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที และอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที โดยมีการ

ใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตกรด 0.34 g/g ของแหล่งคาร์บอน และได้อัตราการผลิตที่ 0.11 g/l/hr.

ในปี ค.ศ. 2000 Rosfaizan และ Ariff ศึกษาการหาความเข้มข้นและชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกในถังหมักโดยใช้การคำนวนทางจลน์ศาสตร์เพื่อหาชนิดและปริมาณที่เหมาะสมพบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้กรดโคจิกสูงสุดที่ 39.9 g/l เมื่อใช้กลูโคส 100 g/l โดยแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือสารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 5 g/l และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน คือ 93:3 และเมื่อทำการผลิตแบบสายใยซ้ำจะมีการเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดโคจิกได้ถึง 70 g/l

สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรดโคจิก

กรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรดมีประโยชน์มากมายในระดับอุตสาหกรรม จึงมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรดมากขึ้น ซึ่งได้ทำการจดสิทธิบัตร ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรดโคจิก

ผู้จดและปีที่จดสิทธิบัตร	เรื่องที่จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร
Izumi,1981	Cosmetic composition containing kojic ester	US Patent 4278656
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	Whitening cosmetic	US Patent 4847074

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ผู้จดและปีที่จดสิทธิบัตร	เรื่องที่จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร
Hatae ,1990a	Method of minimizing erythema and elastosis	US Patent 4891361
Hatae,1990b	Compositions for topical use having melanin synthesis inhibition activity	US Patent 4919921
Hara,1990	Composition for external application	US Patent 4948577
Dowd ,1990	Kojic acid and esters as insecticide synergists	US Patent 4956353
Motono ,1991	External preparations free of discoloration	US Patent 4985455
Yamamoto , 1991	External preparations	US Patent 4990532
Oyama , 1991	Compositions for topical use having melanin Synthesis -inhibiting activity	US Patent 4990330
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 , 1995	Whitening embellisher	US Patent 5427775
Shigetaka , 1995	Production of kojic acid glucoside and production of kojic acid monoglucoside	JPX Patent 7236496A
Koji ,1997	Cultivation of kojic acid-producing bacterium	JPX Patent 9220095A
Junko ,1998	Synthetic medium for production of kojic acid	JPX Patent 10165172A

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ผู้จดและปีที่จดสิทธิบัตร	เรื่องที่จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร
Ishikawa และคณะ ,1996	Process for producing wheat flour and wheat flour products	US patent 5695799
Arsennoult และคณะ,1996	Process of aqueous extraction of maltal	US patent 5646312

เนื่องจากมีความสนใจในการศึกษากรดโคจิกและอนุพันธ์ที่เกี่ยวข้องในประโยชน์ด้านต่างๆ โดยเฉพาะในส่วนของการนำไปใช้อุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ จึงพบว่ามีการจดสิทธิบัตรจนถึงปัจจุบันเป็นจำนวนมาก

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกโดยกระบวนการหมัก

เนื่องจากมีหลายปัจจัยที่สำคัญในการผลิตกรดโคจิกซึ่งประกอบไปด้วย

1. **ชนิดของจุลินทรีย์และวิธีการผลิต** ชนิดของจุลินทรีย์ที่ถูกคัดเลือกควรจะเป็นชนิดที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสารประกอบอื่นๆในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สามารถผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณมาก ดังนั้นจึงต้องคัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูง เพาะเลี้ยงง่าย ทนทาน ใช้ภาวะไม่ยุ่งยากในการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้โดยการเลือกชนิดของจุลินทรีย์ต้องให้เหมาะกับวิธีการผลิตด้วย เพราะจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะเหมาะกับการผลิตในรูปแบบแตกต่างกัน

2.แหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้สารตั้งต้นที่จะมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิกนั้นพบว่ามีอยู่หลายชนิด (Bajpai และคณะ, 1982(a)) (ดังแสดงตารางที่ 3) แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดที่นิยมใช้คือ กลูโคส โดยพบถึง 65% ของสารตั้งต้นที่ใช้ผลิตกรดโคจิก รวมทั้งในระดับอุตสาหกรรมก็นิยมใช้ด้วยเช่นกัน โดยพบว่าจากการใช้เชื้อ *A.fla*vus และ *A.oryzae* ทำการหมักโดยใช้แหล่งกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะสามารถผลิตกรดโคจิกได้ถึง 70-90 % (Crueger และ Crueger, 1990) นอกจากนี้ยังมีผู้สนใจหาแหล่งคาร์บอนอื่นๆเพื่อการผลิตกรดโคจิก เช่น รพี โรจนอุไร (2539) พบว่าใช้น้ำตาลทรายขาว 100 g/l ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการ

ผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 Rosfarizan(2000) พบว่าสามารถใช้แป้งสาคูเป็นแหล่งคาร์บอนได้ และนอกจากนี้ Naranong(1999) พบว่าสามารถใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอนได้ด้วย

ตารางที่3 แสดงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิก (Bajpai และคณะ, 1982(a))

จำนวนคาร์บอนของแหล่งคาร์บอน	แหล่งคาร์บอน
2 อะตอม	Ethyl,Glycine,Sodium Acetate
3 อะตอม	1,3-Dihydroxy-2-Propanone ,Glyceraldehyde
4 อะตอม	Tartaric acid
5 อะตอม	Ribitol , Arabinose , Xylose
6 อะตอม	2-Deoxyglucose , Fructose ,Galactose, Glucose, Gluconic acid, Gluconolactone , Inositol ,Mannitol,Mannose,Sorbose,Sorbitol
7 อะตอม	Quinic acid , Shikimic acid
12 อะตอม	Lactobionic acid , Lactose , Maltose , Sucrose , Trehalose
18 อะตอม	Raffinose
6n อะตอม	Dextrin. Inulin ,Pectin , Strach

4.แหล่งไนโตรเจน แอมโมเนียมไนเตรต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมอย่างมาก (Gray, 1959) และแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นที่นิยมใช้กันก็มี เช่น เปปโตน สารสกัดจากยีสต์ โคบอลทามีน (cobaltamines) โดย Shone และคณะ ทำการศึกษาพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ถึง 50% เช่น สารสกัดจากยีสต์ สามารถใช้แทนยูเรีย หรือแอมโมเนียไนเตรตได้ (อ้างถึงใน Bajpai และคณะ, 1982(a)) Ariff และคณะ(1997) ได้ทดลองผลิตกรดโคจิกโดยเลือก

สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และ รพี โรจนอุไร (2539) พบว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนรวมกันที่อัตราส่วนน้ำหนัก 1.5 : 0.24 จะทำให้ *A. oryzae* K-13 ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด ดังนั้นสารสกัดจากยีสต์จึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เป็นที่นิยมในการใช้ผลิตกรดโคจิกด้วยเช่นกัน

5. **แหล่งฟอสเฟต** ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นในการเติบโตของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดโคจิก โดยสารประกอบฟอสเฟตที่นิยมใช้ คือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าให้ฟอสเฟตในปริมาณมากเกินไปจะทำให้เกิดการย่อยสลายกรดโคจิกเป็นไปอย่างรวดเร็วเกินปกติ แต่ถ้าให้ฟอสเฟตในปริมาณน้อยเกินไปทำให้การสร้างของกรดโคจิกเป็นไปอย่างช้าๆซึ่งอาจจะช้าเกินไป (Bajpai และคณะ, 1982(a))

6.**เกลืออนินทรีย์** ความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ต่างๆเพียงเล็กน้อย สามารถทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตกรดโคจิกดีขึ้น แต่ถ้ามีปริมาณมากเกินความจำเป็นจะไปเสริมการเติบโตของเชื้อราแทน ซึ่งมีบทบาทเหมือนกับแหล่งไนโตรเจน (อ้างถึงใน Presscott และ Dunn, 1959) ซึ่งเกลืออนินทรีย์ที่ใช้ในการเลี้ยงเพื่อผลิตกรดโคจิกนั้นจะขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันไป ตัวอย่างของเกลืออนินทรีย์ ได้แก่ โพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมไนเตรต โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต เฟอริกซัลเฟต (Bajpai และคณะ, 1982 (a)) ในการศึกษาหาการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 ของ รพี โรจนอุไร (2539) พบว่าการใช้น้ำประปาในการเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอกเพื่อการเติบโตของสายใยสามารถทำให้สายใยสปอร์งอกเติบโตได้ดีกว่าน้ำปลอดประจุซึ่งหมายความว่าในน้ำประปามีแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเติบโตของสปอร์งอกปริมาณที่เหมาะสมที่ทำให้ราเติบโตได้ดีส่งผลให้ผลิตกรดได้ดีด้วย

7.**อุณหภูมิ** อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตกรดโคจิกของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน Presscott และ Dunn (1959) พบว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกจะอยู่ในช่วง 29-35 องศาเซลเซียส และอาจจะแปรไปตามชนิดของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆได้ May และคณะ(1931) พบว่าที่อุณหภูมิ 30-35

องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก โดยการเพาะเลี้ยง *A. flavus* รพี โรจนอุไร (2539) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 ในระดับขวดเขย่าที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปคือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (May และคณะ, 1937 ; Kwak และ Joon, 1992 ; Ariff และคณะ, 1996 ; Ariff และคณะ, 1997)

8.ระยะเวลาในการผลิต การเลือกช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มากในเวลาที่คุ้มค่า เพราะหลังจากการใช้น้ำตาลหมดแล้ว กรดโคจิกอาจจะถูกนำไปใช้โดยเชื้อราซึ่งจะทำให้ปริมาณกรดโคจิกลดลงได้ ผลการวิจัยที่มีรายงานไว้เป็นจำนวนมากมักจะอยู่ในช่วง 9-20 วัน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้น สายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้ อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง การให้อากาศ และปัจจัยอื่นๆ (อ้างถึงใน Presscott และ Dunn, 1959 ; รพี โรจนอุไร, 2539) และมักจะนิยมมีการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) พบว่าจะสามารถประหยัดวัตถุดิบ ปริมาตรของถังหมัก คนงาน และค่าใช้จ่ายอื่นๆ เป็นผลให้ราคาของกรดโคจิกถูกลง แต่จะหยุดเพาะเลี้ยงเมื่อได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด เป็นการป้องกันไม่ให้เชื้อรานำกรดโคจิกที่ผลิตได้ไปใช้เมื่อสายใยใช้น้ำตาลหมดแล้ว (Bajpai และคณะ, 1982(a))

9. **หัวเชื้อ** การหมักส่วนใหญ่มักจะเตรียมหัวเชื้อในรูปของสายใย ซึ่งเหมาะสำหรับระดับอุตสาหกรรม ขนาดหัวเชื้อโดยทั่วไปที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าจากงานวิจัยต่างๆ จะอยู่ในช่วง 10^5-10^6 สปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร (Bajpai และคณะ, 1982(a) ; Lin และคณะ, 1976 ; Ogawa และคณะ, 1995(b)) และจากการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าของ รพี โรจนอุไร(2539) พบว่า ขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมกับการผลิตกรดในขวดเขย่า คือ 4-8 × 10^7 สปอร์งอกต่อมิลลิลิตร โดยอายุของสปอร์งอกที่เหมาะสมคือ 24 ชั่วโมง และในระดับขยายส่วนการผลิตในถังหมักจะนิยมใช้ขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกเท่ากับ 10%-15% ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (Ariff, 1996)

10.ความเป็นกรดด่าง ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเติบโตของราและการผลิตกรดโคจิก Katagiri และ Kitahara (1933) รายงานว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *A. oryzae* คือ 5.0 แต่ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดคือ 2.4 ต่อมา Barham และ Smith (1936) พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกจากไซโลส โดย *A. oryzae* อยู่ในช่วง 2.0 - 3.5 Presscott และ Dunn (1959) พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยราจะอยู่ในช่วง 2.0-5.0 หรือช่วงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ Ariff และคณะ (1996) ได้เลือกใช้ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นที่ 3.5 ในการผลิตกรดโคจิกในถังหมักเพื่อให้ได้กรดโคจิกที่สูงสุด รพี โรจนอุไร (2539) พบว่าการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 4.5 ซึ่งทำให้มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด จะเห็นว่าช่วงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกมีค่าต่ำ ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นต้องใส่สารควบคุมความเป็นกรดด่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตในการปรับค่าความเป็นกรดด่างได้และทำให้การผลิตง่ายขึ้น

11. **การให้อากาศ** การผลิตกรดโคจิกนี้จะผลิตเมื่อเชื้อรามีการเติบโตอย่างเต็มที่ โดยที่มีสภาวะที่เหมาะสมและมีการให้อากาศอย่างเหมาะสม เดิมการผลิตกรดโคจิกจะมีการให้อากาศตลอดการทดลองเพียงหนึ่งค่า ไม่ว่าจะเป็นการผลิตในระดับขวดเขย่าหรือถังหมัก แต่ในปี ค.ศ. 1996 Ariff และคณะ ทดสอบหาผลของค่าออกซิเจนละลายที่มีต่อการผลิต พบว่าถ้ามีการกำหนดค่าการให้อากาศเพียงค่าเดียวตลอดการทดลอง กรดโคจิกที่เกิดขึ้นในระดับขวดเขย่ากับในถังหมักจะไม่พบความแตกต่าง ดังนั้นจึงมีการแบ่งการให้อากาศเป็น 2 ช่วงแตกต่างกัน พบว่าจะมีการผลิตกรดโคจิกได้มากขึ้น เมื่อมีการแบ่งสภาวะการให้อากาศ เป็น 2 ช่วงคือ ค่าออกซิเจนละลายที่ 80 % ของค่าอากาศอิ่มตัว ในช่วงการเติบโตของเชื้อรา เพื่อให้เชื้อรามีการเติบโตอย่างเต็มที่ และ ค่าออกซิเจนละลายที่ 30 %ของค่าอากาศอิ่มตัว ในช่วงของการผลิตกรดโคจิก จะทำให้มีการผลิตสูงขึ้นอย่างมากเมื่อเทียบกับการผลิตในสภาวะควบคุม เพราะฉะนั้นจึงสรุปได้ว่า ควรจะให้ค่าออกซิเจนละลายสูงๆในช่วงการเติบโตเพื่อให้มีการเติบโตได้

อย่างเต็มที่ แต่ช่วงการผลิตจะควบคุมให้มีค่าออกซิเจนละลายต่ำกว่าเพื่อการผลิตกรดโคจิกที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

12.สารพิเศษบางอย่าง May และคณะศึกษาสารอินทรีย์ 40 ชนิด ที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิก พบว่า เอทีลีนคลอโรไฮดริน ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จะมีผลต่อการผลิตกรดโคจิกให้สูงขึ้นในระยะเวลา 10 วัน (อ้างถึงใน Presscott และ Dunn, 1959) และ Bajpai และคณะ (1982(a)) พบว่าเมทิลแอลกอฮอล์ เอทิลแอลกอฮอล์ โพรพิลแอลกอฮอล์ ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ กรดปาล์มมิติก จะสามารถกระตุ้นการผลิตกรดโคจิกได้ Barham และ Smith (1936) พบว่าสารบางอย่างก็อาจจะยับยั้งการสร้างกรดโคจิกได้ เช่น กรดออกซาลิก กรดซิตริก กรดฟอร์มิก ไฮโดรคลอริก และ กรดไนตริก ส่วนในกรณีถ้าใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการเติบโตที่มีอาหารเพื่อเลี้ยงสายใยซ้ำ Bajpaiและคณะ (1982(a)) พบว่า กลูโคส-6-ฟอสเฟต ฟรุคโตส-1-6-ไดฟอสเฟต โซเดียมเอไซด์ โซเดียมฟลูโอไรด์ กรดไอโอโดอะซิติก พี-ไฮดรอกซีควิโนลีน เซมิคาร์บาไซด์ โซเดียมไนเตรต โพแทสเซียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต และโพแทสเซียมซัลเฟต สามารถยับยั้งการผลิตกรดโคจิกได้ และถ้ามี ไรโบฟลาวิน และโซเดียมอาซีเนท จะสามารถกระตุ้นการเติบโตและการผลิตกรดโคจิกได้ที่ความเข้มข้นต่ำๆ แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงจะเป็นการยับยั้งแทน

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการผลิตกรดโคจิกในถังหมักขนาด 2 ลิตร จากน้ำตาลทรายขาว

ขอบเขตของงานวิจัย

1. หาปริมาณออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างที่ทำให้ *A. oryzae* K-13 เติบโตได้สูงที่สุดและเร็วที่สุด
2. หาปริมาณออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13
3. หาขนาดหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก
4. หาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดโคจิกโดยเลี้ยงเชื้อแบบใช้สายใยซ้ำ และการเติมสารอาหารระหว่างการผลิต

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์

1. เคมีภัณฑ์

น้ำตาลทรายขาว ของบริษัท มิตรผล จำกัด (มหาชน) ประเทศไทย

น้ำตาลดี(+)กลูโคสโมโนไฮเดรตของบริษัท Difco laboratory, USA

น้ำตาลซูโครส (Sucrose) ของบริษัท E . Merck Darmstadt, Germany

น้ำตาลราฟฟิโนส (Raffinose) ของบริษัท Difco laboratory, USA

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) ของบริษัท Difco laboratory, USA

ทวีน 80 (Tween 80) ของบริษัท BDH laboratory chemicals Ltd., England

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท E . Merck Darmstadt,Germany

เฟอริกคลอไรด์($FeCl_3$) ของบริษัท BDH laboratory chemicals Ltd.,England

กรดโฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท Riedel – dehaen, Germany

กรดไดไนโตรซาลิซิลิก (3,5 – Dinitro salicylic acid) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรต ($C_4H_4KNaO_6 .H_2O$) ของบริษัท May and Baker Ltd.,England

ฟีนอล (C_6H_5OH) ของบริษัท Riedel – dehaen, Germany

กรดซัลฟุริก (H_2SO_4) ของบริษัท E. Merck Darmstadt, Germany

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. อุปกรณ์ที่สำคัญ

ถังหมัก (fermenter) รุ่น MD-300ของบริษัท L.E. Marubishi Co., Ltd., Japan

เครื่องควบคุมและวัดค่าออกซิเจนละลาย (DO controller) รุ่น FM-2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan

เครื่องควบคุมและวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH controller) รุ่น FC-2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan

เครื่องควบคุมและวัดระดับของเหลว (Antifoam / Level probe) รุ่น MZ-2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan

ปั๊มเติมสาร (pump box) รุ่น FB-2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan

ปั๊มเติมสาร (Micro tube pump) รุ่น MP-3N ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan

เครื่องควบคุมอุณหภูมิพร้อมปั๊ม (Circulation type handy cooler)รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas scientific Co., Ltd., USA

อุปกรณ์วัดค่าออกซิเจนละลาย (DO probe) รุ่น FM-1000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan

อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH probe) รุ่น FC-2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan

อุปกรณ์วัดระดับฟอง (antifoam / level probe) รุ่น AF-1000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan

เครื่องบันทึกผลการทดลอง (Recorder) รุ่น REC-7 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan

ปั๊มอากาศ (Aeration unit) รุ่น MAU-1 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan

เครื่องปรับกระแสไฟฟ้า (Step down transformer) Auto-05 ของบริษัท Tron Advance Technology Transformer., USA

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Controlled environment incubator shaker) รุ่น G27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co. Inc., USA

เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น G 560 E ของบริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc., USA

ตู้อบแห้ง (Hot air oven) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memert Gmbh, Germany

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น spectronic 401 ของบริษัท Milton Ray, USA

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama manufacturing corparation, Japan

อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น O-207 ของบริษัท Mamert Gmbh, Germany

อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ขนาด Blight line deep 1/10 มิลลิเมตร ของบริษัท Boeco, Germany

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000 pH ของบริษัท Eutech Cybernetics, Singapore

เครื่องโครมาโตรกราฟฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High performance liquid chromatography ; HPLC) รุ่น LC-3A ของบริษัท Shimadzu, Japan

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) CHK ของ Olympus optical Co., Ltd., Taiwan

อุปกรณ์ควบคุมปิเปต (Pipet controller) รุ่น Macro ของบริษัท Brand Co., Ltd., Germany

เครื่องชั่งน้ำหนัก (Balance) รุ่น A2005 ของบริษัท Sartorius GMBH, Germany

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองได้แก่ *Aspergillus oryzae* K-13 ที่คัดเลือกจากดินในประเทศไทย (เพชรรุ่ง พันธ์พิริยะ, 2536)

2. การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เขี่ยสปอร์ของราโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อลากลงบนอาหารแข็งเอียง โปเตโตเด็กซโตรส (potato dextrose agar, PDA) (ภาคผนวก ก.1) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4-6 วัน เมื่อราสร้างสปอร์จนถึงเวลาเหมาะสมแล้วจึงนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมหัวเชื้อ

3.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอย

เพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 บนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส ที่อุณหภูมิห้อง (30±3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5-7 วัน หรือจนกระทั่งเกิดสปอร์เต็มที่ จากนั้นเติมน้ำกลั่นผสมทวีน 80 ความเข้มข้น 0.1% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงบนสปอร์ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยสปอร์ให้หลุดกระจาย จนกระทั่งสามารถเขี่ยสปอร์จนได้ความเข้มข้นสปอร์เท่ากับ 4–8×10^7 สปอร์ต่อสารละลายสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยนับจำนวนสปอร์ด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2 การเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอก

นำสปอร์แขวนลอยที่ได้จากข้อ 3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลวเพาะเลี้ยงสปอร์งอก (ภาคผนวก ก.2) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใช้เป็นหัวเชื้อสปอร์งอกที่มีความหนาแน่น 4-8 × 10^7 สปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4. การผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่า

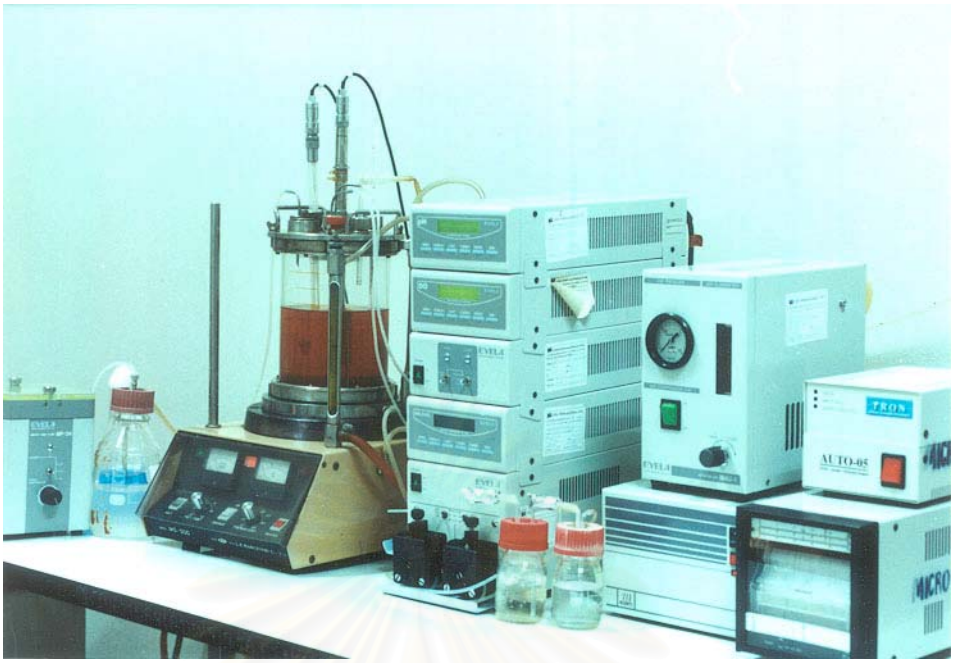
ถ่ายหัวเชื้อสปอร์งอก ที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 ตามที่ระบุไว้ในการทดลอง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก.3) โดยแปรปัจจัยต่างๆตามจุดประสงค์ของหัวข้อการทดลองนั้นๆ บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน

5. การผลิตกรดโคจิกในถังหมัก

ถ่ายหัวเชื้อสปอร์งอกที่เตรียมได้จากข้อ 3.2 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก ตามที่ระบุในการทดลอง ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (รูปที่10) กำหนดอัตรากวนและอัตราการให้อากาศ จนกระทั่งได้ระดับค่าออกซิเจนละลายที่ต้องการ ควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ใช้อะดีคานอลเป็นสารกำจัดฟอง ปรับค่าออกซิเจนละลาย ค่าความเป็นกรดด่าง ตามที่ระบุไว้ในการทดลองด้วยเครื่องควบคุมและตรวจวัดค่าความเป็นกรดด่าง ค่าออกซิเจนละลายและระดับฟอง (รูปที่ 11) ทำการทดลองเป็นเวลา 20 วัน

6. การเก็บเกี่ยวกรดโคจิก

นำน้ำหมักที่เก็บมาจากแต่ละการเพาะเลี้ยงปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากการทดลองในขวดเขย่าและ 5 มิลลิลิตร จากการทดลองในระดับถังหมัก มากรองแยกสายใย *A. oryzae* K-13 ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 41 หลังจากนั้นนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการกรองไปตรวจหาปริมาณกรดโคจิก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดตามวิธีการทดลองในข้อ 7 และ 9 ตามลำดับ ส่วนสายใยราที่กรองได้นำไปวัดการเติบโตตามวิธีการทดลองในข้อ 10



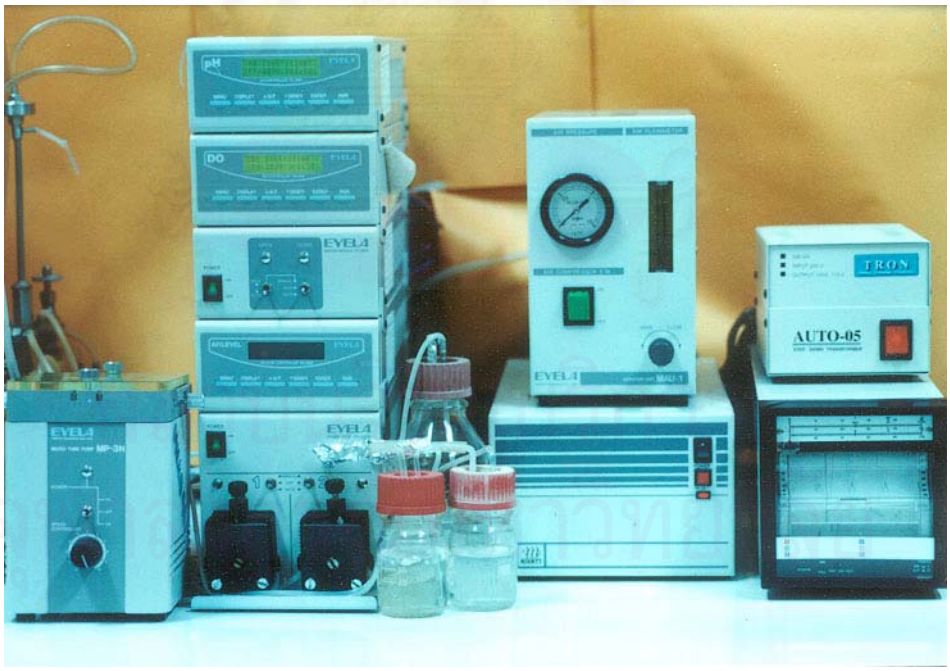
รูปที่ 10 การผลิตกรดโคจิกในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยมีการใช้เครื่องควบคุมและตรวจวัดค่าความเป็นกรดด่าง ค่าออกซิเจนละลายและระดับฟอง

(1)

(2)

(3)

(6)



(4)

(5)

รูปที่ 11 เครื่องควบคุมและตรวจวัด ค่าความเป็นกรดด่าง (1) ค่าออกซิเจนละลาย (2) ระดับฟอง (3) ปั้มอากาศ (4) เครื่องบันทึกผลการทดลอง (5) และ ปั้มเติมสาร(6)

7. **การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกที่สร้างโดย *A. oryzae* K-13 โดยวิธีของ Bentley (1957)**

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองได้จากวิธีในข้อ 5 มาเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม และปิเปตสารละลายที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (ภาคผนวก ข.1) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรนำผลดังกล่าวมาคำนวนหาปริมาณกรดโคจิกโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค.1)

8. **การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกที่สร้างโดย *A. oryzae* K-13 โดยวิธี HPLC** (ใช้บริการจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่กรองได้ในช่วงเวลาที่ต้องการจะตรวจสอบ มาตรวจด้วยเครื่องโครมาโตกราฟฟี่แบบเหลวสมรรถนะสูง (Shimadzu LC 3A) โดยใช้คอลัมน์ Zorbax C- 8 (L-3555) ขนาดความยาว 25 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายในเท่ากับ 4.6 มิลลิลิตร โดยใช้กรดฟอสเฟอริกเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.5 เป็นตัวพาโดยปรับให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที ปรับอุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย UV Detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับกรดโคจิกมาตรฐาน และมีกรดกลูโคนิกเป็นสารมาตรฐานภายใน (Internal standard)

9. **การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล**

9.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยการทำปฏิกิริยาของฟีนอลและกรดกำมะถัน (Hansen และ Phillips, 1981)

นำน้ำหมักที่กรองแยกสายใยราออกแล้วมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสม ปิเปตสารละลายที่ได้มา 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอล (ภาคผนวก ข.2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น

ปริมาตร 5 มิลลิลิตรตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เขย่าแรงๆ ตั้งทิ้งต่อไปอีกประมาณ 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 488 นาโนเมตร หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค.2)

9.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Bernfeld (Bernfeld , 1955)

เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ข.3) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในน้ำหมักที่เจือจางจนได้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดแก้ว เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นลงในอ่างน้ำเย็น เติมน้ำปลอดประจุปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ค .3)

9.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆโดยใช้วิธี HPLC

(ใช้บริการจากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

นำน้ำหมักที่เก็บได้จากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 มาตรวจสอบโดยเครื่องโครมาโตรกราฟฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (Shimadzu LC-3A) โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb 10 NH-2 (Phenomenax) โดยใช้อะซีโตไนไตรล์ความเข้มข้น 75 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ข.4) เป็นตัวพา และปรับให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ใช้เครื่องตรวจสอบ (detector) ชนิด Refractive Index Detector (RID) โดยเปรียบเทียบกับซูโครส กลูโคส และฟรัคโตสมาตรฐาน (ภาคผนวก ค .4, ค.5, ค.6)

10. การวัดการเติบโตของ *A. oryzae* K-13

วัดการเติบโตของเชื้อราจากน้ำหมักที่เก็บได้ตามวิธีในข้อ 6 โดยนำสายใยมาทำให้แห้ง นำไปอบในตู้อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แล้วนำมาใส่ในโถที่มีสารดูดความชื้นระบบสูญญากาศ จนน้ำหนักคงที่ หลังจากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งของสายใย

11. การทดลองผลิตกรดโคจิกในถังหมัก

จากการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวซึ่งได้ศึกษาในขวดเขย่ามาแล้ว พบว่าได้ผลผลิตกรดดี เมื่อจัดภาวะให้เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกโดยเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 (รพี โรจนอุไร, 2539) จึงเห็นว่าน่าจะมีการศึกษาเพื่อผลิตกรดโคจิกในระดับขยายส่วน โดยในการทดลองนี้เป็นการทดลองผลิตกรดโคจิกแบบขยายส่วน ภายใต้ภาวะที่ได้ศึกษามาว่าเหมาะกับการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่า (รพี โรจนอุไร, 2539) คือ เพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 1,500 มิลลิลิตรในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้หัวเชื้อที่เตรียมโดยวิธีการจากข้อ 3.2 โดยปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 4.5 (รพี โรจนอุไร, 2539) อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที (VVM) เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกวัน นำมาวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และปริมาณน้ำตาลเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน นำผลที่ได้มาพิจารณาการผลิตกรดโคจิกเมื่อยังไม่มีการปรับสภาวะที่เหมาะสม

12. การทดลองหาผลของการให้อากาศต่อการเติบโตและการผลิตกรดโคจิกของ *A. oryzae* K-13 ในขวดเขย่า

เพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในขวดเขย่า โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมโดยวิธีการข้อ 3.2 โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วน คือ

1) ผลิตกรดโคจิกในขวดทดลองปกติ (elenmeyer flask) ที่มีการให้ออกซิเจนละลายในภาวะปกติ ดังแสดงในรูปที่ 11
2) ผลิตกรดโคจิกในขวดทดลองที่ทำให้ก้นของขวดบุบ (baffle flask) ดังแสดงในรูปที่ 11 เพื่อเพิ่มออกซิเจนละลายลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จัดค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 20 วัน ทำการตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต ปริมาณน้ำตาล ทุก 2 วัน นำผลมาเปรียบเทียบดูผลของการผลิตกรดโคจิก เมื่อมีการให้ออกซิเจนละลายในการเติบโตและในการผลิตที่ต่างกัน เพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางในการทดลองในระดับถังหมักต่อไป

รูปที่ 12 ลักษณะของขวดเขย่าปกติ และ ขวดเขย่าก้นบุบ

13. การหาค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโตของ *A. oryzae* K-13 ในถังหมัก

13.1 การหาค่าออกซิเจนละลายที่ทำให้มีการเติบโตของสายใยมากที่สุดและเร็วที่สุด

เพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยจัดค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 4.5 (รพี โรจนอุไร, 2539) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส โดยมีการควบคุมค่าออกซิเจนละลายตลอดการเพาะเลี้ยง ดังนี้คือ ให้ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 40% 60% 80% และ 100% ของค่าอากาศอิ่มตัว

เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้มาวัดหา ค่าน้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลและกรดโคจิก แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อหาค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะสมที่ให้การเติบโตมากและรวดเร็ว

13.2 การหาค่าความเป็นกรดด่างที่ทำให้มีการเติบโตสายใยมากที่สุดและเร็วที่สุด

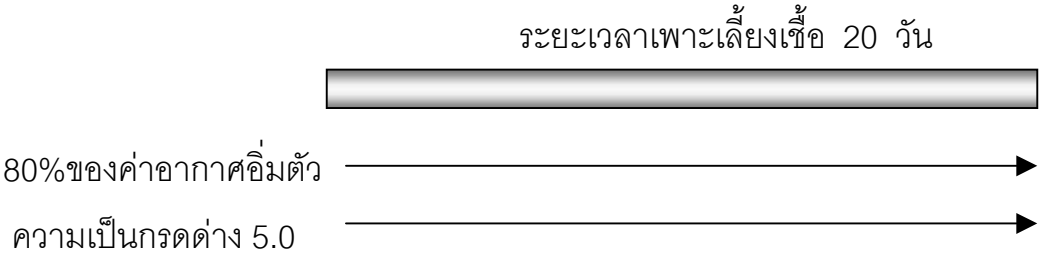
เพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยจัดค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะกับการเติบโตที่ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัว จากผลการทดลองของข้อ 13.1 อุณหภูมิควบคุมที่ 30 องศาเซลเซียส แปรผันค่าความเป็นกรดด่างตลอดการทดลอง ดังนี้คือ 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำน้ำหมักที่ได้มาตรวจวัดหา ค่าน้ำหนักแห้ง ปริมาณน้ำตาลและกรดโคจิก นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมเพื่อทำให้มีการเติบโตมากและรวดเร็ว

14. การหาค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 ในถังหมัก

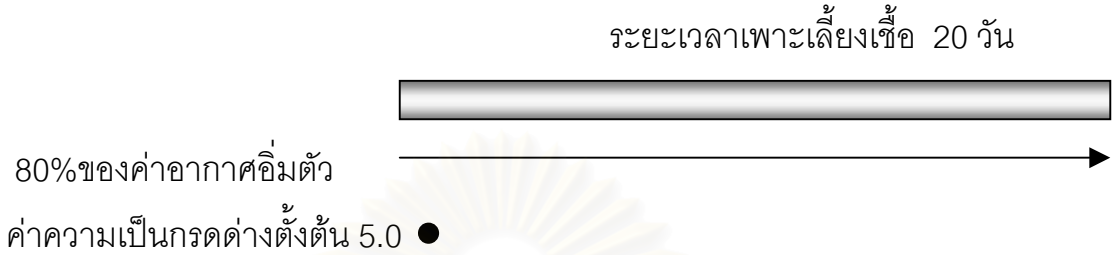
14.1 การผลิตกรดโคจิกภายใต้ภาวะที่เหมาะกับการเติบโตของสายใย

ผลิตกรดโคจิกในถังหมัก 2 ลิตร ใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 1,500 มิลลิลิตร โดยควบคุมภาวะที่เหมาะกับการเติบโตสายใยคือ ค่าออกซิเจนละลายที่ 80 %ของค่าอากาศอิ่มตัว ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 และ อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส โดยจัดการทดลองเป็น 2 การทดลอง ดังนี้คือ

14.1.1 ค่าออกซิเจนละลายที่ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 ตลอดการเพาะเลี้ยง



14.1.2 ค่าออกซิเจนละลายที่ 80 %ของค่าอากาศอิ่มตัว ตลอดการทดลองแต่จัดค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นที่ 5.0

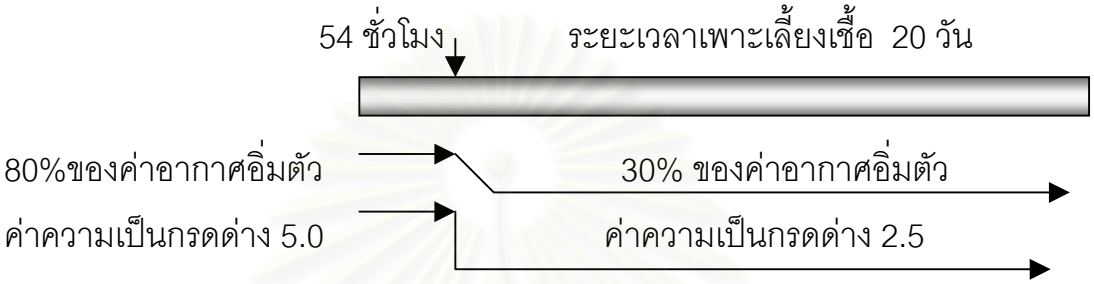


เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ทำการตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และปริมาณน้ำตาลทุกวันระหว่างการเพาะเลี้ยง นำผลที่ได้มาพิจารณาปริมาณและระยะเวลาในการผลิตกรดโคจิก

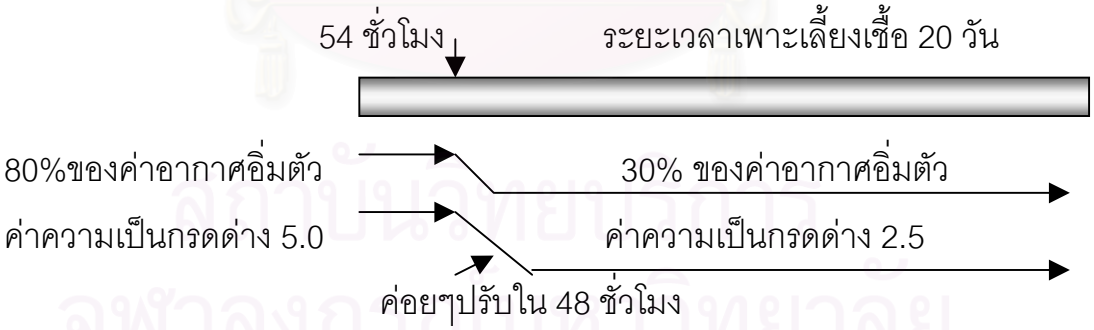
14.2 การหาค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่าง 2 ช่วง ที่เหมาะต่อการผลิตกรดโคจิก

ผลิตกรดโคจิกในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิและค่าออกซิเจนละลายให้เหมาะกับการเติบโตที่ 30 องศาเซลเซียส และ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัวและคุมค่าความเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 5.0 ซึ่งเหมาะสมต่อการเติบโตนาน 54 ชั่วโมง หลังจากนั้นแปรค่าออกซิเจนละลายเป็น 30% หรือ 50%ของค่าอากาศอิ่มตัว และปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2.5 (ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างนี้ได้จากผลการวิจัยของ รพี โรจนอุไร (2539) ที่แสดงให้เห็นว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 2.5 จะมีอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้เป็นค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการผลิต) หรือค่อยๆ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เป็น 2.5 ภายใน 48 ชั่วโมง โดยจะแบ่งการทดลองเป็น 3 แบบ คือ

14.2.1 จัดค่าออกซิเจนละลายที่ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 นาน 54 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่าออกซิเจนลงเป็น 30% ของค่าอากาศอิ่มตัว และปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2.5 ทันที

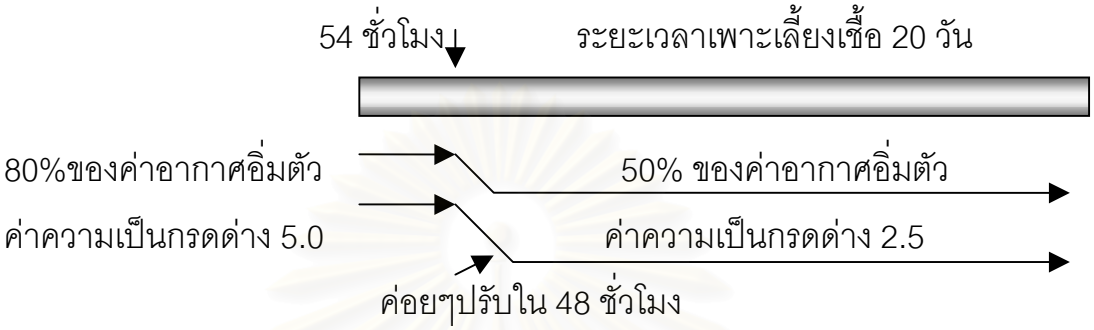


14.2.2 ค่าออกซิเจนละลาย 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 นาน 54 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่าออกซิเจนลงเป็น 30%ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่อยๆปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2.5 ภายใน 48 ชั่วโมงและควบคุมจน สิ้นสุดการทดลอง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14.2.3 ค่าออกซิเจนละลายเริ่มต้นที่ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 นาน 54 ชั่วโมง จากนั้นปรับค่าออกซิเจนละลายลงเป็น 50%ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่อย ๆปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2.5 ภายใน 48 ชั่วโมง



วัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และปริมาณน้ำตาลทุกวันระหว่างการผลิต นาน 20 วัน เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกและระยะเวลาในการผลิตภายใต้การแปรภาวะดังกล่าวโดยเทียบกับการทดลองข้อ 14.1

14.3 การผลิตกรดโคจิกภายใต้ภาวะที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกตลอดการเพาะเลี้ยง

ผลิตกรดโคจิกในถังหมักโดยควบคุมภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะกับการผลิตที่ 50% ของค่าอากาศอิ่มตัว ค่าความเป็นกรดด่างที่ 2.5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตลอดการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต และปริมาณน้ำตาลทุกวันระหว่างการผลิต เปรียบเทียบปริมาณและระยะเวลาในการผลิตกรดโคจิกกับการทดลองข้อ 14.1 และ 14.2

15. การหาขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในถังหมัก

เนื่องจากปริมาณสายใยมีความสัมพันธ์กับการผลิตกรดโคจิก จึงทำการทดลองเพื่อหาผลของขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกต่อการผลิตกรดโคจิกโดยผลิตกรดโคจิกในถังหมัก โดยแปรขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกค่าต่างๆกัน คือ 5% 10% 15%

ของปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จัดค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัวและค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 จนกระทั่งการเติบโตเข้าสู่ภาวะที่คงที่ (54 ชั่วโมง) แล้วจึงปรับค่าออกซิเจนละลายลดลงเป็น 50%ของค่าอากาศอิ่มตัวและค่อยๆปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2.5 ภายใน 48 ชั่วโมง ทำการทดลองจนกระทั่งครบ 20 วัน ตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโตและปริมาณน้ำตาลทุกวัน

16. การผลิตกรดโคจิกเมื่อจัดภาวะที่เหมาะสมต่อทั้งการเติบโตและการผลิต

เมื่อได้ภาวะที่เหมาะต่อการเติบโตและการผลิตกรดโคจิกดังการทดลองข้างต้นจึงทำการเพาะเลี้ยงซ้ำอีกครั้งโดยเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร ในถังหมัก 2 ลิตร ในภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตที่ดีที่สุด กล่าวคือค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัว ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโต 5.0 หลังจากชั่วโมงที่ 54 ปรับค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะกับการผลิตที่ 50%ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการผลิต โดยค่อยๆปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2.5 ภายใน 48 ชั่วโมง โดยใช้หัวเชื้อสปอร์งอกขนาดที่เหมาะสมคือ 10%ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ตรวจปริมาณกรดโคจิก การเติบโต ปริมาณน้ำตาลทุกวันตลอดการทดลอง เป็นเวลา 20 วัน

17. หาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบการเติมแหล่งคาร์บอน(น้ำตาลทราย)ระหว่างการผลิตกรดโคจิก

ผลิตกรดโคจิกในถังหมักเช่นเดียวกับข้อ 16 จนมีการใช้น้ำตาลไป 80% ของน้ำตาลตั้งต้น แล้วจึงแบ่งน้ำหมักที่มีสายใยจากถังหมักมา 120 มิลลิลิตรใส่ขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่มีน้ำตาลทราย 12 กรัมในปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำมาเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ที่ 200 รอบต่อนาที (ซึ่งเมื่อวัดค่าออกซิเจนละลายจะได้ประมาณ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว) นาน 54 ชั่วโมง หลังจากนั้นค่อยๆปรับค่าความเป็นกรดด่างลงให้เท่ากับ 2.5 ภายใน 48 ชั่วโมง และใช้ความเร็วในการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที (ซึ่งให้ค่าออกซิเจนละลายที่ 50%

ของค่าอากาศอิ่มตัว) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงจนพบว่ามีผลผลิตกรดโคจิกลดลง นำน้ำหมักมาตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต ปริมาณน้ำตาลทุกวัน แล้วจึงนำผลที่ได้มาพิจารณาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดโคจิกแบบเติมแหล่งคาร์บอนในระหว่างการผลิต

18. **หาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำ**

ผลิตกรดโคจิกในถังหมักเช่นเดียวกับข้อ 16 จนได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดหรือเริ่มลดลง (18 วัน) แล้วนำสายใยจากถังหมักไปใช้ผลิตกรดโคจิกซ้ำในขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก.3) ปริมาณ 120 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมที่มีสายใยเท่ากับ 10 %ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ จัดภาวะในการผลิตเช่นเดียวกับข้อ 17 ตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก การเติบโต ปริมาณการใช้น้ำตาลทุกวัน นำผลที่ได้มาพิจารณาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดโคจิกแบบมีการใช้สายใยซ้ำในระดับถังหมักต่อไป

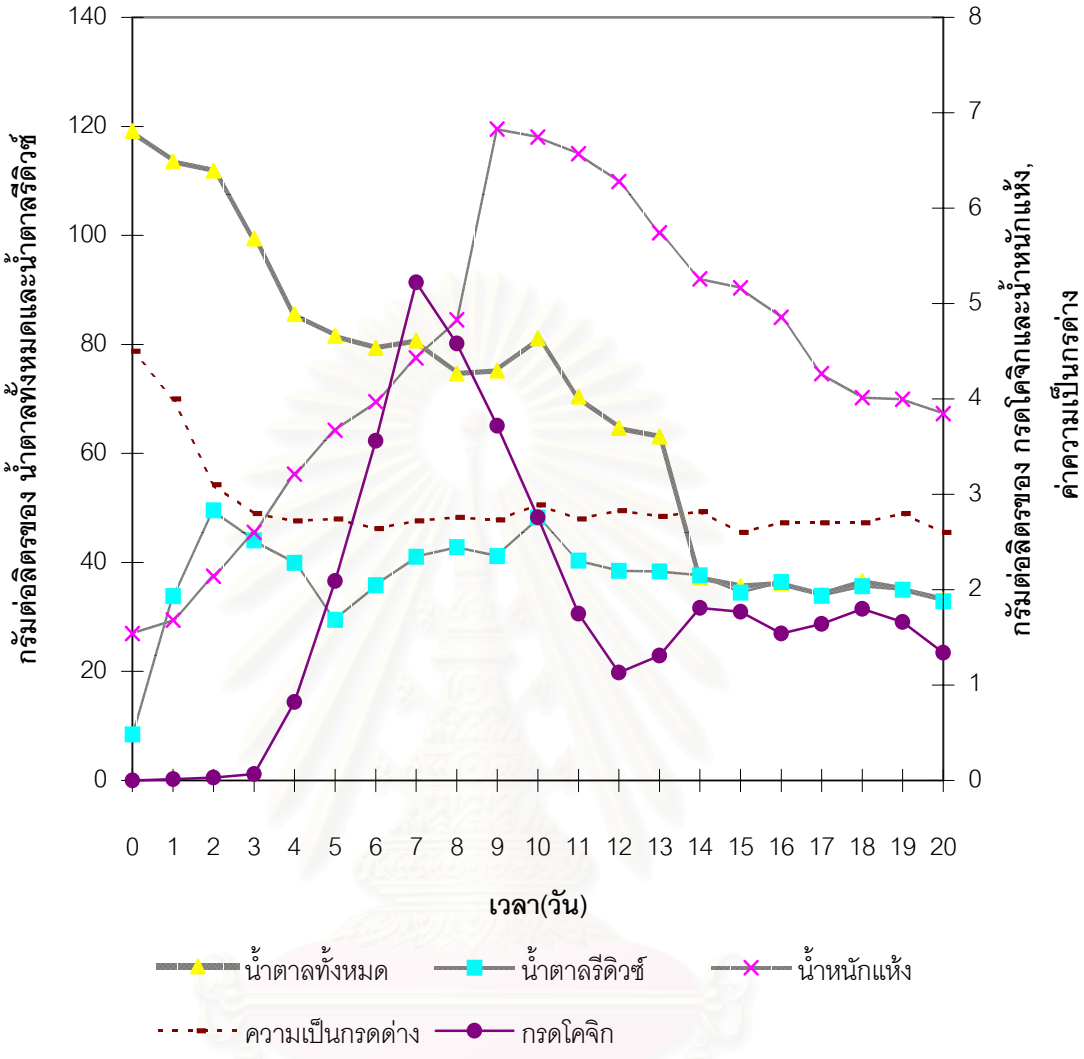
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
ผลการวิจัย

1. ผลการทดลองผลิตกรดโคจิกในถังหมักโดย *Aspergillus oryzae* K-13

จากการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวซึ่งได้ศึกษาในขวดเขย่ามาแล้ว พบว่าเมื่อจัดภาวะให้เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกจะได้กรดโคจิกสูงเท่ากับ 40.03 g/l ในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 (รพี โรจนอุไร, 2539) จึงเห็นว่าน่าจะมีการศึกษาเพื่อผลิตกรดโคจิกในระดับขยายส่วน ดังนั้นในการทดลองนี้จะเป็นการทดลองผลิตกรดโคจิกแบบขยายส่วน โดยเพาะเลี้ยง *A.oryzae* K-13 ภายใต้ภาวะที่ได้ศึกษามาแล้วว่าเหมาะกับการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่า (รพี โรจนอุไร, 2539) คือ ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก.3) มีการให้ความเป็นกรดด่างตั้งต้นที่ 4.5 อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส โดยจัดอัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที และให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที (VVM) ใช้สปอร์แขวนลอยความหนาแน่น 4-8 x 10^8 สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้หัวเชื้อสปอร์งอกขนาด 10% ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 1,500 มิลลิลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร เป็นเวลา 20 วัน

เมื่อทดลองขยายส่วนผลิตกรดโคจิกในถังหมัก 2 ลิตร พบว่าผลิตกรดโคจิกสูงสุดเพียง 5.22 g/l ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักแห้งสายใยสูงสุดเท่ากับ 6.82 g/l ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อตรวจวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดค่อยๆลดลง ส่วนน้ำตาลรีดิวซ์จะสูงขึ้นในช่วงประมาณวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงหลังจากนั้นค่อยๆลดลง จนในที่สุดพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับน้ำตาลทั้งหมดมีค่าใกล้เคียงกันในวันที่14 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งหมายความว่าน้ำตาลทรายถูกสลายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตส (ซึ่งตรวจวัดในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์) จะเห็นว่าใช้เวลาสลายน้ำตาลทรายนานถึง 14 วัน และมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือเมื่อสิ้นสุดการทดลองถึง 37.62 g/l ดังแสดงในรูปที่ 13

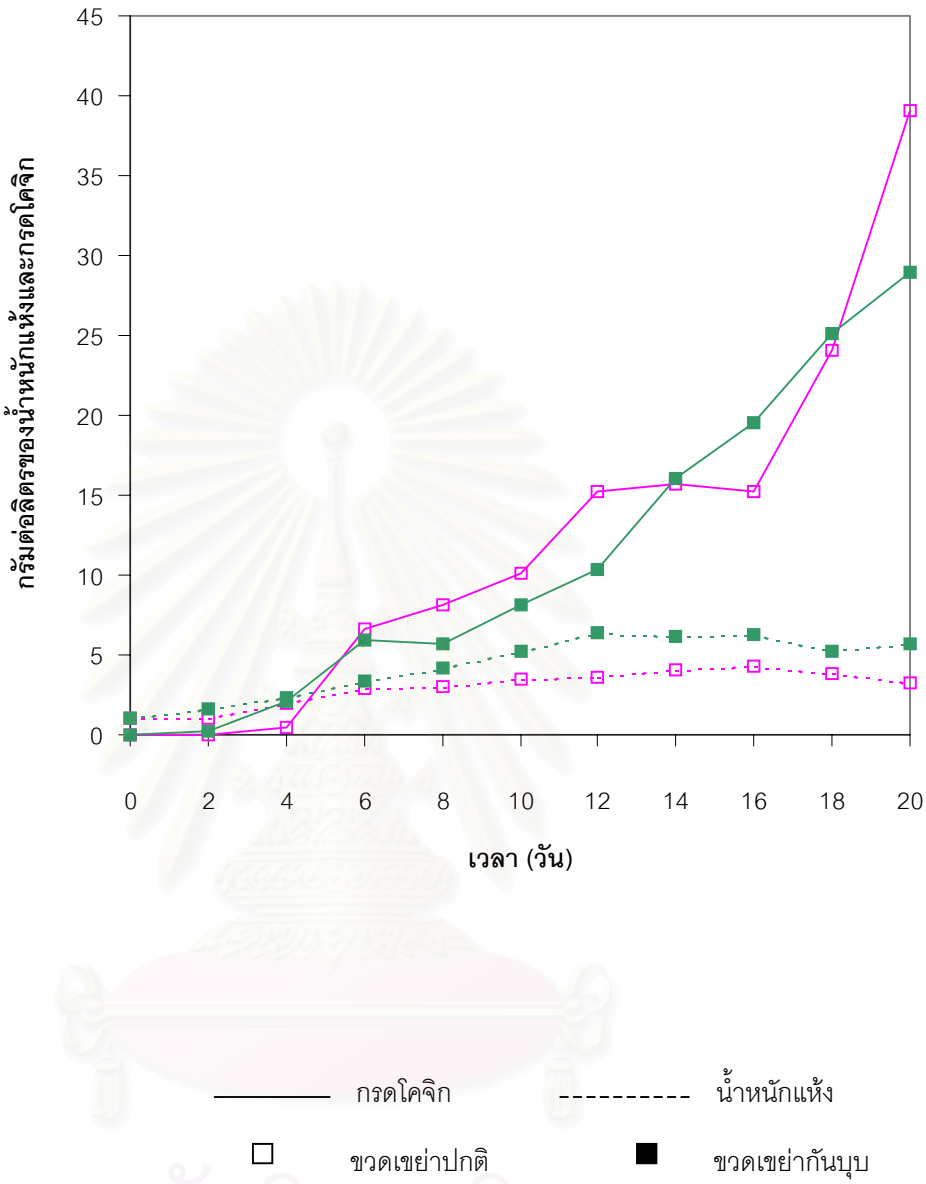


รูปที่13 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรดด่าง ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 เมื่อทดลองผลิตในถังหมัก

จะเห็นได้ว่าในการทดลองนี้ผลผลิตกรดโคจิกที่ได้ต่ำมาก เนื่องจากยังไม่มีการจัดการการกวน การให้อากาศ และปัจจัยอื่นๆให้เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิกในระดับขยายส่วน เพราะฉะนั้นภาวะการให้อากาศน่าจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกในถังหมัก จึงทำให้มีความสนใจที่จะทำการทดลองต่อไปเพื่อหาผลเบื้องต้นของการให้อากาศต่อการเติบโตและการผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่า ซึ่งจะได้นำผลในการทดลองดังกล่าวมาพิจารณาว่าการจัดภาวะการให้อากาศจะมีผลต่อการเติบโตและการผลิตกรดโคจิกต่อไปอย่างไร

2. ผลของการให้อากาศต่อการเติบโตของ *A. oryzae* K-13 และการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่า

เพื่อเป็นการหาผลของการให้อากาศที่แตกต่างกันต่อการเติบโตของ *A.oryzae* K-13 และการผลิตกรดโคจิก เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ในการผลิตในถังหมักต่อไป โดยทำการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก.3) ในขวดเขย่า 2 แบบ คือ ขวดเขย่าปกติซึ่งจะเป็นตัวแทนของการเพิ่มการละลายของออกซิเจนและขวดเขย่าก้นบุบเป็นตัวแทนของการเพิ่มการละลายของออกซิเจนที่มากกว่าปกติ โดยขวดเขย่าทั้ง 2 แบบมีความจุ 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร จัดหัวเชื้อสปอร์งอกเท่ากับ 1 มิลลิลิตรต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าโรตารี่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน พบว่าได้ปริมาณกรดโคจิกในขวดเขย่าก้นบุบต่ำกว่าขวดเขย่าปกติคือได้เท่ากับ 28.98 g/l ในวันที่ 20 ในขณะที่ปริมาณกรดโคจิกในขวดเขย่าปกติคือ 39.03 g/l ในวันที่ 20 และการเติบโตของสายใยสูงสุดในขวดเขย่าก้นบุบมากกว่าขวดเขย่าปกติคือ 6.40 g/l ในวันที่ 12 ในขณะที่การเติบโตของสายใยสูงสุดในขวดเขย่าปกติ เท่ากับ 4.25 g/l ในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูป 14 จากผลการผลิตกรดโคจิกและการเติบโตพบว่าในขวดเขย่าก้นบุบจะมีการเติบโตมากกว่าแต่ขวดเขย่าก้นบุบกลับผลิตกรดโคจิกน้อยกว่าขวดเขย่าปกติ แสดงว่าการเติบโตของสายใยมีความต้องการปริมาณออกซิเจนละลายมากแต่สำหรับการผลิตกรดโคจิกนั้นต้องการ



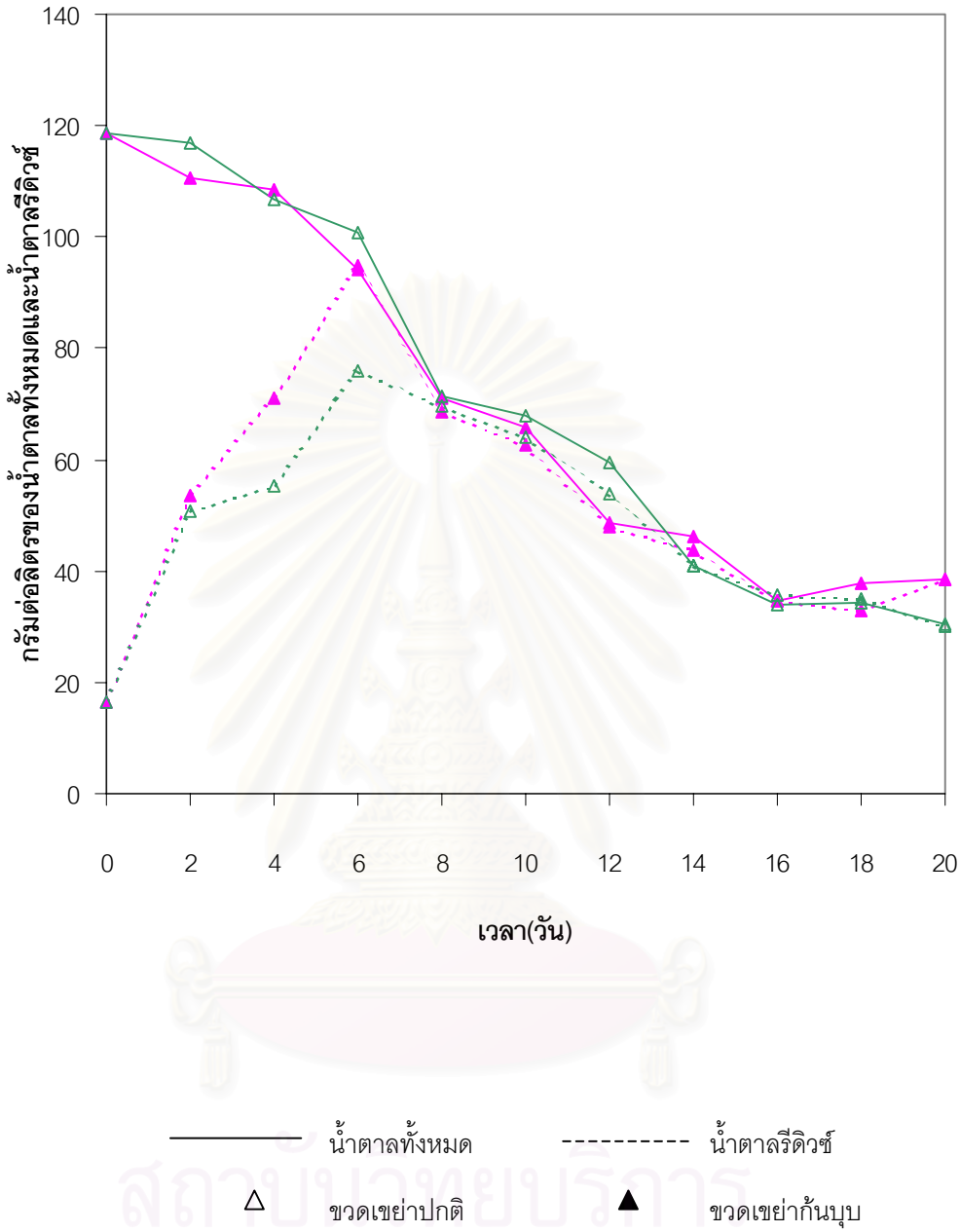
รูปที่14 การเปลี่ยนแปลงกรดโคจิกและน้ำหนักแห้งสายใยเมื่อผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 ในขวดเขย่าปกติและขวดเขย่าก้นบุบ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ปริมาณออกซิเจนละลายที่น้อยกว่า สำหรับการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่าก้นบุบถึงแม้จะให้การเติบโตมากแต่อาจจะมีการละลายของออกซิเจนมากไปสำหรับการผลิตกรดโคจิก จากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าค่าการละลายออกซิเจนสำหรับการเติบโตและการผลิตกรดโคจิกไม่ใช่ค่าเดียวกัน ดังนั้นจึงควรหาภาวะการละลายของออกซิเจนที่เหมาะกับการเติบโตและการผลิตต่อไป และเมื่อดูผลการสลายของน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตส (ซึ่งตรวจวัดในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์) ในการผลิตในขวดเขย่าก้นบุบซึ่งให้การเติบโตที่ดีกว่าขวดเขย่าปกติพบว่า น้ำตาลทรายในขวดเขย่าก้นบุบจะถูกสลายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสได้เร็วกว่าและมากกว่า คือสลายหมดในวันที่ 6 ขณะที่ขวดเขย่าปกติจะใช้เวลานานกว่าจะสลายน้ำตาลทรายได้หมดต้องใช้เวลาถึง 8 วัน ดังนั้นสายใยในขวดเขย่าก้นบุบจึงนำน้ำตาลมาใช้ได้เร็วและมากกว่า ดังแสดงในรูปที่ 14 แสดงให้เห็นว่าออกซิเจนละลายที่มากกว่ามีผลทำให้มีการเติบโตและการสร้างอินเวอร์เทสมากกว่าจึงทำให้มีการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสได้เร็วกว่าและมากกว่าโดยจะเห็นว่าในขวดเขย่าก้นบุบจะมีน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มมากกว่าในขวดเขย่าปกติ (รูปที่ 15) และการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่างของการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าก้นบุบและขวดเขย่าปกติจะมีแบบแผนเดียวกัน และมีการลดลงของความเป็นกรดด่างต่ำสุดที่ 2.38 ณ วันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงเหมือนกัน ในรูปที่ 16 และพบว่าเมื่อค่าความเป็นกรดด่างลดต่ำลงมาในช่วง 2.3-2.7 จึงมีการผลิตกรดโคจิกทั้งในขวดเขย่าก้นบุบและขวดเขย่าปกติ

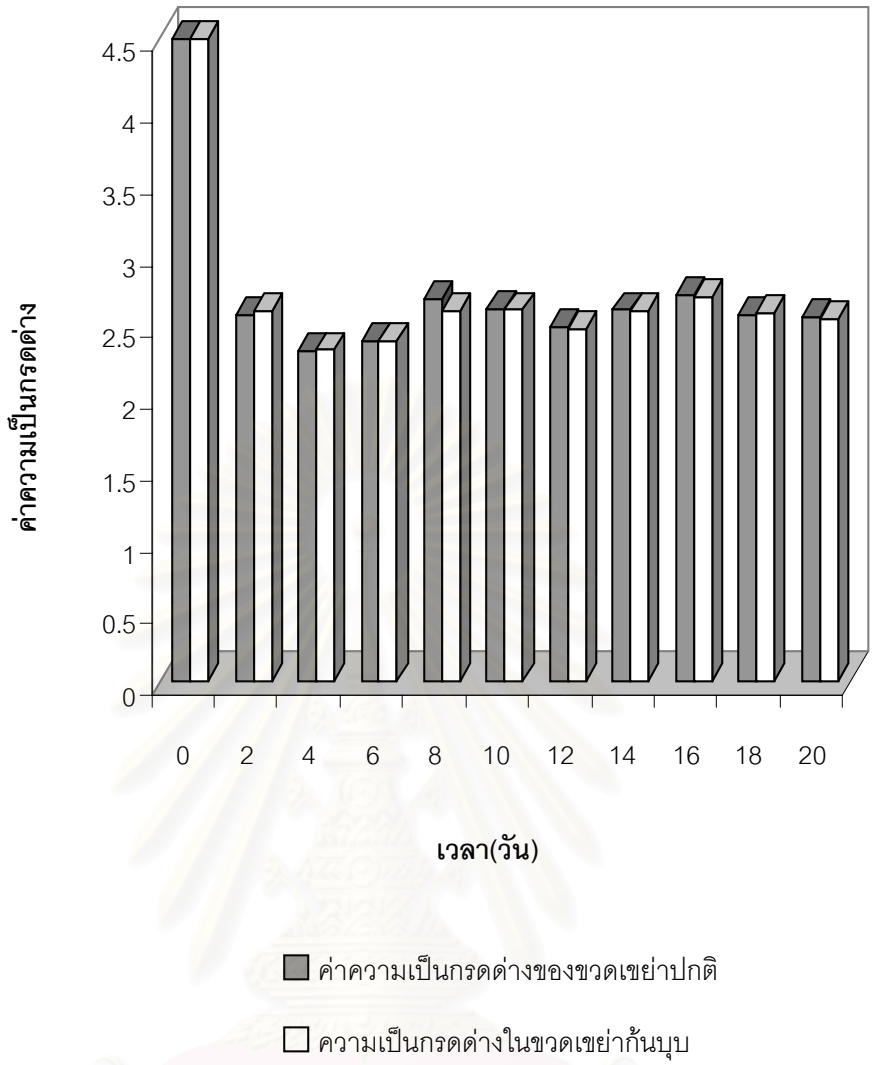
3. ผลของการหาค่าออกซิเจนละลายและความเป็นกรดด่างที่เหมาะต่อการเติบโตของ *A. oryzae* K-13

3.1 ผลการหาปริมาณออกซิเจนละลายที่ทำให้มีการเติบโตของสายใยมากที่สุดและเร็วที่สุด

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการเติบโต ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยให้ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 4.5 และควบคุมตลอดการเพาะเลี้ยง ควบคุมอุณหภูมิที่ 30±1 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก.3)



รูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ เมื่อผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 ในขวดเขย่าปกติและขวดเขย่าก้นบุบ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



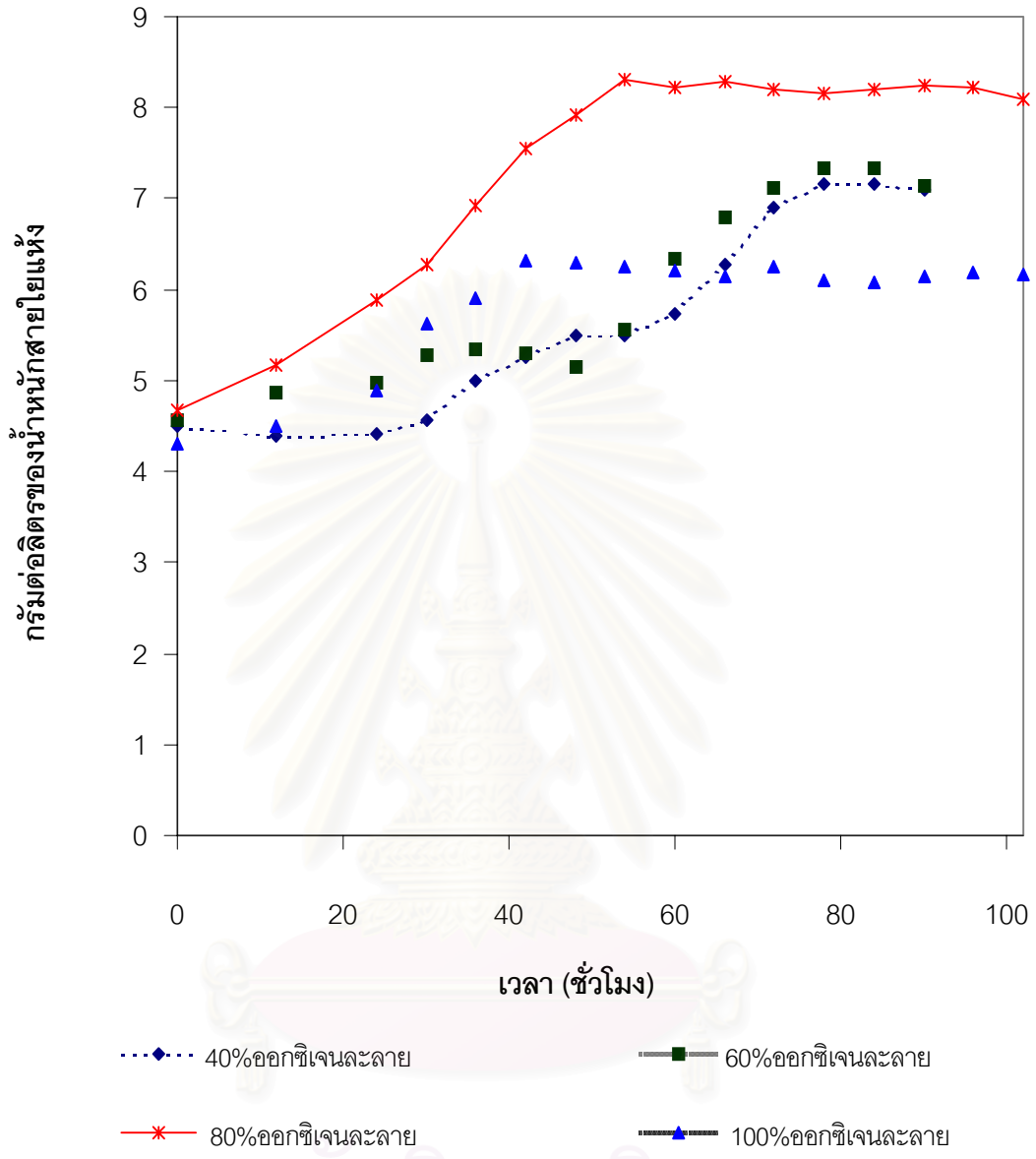
รูปที่ 16 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A.oryzae* K-13 ในขวดเขย่าปกติและขวดเขย่าก้นบุบ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

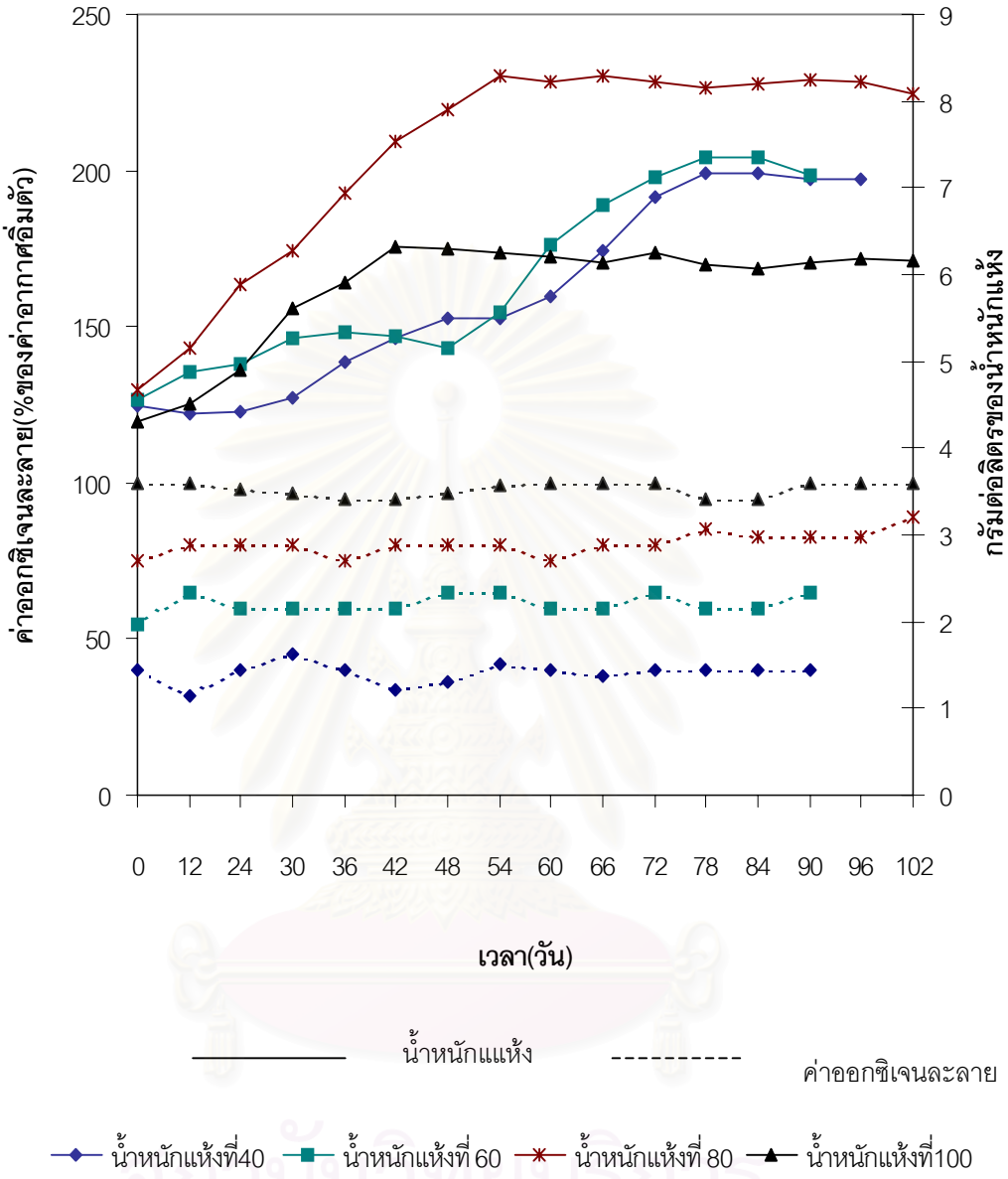
ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร โดยจัดขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกเท่ากับ 10% ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ แปรผันค่าออกซิเจนละลายที่ 40% 60% 80% และ 100% ของค่าอากาศอิ่มตัว ผลการทดลองพบว่าที่ค่าออกซิเจนละลายที่ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัว จะให้การเติบโตเร็วกว่าและสูงกว่าคือให้น้ำหนักแห้งเท่ากับ 8.30 g/l เมื่อชั่วโมงที่ 52 ส่วนค่าออกซิเจนละลายที่ 60 % และ 40 %ของค่าอากาศอิ่มตัวจะให้การเติบโตไล่เลี่ยกันแต่ช้าและน้อยกว่าที่ค่าออกซิเจนละลายที่ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว คือให้น้ำหนักแห้งที่ 7.34 และ 7.16 g/l ในชั่วโมงที่ 80 และ 80 ตามลำดับ แต่เมื่อให้ค่าออกซิเจนละลายที่100% ของค่าอากาศอิ่มตัวกลับมีน้ำหนักแห้งสายใยที่น้อยเนื่องจากที่ค่าออกซิเจนที่ 100 %ของค่าอากาศอิ่มตัว มีสายใยติดข้างถังจำนวนมากเพราะจำเป็นต้องให้การกวนและให้อากาศสูงมากเพื่อให้บรรลุภาวะดังกล่าวจึงทำให้น้ำหนักแห้งสายใยที่ตรวจได้น้อยกว่าค่าที่แท้จริง ดังนั้นในภาวะออกซิเจนละลายที่ 100% ของค่าอากาศอิ่มตัว จึงเป็นภาวะที่ไม่สามารถนำมาร่วมพิจารณากับภาวะอื่นได้ (รูปที่ 17)

เนื่องจากการผลิตกรดโคจิกจะเกิดขึ้นเมื่อมีภาวะคงที่ของการเติบโตดังนั้นจึงนำปัจจัยนี้มาพิจารณาหาภาวะที่เหมาะกับการเติบโตด้วย จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ค่าออกซิเจนละลายที่ 80% จะทำให้มีการเติบโตเพื่อเข้าสู่ภาวะคงที่ของการเติบโตเร็วคือ 54 ชั่วโมง ได้น้ำหนักแห้งสายใย 8.30 g/l ส่วนการเพาะเลี้ยงที่ค่าออกซิเจนละลายที่ 40% และ 60 %ของค่าอากาศอิ่มตัว จะทำให้เวลาที่เข้าสู่ภาวะการเติบโตคงที่ช้า ณ ชั่วโมงที่ 80 เมื่อสังเกตผลของปริมาณการเติบโตก็พบว่าการให้ค่าออกซิเจนละลายมากจะทำให้มีการเติบโตของสายใยที่สูง (รูปที่ 18)

เมื่อพิจารณาถึงการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตส (ซึ่งตรวจวัดในรูปน้ำตาลรีดิวซ์) ที่ภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายที่ 40% 60% และ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัว พบว่าที่ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 40 %และ 60 % ของค่าอากาศอิ่มตัว จะมีการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสได้หมดที่ชั่วโมงที่ 60 ซึ่งสอดคล้องกับการเติบโตของทั้ง 2 ภาวะที่มีการเข้าสู่ภาวะการเติบโตคงที่ช้าด้วย ส่วนที่ค่าออกซิเจนละลายที่ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว มีการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรัคโตสหมดเมื่อชั่วโมงที่ 48 ในภาวะนี้ให้การเติบโตคงที่ที่เร็ว สอดคล้อง



รูปที่ 17 น้ำหนักสายใย เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการเติบโตในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในภาวะการให้ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีการแปรค่าออกซิเจนละลายค่าต่างๆ

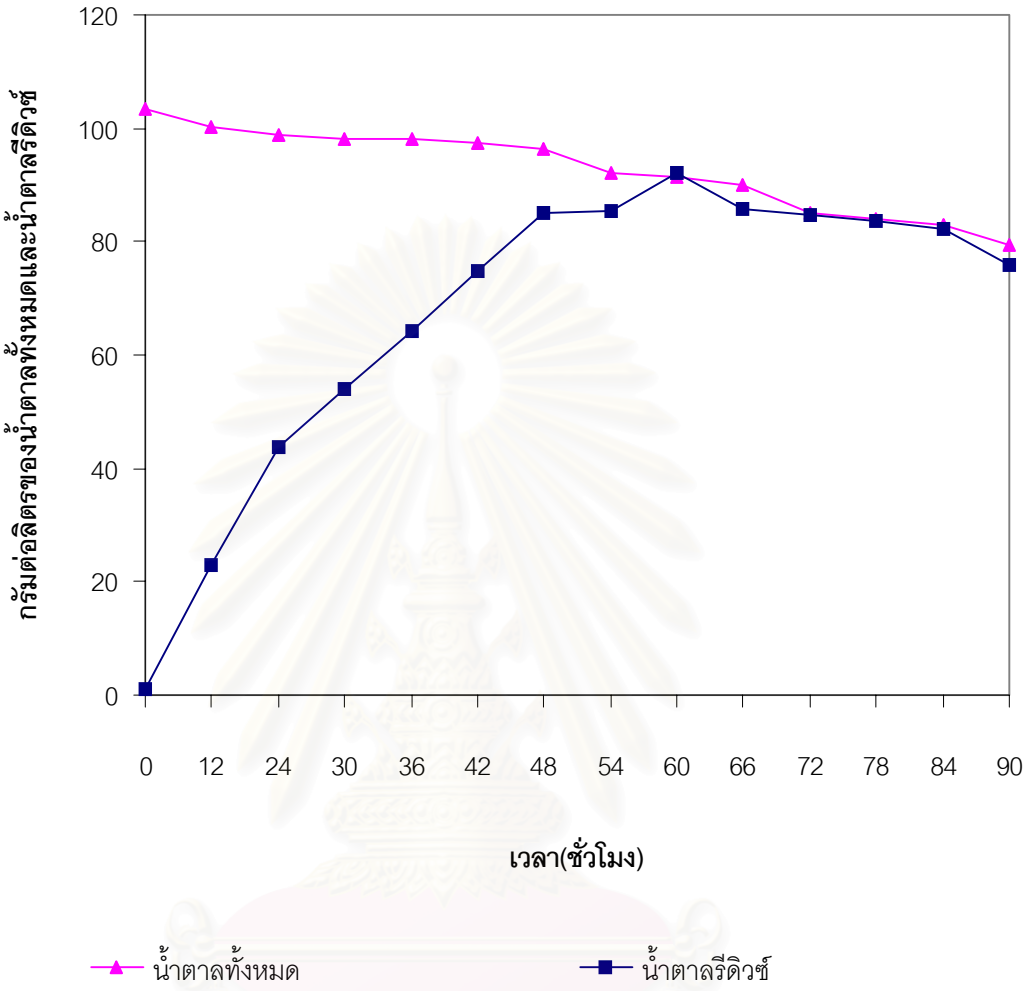


รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งสายใยและค่าออกซิเจนละลายเมื่อผลิตกรดโคจิกโดยรา *A. oryzae* K-13 ในถังหมักเมื่อมีการแปรค่าออกซิเจนละลายต่างๆกัน

กับผลการสลายน้ำตาลเช่นกัน (รูปที่ 19-21) ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการให้ค่าออกซิเจนละลายมากจะทำให้มีการเติบโตเร็วและสูงส่งผลให้มีการสร้างอินเวอร์เทสได้มากและได้เร็วจึงทำให้มีการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสเร็วด้วย

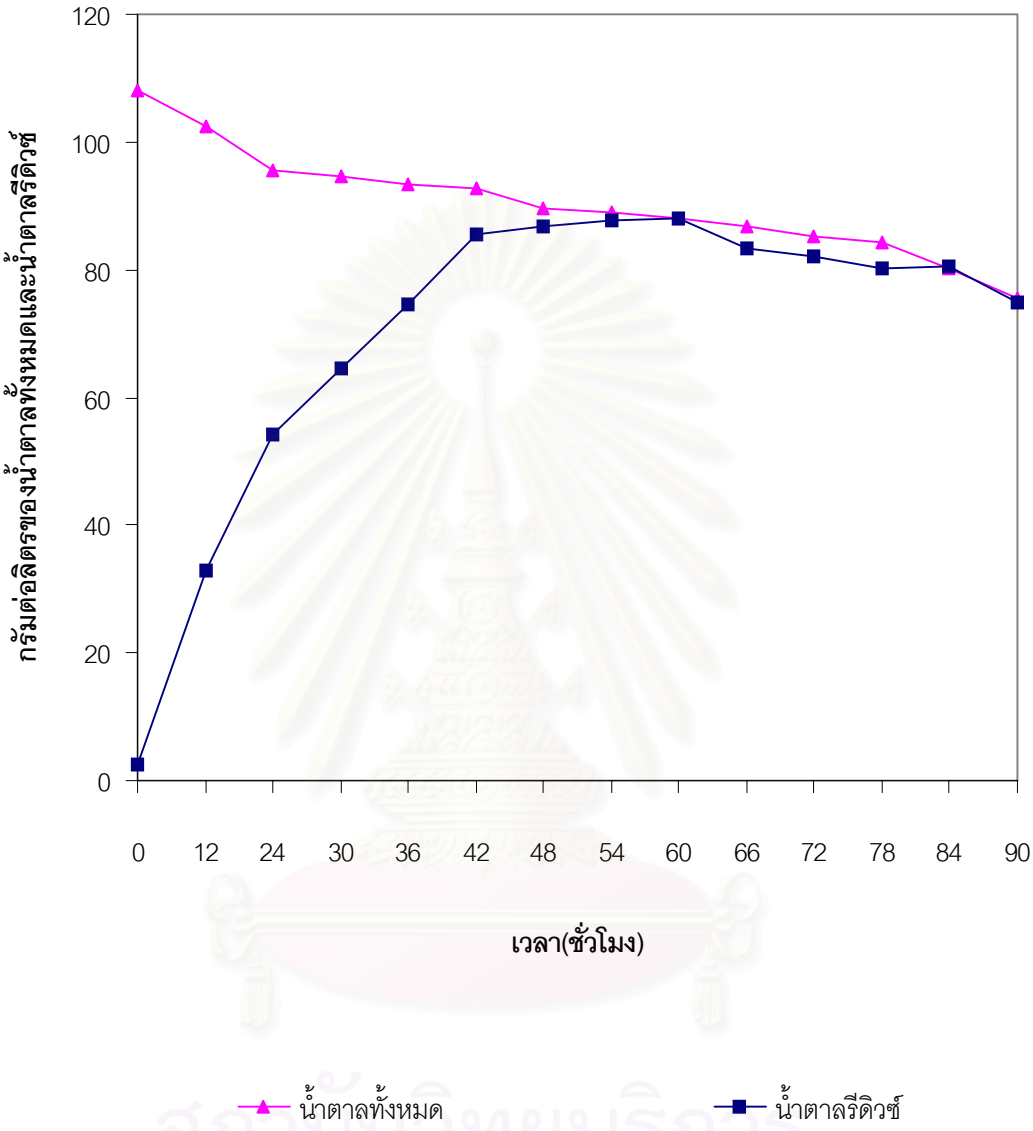
ในภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายต่างๆกันจะมีการเริ่มผลิตกรดโคจิกต่างกันด้วย จากผลการทดลองพบว่าจะเริ่มมีการผลิตกรดโคจิกในปริมาณมากได้รวดเร็วเมื่อเพาะเลี้ยงในภาวะที่ให้ค่าออกซิเจนละลายที่ 40% ของค่าอากาศอิ่มตัว จึงเห็นได้ว่าการให้ค่าออกซิเจนละลายที่น้อยจะทำให้มีการผลิตกรดโคจิกได้เร็วกว่าและเพิ่มขึ้นได้เร็วกว่าเมื่อให้ค่าออกซิเจนละลายที่มากขึ้น (รูปที่ 22)

เมื่อเปรียบเทียบผลการเติบโตและการใช้น้ำตาลเมื่อแปรค่าออกซิเจนละลายในการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 พบว่าการเติบโตที่เร็วและสูงที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดโคจิกเมื่อมีการเพาะเลี้ยงต่อไป เท่ากับ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว คือมีการเติบโตเข้าสู่ภาวะคงที่ที่ 54 ชั่วโมง ให้น้ำหนักแห้งสายใยสูงสุดเท่ากับ 8.30 g/l และที่ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัวยังเหมาะกับการสลายน้ำตาลทรายเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรัคโตสเพื่อนำมาใช้ในการเติบโตและการผลิตกรดโคจิกได้รวดเร็วอีกด้วย ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่ค่าออกซิเจนละลายสูงจะให้การเติบโตที่ดีส่งผลให้เกิดการสร้างอินเวอร์เทสเพื่อการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรัคโตสได้เร็วด้วย และผลการทดลองทั้งหมดก็สรุปได้ว่าที่ค่าออกซิเจนละลายที่ 80 % ของค่าอากาศอิ่มตัว เป็นค่าที่ให้สมดุลที่เหมาะต่อการเติบโตมากที่สุด เมื่อหาค่าอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) พบว่าภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายที่ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว จะให้อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด ที่มากที่สุดเท่ากับ 0.102 hr^{-1} และที่ ค่าออกซิเจนละลายที่ 40% และ 60%ของค่าอากาศอิ่มตัว จะให้อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด มีค่าใกล้เคียงกันเท่ากับ 0.043 และ 0.053 hr^{-1} ตามลำดับ (ตารางที่ 4) ซึ่งผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าที่ภาวะค่าออกซิเจนละลายที่ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว จะให้การเติบโตที่สูงที่สุดเช่นกัน ดังนั้นภาวะนี้จึงเหมาะกับการเติบโตมากกว่าภาวะอื่นๆจึงเลือกภาวะค่าออกซิเจนละลายที่ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัวนี้เป็นค่าที่เหมาะกับการเติบโตที่ใช้ในการทดลองต่อไป



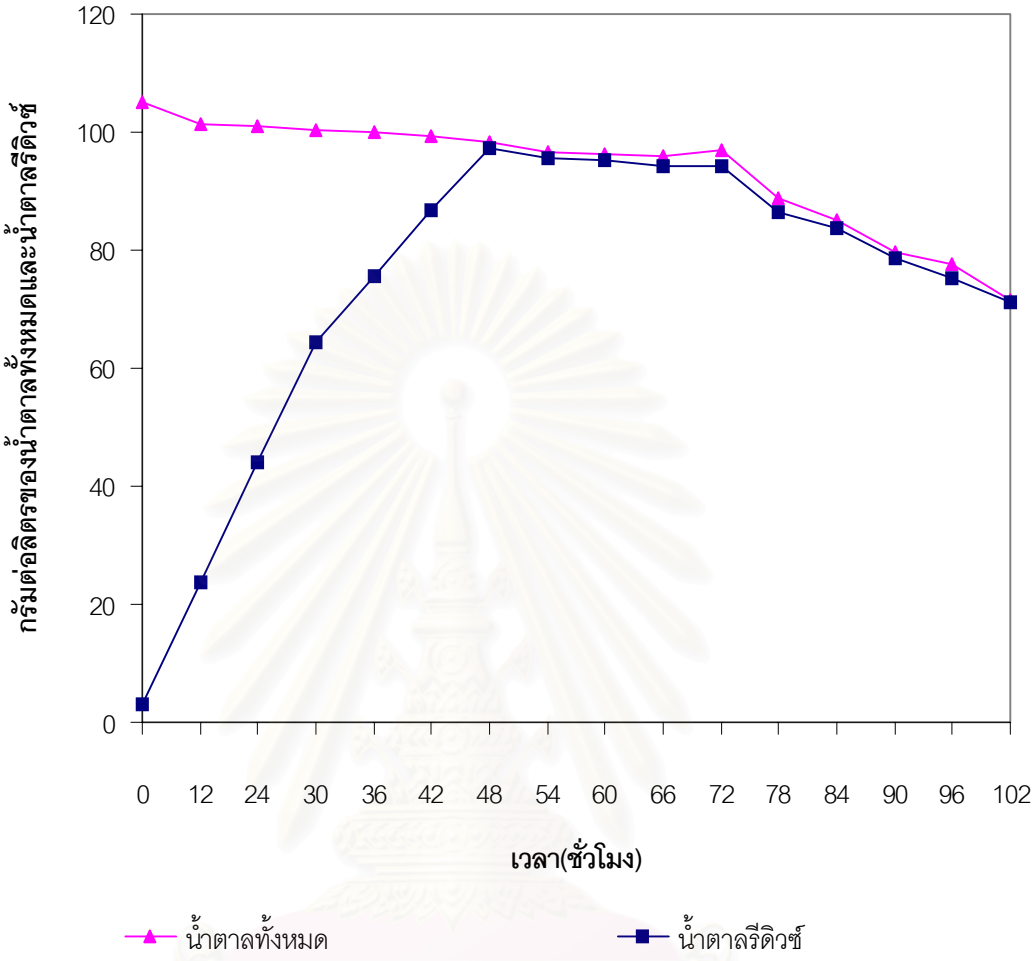
รูปที่ 19 การเปลี่ยนแปลง น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการเติบโตในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในภาวะการให้ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 40%ของอากาศอิ่มตัว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

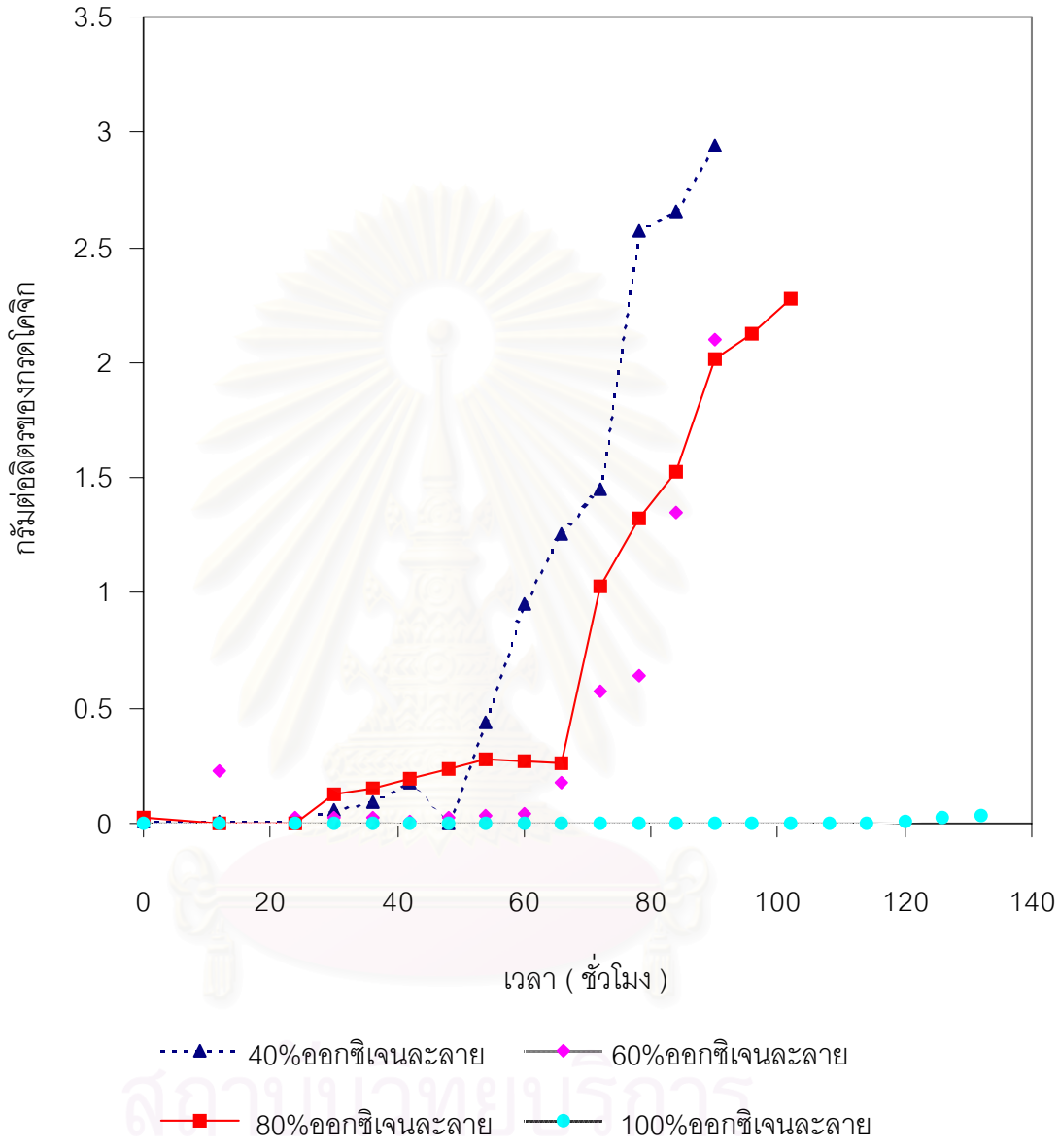


รูปที่ 20 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการเติบโตในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในภาวะการให้ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 60% ของอากาศอิ่มตัว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 21 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการเติบโตในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในภาวะการให้ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80%ของอากาศอิ่มตัว



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 22 การเปลี่ยนแปลงกรดโคจิก เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการเติบโตในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในภาวะการให้ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีการแปรค่าออกซิเจนละลายค่าต่างๆ

ตารางที่ 4 อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด เวลาที่เข้าสู่ภาวะการเติบโตคงที่ น้ำหนักแห้งเมื่อมีการเติบโตสูงสุด และเวลาที่สลายน้ำตาลทรายหมด ที่ภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายต่างๆกัน ของการเพาะเลี้ยงเพื่อหาค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะกับการเติบโตของ *A. oryzae* K-13

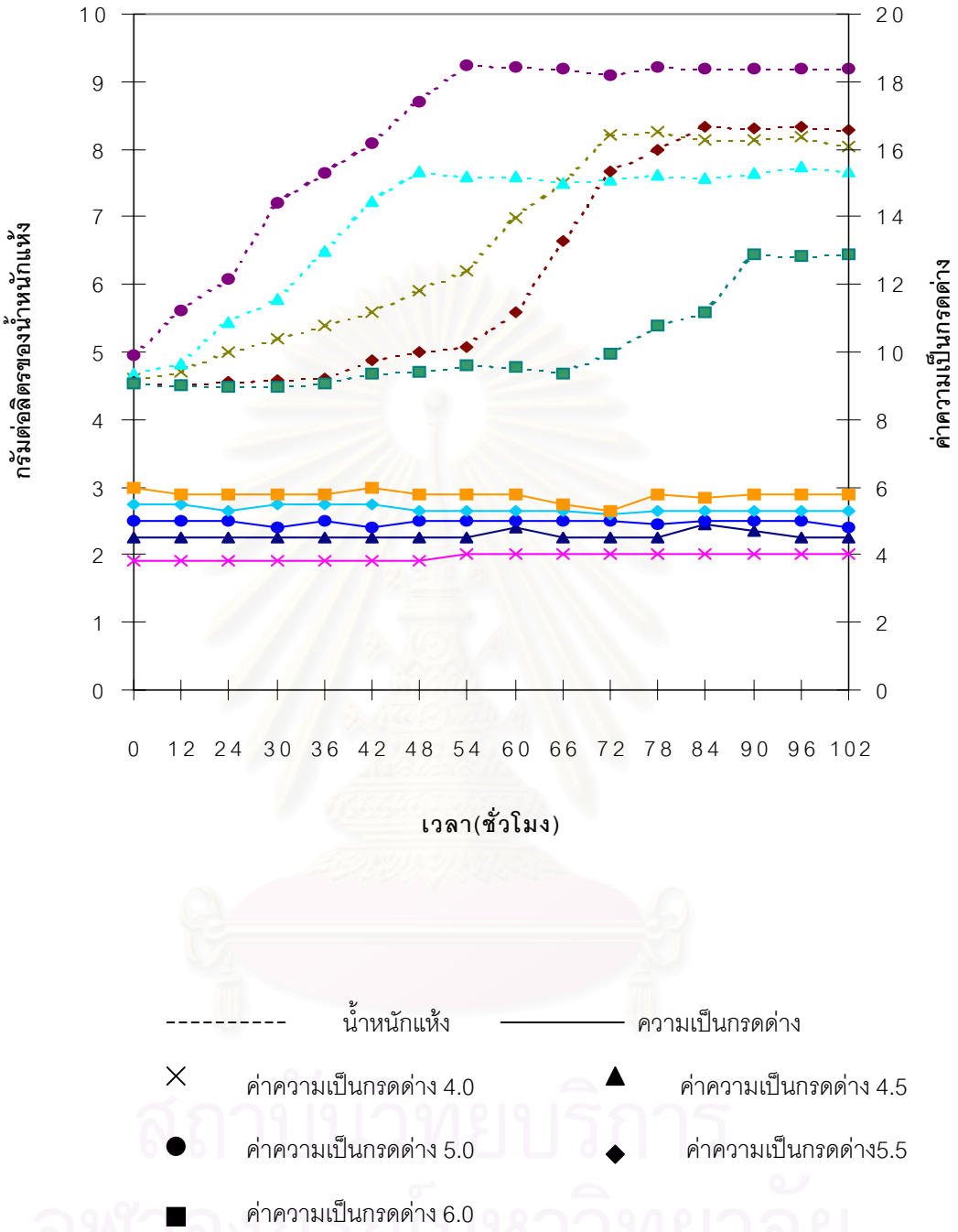
ภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลาย (ของค่าอากาศอิ่มตัว)	อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (hr^{-1})	เวลาที่เข้าสู่ภาวะการเติบโตคงที่ (ชั่วโมง)	น้ำหนักแห้งเมื่อมีการเติบโตสูงสุด (g/l)	เวลาที่ใช้ในการสลายน้ำตาลทรายหมด (ชั่วโมง)
40%	0.043	80	7.16	60
60%	0.053	80	7.34	54
80%	0.102	54	8.30	48
100%	ไม่สามารถนำค่าต่างๆมาพิจารณาร่วมด้วยได้			

3.2 การหาค่าความเป็นกรดด่างที่ทำให้มีการเติบโตของสายใยมากที่สุดและเร็วที่สุด

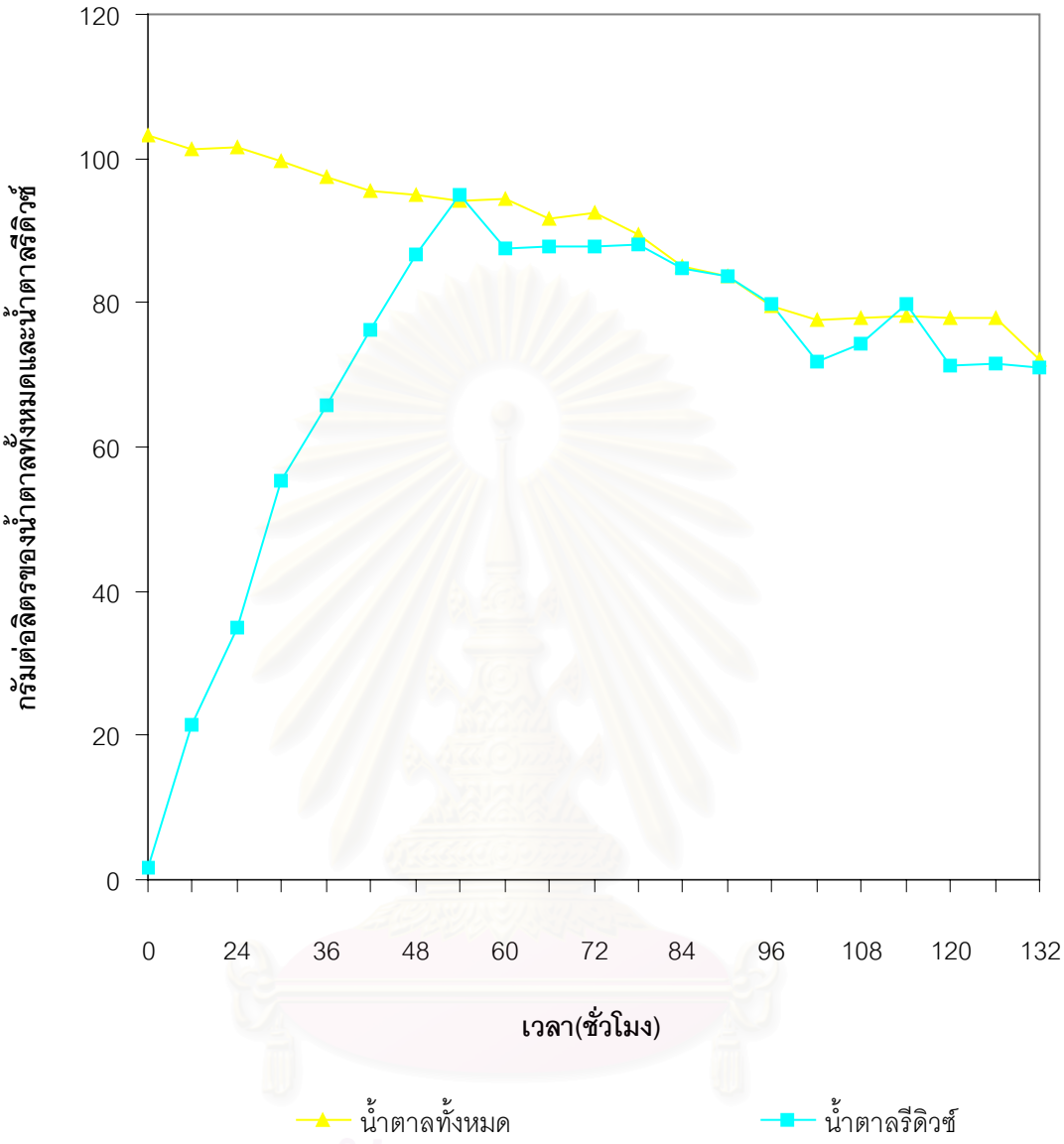
เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการเติบโตในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยจัดค่าออกซิเจนละลายที่ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว (ได้จากผลการทดลองข้อ 3.1) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30±1 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร จัดให้มีหัวเชื้อสปอร์งอกขนาด 10% ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ แปรค่าความเป็นกรดด่างตลอดการเพาะเลี้ยงต่างๆ กัน ได้แก่ 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 ผลการทดลองพบว่า ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 จะให้การเติบโตที่เร็วและมีน้ำหนักแห้งสูงสุดมากถึง 9.24 g/l ที่ชั่วโมงที่ 54 แต่ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 จะมีการเติบโตที่เร็วกว่าคือที่ 48 ชั่วโมงซึ่งมีให้น้ำหนักแห้งสูงสุดน้อยกว่าที่ 7.66 g/l ซึ่งต่ำกว่าการเติบโตที่ความเป็นกรดด่างที่ 5.0 ส่วนที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 และ 5.5 ที่

ให้การเติบโตสูงสุดถึง 8.20 และ 8.34 g/l แต่ใช้เวลานานถึง 72 และ 82 ชั่วโมง ถึงแม้ว่าจะมีการเติบโตที่สูงแต่ก็ใช้เวลานาน และที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.0 จะให้การเติบโตน้อยและช้าที่สุดที่ 90 ชั่วโมง (รูปที่ 23) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 เป็นค่าที่ทำให้มีปริมาณน้ำหนักแห้งมากในเวลาที่เร็ว ถึงจะไม่เร็วที่สุดแต่มีน้ำหนักแห้งสูงที่สุดนอกจากนี้การเติบโตเพิ่มขึ้นมากในเวลาที่รวดเร็ว และค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 มีการเติบโตเร็วแต่ใช้เวลานานกว่า ส่วนที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 และ 5.5 มีปริมาณการเติบโตสูงสุดช้ากว่าและค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.0 ใช้เวลานานกว่าจะให้ปริมาณสายใยสูงสุดและให้ปริมาณสายใยน้อยด้วย จึงมีความเหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกน้อยกว่าทุกภาวะที่ได้กล่าวไป ดังนั้นการเติบโตของ *A. oryzae* K-13 จะเติบโตได้ดีเมื่อมีค่าความเป็นกรดด่างที่ไม่ต่ำและไม่สูงจนเกินไป และค่าที่ทำให้เติบโตได้ดีคือที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 (รูปที่ 23)

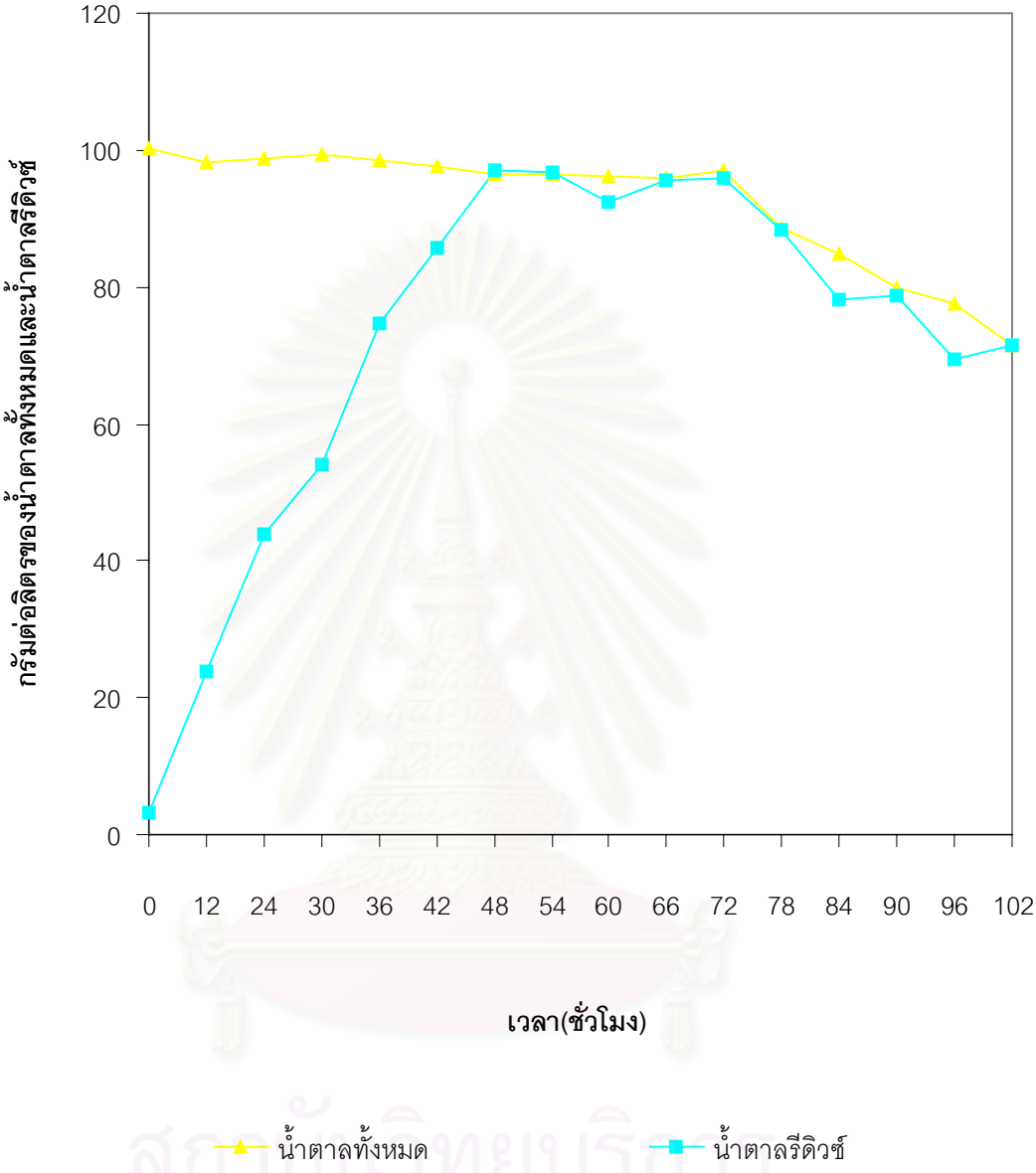
เมื่อพิจารณาถึงการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตส พบว่าค่าความเป็นกรดด่างในช่วงที่มีการทดลองจะมีผลต่อการสลายน้ำตาลทรายไม่ต่างกันมากนัก โดยที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 จะมีการสลายน้ำตาลทรายเป็นกลูโคสและฟรัคโตสหมดที่ชั่วโมงที่ 54 สอดคล้องกับการเติบโตที่รวดเร็วในภาวะนี้แสดงว่าการเติบโตที่มากส่งผลให้มีการสร้างอินเวอร์เทสมาสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสเพื่อที่สายใยราจะนำมาใช้ในการเติบโตได้ดี ส่วนที่ความเป็นกรดด่างที่ 4.5 มีการสลายน้ำตาลทรายได้เร็วที่สุดที่ชั่วโมงที่ 48 เนื่องจากมีการเติบโตรวดเร็วที่สุดจึงมีการสร้างอินเวอร์เทสเพื่อมาสลายน้ำตาลทรายเร็วที่สุดเช่นกัน ที่ความเป็นกรดด่างที่ 4.0 และ 5.5 ใช้เวลาที่สลายน้ำตาลทรายหมดเท่ากันที่ 54 ชั่วโมง แต่มีการเติบโตที่ช้ากว่า และที่ความเป็นกรดด่างที่ 6.0 ใช้เวลาในการสลายน้ำตาลทรายหมดใช้เวลานานถึง 66 ชั่วโมง เพราะฉะนั้นค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการสลายน้ำตาลจึงอยู่ในช่วง 4.0-5.5 (รูปที่ 24-28)



รูปที่ 23 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างและน้ำหนักแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการเติบโตในถังหมักขนาด 2 ลิตร จัดค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัว อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรดด่างค่าต่างๆ

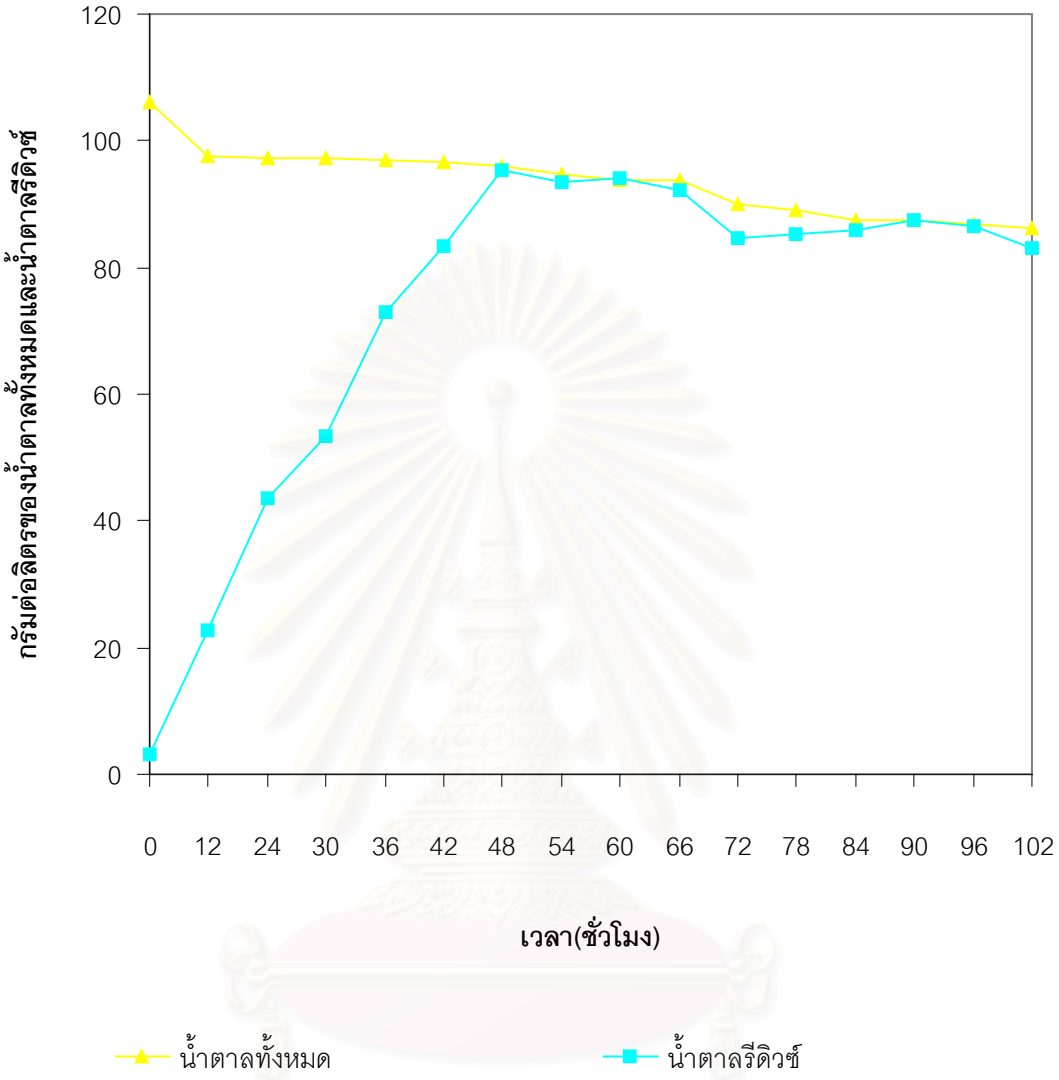


รูปที่ 24 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการเติบโต ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้ภาวะความเป็นกรดด่างที่ 4.0

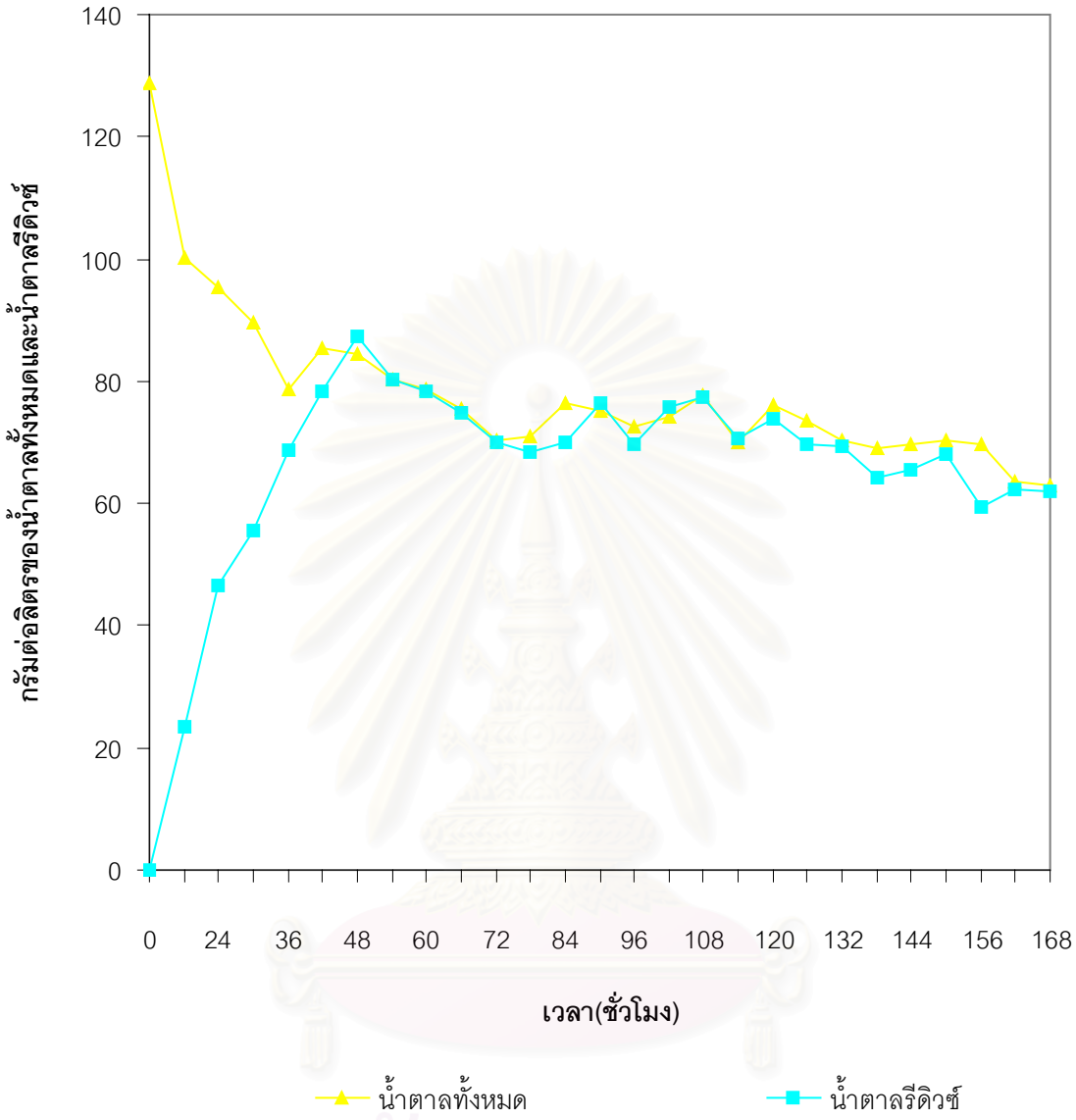


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 25 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการเติบโต ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้ภาวะความเป็นกรดด่างที่ 4.5

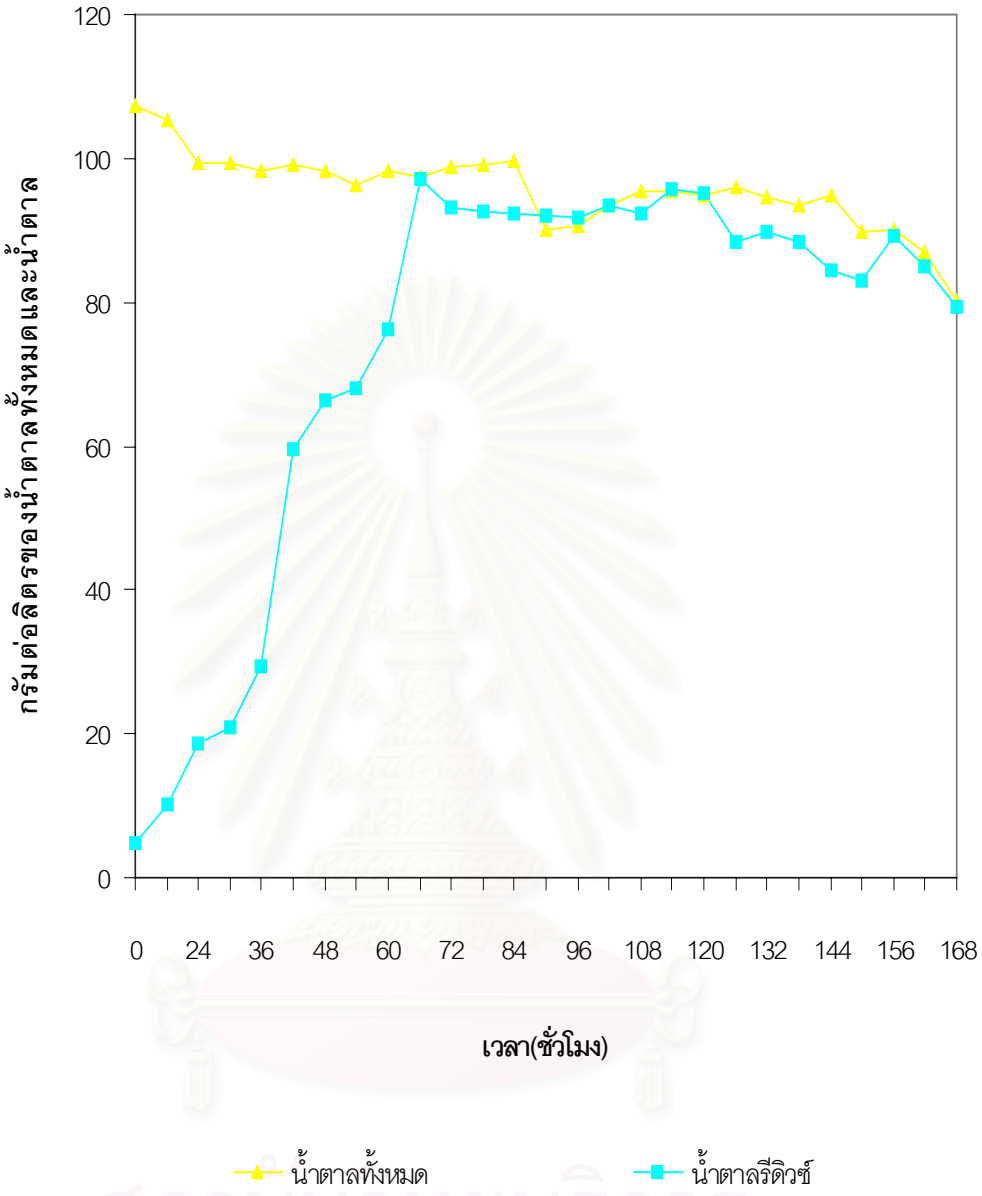


รูปที่ 26 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการเติบโต ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้ภาวะความเป็นกรดด่างที่ 5.0



รูปที่ 27 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการเติบโต ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้ภาวะความเป็นกรดด่างที่ 5.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



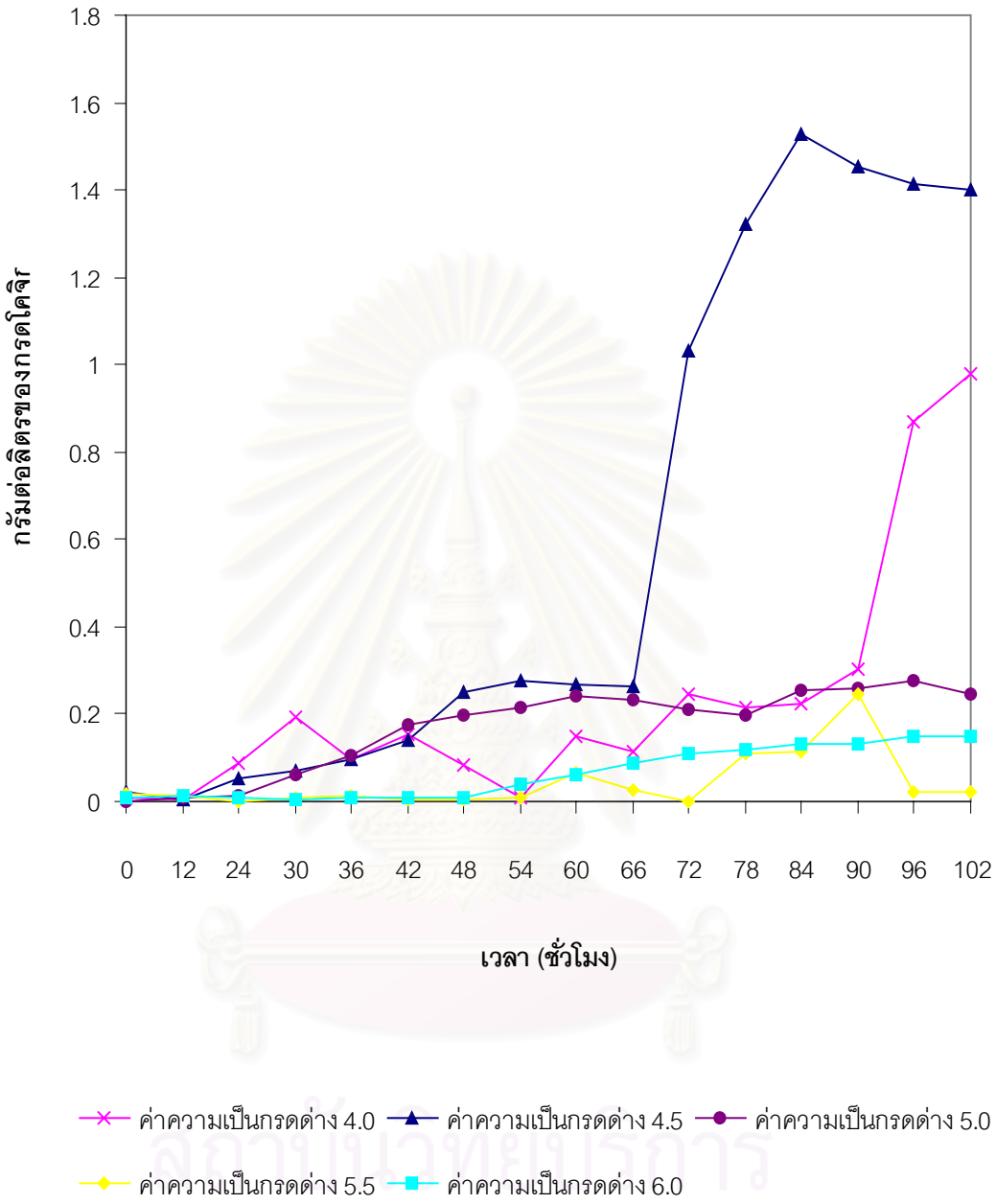
รูปที่ 28 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการเติบโต ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้ภาวะความเป็นกรดด่างที่ 6.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในภาวะการให้ความเป็นกรดด่างต่าง ๆ กัน จะมีการเริ่มผลิตกรดโคจิกในเวลาที่ต่างกันด้วย ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 มีการผลิตกรดโคจิกมากจนเห็นได้ชัดหลังชั่วโมงที่ 72 และมีการผลิตกรดโคจิกในปริมาณที่สูงขึ้นหลังจากนั้น ส่วนที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 เริ่มผลิตหลังชั่วโมงที่ 66 ในการเติบโตที่ค่าความเป็นกรดด่างที่สูงขึ้นที่ 5.0 5.5 และ 6.0 ไม่พบว่ามีการผลิตกรดโคจิกมากพอที่จะมีนัยสำคัญในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำจะสามารถทำให้มีการเริ่มผลิตกรดโคจิกได้เร็ว ในระหว่างที่จะไม่มีการผลิตกรดด่างโคจิกในภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่สูงขึ้น เพราะฉะนั้นเป็นข้อสังเกตได้ว่าถ้าต้องการผลิตกรดโคจิกควรจะผลิตในภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างต่ำๆ ดังแสดงในรูป 29

เมื่อเปรียบเทียบผลการเติบโต ในการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 โดยแปรค่าความเป็นกรดด่างในการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ กัน พบว่าการเติบโตที่รวดเร็วและได้ปริมาณสูง โดยมีการสลายน้ำตาลทรายเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรัคโตสได้เร็วจะเกิดขึ้นเมื่อปรับภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 ถึงแม้ว่าภาวะดังกล่าวยังไม่มีการเริ่มผลิตกรดโคจิก แต่ในการทดลองนี้มุ่งเน้นหาภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโตสูงสุดของ *A. oryzae* K-13 ดังนั้นจากผลการทดลองจึงพบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมที่สุดคือ 5.0 ประกอบกับการหาอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ก็พบว่าที่ภาวะการให้ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 จะให้อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดสูงสุดเท่ากับ 0.143 hr^{-1} ซึ่งมากกว่าที่ความเป็นกรดด่าง 4.0 4.5 5.5 และ 6.0 ที่มีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดมีค่าใกล้เคียงกันคือ 0.033 0.056 0.0.041 และ 0.051 hr^{-1} ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 29 ปริมาณกรดโคจิก เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการเติบโตในถังหมักขนาด 2 ลิตร จัดค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรดด่างค่าต่างๆ

ตารางที่ 5 อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด เวลาที่เข้าสู่ภาวะการเติบโตคงที่ น้ำหนักแห้งเมื่อมีการเติบโตสูงสุด และเวลาที่ใช้ในการสลายน้ำตาลทรายหมด ของการเพาะเลี้ยงเพื่อหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโตของ *A. oryzae* K-13

ค่าความเป็นกรดด่าง	อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (hr^{-1})	เวลาที่เข้าสู่ภาวะการเติบโตคงที่ (ชั่วโมง)	น้ำหนักแห้งเมื่อมีการเติบโตสูงสุด (g/l)	เวลาที่ใช้ในการสลายน้ำตาลทรายหมด (ชั่วโมง)
4.0	0.033	72	6	54
4.5	0.056	48	7.11	48
5.0	0.143	54	8.86	48
5.5	0.041	84	8.24	48
6.0	0.051	96	6.21	66

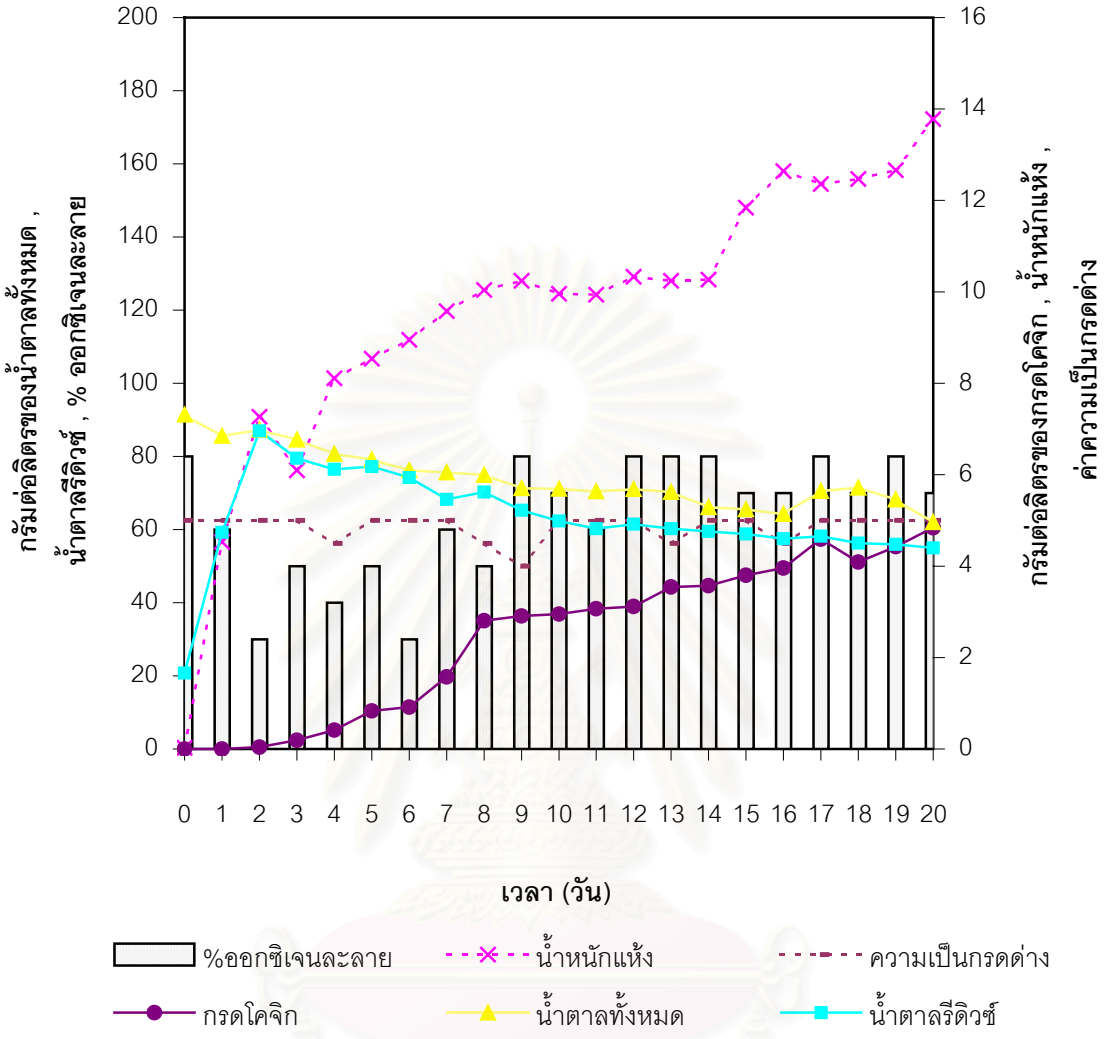
จากผลการทดลองทั้งหมดเมื่อพิจารณามุ่งเน้นที่การเติบโต การสลายน้ำตาล และความสามารถในการผลิตกรด พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 จะมีการเติบโตที่เร็วและให้ปริมาณสูง มีการสลายน้ำตาลอย่างรวดเร็ว ดังนั้นภาวะนี้จึงเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดและจากผลข้อ 3.1 และ 3.2 นี้จึงสรุปได้ว่าภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสำหรับการเติบโตคือค่าออกซิเจนละลายที่ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัวและค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 แต่เนื่องจากผลการทดลองเบื้องต้นในข้อ 2 บอกได้ว่าค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างสำหรับการเติบโตและการผลิตกรดโคจิกไม่ใช่ค่าเดียวกัน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเห็นว่าควรจะจัดการทดลองเพื่อหาภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายและความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกต่อไป

4.ผลการหาค่าออกซิเจนละลายและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

4.1 ผลการผลิตกรดโคจิกภายใต้ภาวะที่เหมาะกับการเติบโตของสายใย

4.1.1 การผลิตกรดโคจิกภายใต้ค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะต่อการเติบโตของสายใยตลอดการทดลอง

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* K-13 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรโดยใช้หัวเชื้อสปอร์งอกขนาด 10 %ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 1,500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30±1 องศาเซลเซียสตลอดการเพาะเลี้ยง จัดค่าออกซิเจนละลายที่ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 ควบคุมภาวะดังกล่าวตลอดระยะเวลาเพาะเลี้ยง 20 วัน ผลการทดลองพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดได้เพียง 4.84 g/l ในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง และเมื่อคิดอัตราการผลิตกรดโคจิก ณ วันที่มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดแล้วก็ได้เพียง 0.153 g/l/d แต่พบว่ามีน้ำหนักสายใยแห้งสูงมากถึง 13.78 g/l เมื่อมีการเติบโตที่สูงมากจึงทำให้มีการสร้างอินเวอร์เทสมากส่งผลให้ในการทดลองนี้มีการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตส (ซึ่งตรวจวัดในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์) ได้อย่างรวดเร็วภายในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง แต่กลับมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์น้อย จึงพบว่าเหลือน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อสิ้นสุดการทดลองสูงถึง 55 g/l (รูปที่ 30) จะเห็นได้ว่าในภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายกับความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโตตลอดการเพาะเลี้ยงจะทำให้มีการเติบโตดี เกิดการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสได้ดี และน้ำตาลที่ได้จะถูกนำมาใช้เพื่อการเติบโตเพียงอย่างเดียว ใช้ในการผลิตกรดโคจิกน้อยมาก ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือมากเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และเนื่องจากมีการให้ค่าออกซิเจนละลายและความเป็นกรดด่างไม่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกจึงทำให้มีการผลิตกรดโคจิกได้ในปริมาณต่ำมาก จากผลการทดลองทั้งหมดจึงพบว่าการผลิตกรดโคจิกโดยจัดภาวะที่เหมาะกับการเติบโตของสายใยตลอดการเพาะเลี้ยงเป็นวิธีการที่เพิ่มการเติบโตได้แต่ไม่สามาถเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกได้ เพราะภาวะที่จัดให้ตลอดการเพาะเลี้ยงนั้นเหมาะกับการเติบโต แต่ไม่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกและการที่มีปริมาณออกซิเจนละลายที่มากเกินไปอาจไม่ได้ส่งเสริมระบบเอนไซม์เพื่อการผลิตกรด

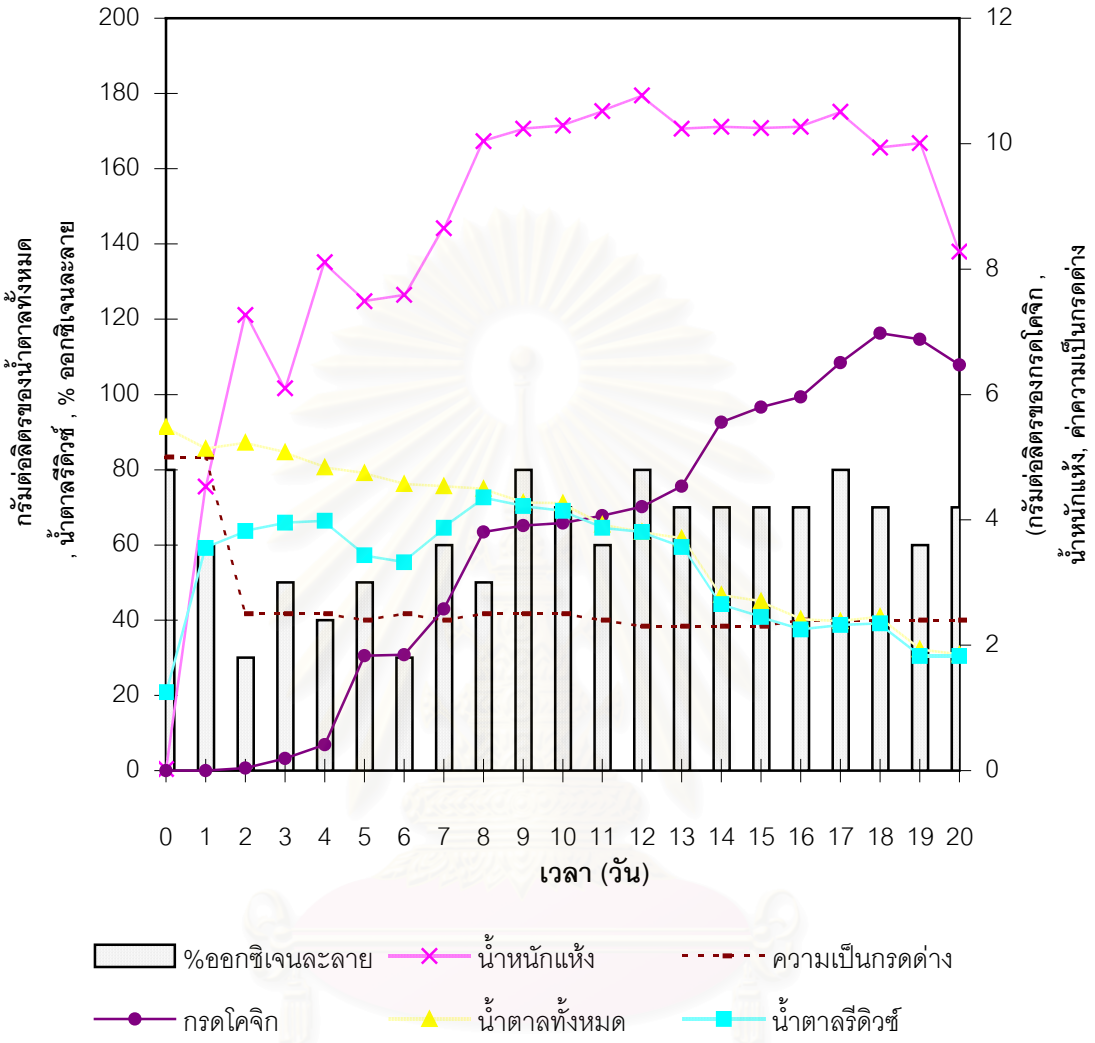


รูปที่ 30 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลายและความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโตคือ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัวและ 5.0 ตลอดการเพาะเลี้ยง

โคจิกมากนัก ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงลองศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยปรับรูปแบบการจัดภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโตเพื่อดูว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าภาวะความเป็นกรดด่างจะมีผลทำให้การผลิตกรดโคจิกมีการเปลี่ยนแปลงไป

4.1.2 ผลการผลิตกรดโคจิกภายใต้ค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะสมกับการเติบโตตลอดการทดลองแต่จัดค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรใช้หัวเชื้อสปอร์งอกขนาด 10 %ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 1,500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30±1 องศาเซลเซียสตลอดการเพาะเลี้ยง จัดค่าออกซิเจนละลายที่ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัวตลอดการทดลอง และลองเปลี่ยนการปรับค่าความเป็นกรดด่างโดยจัดแค่ค่าตั้งต้นที่ 5.0 ทำการทดลอง 20 วัน ผลการทดลองพบว่ามีการผลิตกรดโคจิกสูงขึ้นเท่ากับ 6.98 g/l โดยใช้เวลาเร็วขึ้นเป็นวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง แต่น้ำหนักสายใยแห้งลดลงเล็กน้อยเท่ากับ 10.77 g/l และกลับพบว่าใช้เวลาในการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสนานถึง 8 วัน แต่เนื่องจากมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นและการเติบโตก็ยังมีมากอยู่ น้ำตาลรีดิวซ์จึงถูกใช้มากขึ้นจึงทำให้เหลือน้อยลงที่ 30.46 g/l เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงค่าความเป็นกรดด่างจะค่อยๆลดลงจนกระทั่งอยู่ในช่วง 2.4-2.6 ตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงและในช่วงเวลานั้นไม่เหมาะกับการเติบโตเลย เพราะการเติบโตจะมีค่าที่แปรปรวนมากส่งผลให้มีการเข้าสู่ภาวะคงที่ของการเติบโตซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะต่อการผลิตกรดโคจิกช้าด้วย ปริมาณกรดโคจิกที่เพิ่มขึ้นจึงเกิดหลังจากที่การเติบโตไม่มีการแปรปรวนมากนักในช่วงหลังจากนั้น (รูปที่ 31) และในการทดลองนี้เมื่อคิดอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุดจะได้มากขึ้นคือเท่ากับ 0.283 g/l/d จะเห็นได้ว่าในภาวะนี้จะมีการผลิตกรดโคจิกได้ไม่มากและถึงแม้จะใช้เวลาเร็วกว่าการทดลองที่แล้วแต่ก็ใช้เวลานานถึง 18 วัน อาจเป็นเพราะการให้ออกซิเจนละลายที่มากอาจไม่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกจึงทำให้สายใยรานำน้ำตาลรีดิวซ์ไปผลิตกรดโคจิกได้น้อย ดังนั้นในภาวะดังกล่าวนี้จึงไม่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิก เพราะยังมีการให้ค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะกับการเติบโตเพียงอย่างเดียวตลอดการทดลองเหมือนในข้อที่ 4.1.1 แต่สิ่งที่แตกต่างจากข้อ 4.1.1 คือ ค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่ามีการลดลงในระหว่างการเพาะเลี้ยงซึ่ง



รูปที่ 31 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิต กรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว และจัดค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นเท่ากับ 5.0

จะทำให้มีการผลิตกรดโคจิกสูงกว่าและมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่มากกว่า ถึงแม้ว่าจะมีการเติบโตที่น้อยกว่าก็ตาม แสดงว่าในภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการเพาะเลี้ยงที่ต่ำลงนี้จะทำให้เกิดภาวะที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกมากขึ้น แต่อาจจะทำให้เหมาะกับการเติบโตน้อยลง เนื่องจากภาวะในข้อ 4.1.1 และ 4.1.2 มีค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนแปลงต่างกันส่งผลให้มีการผลิตกรดโคจิกไม่เท่ากันและการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสก็ใช้เวลาไม่เท่ากันด้วย จากผลการทดลองทั้งสองจึงทำให้เห็นว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงภาวะความเป็นกรดด่างระหว่างการเพาะเลี้ยงโดยเมื่อมีค่าความเป็นกรดด่างลดลงจะทำให้มีการผลิตกรดโคจิกดีขึ้น ถ้ามีการปรับภาวะค่าออกซิเจนละลายระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยอาจส่งผลให้มีการผลิตกรดโคจิกที่สูงขึ้นได้ ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงสนใจที่จะทำการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตกรดโคจิกโดยแบ่งภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายและความเป็นกรดด่างเป็น 2 ช่วง เพื่อให้เหมาะกับการเติบโตและการผลิตกรดโดยคาดหวังว่าจะมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้น

4.2 ผลการหาค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่าง 2 ช่วง ที่เหมาะต่อการผลิตกรดโคจิก

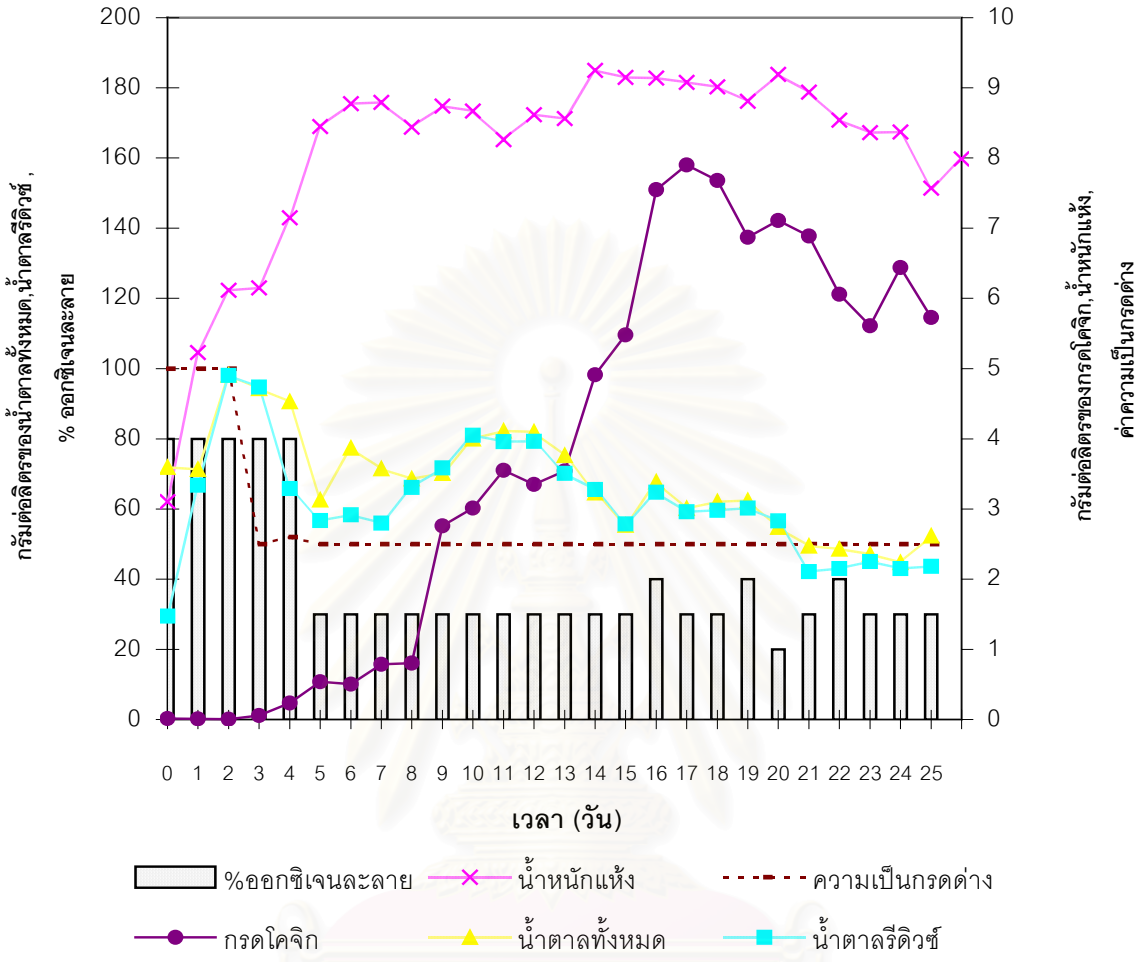
เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* K-13 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้หัวเชื้อสปอร์งอกขนาด 10 %ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 1,500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30±1 องศาเซลเซียสตลอดการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 20 วัน โดยมีการแบ่งการควบคุมค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่าง 2 ช่วง เพื่อให้เหมาะกับการเติบโตเหมาะและการผลิตกรดโคจิก ทั้งนี้เพราะจากการทดลองที่ 4.1.2 พบว่าเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงภาวะความเป็นกรดด่างระหว่างการเพาะเลี้ยงทำให้น้ำหนักแห้งสายใยน้อยลงแต่ทำให้มีแนวโน้มการผลิตมากขึ้น ในการทดลองข้อนี้จึงเห็นว่าการจัดภาวะให้เหมาะกับการเติบโตให้ได้เต็มที่ก่อนในช่วงแรกจะไม่ทำให้การเติบโตลดลงและมีปริมาณสายใยเพื่อใช้ในการผลิตกรดโคจิกได้เต็มที่โดยช่วงการเติบโตนี้จะใช้เวลานาน 54 ชั่วโมง (เพราะจากผลการทดลองข้อ 3 พบว่าเวลาที่สายใยใช้ในการเติบโตจนได้การเติบโตสูงสุดและเข้าสู่ภาวะคงที่ของการเติบโตในภาวะที่เหมาะที่สุดสำหรับการเติบโตคือ 54 ชั่วโมง)หลังจากนั้นจึงปรับให้เข้าสู่

ภาวะที่คาดว่าจะเหมาะกับการผลิตกรดโคจิกเพื่อให้สายใยที่ได้ในช่วงการเติบโตสามารถผลิตกรดโคจิกได้เต็มที่ต่อไป

4.2.1 **ผลการผลิตกรดโคจิกเมื่อจัดค่าออกซิเจนละลายที่ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 นาน 54 ชั่วโมง แล้วจึงปรับค่าออกซิเจนละลายลงเป็น 30% ของค่าอากาศอิ่มตัว และปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2.5 ทันที**

ผลการทดลองพบว่ามีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเพียง 7.9 g/l ในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยง มีน้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 9.25 g/l มีการสลายน้ำตาลไปกลูโคสและฟรัคโตสได้ภายใน 2 วัน (โดยตรวจวัดในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์) เพราะมีการจัดให้ค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโตและส่งผลให้มีการสร้างอินเวอร์เทสที่จะใช้สลายน้ำตาลได้ดีด้วยในช่วง 54 ชั่วโมงแรก แต่กลับพบว่ามีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพื่อการผลิตและการเติบโตน้อยจึงทำให้เหลือน้ำตาลรีดิวซ์ในวันสิ้นสุดการทดลองสูงถึง 43.60 g/l (รูปที่ 32) และเมื่อพิจารณาอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุดจะได้เพียง 0.129 g/l/d จะเห็นได้ว่าในการทดลองนี้มีการผลิตกรดโคจิกช้าและได้ปริมาณมากขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับผลการทดลองในข้อ 4.1 ทั้งๆที่คาดว่าเมื่อมีการแบ่งภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างออกเป็น 2 ช่วงจะทำให้ผลผลิตกรดดีขึ้น อาจจะเป็นเพราะมีการปรับค่าความเป็นกรดด่างจาก 5.0 เป็น 2.5 อย่างกระทันหันทำให้มีการเปลี่ยนแปลงภาวะอย่างรวดเร็วเกินไป ส่งผลต่อการปรับตัวของสายใยซึ่งทำให้การผลิตกรดโคจิกมีประสิทธิภาพไม่เต็มที่จึงพบว่าเมื่อค่าความเป็นกรดด่างลดลงทันทีการผลิตกรดโคจิกจึงยังไม่เพิ่มขึ้นจนกระทั่งเมื่อการเติบโตเริ่มไม่แปรปรวนการผลิตกรดโคจิกจึงสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดและเนื่องจากมีการสูญเสียเวลาในการปรับตัวของสายใยในช่วงต้นของการทดลองจึงทำให้น้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้เพื่อการผลิตกรดโคจิกได้น้อยด้วย

จากผลการทดลองนี้จึงทำให้เห็นว่ามีแนวโน้มที่การผลิตกรดโคจิกจะเพิ่มขึ้นได้เมื่อมีการจัดค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2 ช่วง แต่ควรเปลี่ยนวิธีการปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมกว่านี้และส่งผลกระทบต่อสายใยน้อยที่สุด

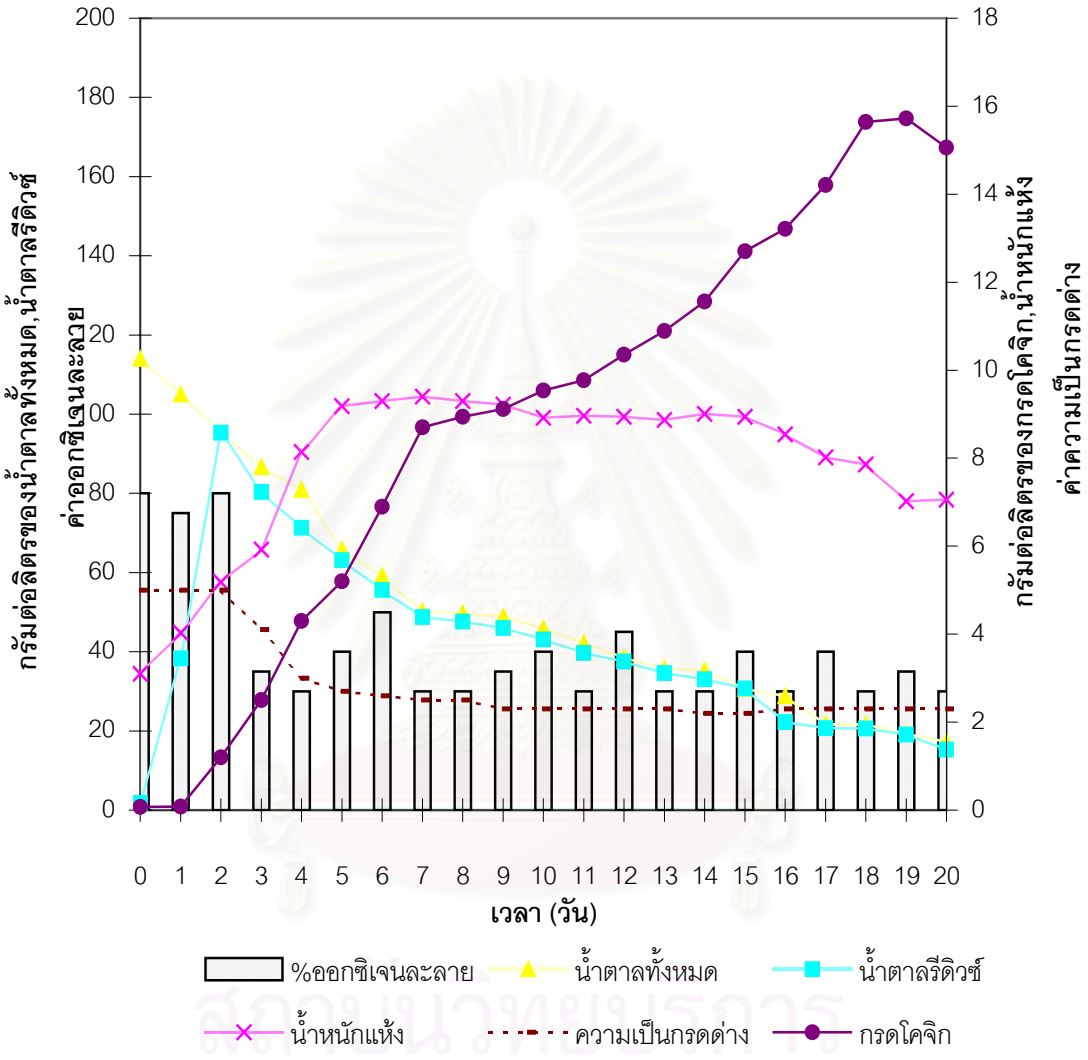


รูปที่ 32 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลายและความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโต (ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ80%ของค่าอากาศอิ่มตัว,ความเป็นกรดด่าง 5.0) เป็นเวลา 54 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับภาวะการให้อากาศเป็น 30%ของค่าอากาศอิ่มตัว ความเป็นกรดด่างเป็น 2.5 ทันที

ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงสนใจที่จะทดลองการผลิตกรดโคจิกโดยจัดภาวะเป็น 2 ช่วง เช่นเดิม แต่เปลี่ยนวิธีการปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมขึ้น

4.2.2 ผลการผลิตกรดโคจิกเมื่อจัดค่าออกซิเจนละลายที่ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัว และความเป็นกรดด่างที่ 5.0 เป็นเวลานาน 54 ชั่วโมง แล้วจึงปรับค่าออกซิเจนละลายเป็น 30% และค่อย ๆปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2.5 ใน 48 ชั่วโมง

จากผลการทดลองพบว่ามีการผลิตกรดโคจิกได้มากขึ้นถึง 15.72 g/l ในวันที่ใกล้เคียงกับ 4.2.1 คือวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง ให้น้ำหนักสายใยแห้งใกล้เคียงกันด้วยซึ่งเท่ากับ 9.4 g/l เนื่องจากจัดภาวะที่เหมาะกับการเติบโตและการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสในช่วง 54 ชั่วโมงแรกเหมือนกัน จึงทำให้มีการสลายน้ำตาลทรายได้อย่างรวดเร็วภายใน 2 วัน เมื่อมีปริมาณน้ำตาลพร้อมที่จะให้ใช้ในการเติบโตและผลิตได้เร็วประกอบกับมีการจัดภาวะให้เหมาะกับการเติบโตและการผลิตดีกว่าทุกภาวะที่กล่าวมาเลยทำให้มีการใช้น้ำตาลได้มากจึงพบว่า น้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยลงเมื่อสิ้นสุดการทดลองซึ่งเหลืออยู่เท่ากับ 19.52 g/l (รูปที่ 33) เมื่อหาอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุดจะได้มากขึ้นเท่ากับ 0.369 g/l/d จะเห็นได้ว่าเมื่อค่อยๆ ปรับค่าความเป็นกรดด่างจาก 5.0 เป็น 2.5 ทำให้มีการผลิตกรดโคจิกสูงขึ้นอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในข้อ 4.2.1 และเมื่อค่อยๆปรับลดค่าความเป็นกรดด่างก็พบว่าสามารถผลิตขึ้นได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่ต้องใช้ระยะเวลาปรับตัว เพราะฉะนั้นภาวะการปรับค่าความเป็นกรดด่างจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการผลิตกรดโคจิก เมื่อมีการปรับค่าความเป็นกรดด่างโดยให้สายใยได้ค่อยๆปรับตัวตามภาวะความเป็นกรดด่างที่ลดลง จึงทำให้สายใยยังคงมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโคจิกได้ และเนื่องจากในการทดลองนี้มีการจัดภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลาย และค่าความเป็นกรดด่างออกเป็น 2 ช่วงคือ ให้เหมาะกับการเติบโตและภาวะที่คาดว่าจะเหมาะกับการผลิตกรดโคจิก จึงทำให้มีการผลิตกรดโคจิกในปริมาณสูงขึ้นมากกว่าการทดลอง 4.2.1 โดยให้กรดโคจิกสูงกว่าถึง 7.82 g/l ในเวลาที่ใกล้เคียงกันจึงทำให้มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าด้วย

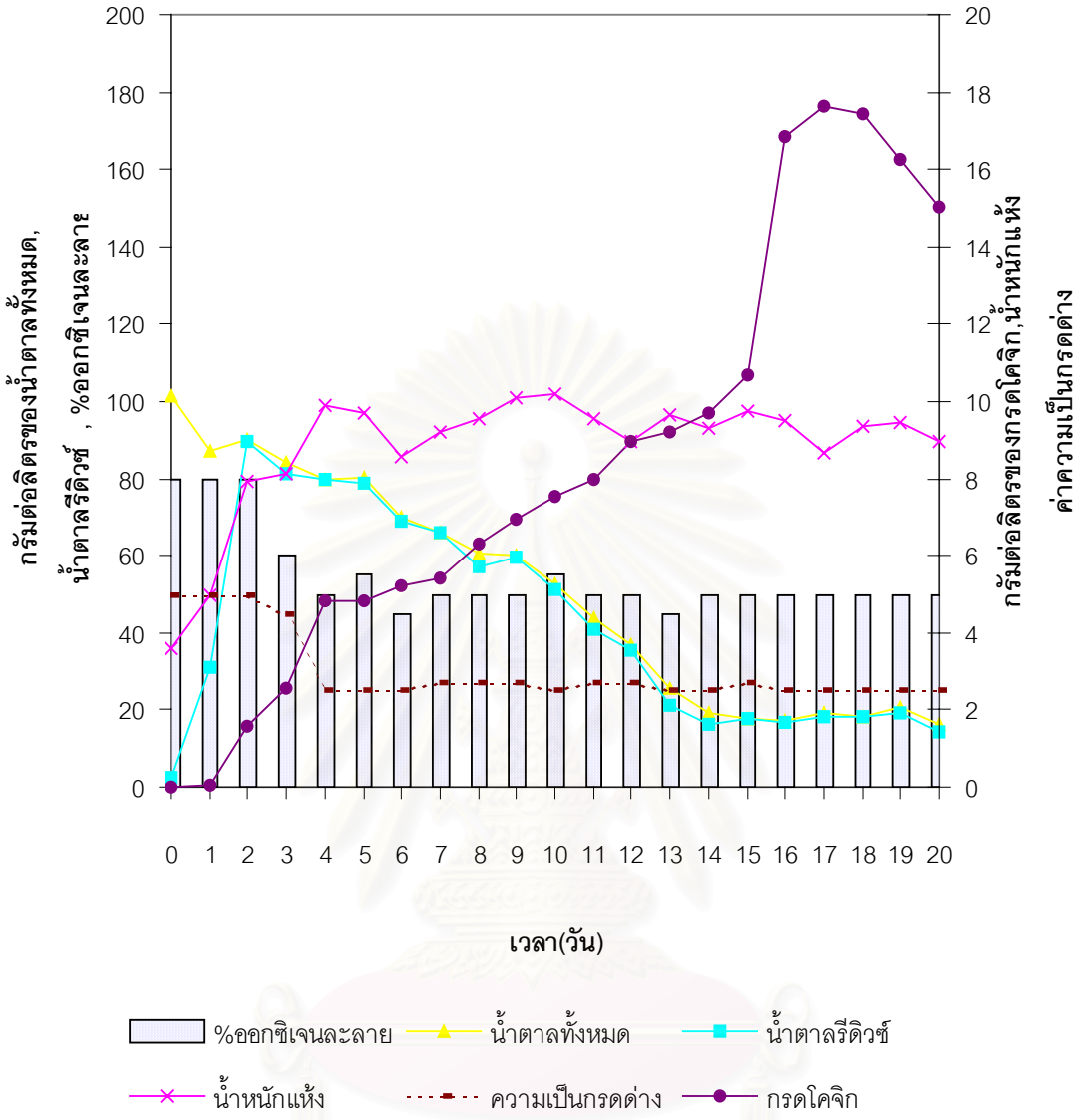


รูปที่ 33 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเมื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลายและความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโต(ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ80%ของค่าอากาศอิ่มตัว,ความเป็นกรดด่าง 5.0) เป็นเวลา 54 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับภาวะการให้อากาศเป็น 30%ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่อยๆปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2.5 ภายใน 48ชั่วโมง

จากผลการทดลองทำให้เห็นว่าการจัดภาวะให้เหมาะสมกับการเติบโตใน 54 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นปรับภาวะค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างโดยค่อยๆ ปรับลงมาที่ระดับ 2.5 จึงเป็นวิธีที่เหมาะสม และปรับลดค่าออกซิเจนละลายมาอยู่ที่ 30%ของค่าอากาศอิ่มตัว สามารถทำให้มีการผลิตกรดโคจิกสูงขึ้นได้ ดังนั้นการทดลองต่อไปต้องการที่จะหาค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะกับการผลิตค่าอื่นๆ โดยใช้วิธีการปรับค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมแล้วจากผลการทดลองในข้อนี้

4.2.3 ผลการผลิตกรดโคจิกเมื่อจัดค่าออกซิเจนละลายที่ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัว และความเป็นกรดด่างที่ 5.0 เป็นเวลานาน 54 ชั่วโมง แล้วจึงปรับค่าออกซิเจนละลายเป็น 50% และค่อย ๆปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2.5 ใน 48 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่า มีการผลิตกรดโคจิกสูงถึง 17.64 g/l ในเวลาที่เร็วขึ้นคือ 17 วัน โดยมีน้ำหนักสายใยแห้งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเท่ากับ 10.2 g/l เช่นเดียวกับผลการทดลองข้อ 4.2.1 และ 4.2.2 มีการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสได้อย่างรวดเร็วภายใน 2 วันเพราะได้จัดภาวะที่เหมาะกับการเติบโตในช่วงเวลานั้นส่งผลให้มีการสลายน้ำตาลทรายได้รวดเร็วเช่นกัน เนื่องจากมีการผลิตกรดโคจิกมากจึงมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพื่อการผลิตมากขึ้นเลยพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองจึงเหลือน้อยเท่ากับ 15.25 g/l (รูปที่ 34) เมื่อหาอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุดในการทดลองนี้จะได้สูงขึ้นคือ 0.386 g/l/d จะเห็นได้ว่าเมื่อเปลี่ยนมาใช้ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 50% ของค่าอากาศอิ่มตัวในการผลิตกรดโคจิก จะทำให้มีการผลิตกรดโคจิกสูงกว่าเมื่อใช้ค่าออกซิเจนละลายที่ 30% ของอากาศอิ่มตัว (จากผลการทดลองในข้อ 4.2.2) เท่ากับ 1.92 g/l และให้กรดโคจิกสูงสุดเร็วขึ้นอีก 2 วันและเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในข้อที่ 4.2.1 ก็ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงกว่า 9.74 g/l ถึงแม้จะใช้เวลา 17 วันเท่ากันก็ตาม โดยที่ในผลการทดลองที่ 4.2.1 4.2.2 และ 4.2.3 มีน้ำหนักสายใยแห้งใกล้เคียงกัน เพราะมีการจัดภาวะในช่วงการเติบโตสายใยเหมือนกัน แสดงว่าการจัดภาวะค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่าง 2 ช่วงที่เหมาะกับการเติบโตและการผลิตโดยให้ค่อยๆปรับค่าความเป็นกรดด่างเพื่อให้สายใยสามารถปรับตัวเข้ากับค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนไปได้และทำให้ผลของการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างส่งผลให้



รูปที่ 34 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเมื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลายและความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโต(ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ80%ของค่าอากาศอิ่มตัว,ความเป็นกรดด่าง 5.0) เป็นเวลา 54 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับภาวะการให้อากาศเป็น 50%ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่อยๆปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2.5 ภายใน 48ชั่วโมง

กระทบต่อระบบเอนไซม์ในการผลิตกรดน้อยลง จะทำให้มีการผลิตกรดโคจิกสูงขึ้นได้ โดยภาวะการให้ออกซิเจนละลายที่เหมาะต่อการผลิต คือที่ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 50 %ของค่าอากาศอิ่มตัวเพราะให้การผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด (และเมื่อพิจารณาอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุด ก็พบว่าเมื่อจัดให้ค่าออกซิเจนละลายในการผลิตที่ 50 % ของค่าอากาศอิ่มตัว ก็ให้อัตราการผลิตสูงสุดเช่นกัน) แต่เมื่อพิจารณาผลผลิตกรดโคจิกในช่วงท้ายของการทดลองของทั้ง 3 ภาวะ (ข้อ 4.2.1 4.2.2 และ 4.2.3) พบว่าจะมีการลดลงของกรดโคจิกถึงแม้ว่าจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือแสดงว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงบางอย่างในระบบ เช่น ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการผลิตลดลง ความเสถียรภาพของสายใยในการผลิตกรดลดลงและอาจจะมีการนำกรดโคจิกไปใช้ควบคู่กับน้ำตาลก็ได้

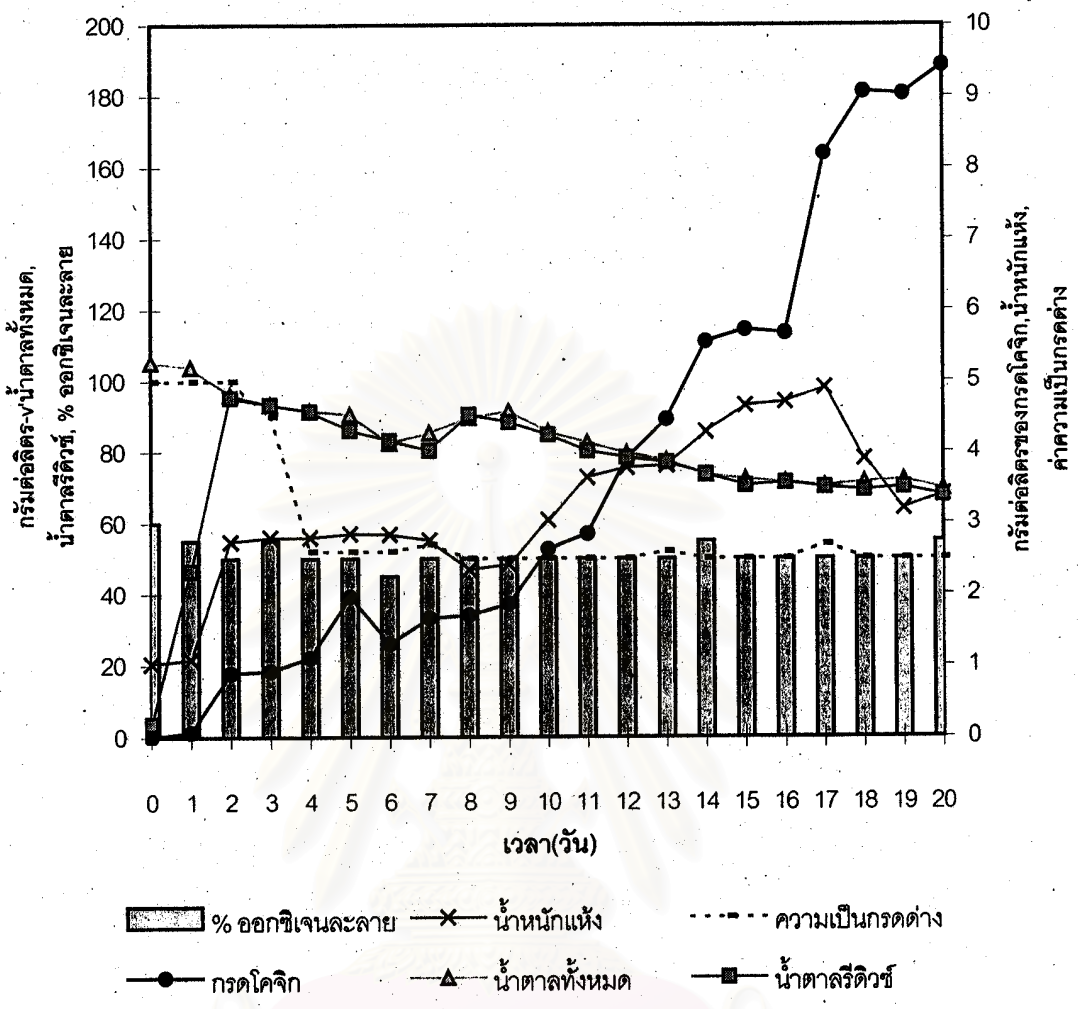
จากผลการทดลองข้อ 4.2.1 4.2.2 4.2.3 ทำให้เห็นว่าการจัดภาวะให้เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกโดยจัดภาวะค่าออกซิเจนละลาย และค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2 ช่วง ซึ่งจะต้องปรับค่าออกซิเจนละลายที่ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ที่เหมาะกับการเติบโตก่อนและปรับให้เหมาะกับการผลิต ณ ชั่วโมงที่ 54 ของการเพาะเลี้ยง โดยปรับค่าออกซิเจนละลายเป็น 50 %ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่อยๆปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2.5 ภายใน 48 ชั่วโมงจากการทดลองนี้จะได้ภาวะที่เหมาะกับการผลิต ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะทดลองผลิตกรดโคจิกโดยจัดภาวะที่เหมาะกับการผลิตตลอดการทดลอง เพื่อดูความเป็นไปได้ของการลดขั้นตอนการจัดภาวะเป็น 2 ช่วง

4.3 ผลการผลิตกรดโคจิกภายใต้ภาวะการให้ออกซิเจนละลายที่เหมาะกับการผลิตตลอดการเพาะเลี้ยง

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรใช้หัวเชื้อสปอร์งอกขนาด 10 %ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 1,500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30±1 องศาเซลเซียสโดยจัดภาวะให้เหมาะกับการผลิตตลอดคือ ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 2.5 และมีการกำหนดค่าออกซิเจนละลายที่ 50 %ของค่าอากาศอิ่มตัวตลอดการทดลอง ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 20 วัน ผลการทดลองพบว่าผลิตกรดโคจิกได้เพียง 9.43 g/l ใช้เวลานานถึง 20 วัน มีน้ำหนักสายใยแห้งสูงสุดเพียง 4.9 g/l มีการสลายน้ำตาลไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสภายใน 2 วัน

และมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือสูงถึง 67.73 g/l เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 35) และเมื่อพิจารณาอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุดจะได้เพียง 0.148 g/l/d แสดงให้เห็นว่าการจัดภาวะออกซิเจนละลายให้เหมาะกับการผลิตเพียงอย่างเดียวจะทำให้ได้น้ำหนักสายใยแห้งน้อยถึงแม้จะมีการสลายน้ำตาลทรายเป็นกลูโคสและฟรัคโตสได้เร็วก็ตามแต่การผลิตกรดโคจิกไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ จึงทำให้ได้ปริมาณกรดโคจิกน้อยเมื่อเทียบกับผลการทดลองที่ 4.2.1 4.2.2 4.2.3 ซึ่งมีการจัดภาวะค่าออกซิเจนละลายเป็น 2 ช่วง เมื่อมีการผลิตกรดโคจิกน้อยและการเติบโตต่ำ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือจึงมีปริมาณสูง เพราะมีการนำน้ำตาลรีดิวซ์ไปใช้ผลิตกรดโคจิกน้อยแต่ก็พบว่าผลผลิตกรดโคจิกยังมากกว่าในการทดลองที่ 4.1.1 ที่จัดภาวะให้เหมาะกับการเติบโตเพียงอย่างเดียว เพราะในภาวะข้อนี้ยังมีช่วงเวลาที่มีภาวะที่เหมาะกับการผลิตอยู่บ้างแต่ที่ผลผลิตกรดไม่ดีเพราะปริมาณสายใยที่ถูกสร้างขึ้นน้อยในช่วงของการเติบโตดังนั้นการผลิตกรดโคจิกในภาวะนี้จึงไม่เหมาะสม เนื่องจากจัดภาวะไม่เหมาะกับการเติบโตในช่วง 54 ชั่วโมงแรกจึงทำให้มีสายใยราที่ใช้ผลิตกรดโคจิกน้อยส่งผลให้ในช่วงการผลิตกรดจึงผลิตกรดได้ปริมาณน้อยด้วย

จากการทดลองข้อ 14.1 –14.3 แสดงให้เห็นว่าในการผลิตกรดโคจิกมีความจำเป็นต้องจัดภาวะให้เหมาะสมต่อทั้งการเติบโตสายใยและการผลิตกรดโคจิก โดยภาวะที่เหมาะที่สุดในการผลิตกรดโคจิกคือภาวะจากข้อ 4.2.3 โดยจัดภาวะออกซิเจนละลายที่ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 นาน 54 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับออกซิเจนละลายเป็น 50%ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่อยๆปรับค่าความเป็นกรดด่างลงเป็น 2.5 ภายใน 48 ชั่วโมง เมื่อนำค่าอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุดมาพิจารณาเปรียบเทียบกัน ก็จะพบว่าภาวะดังกล่าวในผลการทดลองที่ 4.2.3 ทำให้มีอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุดสูงสุดเช่นกัน (ตารางที่ 6)



รูปที่ 35 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลายและความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกคือ 50%ของค่าอากาศอิ่มตัว ค่าความเป็นกรดด่างที่ 2.5 ตลอดการเพาะเลี้ยง

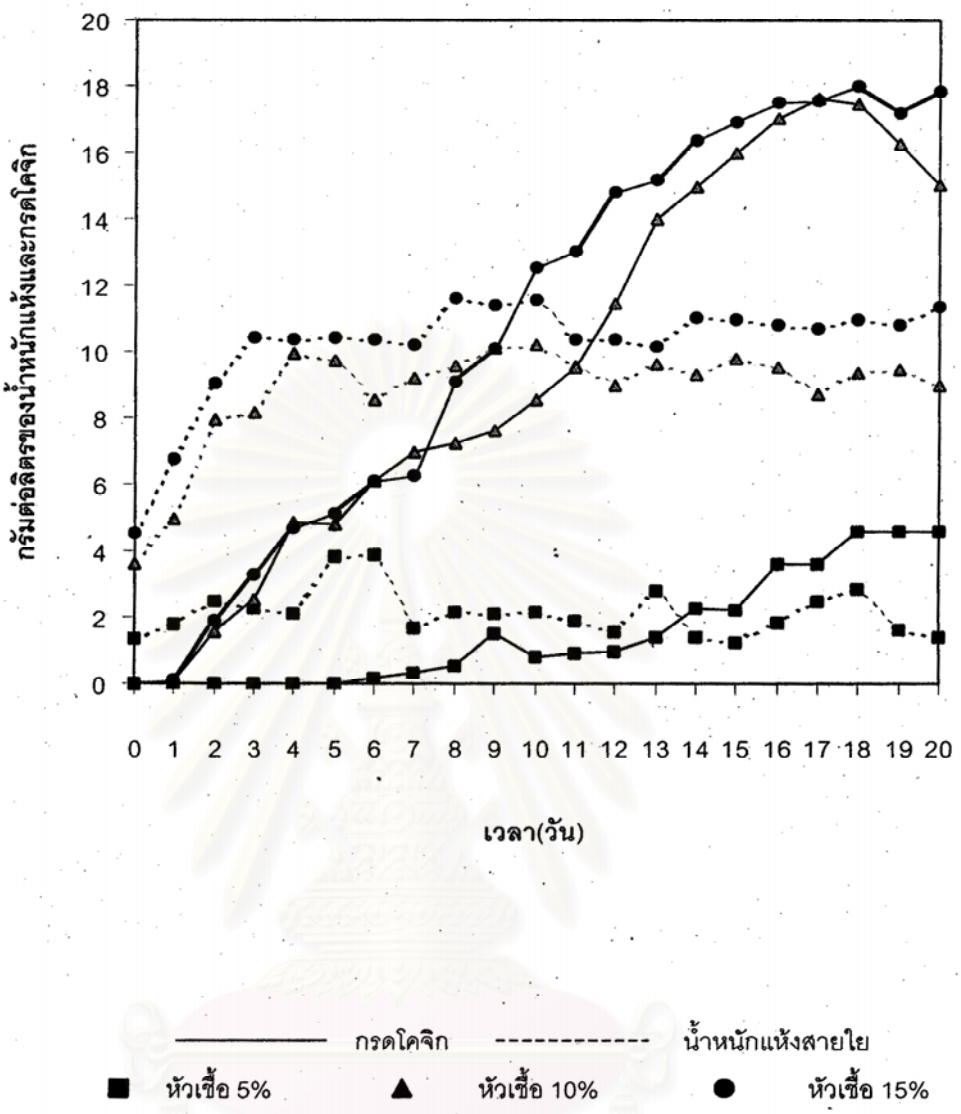
ตารางที่ 6 อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุด ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด วันที่มีการผลิตกรดสูงสุด เวลาที่ใช้ในการสลายน้ำตาลทราย และน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในวันสิ้นสุดการทดลอง ของการหาค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตกรดโคจิก

ผลการทดลองที่	อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุด (g/l/d)	กรดโคจิกสูงสุด (g/l)	วันที่มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด (วัน)	เวลาที่ใช้ในการสลายน้ำตาลทราย (วัน)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันสิ้นสุดการทดลอง(g/l)
4.1.1	0.153	4.84	20	2	55.00
4.1.2	0.283	6.98	18	8	30.46
4.2.1	0.129	7.90	17	2	43.60
4.2.2	0.369	15.72	18	2	19.52
4.2.3	0.386	17.64	17	2	15.25
4.3	0.148	9.43	20	2	67.73

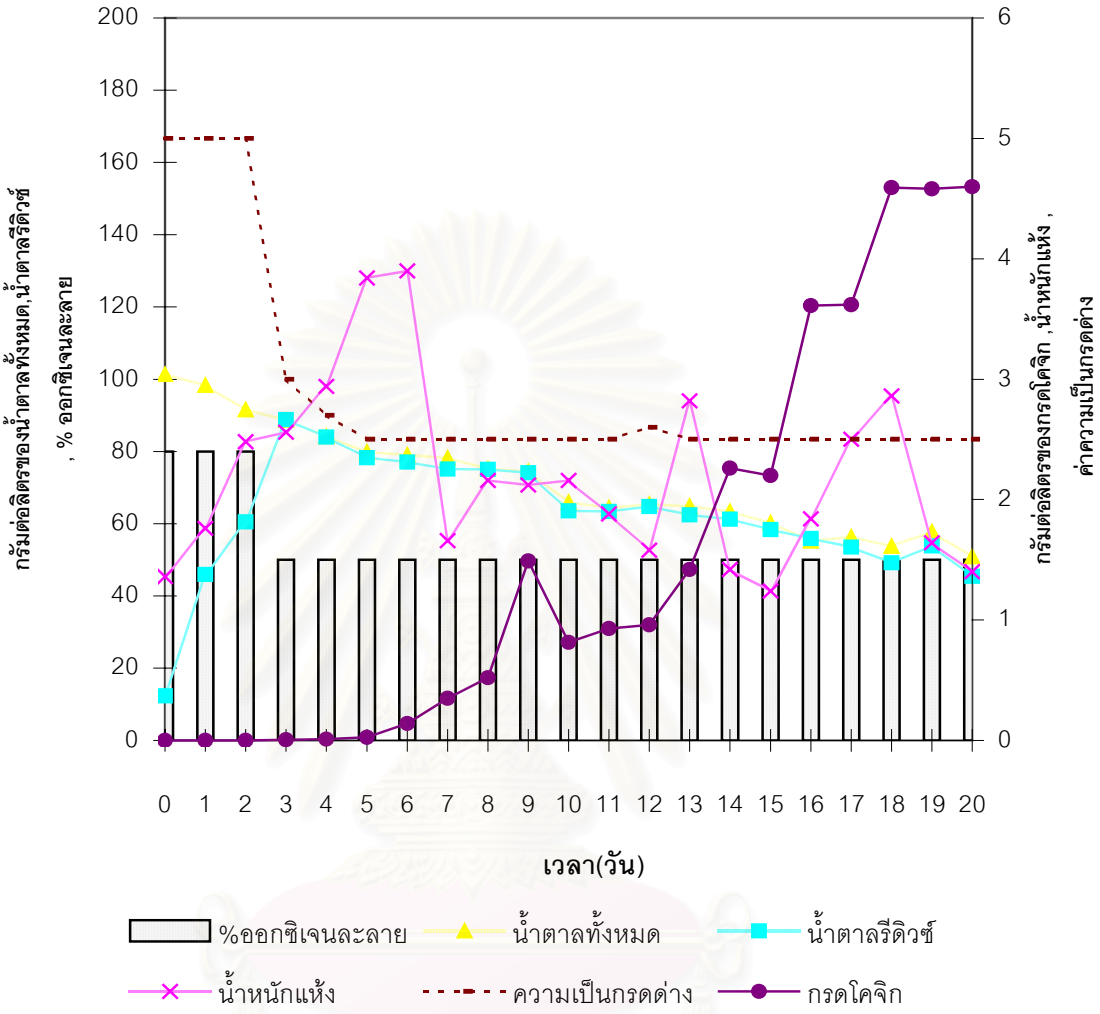
5. **ผลการหาขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก**

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในถังหมัก 2 ลิตรโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 1,500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30±1 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน จัดภาวะที่ได้ศึกษามาจากข้อ 4 เพื่อทำให้เหมาะกับการเติบโตและการผลิต โดยจัดค่าออกซิเจนละลายที่ 80 %ของค่าอากาศอิ่มตัว ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะกับการเติบโตของสายใย นาน 54 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับค่าออกซิเจนละลายเป็น 50 % ของค่าอากาศอิ่มตัว ค่อยๆปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ลดลงจนเท่ากับ 2.5 ภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิก แปรผันขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกเป็น 5% 10% และ 15% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ขนาดหัวเชื้อที่ 10 % ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดที่ 17.55 g/l ในวันที่ 17 ซึ่งใกล้เคียงกับการผลิตเมื่อให้หัวเชื้อสปอร์งอกขนาด 15 % ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเท่ากับ 17.98 g/l ในวันที่ 18 และเมื่อ

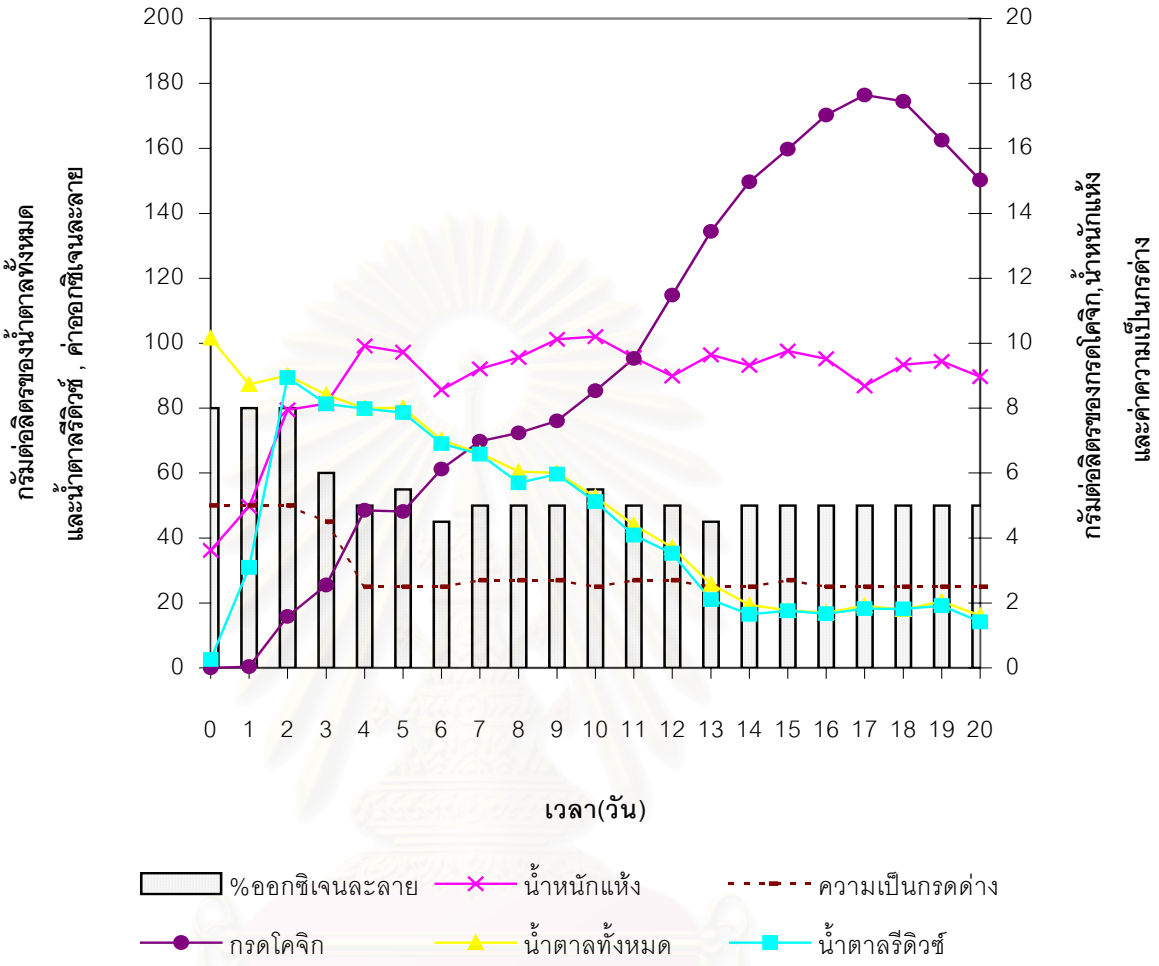
ให้หัวเชื้อสปอร์งอกขนาด 5% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะให้ปริมาณกรดโคจิกน้อยที่สุดแค่เพียง 4.6 g/l ใช้เวลานานถึง 20 วัน พบว่าน้ำหนักสายใยแห้งจะแปรตามขนาดหัวเชื้อคือ เมื่อให้หัวเชื้อขนาด 15 % 10% และ 5% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 11.6 10.2 และ 3.9 g/l ตามลำดับ (รูปที่ 36) เมื่อมีปริมาณสายใยมาก การเติบโตมาก ค่าออกซิเจนละลายจะควบคุมได้ยากขึ้น ดังจะเห็นจากภาวะที่ใช้หัวเชื้อสปอร์งอกที่ 15% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีการแปรปรวนของค่าออกซิเจนละลายมากกว่าที่หัวเชื้อสปอร์งอกขนาด 10 % และ 5% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 37-39) ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุให้การใช้ขนาดหัวเชื้อที่ 15%ซึ่งมีสายใยมากที่สุดกลับผลิตได้ไม่แตกต่างกับภาวะที่มีสายใยน้อยกว่าที่ขนาดหัวเชื้อ 10%เพราะเมื่อมีการแปรปรวนของภาวะค่าออกซิเจนละลายอาจส่งผลต่อระบบการทำงานของเอนไซม์เพื่อการผลิตกรดโคจิก เมื่อมีการผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณต่างๆกัน ดังนั้นในการใช้ขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกที่ 15 % ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงให้กรดโคจิกใกล้เคียงกับการใช้ขนาดหัวเชื้อที่10%ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยไล่เลี่ยกับเมื่อใช้หัวเชื้อสปอร์งอกขนาด 10 % ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย เพราะที่ 15%ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลือเท่ากับ 14.15 g/l และที่ 10% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลือเท่ากับ 15.32 g/l ถึงแม้ว่าที่ 15%ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีน้ำหนักสายใยแห้งมากกว่าเล็กน้อยก็ตามและที่ขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกที่ 5% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้การผลิตกรดโคจิกต่ำและน้ำหนักสายใยแห้งน้อย จึงมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือมากที่สุดเท่ากับ 42.45 g/l และพบว่าที่ขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกที่ 10% และ 15% ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จะสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสได้ใน 2 วัน แต่ที่ 5%ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ สลายน้ำตาลทรายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ได้ช้ากว่าในวันที่ 3 เนื่องจากที่ 10%และ 15%ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณสายใยมากกว่าทำให้มีอินเวอร์เทสสูงกว่าส่งผลให้มีการสลายน้ำตาลทรายเป็นกลูโคสและฟรัคโตสได้เร็วกว่า(รูปที่ 40)



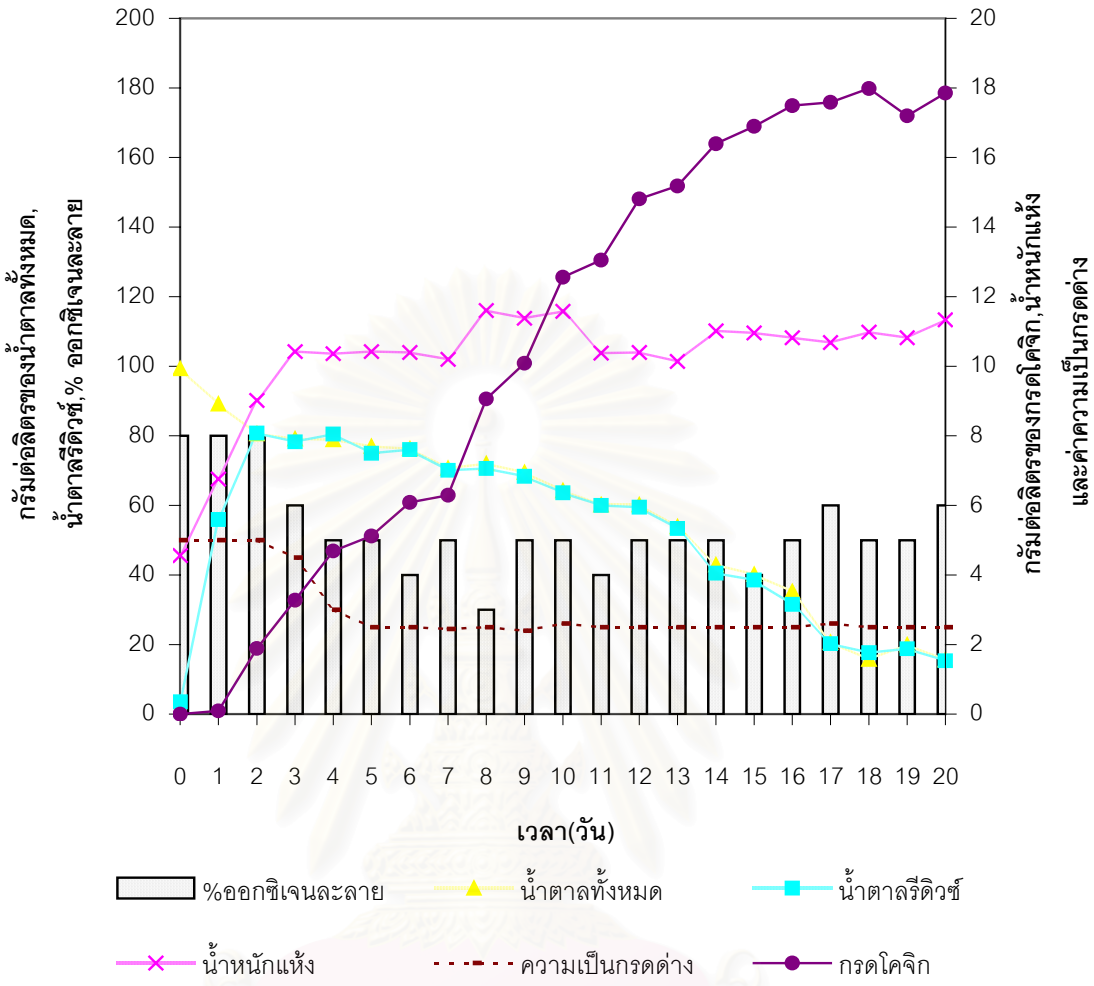
รูปที่ 36 กรดโคจิก และน้ำหนักแห้งสายใย เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13เพื่อการผลิตกรดโคจิกในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่มีภาวะเหมาะกับการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิต เมื่อแปรปริมาณหัวเชื้อสปอร์งอกต่างๆกัน



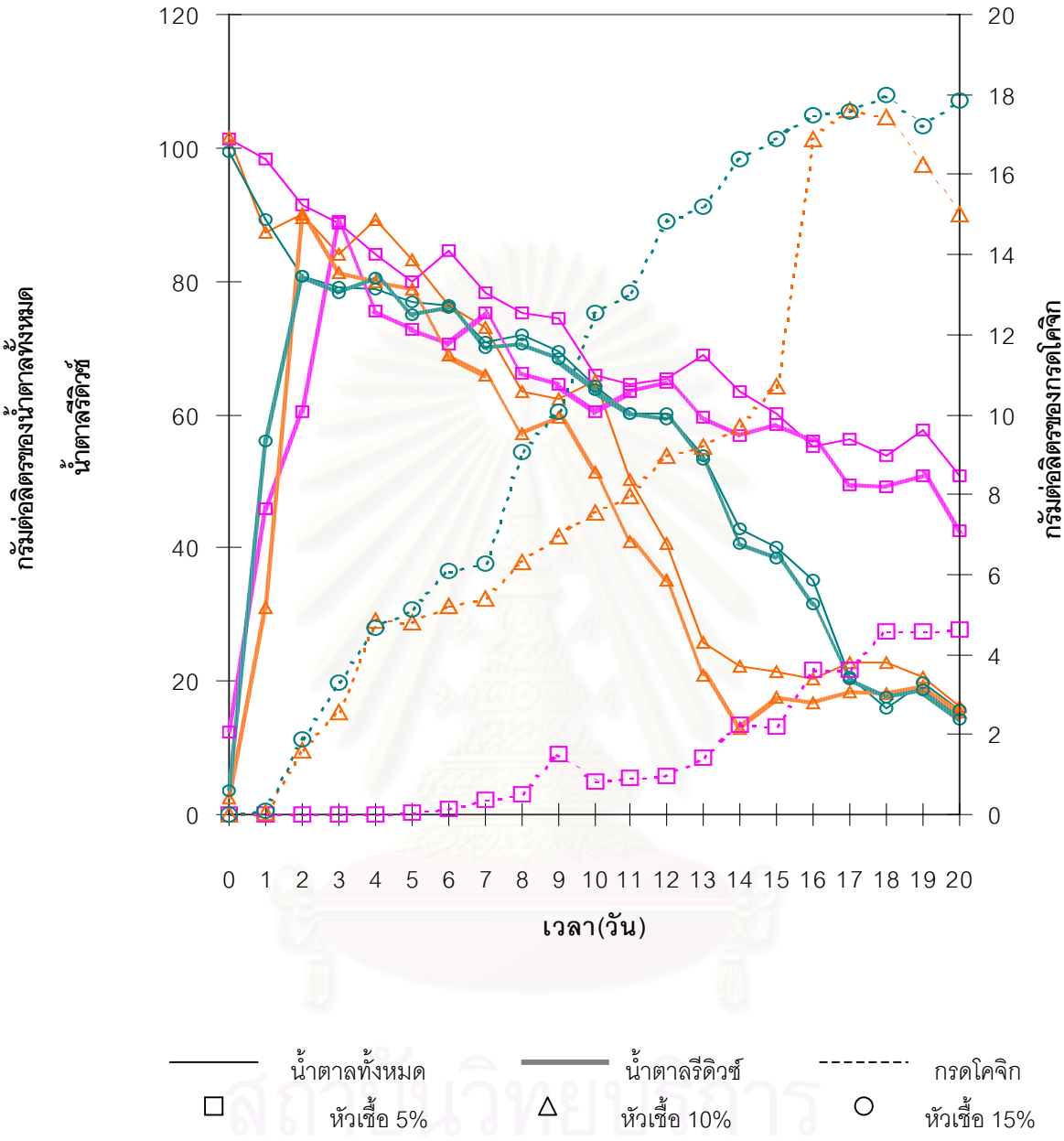
รูปที่ 37 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลายที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ภาวะที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้ขนาดหัวเชื้อ 5% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 38 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ภาวะที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้ขนาดหัวเชื้อ 10% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 39 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ภาวะที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้ขนาดหัวเชื้อ 15% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

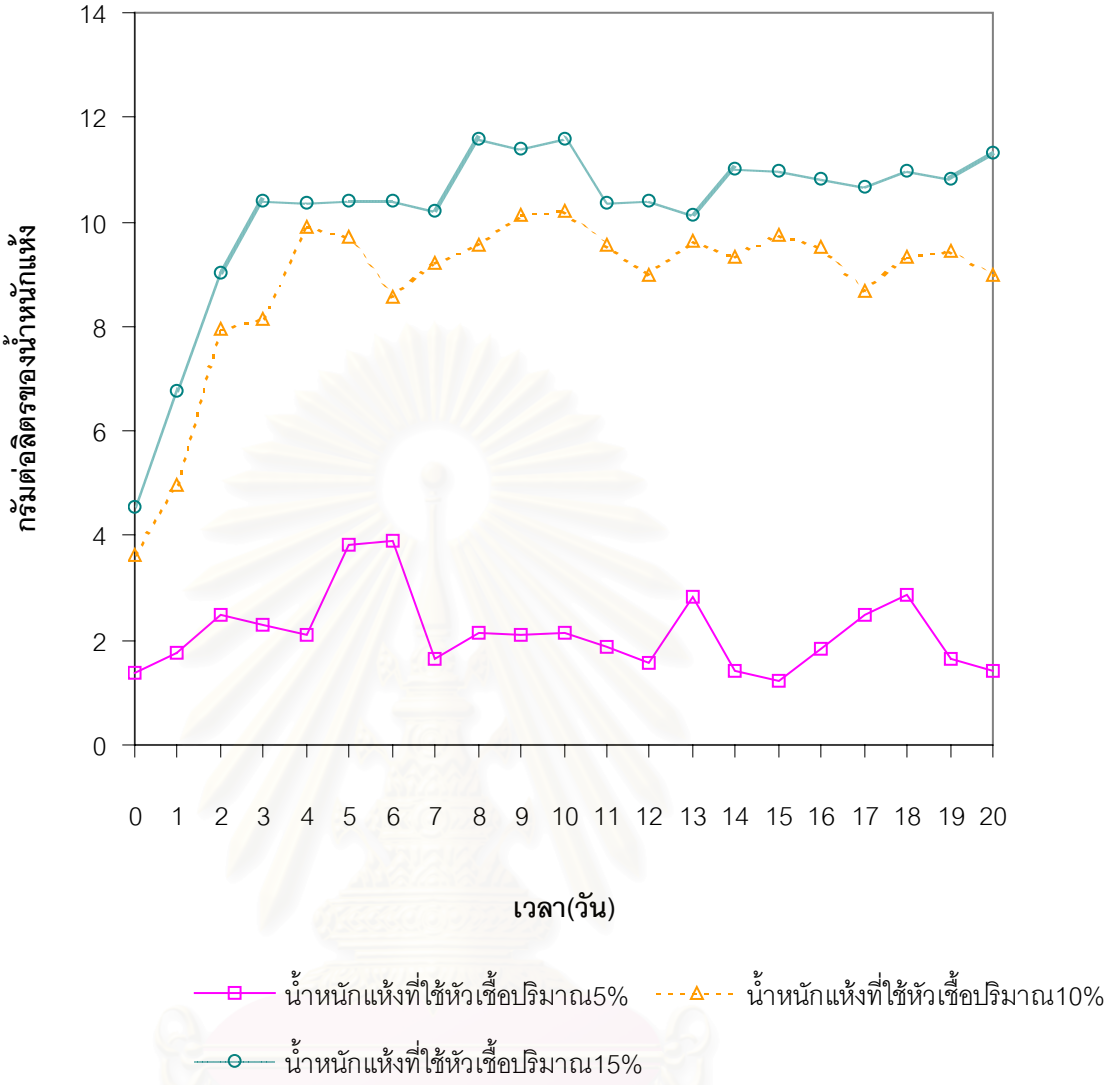


รูปที่ 40 น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ กรดโคจิก เมื่อเพาะเลี้ยง A. oryzae K-13 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ภาวะที่เหมาะกับการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิต โดยมีการแปรปริมาณหัวเชื้อสปอร์งอกต่างๆกัน

จากผลการทดลองทั้งหมด จะทำให้เห็นว่าเมื่อมีการใช้ปริมาณหัวเชื้อสปอร์งอกขนาดสูงขึ้นจะมีน้ำหนักแห้งสายใยสูงขึ้น (รูปที่ 41) จึงทำให้มีสายใยในการผลิตกรดโคจิกมาก (รูปที่ 42) มีการใช้น้ำตาลในการผลิตมากด้วย แต่เมื่อพิจารณาการผลิตกรดโคจิก น้ำหนักสายใยแห้ง และการใช้น้ำตาลของการเพาะเลี้ยงโดยจัดขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกเท่ากับ 5 % ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีการผลิตต่ำใช้เวลานาน การใช้น้ำตาลต่ำ จึงไม่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิก ส่วนที่ 10% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าให้ค่าใกล้เคียงกับเมื่อใช้หัวเชื้อที่ 15% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ใช้เวลาในการผลิตกรดโคจิกน้อยกว่า 24 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาค่าอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุดก็พบว่า เมื่อใช้หัวเชื้อที่ขนาด 10% และ 15% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็ให้ค่าใกล้เคียงกันด้วยคือ 0.366 g/l/d และ 0.346 g/l/d (ตารางที่ 7) ดังนั้นขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกที่ 10 % ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงเป็นค่าที่เหมาะสมกว่าเนื่องจากจะทำให้ประหยัดขนาดหัวเชื้อและพลังงานมากกว่า เมื่อได้ภาวะที่ส่งเสริมการผลิตในถังหมักแล้ว การทดลองต่อไปจึงทำเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในภาวะดังกล่าวเพื่อตรวจสอบการผลิตอีกครั้งหนึ่ง

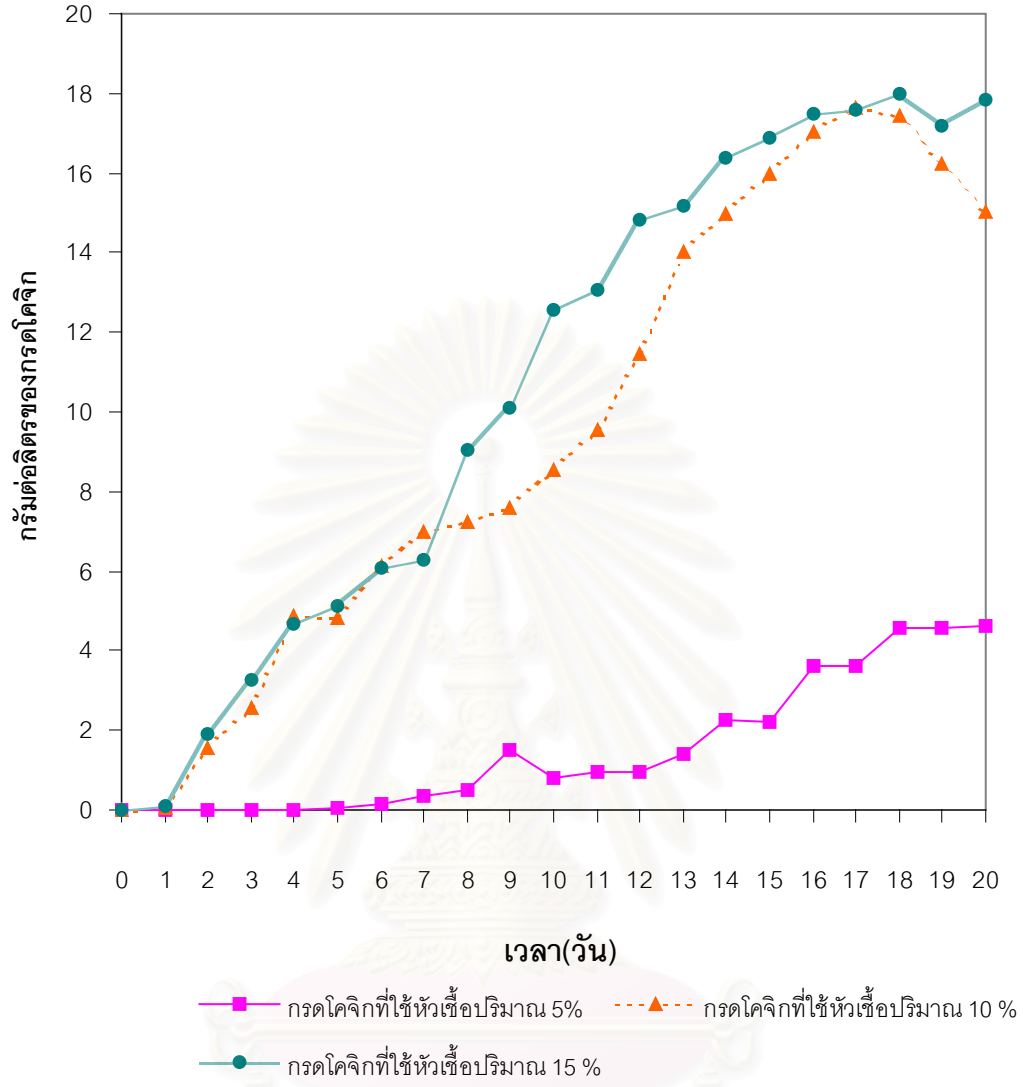
5. ผลผลิตกรดโคจิกเมื่อจัดภาวะที่เหมาะสมทั้งต่อการเติบโตและการผลิต

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร ในถังหมัก 2 ลิตร โดยจัดหัวเชื้อขนาด 10% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30±1 องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง โดยจัดค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างที่ศึกษามาว่าเหมาะต่อการเติบโตและการผลิตที่ค่าออกซิเจนละลายที่ 80 %ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 5.0 นาน 54 ชั่วโมงหลังจากนั้นจัดค่าออกซิเจนละลายเป็น 50%ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่อยๆปรับลดค่าความเป็นกรดด่างลงจนเป็น 2.5 ใน 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 20.86 g/l ณ วันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยง มีน้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 10.57 g/l ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงเหลือเพียง 12.62 g/l โดยมีการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นน้ำตาล



รูปที่ 41 น้ำหนักแห้งสายใยเมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เพื่อการผลิตกรดโคจิก ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ภาวะที่เหมาะกับการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิต โดยมีการแปรปริมาณหัวเชื้อสปอร์งอกต่างๆกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



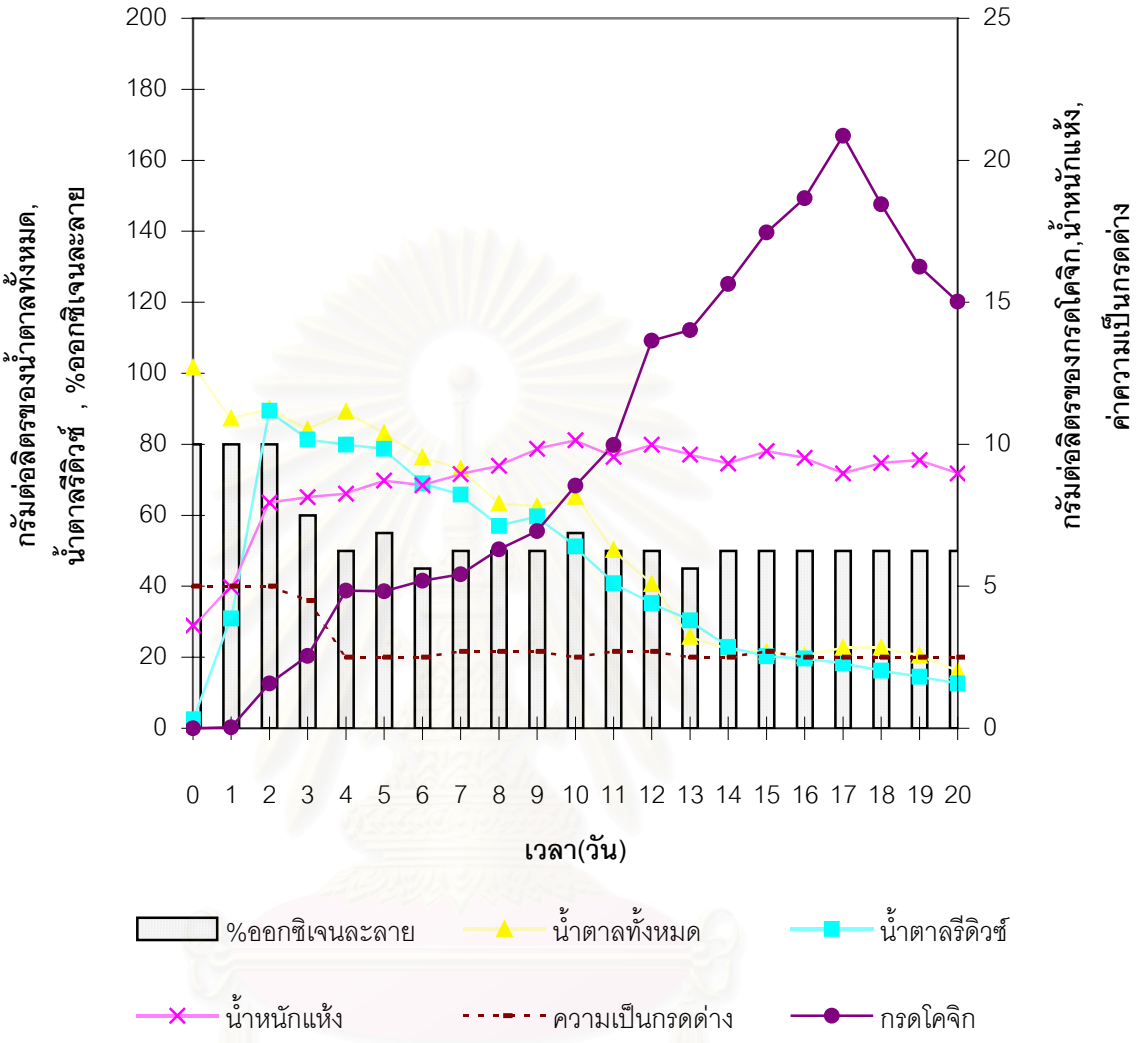
รูปที่ 42 ปริมาณกรดโคจิกเมื่อเพาะเลี้ยง *A.oryzae* K-13 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ภาวะที่เหมาะกับการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิต โดยมีการแปรปริมาณหัวเชื้อสปอร์งอกต่างๆกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุด ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด วันที่มีการผลิตกรดสูงสุด เวลาที่ใช้ในการสลายน้ำตาลทราย และ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันสิ้นสุดการทดลอง เมื่อแปรผันขนาดของหัวเชื้อต่างๆกัน

ขนาดหัวเชื้อสปอร์งอก (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ)	อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุด (g/l/d)	กรดโคจิกสูงสุด (g/l)	วันที่มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด (วัน)	เวลาที่ใช้ในการสลายน้ำตาลทราย (วัน)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันสิ้นสุดการทดลอง(g/l)
5%	0.08	4.60	20	3	42.45
10%	0.364	17.55	17	2	15.32
15%	0.346	17.98	18	2	14.15

รีดิวซ์หมดภายในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 43) และอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุดในภาวะที่เหมาะสมเท่ากับ 0.351 g/l/d เมื่อการเติบโตสูงขึ้นใกล้เข้าช่วงการเติบโตคงที่ ก็พบว่ามีการผลิตกรดโคจิกเล็กน้อยและค่อยๆเพิ่มมากขึ้น ในระหว่างนั้นพบว่าช่วงเวลาวันที่ 9-12 น้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของกรดโคจิกที่รวดเร็วเช่นกัน แต่เมื่อวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยงพบว่าเมื่อผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดแล้วกลับพบว่ากรดโคจิกจะลดลงอย่างรวดเร็ว อาจจะเป็นเพราะปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อย ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์มีไม่มากพอที่จะทำให้สายใยนำไปใช้ในการผลิตได้ กรดโคจิกที่ถูกผลิตขึ้นโดยสายใยจึงถูกนำมาใช้แทน เราจึงพบว่ากรดโคจิกมีปริมาณลดลง ทั้งๆที่ควรจะเพิ่มขึ้นในช่วงเวลานั้น แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าเมื่อปรับภาวะที่เหมาะสมจะทำให้ผลิตกรดโคจิกได้ในปริมาณสูงในระยะเวลาที่สั้นกว่าการทดลองในข้ออื่นๆที่ยังมิได้มีการปรับภาวะที่เหมาะสมทั้งกับการเติบโตและการผลิตกรดโคจิก

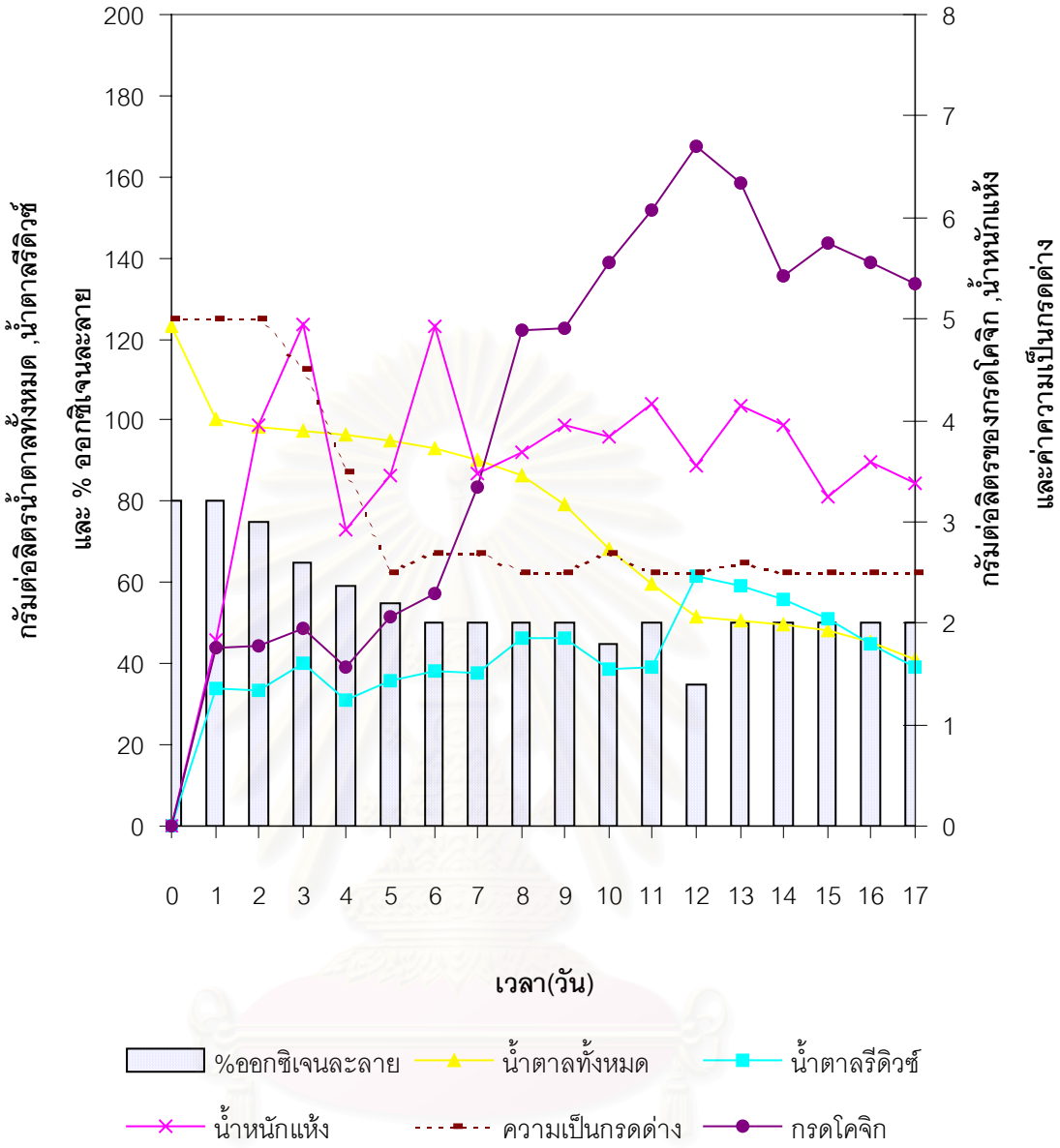


รูปที่ 43 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าออกซิเจนละลาย ที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K-13 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อจัดภาวะให้เหมาะสมต่อทั้งการเติบโตและการผลิต

7. ผลการผลิตกรดโคจิกโดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเติมแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลทราย) ระหว่างการผลิต

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร นาน 17 วัน แล้วทำการทดลองต่อในขวดเขย่าตามวิธีการทดลองข้อที่ 17 ผลการทดลองพบว่ากรดโคจิกที่ได้มาจากน้ำหมักในถังหมักเท่ากับ 1.76 g/l เนื่องจากขณะที่นำน้ำหมักจากถังหมักนั้นปริมาณน้ำตาลในระบบการผลิตยังคงเหลือประมาณ 20% เพราะฉะนั้นจึงมีน้ำตาลเหลือในน้ำหมักจากถังหมักเท่ากับ 22.33 g/l และน้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 1.84 g/l หลังจากที่เพาะเลี้ยงต่อในขวดเขย่าจะมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดถึง 8.98 g/l ซึ่งเมื่อคิดเป็นปริมาณกรดโคจิกจากสารละลายน้ำตาลทรายที่เติมเข้าไปในขวดเขย่า 12 กรัม โดยไม่รวมกับกรดโคจิกที่มาจากน้ำหมักในถังหมัก จะได้กรดโคจิกที่ผลิตจากน้ำตาล 12 กรัม เท่ากับ 7.22 g/l ส่วนน้ำหนักแห้งที่ตรวจวัดได้เท่ากับ 4.94 g/l (รูปที่ 44) ซึ่งเมื่อหักน้ำหนักแห้งที่มาจากถังหมักจะได้น้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นเพียง 3.1 g/l มีการเติบโตของสายใยน้อยมาก เนื่องจากในสารละลายน้ำตาลทรายที่เติมเข้าไปไม่มีแหล่งไนโตรเจนสายใยจึงใช้แหล่งไนโตรเจนที่ยังคงเหลือจากน้ำหมักที่นำมาจากถังหมักเท่านั้นซึ่งคงมีปริมาณเหลืออยู่ไม่มากพอสำหรับการเติบโตต่อจึงทำให้มีการเติบโตน้อย

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลพบว่า มีการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสภายในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง และมีน้ำตาลรีดิวซ์ในวันสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ 39.23 g/l (รูปที่ 44) และเมื่อคิดอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุดของวิธีนี้จะได้ถึง 0.527 g/l/d จะเห็นได้ว่าเมื่อเราเติมน้ำตาลทรายให้ 12 กรัม จะมีการผลิตเพิ่มขึ้นได้ถึง 7.22 g/l คิดเป็น 0.64 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลทราย ซึ่งถ้าเทียบเป็นสัดส่วนการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตกรดโคจิกจะคิดเป็นประมาณ 72.2% ซึ่งนับว่าเป็นการผลิตกรดโคจิกที่มีแนวโน้มว่าจะผลิตได้มากขึ้นน่าพอใจ จึงเห็นว่าการเติมแหล่งคาร์บอนเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกให้มีปริมาณสูงขึ้นได้ ซึ่งต้องหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโดยการเติมแหล่งคาร์บอนเช่น เวลาที่เติมแหล่งคาร์บอนหรือปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เติมลงไปเพื่อเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้ *A. oryzae* K-13 ต่อไป



รูปที่ 44 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่างและค่าออกซิเจนละลาย เมื่อผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าด้วยวิธีการเติมแหล่งคาร์บอนระหว่างการผลิต

8. ผลการผลิตกรดโคจิกโดยการใช้สายใยซ้ำ

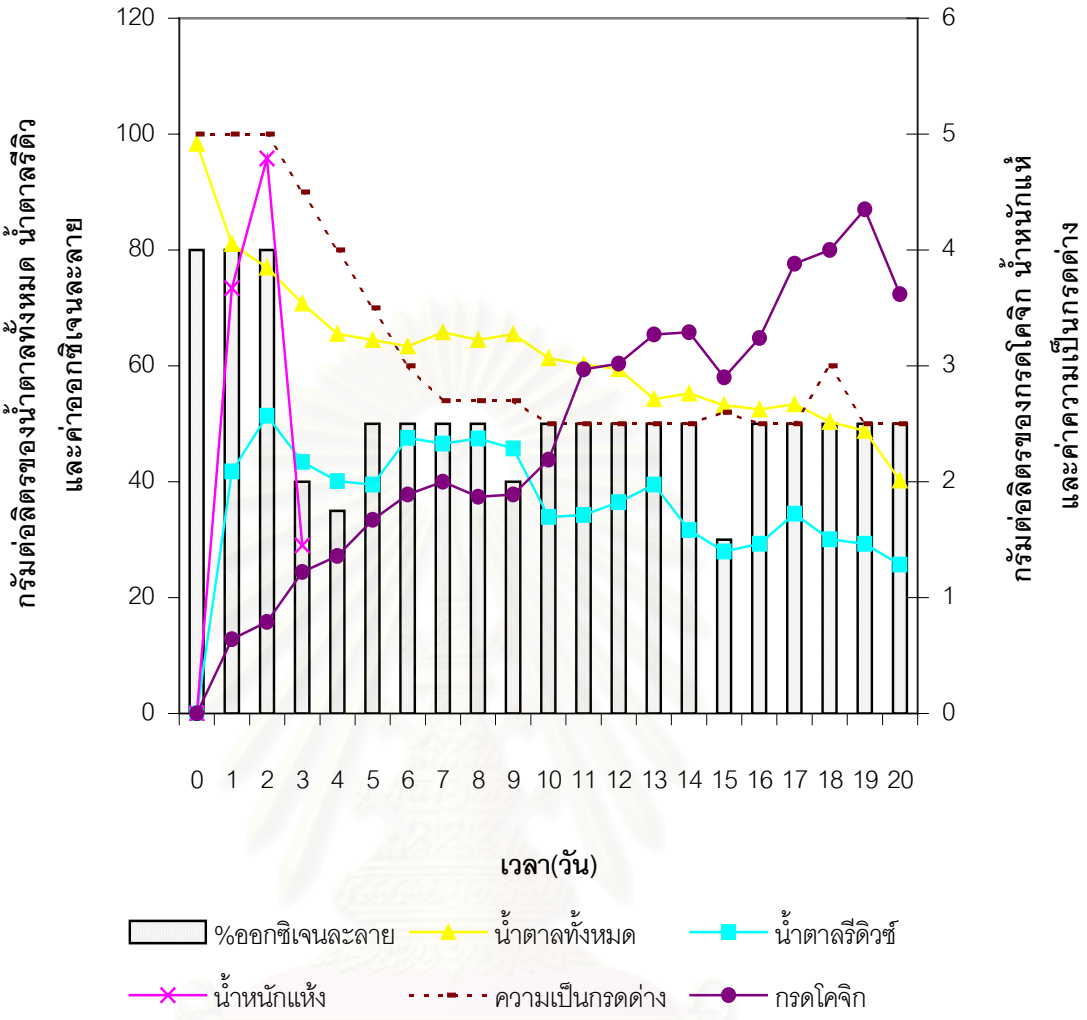
เพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร แล้วทำการทดลองผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำต่อในขวดเขย่าตามวิธีการทดลองข้อที่ 18 ผลการทดลองพบว่ากรดโคจิกที่ติดมาจากน้ำหมักในถังหมักเท่ากับ 1.32 g/l และมีน้ำตาลที่มาจากน้ำหมักเท่ากับ 0.8 g/l น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 0.23 g/l หลังจากให้สายใยที่ผ่านการใช้ผลิตกรดโคจิกจนได้ผลผลิตสูงสุดมาแล้วมาผลิตกรดโคจิกต่อในขวดเขย่าพบว่ามีการผลิตกรดโคจิกตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเร็วกว่าการผลิตกรดโคจิกแบบกะที่ไม่ได้ใช้สายใยซ้ำและจากปริมาณน้ำตาลที่อยู่ในอาหารเพื่อการผลิต 12 กรัม (คิดเป็นความเข้มข้นที่ 100 g/l ตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตจากภาคผนวก ก.3) จะมีการผลิตกรดโคจิก (ไม่คิดรวมกรดโคจิกที่ได้มาจากถังหมัก) เท่ากับ 4.35 g/l ซึ่งคิดเป็น 0.36 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลทราย คิดเป็น 43.5 % ของความเข้มข้นน้ำตาลทรายสำหรับการเติบโต พบว่ามีการเติบโตมากจนสายใยจับตัวกันเป็นก้อนใหญ่จนไม่สามารถตรวจวัดหาค่าน้ำหนักสายใยแห้งจากขวดเขย่าได้เมื่อถึงวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 45) จะเห็นว่าสายใยมีการเติบโตสูงมากเพราะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีไนโตรเจนอยู่ด้วยทำให้สายใยมีการนำมาใช้เพื่อการเติบโตต่อมาเมื่อมีการเติบโตมากขึ้นจึงมีการสร้างอินเวอร์เทสเพื่อสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสมากแต่สายใยนำน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไปใช้ได้น้อยโดยจะใช้ในการเติบโตมากกว่าการผลิตกรดโคจิกอย่างไรก็ตามยังคงใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในปริมาณน้อยอยู่จึงทำให้น้ำตาลที่เหลือ (เมื่อคิดจากน้ำตาล 12 กรัม) ซึ่งตรวจวัดได้เท่ากับ 40.23 g/l (รูปที่ 46)

ถึงแม้ว่าวิธีการใช้สายใยซ้ำจะให้ผลผลิตน้อย แต่ก็เป็นวิธีการเพิ่มผลผลิตที่น่าสนใจถ้ามีการปรับภาวะการผลิตให้เหมาะสมกว่านี้ เนื่องจากไม่ต้องใช้เวลาในการเติบโตของสายใยจึงนำสายใยมาผลิตกรดโคจิกได้เลย แต่ในการทดลองนี้มีการให้แหล่งไนโตรเจนจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมลงไปมากจึงทำให้สายใยมีการเติบโตต่อส่งผลให้มีการใช้น้ำตาลในการเติบโตแทนการผลิต จึงเห็นว่าควรจะต้องมีการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการใช้ สายใยซ้ำเพื่อเพิ่มผลผลิตต่อไป

รูปที่ 45 ลักษณะสายใยที่เติบโตจนจับตัวเป็นก้อนเมื่อเพาะเลี้ยงโดยมีการใช้สายใยซ้ำในการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่า

9. ผลการวิเคราะห์กรดโคจิกที่สร้างขึ้นโดย *A. oryzae* K-13 โดยวิธี HPLC

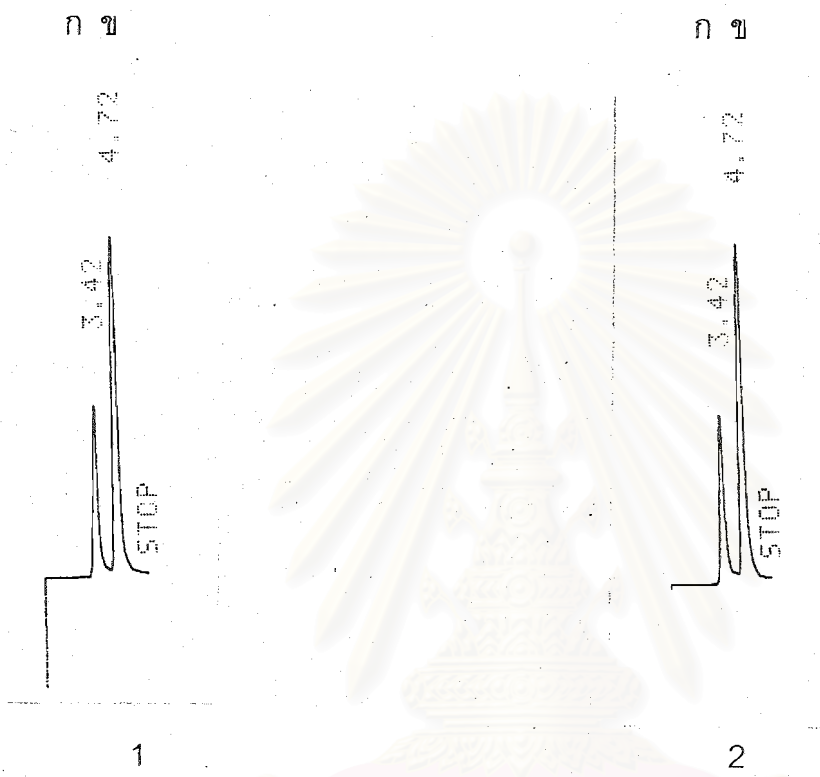
เนื่องจาก รพี โรจนอุไร (2539) ได้ตรวจหากรดอินทรีย์ที่สร้างจากราสายพันธุ์ *A.oryzae* K-13 โดยวิธี HPLC พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของกรดอินทรีย์ชนิดอื่นเลย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงนำน้ำหมักมาทำการวิเคราะห์กรดอินทรีย์จากการทดลองที่ผลิตกรดโดย *A. oryzae* K-13 เพื่อยืนยันว่าเป็นกรดโคจิก โดยใช้ตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K-13 เป็นเวลา 20 วัน จากการทดลองในขวดเขย่าเพื่อผลิตกรดโคจิกโดยมีการเติมแหล่งคาร์บอนระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่ากรดอินทรีย์ที่สร้างโดย *A. oryzae* K-13 มีช่วงเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ Zorbax-C8 เช่นเดียวกับกรดโคจิกมาตรฐาน (รูปที่47) จึงเป็นการยืนยันได้ว่ากรดที่ตรวจสอบเป็นกรดโคจิกจริง



รูปที่ 46 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่างและค่าออกซิเจนละลาย เมื่อผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าด้วยวิธีการใช้สายใยซ้ำ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (นาที)



รูปที่ 47 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ที่สร้างโดย *A. oryzae* K-13 ในการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่าเมื่อมีการเติมแหล่งคาร์บอนระหว่างการผลิตกรดโคจิก นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ Zorbax-C8

1. กรดโคจิกมาตรฐาน ผสมกับ กรดกลูโคนิคมาตรฐาน (Internal standard)
2. กรดอินทรีย์ที่สร้างโดย *A. oryzae* K-13ผสมกับกรดกลูโคนิคมาตรฐาน

   ก หมายถึง กรดกลูโคนิค

   ข หมายถึง กรดโคจิก

บทที่ 4
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ด้วยวิธี HPLC ยืนยันว่าเป็นกรดโคจิกเนื่องจากมีช่วงเวลาอยู่ในคอลัมน์เช่นเดียวกับกรดโคจิกมาตรฐาน

2. เมื่อทดลองผลิตกรดโคจิกในถังหมักโดย *A. oryzae* K-13 เพื่อขยายส่วนการผลิตกรดโคจิกโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมกับการผลิตกรดในขวดเขย่า (รพี โรจนอุไร , 2539) พบว่ามีการผลิตกรดโคจิกเพียง 5.22 g/l ในวันที่ 7 แสดงว่าในภาวะดังกล่าวยังไม่เหมาะต่อการผลิตในถังหมัก จึงทำให้เห็นว่าการขยายส่วนการผลิตกรดโคจิก จำเป็นต้องมีการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของการให้อากาศต่อการผลิตต่อไป เนื่องจากภาวะที่ไม่ได้จัดให้เหมาะในการขยายส่วนนี้คือ การให้อากาศ

3. เมื่อทดลองศึกษาผลของการให้อากาศต่อการเติบโตของ *A. oryzae* K-13 และการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่า พบว่าการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่าก้นบุบ ซึ่งเป็นตัวแทนของภาวะการเติบโตและการผลิตที่มีออกซิเจนละลายมาก จะมีการเติบโตมากกว่าและเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่าปกติซึ่งเป็นตัวแทนของการผลิตที่มีออกซิเจนละลายปกติคือให้น้ำหนักแห้งสายใยเท่ากับ 6.40 g/l ใช้เวลาในการเติบโต 12 วัน แต่ในขวดเขย่าปกติจะมีการผลิตกรดโคจิกได้มากกว่าขวดเขย่าก้นบุบคือให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 39.03 g/l ใช้เวลาในการผลิต 20 วัน และการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ของขวดเขย่าก้นบุบจะเร็วกว่าขวดเขย่าปกติ 2 วัน

4. ค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะสำหรับการเติบโตของ *A. oryzae* K-13 คือที่ 80% ของอากาศอิ่มตัว เนื่องจากสามารถทำให้มีน้ำหนักสายใยแห้งมากที่สุดและเร็วที่สุดเท่ากับ 8.30 g/l ในชั่วโมงที่ 54 ซึ่งมากกว่าและเร็วกว่าภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายที่ 40% 60% และ 100% ของอากาศอิ่มตัวตามลำดับ และพบว่าเมื่อให้ภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายสูง จะทำให้มีการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสได้

เร็วกว่า แต่จะไม่สามารถจัดภาวะที่ค่าออกซิเจนละลายที่ 100% ของอากาศอิ่มตัวได้ เนื่องจากมีปัญหาในเรื่องสายใยติดข้างถังหมัก

5. ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสำหรับการเติบโตของ *A. oryzae* K-13 คือที่ 5.0 ให้มีการเติบโตที่มากและเร็วเท่ากับ 9.24 g/l ในชั่วโมงที่ 54 และที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 จะมีการสลายน้ำตาลทรายหมดได้เร็วที่ชั่วโมงที่ 54 นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อมีการให้ค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำจะทำให้มีการเริ่มผลิตกรดโคจิกได้เร็วกว่า

6. การผลิตกรดโคจิกภายใต้ภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลาย 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว ค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 ซึ่งเหมาะกับการเติบโตเพียงอย่างเดียวตลอดการเพาะเลี้ยงจะทำให้ได้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำคือให้เพียง 4.84 g/l ในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง และเมื่อผลิตกรดโคจิกภายใต้ภาวะค่าออกซิเจนละลายที่ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัวตลอดการทดลองแต่จัดให้ค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นที่ 5.0 พบว่ามีผลผลิตกรดโคจิกสูงขึ้นเท่ากับ 6.98 g/l ในวันที่ 18

7. เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยมีการให้ค่าออกซิเจนละลายและความเป็นกรดด่าง 2 ช่วง พบว่าภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้มีการผลิตกรดโคจิกได้ดีที่สุดคือ การจัดภาวะค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างให้เหมาะกับการเติบโตก่อนในช่วง 54 ชั่วโมงแรกที่ค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80% ของค่าอากาศอิ่มตัว และความเป็นกรดด่างที่ 5.0 หลังจากนั้นปรับค่าออกซิเจนละลายลงเป็น 50% ของอากาศอิ่มตัว และค่อยๆปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2.5 ภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งในภาวะนี้จะให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 17.64 g/l ในวันที่ 17 ซึ่งเป็นผลผลิตกรดที่สูงกว่าและเร็วกว่าในการจัดภาวะอื่นๆ และมีอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 0.386 g/l/d

8. เมื่อทดลองผลิตกรดโคจิกภายใต้ภาวะที่เหมาะกับการผลิตเพียงอย่างเดียวตลอดการเพาะเลี้ยง จะไม่ได้ทำให้ผลผลิตกรดดีขึ้นเพราะได้กรดโคจิกเล็กน้อยเพียง 9.43 g/l ในวันสุดท้ายของการทดลอง

9. ขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกที่เหมาะต่อการผลิตกรดโคจิกในถังหมัก คือ 10% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 17.55 g/l ในวันที่ 17

10. เมื่อผลิตกรดโคจิกภายใต้ภาวะที่เหมาะสมในถังหมัก จะทำให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 20.80 g/l ในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยง

11. เมื่อทดลองหาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงแบบเติมแหล่งคาร์บอนระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยทำการทดลองในขวดเขย่า พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกขึ้นอีก 7.22 กรัม จากน้ำตาลทรายที่เติม 12 กรัม คิดเป็น 72.2 % ของน้ำตาลทรายที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าการเติมแหล่งคาร์บอนระหว่างการผลิตมีความเป็นไปได้ที่จะทำให้มีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นได้

12. เมื่อทดลองหาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดโคจิกโดยการใช้สายใยซ้ำในขวดเขย่าพบว่ามีความเป็นไปได้คือ ให้ผลผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้น 4.35 กรัม จากน้ำตาลทราย 12 กรัม คิดเป็น 43.5 % ของน้ำตาลทรายที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือให้ผลผลิตกรดไม่มากนัก เพราะมีการเติบโตเพิ่มขึ้นมากเนื่องจากยังไม่ได้หาสูตรอาหารที่เหมาะสม จึงจำเป็นต้องจัดภาวะให้เหมาะต่อไป

13. สามารถสรุปผลการทดลองในเรื่องการผลิตกรดโคจิกในถังหมักเป็นตารางดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุด กรดโคจิกสูงสุด วันที่มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด เวลาที่ใช้ในการสลายน้ำตาลทราย และ น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันสิ้นสุดการทดลองของการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตกรดโคจิกในภาวะต่างๆ

การทดลอง (เรียงลำดับตามผลการวิจัย)	อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุด (g/l/d)	กรดโคจิกสูงสุด (g/l)	วันที่มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด (วัน)	เวลาที่ใช้ในการสลายน้ำตาลทราย (วัน)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันสิ้นสุดการทดลอง (g/l)
-ผลิตกรดโคจิกในภาวะที่เหมาะกับการเติบโตตลอดการเพาะเลี้ยง (ผลข้อ 4.1.1)	0.153	4.84	20	2	55.0

การทดลอง (เรียงลำดับตามผลการวิจัย)	อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุด (g/l/d)	กรดโคจิกสูงสุด (g/l)	วันที่มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด(วัน)	เวลาที่ใช้ในการสลายน้ำตาลทราย (วัน)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันสิ้นสุดการทดลอง (g/l)
-ผลิตกรดโคจิกในภาวะค่าออกซิเจนละลายที่ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัวและ pH ตั้งต้นที่ 5.0 (ผลข้อ 4.1.2)	0.283	6.98	18	8	30.46
-เพาะเลี้ยงในภาวะ 80%ออกซิเจนละลาย pH 5.0 หลังจากนั้นปรับเป็น 30% 2.5 ทันที (ผลข้อ 4.2.1)	0.129	7.90	17	2	43.60
-เพาะเลี้ยงในภาวะ 80%ออกซิเจนละลาย pH 5.0 หลังจากนั้นปรับเป็น 30% และค่อยๆ pH เป็น2.5 ภายใน 48 ชม. (ผลข้อ 4.2.2)	0.369	15.72	18	2	19.52
-เพาะเลี้ยงในภาวะ 80%ออกซิเจนละลาย pH 5.0 หลังจากนั้นปรับเป็น 50% และค่อยๆปรับ pH เป็น 2.5ภายใน 48 ชม. (ผลข้อ 4.2.3)	0.386	17.64	17	2	15.25
-ผลิตกรดโคจิกในภาวะที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกตลอด (ผลข้อ4.3)	0.148	9.43	20	2	67.73

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลอง (เรียงลำดับตามผลการวิจัย)	อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุด (g/l/d)	กรดโคจิกสูงสุด (g/l)	วันที่มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด(วัน)	เวลาที่ใช้ในการสลายน้ำตาลทราย (วัน)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันสิ้นสุดการทดลอง (g/l)
-ผลิตกรดโคจิกโดยแปร 5%	0.080	4.60	18	3	42.45
%หัวเชื้อสปอร์งอก 10%	0.364	17.55	17	2	15.32
(ผลข้อ 5) 15%	0.346	17.98	18	2	14.15
-ผลิตกรดโคจิกในภาวะที่เหมาะสม (ผลข้อ 6)	0.351	20.86	17	2	12.62

วิจารณ์ผลการวิจัย

ก่อนที่จะทำการทดลองเพิ่มผลผลิตการขยายส่วนผลิตกรดโคจิก ได้ทดลองผลิตกรดโคจิกในถังหมักโดย *A. oryzae* K-13 เพื่อต้องการลองขยายส่วนผลิตในถังหมักโดยจัดภาวะให้เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าตามผลการทดลองของ รพี โรจนอุไร (2539) คือผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าที่อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง ตั้งต้นที่ 4.5 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะกับการผลิต (ภาคผนวก ก.3) พบว่าให้ ผลผลิตกรดโคจิกเพียงเล็กน้อยเท่ากับ 5.22 g/l ในเวลา 7 วัน ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก ยังไม่ได้จัดภาวะการให้อากาศและขนาดหัวเชื้อที่เหมาะสม ซึ่ง Rosfarizan และคณะ (1998) ก็พบว่าเมื่อมีการผลิตกรดโคจิกในระดับขยายส่วนโดยใช้แป้งสาคูจะทำให้มี ผลผลิตกรดโคจิกที่ลดลง เนื่องมาจากการจัดภาวะการให้อากาศที่ไม่เหมาะสมเช่นกัน นอกจากนี้จากการทดลองนี้พบว่า มีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 จนกระทั่งมีผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 7 ปริมาณกรดโคจิกกลับลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rosfarizan และคณะ (1998) เช่นกันที่พบว่าเมื่อมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดแล้วกลับลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่ง

Rosfarizan และคณะสรุปว่า การให้อากาศที่ไม่เหมาะสมน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้การผลิตกรดโคจิกไม่มีเสถียรภาพมากพอที่จะคงประสิทธิภาพในการผลิตต่อไป แต่ในการทดลองผลิตกรดโคจิกในภาวะนี้การเติบโตกลับเป็นค่าที่อยู่ในระดับสูงพอสมควรเนื่องจากน้ำตาลที่ถูกสลายโดย อินเวอร์เทสจะถูกนำไปใช้ในการเติบโต โดยพบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างมากในระหว่างวันที่น้ำหนักแห้งสายใยเพิ่มขึ้นมากเช่นเดียวกัน และเมื่อพิจารณาดูการผลิตกรดโคจิกกลับไม่เพิ่มขึ้นในช่วงแรกแต่หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ว่าน้ำตาลที่ถูกสลายจะถูกนำมาใช้ในการเติบโตก่อน เมื่อมีการเติบโตถึงระดับหนึ่งระบบเอนไซม์จึงพร้อมที่จะผลิตกรดโคจิกจึงพบว่ามีการผลิตกรดโคจิกขึ้น แต่ หลังจากที่ปริมาณกรดโคจิกลดลงพบว่ามีน้ำหนักแห้งสายใยจะสูงขึ้นแทน ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ที่มีการนำน้ำตาลมาใช้ในการเติบโตแทนการผลิต และอาจจะมีการนำกรด โคจิกมาใช้ในการเติบโตด้วยก็ได้ แต่เนื่องจากมีการสลายน้ำตาลที่สลายได้ถูกนำมาใช้เติบโตมากจึงทำให้เหลือวัตถุดิบในการผลิตกรดโคจิกน้อยซึ่งทำให้มีการผลิตกรดโคจิกต่ำ จากผลการทดลองนี้จึงทำให้เห็นว่าการปรับค่าการให้อากาศและปัจจัยอื่นที่จะมีผลต่อการผลิตน่าจะทำให้มีการผลิตกรดโคจิกสูงขึ้น ดังนั้นในเบื้องต้นจึงทดสอบหาผลของภาวะการให้อากาศที่แตกต่างกันต่อการเติบโตและการผลิตในระดับขวดเขย่าก่อน เพื่อใช้เป็นแนวทางในการหาภาวะการให้อากาศที่เหมาะสมในถังหมักต่อไป

เมื่อทดลองหาผลของการให้อากาศต่อการเติบโตและการผลิต *A. oryzae* K-13 ในระดับขวดเขย่าก่อนที่จะเพาะเลี้ยงในระดับถังหมัก โดยให้ขวดเขย่าก้นบุบเป็นตัวแทนของภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีการละลายออกซิเจนมากกว่าปกติ พบว่าการใช้ขวดก้นบุบให้การเติบโตมากกว่าในขวดเขย่าปกติ แต่การผลิตกรดโคจิกกลับมีน้อยกว่าในขวดเขย่าปกติ จากผลการทดลองนี้จึงทำให้เห็นว่าภาวะการละลายของออกซิเจนที่เหมาะกับการเติบโตของสายใยและการผลิตกรดโคจิกไม่ใช่ค่าเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับ Ariff และคณะ (1996) ที่มีการศึกษาโดยตั้งข้อสังเกตว่าภาวะความต้องการของออกซิเจนในช่วงการเติบโตและการผลิตไม่เท่ากัน เมื่อพิจารณาถึงความต้องการออกซิเจนพบว่า ในกระบวนการผลิตกรดโคจิกต้องอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีทั้งออกซิเดชั่นและดีไฮโดรจีเนชั่น ดังนั้นปริมาณออกซิเจนที่ต้องการจะอยู่ในระดับหนึ่งเท่านั้น เพราะมิใช่

การผลิตกรดที่อาศัยปฏิกริยาออกซิเดชั่นเพียงอย่างเดียว แต่ปริมาณออกซิเจนก็มีความสำคัญต่อการผลิตกรดโคจิก เนื่องจากออกซิเจนจะเป็นปัจจัยสำคัญที่จะกระตุ้นเซลล์ราเพื่อสร้างกลูโคส–6–ฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส และ กลูโคสดีไฮโดรจิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีการผลิตกรดโคจิกด้วย (Ariff และคณะ , 1996) เมื่อพิจารณาการสลายน้ำตาลทรายก็พบว่า ในขวดเขย่าก้นบุบจะมีการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสหมดก่อนในขวดเขย่าปกติ จึงเป็นที่น่าสังเกตว่าค่าออกซิเจนละลายที่ต่างกันน่าจะมีผลต่อการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสด้วย เพราะในภาวะที่มีการเติบโตสูงจะมีการสร้างอินเวอร์เทสเพื่อมาสลายน้ำตาลทรายหรือน้ำตาลซูโครสไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสได้ดีกว่า ดังนั้นเมื่อการให้ค่าออกซิเจนละลายสูงทำให้การเติบโตดีกว่าจึงทำให้มีการสลายน้ำตาลได้ดีด้วย และมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างในแบบแผนเดียวกัน โดยที่จะมีการลดลงจาก 4.5 เป็น 2.5 และพบว่ากรดโคจิกจะสร้างในช่วงค่าความเป็นกรดด่างต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับ Katakiri และ Kitahara (1933) ที่พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมกับ *A. oryzae* ในการเติบโตจะอยู่ในช่วง 5.0 แต่สำหรับการผลิตกรดโคจิกจะมีค่าอยู่ที่ 2.4

จากผลการทดลองที่ได้กล่าวไปทำให้เห็นว่าความต้องการอากาศในช่วงการเติบโตและการผลิตไม่เหมือนกัน นอกจากนี้ก็ยังพบว่าภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโตและการผลิตก็ไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงการเติบโตและช่วงการผลิต เพื่อหาค่าการให้อากาศ (ซึ่งใช้ค่าออกซิเจนละลายเป็นตัวแปรบอกปริมาณการให้อากาศ) และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในแต่ละช่วง สอดคล้องกับเหตุผลของ Ariff และคณะ (1996) ที่ทำการทดลองให้ค่าออกซิเจนละลายเป็น 2 ช่วงเนื่องจากพบว่าค่าออกซิเจนละลายในการเติบโตและการผลิตกรดโคจิกของ *A. flavus* จะมีค่าไม่เท่ากัน

จากแนวคิดที่ว่าเมื่อทำให้มีปริมาณสายใยมากในช่วงการเติบโตจะทำให้มีปริมาณสายใยที่จะมาผลิตกรดโคจิกได้มากขึ้นด้วย เนื่องจากกรดโคจิกจัดอยู่ในกลุ่มของสารเมตาโบไลท์ที่จะสร้างขึ้นหลังจากรามีการเติบโตเข้าสู่ภาวะคงที่และสูงสุดแล้ว (Arnstien และ Bentley, 1951 ; Beelik, 1956, Bajpai,1982) ดังนั้นถ้ามีการทำให้การเติบโตมากจะส่งผลให้มีการผลิตมากขึ้นด้วยและเมื่อหาค่าออกซิเจนละลายที่

เหมาะสมต่อการเติบโตของสายใยโดยแปรค่าออกซิเจนละลายที่ 100% , 80% , 60% และ 40%ของค่าอากาศอิ่มตัว พบว่าที่ค่าออกซิเจนละลาย 80% ของค่าอากาศอิ่มตัว จะให้การเติบโตสูงที่สุดและเข้าสู่ภาวะการเติบโตคงที่ได้เร็วที่สุดด้วย เนื่องจากเมื่อให้ปริมาณออกซิเจนละลายมากจะทำให้มีการเติบโตได้ดี เพราะออกซิเจนมีส่วนสำคัญในการหายใจเพื่อการสันดาปให้ได้พลังงาน ถ้าทำให้ที่ค่าออกซิเจนละลายสูงจะส่งผลให้มีการเติบโตดี แต่จากผลที่ได้พบว่าค่าออกซิเจนละลายที่สูงที่สุดคือ 100% ของอากาศอิ่มตัว กลับให้การเติบโตที่น้อยกว่าที่ระดับออกซิเจนละลาย 80% ของอากาศอิ่มตัว ทั้งนี้เนื่องจากเพื่อให้บรรลุค่าออกซิเจนละลายที่สูงที่ 100% ของอากาศอิ่มตัว ต้องมีการกวนที่แรงขึ้นและให้อากาศมากจนทำให้สายใยถูกพัดและมาเกาะติดข้างถังปริมาณมาก ทำให้ในน้ำหมักมีสายใยเบาบางจึงทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการตรวจวัดน้ำหนักแห้งสายใยที่เก็บจากน้ำหมัก ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมาร่วมพิจารณาหาความเหมาะสมในการเติบโตได้

เมื่อพิจารณาถึงการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสในภาวะการให้ค่าออกซิเจนละลายต่างๆกันพบว่า เมื่อมีการให้ค่าออกซิเจนละลายมากจะทำให้มีการสลายน้ำตาลได้เร็วกว่า เนื่องจากการเติบโตที่มากและรวดเร็วจึงอาจมีการสร้างอินเวอร์เทสมากส่งผลให้มีการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตส (ซึ่งตรวจวัดในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์) ได้เร็วด้วย

จากการทดลองนี้ช่วงเวลาที่ตัดสินว่ามีการสลายน้ำตาลทรายหมดนั้นคิดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใกล้เคียงกับค่าน้ำตาลทั้งหมด เนื่องจากไม่สามารถตรวจพบช่วงเวลาที่น้ำตาลทั้งหมดเท่ากับน้ำตาลรีดิวซ์ได้พอดีในทุกการทดลอง อาจจะเป็นเพราะวิธีที่ใช้ในการตรวจสอบน้ำตาลทั้ง 2 ประเภทเป็นคนละวิธีจึงมีความแตกต่างส่งผลให้ค่าที่วัดได้คลาดเคลื่อนกันบ้างได้ โดยในการทดลองนี้ได้ใช้วิธีตรวจวัดน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลและกรดซัลฟุริก (Hansan และ Phillip, 1981) จากงานวิจัยที่ใช้วิธีนี้ในการตรวจวัดน้ำตาลทั้งหมด เช่น รพี โรจนอุไร (2539) ก็พบว่าเป็นวิธีที่ต้องระมัดระวังในหลายเรื่อง เช่น เวลาที่รอให้เกิดปฏิกริยา ความแรงในการเติมกรดซัลฟุริก และความเจือจางที่ไม่เหมาะสมของตัวอย่างน้ำตาลที่นำมาตรวจสอบ จะเห็นว่าค่าน้ำตาลทั้งหมดบางค่าที่ตรวจวัดได้ในการทดลองนี้จะมีค่าที่แปรปรวน เล็กน้อย แต่

เนื่องจากเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายน้อย หลายๆงานวิจัยจึงจำเป็นต้องเลือกใช้วิธีดังกล่าว ถึงแม้ว่าการตรวจวัดน้ำตาลทั้งหมดจะมีความคลาดเคลื่อนอยู่บ้าง แต่สำหรับงานวิจัยนี้ผลดังกล่าวก็สามารถบอกแนวโน้มในการสลายน้ำตาลทรายได้อย่างถูกต้อง

เมื่อได้ค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะกับการเติบโตแล้วจึงมาหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโตด้วย เนื่องจากค่าความเป็นกรดด่างเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อระบบเอนไซม์ในการเติบโต การสลายน้ำตาล และการผลิตกรดโคจิก ในการหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเติบโต เพื่อให้ได้การเติบโตที่เร็วและสูงที่สุดภายใต้ภาวะค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะสมที่ศึกษามาแล้วคือที่ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว ได้ทำการแปรค่าความเป็นกรดด่างในการเพาะเลี้ยงที่ 4.0 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 พบว่าการเติบโตใช้เวลาเร็วและให้น้ำหนักแห้งสายใยที่สูงเมื่อจัดภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 สอดคล้องกับ Katagiri และ Kitahara (1933) ที่พบว่าค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 5.0 จะเป็นค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะต่อการเติบโตของ *A. oryzae* และ Lin (1976) พบว่าค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง *Aspergillus parasiticus* UNBF-A12 จะอยู่ในช่วง 4.0-5.0 ซึ่งหมายความว่า ถ้ามีการจัดค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นเท่ากับ 5.0 ก่อนเพื่อให้เติบโตได้ดีจะส่งผลให้การผลิตกรดดีด้วย เนื่องจากในการหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะต่อการเติบโตได้มีการจัดภาวะค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะสมแล้ว จึงเห็นได้ว่าน้ำหนักแห้งสายใยของภาวะที่เหมาะที่สุดของการหาค่าออกซิเจนละลาย (ซึ่งยังไม่ได้หาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม) จึงมีน้ำหนักแห้งสายใยน้อยกว่า ภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการหาค่าความเป็นกรดด่าง (ซึ่งได้ค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะสมแล้ว) จึงเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรดด่างเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเติบโตของสายใยให้สูงขึ้นด้วย เนื่องจากการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในการเพาะเลี้ยงทำได้ง่ายโดยแทบจะไม่มีการแปรปรวน จึงทำให้ผลการแปรปรวนของค่าความเป็นกรดด่างต่อการเติบโตไม่ส่งผลกระทบให้เกิดความคลาดเคลื่อนของค่าน้ำหนักแห้งสายใย

เมื่อพิจารณาการสลายน้ำตาลของการหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโตพบว่าเมื่อจัดภาวะค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-5.5 จะให้การสลายน้ำตาลที่รวดเร็วภายใน 48-54 ชั่วโมง สอดคล้องกับ Rosenberg และคณะ (1992) ซึ่ง

พบว่าอินเวอร์เทสในกลุ่มรา *Aspergillus sp.* จะทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0-5.0 เช่นกัน เมื่อเริ่มการเพาะเลี้ยงพบว่าทุกภาวะค่าความเป็นกรดด่างมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ในภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 สายใยจะนำไปใช้ในการเติบโตได้เร็วที่สุด แต่ในภาวะอื่นๆเช่นในค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 และ 4.5 พบว่ามีการเติบโตช่วงแรกเพิ่มได้เล็กน้อย ถึงแม้ว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.5 จะมีการสลายน้ำตาลได้มากและเร็วแต่กลับมีการเติบโตที่ไม่มาก เนื่องจากที่ค่านี้อาจจะเหมาะต่อการสร้างสารเมตาโบไลท์ชนิดอื่นแทนที่จะนำน้ำตาลมาใช้ในการเติบโต แต่เมื่อให้ค่าความเป็นกรดด่างมากขึ้นที่ 5.5 และ 6.0 พบว่าการเติบโตแทบจะคงที่ในช่วงแรกถึงแม้จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้นก็ตาม แสดงว่าค่าความเป็นกรดด่างในช่วงที่ทดลองนี้มีผลต่ออินเวอร์เทสต่างกันเล็กน้อย โดยใช้เวลาสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสอยู่ในช่วง 48-66 ชั่วโมงถึงแม้ว่าจะมีการสลายน้ำตาลทรายได้อย่างรวดเร็วแต่ไม่ได้ส่งผลให้สายใยนำไปใช้ได้เร็วในทุกภาวะ ซึ่งหมายความว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนไปนี้ส่งผลต่อระบบเอนไซม์ในการเติบโตมากกว่าอินเวอร์เทสโดยพบว่าในภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 จะมีการนำน้ำตาลมาใช้ได้อย่างรวดเร็วที่สุด เนื่องจากมีการเติบโตรวดเร็วจึงมีการสร้างอินเวอร์เทสมากส่งผลให้มีการสลายน้ำตาลได้เร็วและที่ค่าความเป็นกรดด่างนี้ช่วงส่งเสริมระบบการทำงานของเอนไซม์ในการเติบโตทำให้สายใยนำไปใช้เพื่อการเติบโตได้เร็วและมากด้วย นอกจากนี้พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำลงจะพบว่าสามารถสร้างกรดโคจิกได้ เมื่อหาภาวะที่เหมาะกับการเติบโตได้แล้วคือ ค่าออกซิเจนละลายที่ 80%ของค่าอากาศอิ่มตัว และค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.0 จึงทำการทดลองต่อไปในส่วนของการผลิตกรดโคจิก โดยที่จะแปรรูปแบบการจัดภาวะเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิก พบว่าการทดลองที่จัดค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างให้เหมาะกับการเติบโตตลอดการทดลองให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำกว่าเมื่อจัดค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะตลอดการทดลองแต่จัดเฉพาะค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นที่ 5.0 ที่เป็นเช่นนี้เพราะเมื่อจัดค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นที่เหมาะจะมีการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2.7 ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง จึงทำให้ได้ภาวะที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกสอดคล้องกับ Ogawa และคณะ (1995), Ariff และคณะ (1996) , Kwak และJoon (1992) ที่ว่า ค่า

ความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกโดยรา *A. oryzae* จะอยู่ในช่วง 2.5-3.0 จากผลการทดลองนี้ทำให้เห็นว่าค่าความเป็นกรดด่างน่าจะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในการผลิตกรดโคจิกด้วย

จากผลการทดลองในขวดเขย่าที่แสดงให้เห็นว่าในช่วงการผลิตต้องการออกซิเจนละลายที่ต่ำกว่าการเติบโตและเมื่อทำการทดลองแปรค่าออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่างในช่วงการผลิตต่างกัน โดยจัดภาวะให้เหมาะกับการเติบโตในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง พบว่าการผลิตที่จัดค่าออกซิเจนละลายที่ 50% ของค่าอากาศอิ่มตัวและค่าความเป็นกรดด่างที่ 2.5 โดยค่อยๆปรับภายใน 48 ชั่วโมง จะเหมาะกว่าเมื่อปรับค่าออกซิเจนละลายเป็น 30%ของค่าอากาศอิ่มตัวหรือปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 2.5 ทันที ถ้าเป็นเช่นนี้น่าจะเพราะว่าความต้องการออกซิเจนละลายเพื่อการเติบโตและการผลิตไม่เท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับ Ariff ที่รายงานว่าความต้องการออกซิเจนละลายของ *A. flavus* ในช่วงการเติบโตจะมากกว่าช่วงการผลิตกรดโคจิก และเพราะค่าความเป็นกรดด่างในช่วงการเติบโตและการผลิตก็จะไม่ใช่ค่าเดียวกัน สอดคล้องกับ Katagiri และKitahara (1933) ที่พบว่า *A.oryzae* มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโตที่ 5.0 และเหมาะกับการเติบโตที่ 2.4 นั่นเอง แต่การปรับค่าความเป็นกรดด่างในช่วงการผลิตก็ต้องปรับอย่างถูกวิธีด้วย คือค่อยๆลดลง เพราะถ้ามีการปรับลดลงทันทีจะทำให้ผลผลิตกรดน้อยเนื่องจากประสิทธิภาพในการผลิตถูกจำกัด ต้องใช้เวลาปรับตัวต่อภาวะการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างที่รวดเร็วกระทันหัน ซึ่งอาจส่งผลให้เอนไซม์ในการผลิตถูกทำลายหรือไม่สามารถทำงานได้เต็มที่

ในการทดลองจัดภาวะที่เหมาะกับการผลิตเพียงอย่างเดียว พบว่าให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำกว่าเมื่อปรับเป็น 2 ช่วง เพราะถึงแม้ว่าภาวะดังกล่าวเหมาะต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ผลิตกรดโคจิก แต่เนื่องจากมีภาวะไม่เหมาะต่อการเติบโตจึงทำให้ได้ปริมาณการเติบโตต่ำ ส่งผลให้มีสายใยที่จะให้เอนไซม์ผลิตกรดโคจิกได้น้อยด้วย ถึงแม้ว่าจะมีเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในภาวะนี้แต่ก็มีปริมาณน้อยเกินไปที่จะนำมาเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกได้ ผลการทดลองหาภาวะที่เหมาะกับการผลิตกรดโคจิกในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับ Ariff และคณะ (1996) ที่พบว่าเมื่อจัดค่าออกซิเจนละลายเพียง

ค่าเดียวตลอดจะให้ผลผลิตกรดโคจิกที่น้อยกว่าภาวะการให้อากาศเป็น 2 ช่วง โดยที่ Ariff และคณะ พบว่าค่าออกซิเจนละลายที่เหมาะกับการผลิตคือ 30% ของค่าอากาศอิ่มตัวแต่ในงานวิจัยนี้คือ 50%ของค่าอากาศอิ่มตัว อย่างไรก็ตาม Ariff ไม่มีการปรับค่าความเป็นกรดด่างแค่จัดค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นที่ 3.5 เท่านั้น แต่ในงานวิจัยนี้พบว่าต้องมีการปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เหมาะกับการเติบโตที่ 5.0 และให้เหมาะกับการผลิตที่ 2.5

ในการทดลองแปรขนาดหัวเชื้อสปอร์งอก พบว่าเมื่อมีการให้ขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกมากขึ้นก็พบว่าน้ำหนักแห้งสายใยก็มากขึ้น การผลิตกรดโคจิกก็มากขึ้นตาม แต่เมื่อพิจารณาความเหมาะสมในการเลือกใช้เพื่อการผลิตกรดโคจิกที่คุ้มค่าจึงเลือกขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกเท่ากับ 10%ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากให้ผลผลิตกรดโคจิกในปริมาณสูง ใกล้เคียงกับเมื่อใช้หัวเชื้อสปอร์งอกขนาด 15%ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และที่ขนาดหัวเชื้อสปอร์งอก 10% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นค่าที่สอดคล้องกับการทดลองของ Ariff และคณะ (1996) ที่เลือกใช้ขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกของ *A. flavus* ในการผลิตในถังหมักที่ 10%ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองเช่นกัน จะเห็นได้ว่าที่หัวเชื้อสปอร์งอกที่ 15%ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีน้ำหนักแห้งสายใยที่สูงกว่าใช้หัวเชื้อที่ 10%ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อมีปริมาณสายใยหนาแน่นมากการส่งถ่ายออกซิเจนและอาหารจะไม่ดีจึงเห็นว่าผลผลิตกรดโคจิกที่ภาวะนี้ไม่มากเท่าที่ควร และที่10%ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการใช้น้ำตาลมากกว่าที่ 15%ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งๆที่ 10%ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำหนักแห้งสายใยน้อยกว่าที่ 15%ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ แสดงว่าการทำงานของเอนไซม์เมื่อมีปริมาณสายใยไม่หนาแน่นเกินไปจะทำงานได้ดีจึงทำให้น้ำตาลถูกใช้ไปในการผลิตกรดโคจิกมากกว่าที่ 15% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อใช้ และจะพบว่าเมื่อมีการใช้ขนาดหัวเชื้อสปอร์งอกน้อยเกินไปคือ 5%ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อจะให้ประสิทธิภาพในการผลิตกรดต่ำ เมื่อพิจารณาถึงการสลาย น้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตสพบว่า เมื่อมีปริมาณหัวเชื้อมากก็จะมี ประสิทธิภาพในการสลายน้ำตาลสูงด้วย เนื่อง

จากเมื่อมีสายใยมากความสามารถในการสร้างอินเวอร์เทสก็มาก ทำให้มีการสลายน้ำตาลทรายไปเป็นกลูโคสและฟรัคโตส เพื่อใช้ในการเติบโตมากด้วย จึงเห็นว่ามีการสลายน้ำตาลทรายได้เร็วกว่าเมื่อมีสายใยน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตามในภาวะที่ใช้ 10% ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็เป็นภาวะที่เหมาะทั้งในด้านการเติบโตการผลิตและความคุ้มค่าในการทดลอง

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่ามีผลผลิตกรดโคจิกสูงเพียงระดับหนึ่ง จึงสนใจที่จะทำการทดลองปรับปรุงการผลิตเพื่อเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกโดยการเติมแหล่งคาร์บอน(น้ำตาลทราย)ระหว่างการผลิต พบว่าได้กรดโคจิกถึง 72.2% ของปริมาณน้ำตาลที่เติม ซึ่งเป็นผลผลิตที่น่าพอใจเพราะมีการเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอนเท่านั้น สอดคล้องกับรายงานของ Bajpai และคณะ (1992) ที่พบว่าสามารถใช้ *A. oryzae* ที่ผ่านการผลิตกรดมาแล้วมาผลิตกรดโคจิกต่อได้เมื่อมีแต่แหล่งคาร์บอน เพียงอย่างเดียว ซึ่งถ้ามีการเติมสารอาหารมากกว่าหนึ่งครั้ง สูตรอาหารที่เติมควรจะมีแหล่งไนโตรเจนด้วย เนื่องจากมีการศึกษาว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนระหว่างการผลิตกรดโคจิกใช้โดย *A. flavus* NRRL484 พบว่าถึงแม้จะไม่สามารถทำให้ผลผลิตกรด โคจิกเพิ่มขึ้นได้แต่สามารถทำให้สายใยดำรงชีวิตอยู่ได้ (Ariff และคณะ, 1996) ซึ่งในการทดลองนี้ถ้ามีการเติมสารอาหารมากกว่าหนึ่งครั้งก็ควรจะมีการให้แหล่งไนโตรเจนร่วมกับแหล่งคาร์บอนเพื่อรักษาความสามารถในการผลิตและเพื่อให้สายใยดำรงชีวิตอยู่ต่อไปได้ จะเห็นว่าวิธีนี้จึงเป็นวิธีที่มีความเป็นไปได้ในการเพิ่มผลผลิตกรดได้ แต่อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ยังให้ผลผลิตได้ไม่ดีเท่าที่ควร อาจเป็นเพราะยังไม่ได้จัดบางภาวะให้เหมาะสม เช่น ระยะเวลาที่จะเติมสารอาหาร หรือปริมาณสารอาหารที่เติมลงไป

การลดต้นทุนการผลิตและการเพิ่มผลผลิตที่นิยมใช้กันอีกวิธีหนึ่งคือ การใช้สายใยซ้ำ ในการทดลองนี้ใช้สายใยที่ได้จากน้ำหมักจากการผลิตในถังหมักเมื่อมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดมาผลิตกรดโคจิกในอาหารสูตรเพื่อการผลิตที่เคยใช้ โดยเพาะเลี้ยงในขวดเขย่าผลการทดลองพบว่า ความสามารถในการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 43.5 %ของความเข้มข้นน้ำตาลทราย 100 g/l (ตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต ในภาคผนวก ก.3) และยังพบว่ามีการเติบโตของสายใยมากจนกระทั่งสายใย

จับตัวเป็นก้อนใหญ่ เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตประกอบไปด้วยแหล่งไนโตรเจนที่มากพอที่จะทำให้สายใยเติบโตเพิ่ม การที่สายใยเติบโตเพิ่มจะทำให้มีการนำแหล่งคาร์บอนไปใช้ในการเติบโต ซึ่งถ้ามีสายใยมากก็จะมีการใช้แหล่งคาร์บอนในการเติบโตมาก เพราะฉะนั้นจึงมีแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตกรดโคจิกน้อยลง การผลิตกรดโคจิกด้วยวิธีนี้จึงได้ผลผลิตกรดน้อย นอกจากนี้ ผลการทดลองพบว่าการสลายน้ำตาลทรายจะสลายได้ไม่หมด อาจเนื่องจากสายใยที่จับตัวกันเป็นก้อนใหญ่ทำให้ผิวสัมผัสระหว่างสายใยรา อาหาร และอากาศลดลง ทำให้อินเวอร์เทสทำงานได้ไม่เต็มที่ การสลายน้ำตาลทรายเป็นกลูโคสและฟรัคโตสจึงช้า ส่งผลให้สารตั้งต้นที่จะใช้ผลิตกรดโคจิกน้อยลงกรดโคจิกที่ได้ในการทดลองนี้จึงมีปริมาณน้อย จะเห็นว่าวิธีการนี้มีความเป็นไปได้ในการเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกจึงมีผู้สนใจที่จะศึกษาการใช้สายใยซ้ำเพื่อเพิ่มผลผลิตกรด เช่น จินตนา ไกรวัฒนพงศ์ (2535) ที่พบว่าการใช้สายใยซ้ำในการผลิตกรดกลูโคนิกในถังหมัก โดย *Aspergillus niger* G153 ทำให้มีการเพิ่มผลผลิตกรดได้อย่างมาก แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ยังไม่ได้ผลผลิตเป็นที่น่าพอใจ เนื่องจากมีแหล่งไนโตรเจนมากเกินไปทำให้มีการเติบโตมากไป ประกอบกับสายใยที่นำมาใช้เคยถูกใช้ผลิตมาแล้ว อายุของสายใยที่มากนี้ส่งผลให้มีประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่มีทำการผลิตกรดโคจิกได้ไม่เต็มที่ และสายใยนี้อยู่ในภาวะที่ขาดแหล่งไนโตรเจนมาก่อนในถังหมัก การซ่อมแซมและฟื้นฟูสายใยจึงทำได้ยาก จึงควรต้องมีการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมเพื่อไม่ให้มีการเติบโตมากเกินไปแต่ต้องมีการเพิ่มปริมาณสายใยในการผลิตควบคู่กันไปด้วย

เนื่องจากพบว่ามีการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลทราย ในงานวิจัยของ รพี โรจนอุไร (2539)ซึ่งได้ผลผลิตกรดสูงโดยเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. oryzae* K-13 ในขวดเขย่า ในงานวิจัยนี้จึงทำการทดลองผลิตกรดโคจิกในถังหมักเพื่อขยายส่วนผลิตและหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกในถังหมัก พบว่าในการเพาะ *A. oryzae* K-13 เพื่อการผลิตกรดโคจิกในถังหมักโดยใช้น้ำตาลทรายเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถที่จะผลิตกรดโคจิกได้แต่มีผลผลิตกรดลดลง ต่อเมื่อมีการปรับภาวะการให้อากาศ ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะกับการเติบโตและการผลิตกรดโคจิก และหาขนาดหัวเชื้อที่เหมาะสมแล้วผลผลิตกรดโคจิกจึงเพิ่มขึ้น แต่เมื่อมาวิเคราะห์ผลการทดลองพบว่าการ

ใช้น้ำตาลเพื่อการผลิตยังใช้น้อยมากทำให้เหลือปริมาณน้ำตาลเมื่อสิ้นสุดการทดลองมาก แต่ในขณะเดียวกันในบางการทดลองก็พบว่าปริมาณของกรดโคจิกกลับลดลงเมื่อยังคงมีน้ำตาลในระบบอยู่ ซึ่งคาดว่าน่าจะมีการใช้กรดโคจิกร่วมด้วยทั้งๆที่ปริมาณน้ำตาลในระบบยังไม่หมด ซึ่งเป็นไปได้ว่ามีการใช้กรดโคจิกควบคู่กันไปกับการใช้น้ำตาลด้วย ลักษณะดังกล่าวอาจจะเป็นไปตามข้อสรุปของ Wei และคณะ (1991) , Bajpai และคณะ (1982(b) และ รพี โรจนอุไร (2539) ที่ว่าการผลิตและการย่อยสลายกรดโคจิกในระหว่างการหมักจะขึ้นกับบางภาวะที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถึงแม้ว่าเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกยังคงนำน้ำตาลมาผลิตกรดโคจิกได้อยู่ แต่บางภาวะในอาหารเหลวอาจจะทำให้มีการย่อยสลายกรดโคจิกควบคู่กันไปได้ด้วยซึ่งยังไม่มีคำอธิบายที่แน่ชัด

ในงานวิจัยนี้พบว่ามีการผลิตกรดโคจิกและมีการใช้น้ำตาลในการผลิตกรดโคจิกน้อย ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากสาเหตุของระบบการผลิตที่เล็กเกินไปทำให้การเปลี่ยนแปลงต่างๆเพียงเล็กน้อยเช่น การหยุดการควบคุมเมื่อเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หรือ การแปรปรวนของค่าออกซิเจนละลายระหว่างการผลิตหรือปัจจัยอื่น ซึ่งส่งให้การใช้น้ำตาล การผลิตกรดโคจิก และการเติบโต มีปริมาณน้อย หรือสาเหตุสำคัญอีกประการที่อาจเป็นไปได้คือ แรงเฉือนของการปั่นกวน ความเร็วในการกวนที่ใช้ในงานวิจัยนี้จะอยู่ในช่วง 250-400 รอบต่อนาที ซึ่งอาจจะเป็นการปั่นกวนที่ค่อนข้างรุนแรงสำหรับราสายพันธุ์นี้ แต่อย่างไรก็ตามยังพบการเติบโตเมื่อภายใต้ภาวะที่มีการกวนดังกล่าว ดังนั้นถ้าผลผลิตที่ต่ำนี้เกิดจากปัจจัยแรงเฉือนแล้ว น่าจะเกิดกับสายใยเพียงบางส่วนเท่านั้น ซึ่งจากผลการวิจัยนี้พบว่าที่จะบรรลุวัตถุประสงค์ที่เมื่อปรับภาวะสำหรับการผลิตเป็น 2 ช่วงคือ ช่วงแรกเหมาะกับการเติบโตและช่วงต่อมาเหมาะกับการผลิตของ *A. oryzae* K-13 จะส่งผลให้มีการผลิตกรดโคจิกมากขึ้นและใช้เวลาน้อยลงกว่าการไม่จัดภาวะเป็น 2 ช่วง นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ก็พบว่ามีความเป็นไปได้ที่จะปรับปรุงการผลิตโดยการเติมแหล่งคาร์บอนและการใช้สายใยซ้ำกับราสายพันธุ์นี้ ทำให้เป็นแนวทางในการผลิตในระดับขยายส่วนที่ใหญ่กว่านี้ โดยใช้ราสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ภายในประเทศต่อไป

ข้อเสนอแนะ

น่าจะมีการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกโดยวิธีการเติมสารอาหาร(แหล่งคาร์บอน)ระหว่างการเพาะเลี้ยง เช่น ระยะเวลาที่จะเติมสารอาหาร ปริมาณสารอาหารที่จะเติม หรือ อาจจะมีการเพิ่มสารอาหารอื่นๆพร้อมกับแหล่งคาร์บอนที่เติมระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วย

น่าจะมีการหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตแบบใช้สายใยซ้ำ เพื่อให้มีการเติบโตที่ไม่มากจนเกินไปและทำให้มีการผลิตกรดโคจิกที่มากขึ้น นอกจากนี้น่าจะเพิ่มปริมาณสายใยที่จะใช้ผลิตโดยใช้สายใยซ้ำเพื่อให้มีปริมาณสายใยผลิตกรดโคจิกได้มากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จินตนา ไกรวัฒนพงศ์. 2536. การผลิตกรดกลูโคนิคในรูปโซเดียมกลูโคเนต โดย *Aspergillus sp.* สายพันธุ์ G153. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เพชรรุ่ง พันธ์พิริยะ. 2536. การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดโคจิก. รายงานการวิจัยโครงการส่งเสริมประสบการณ์การเรียนการสอนในเชิงวิทยาศาสตร์ ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รพี โรจนอุไร. 2539. ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในระดับขวดเขย่า. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

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

Ariff, A. B., Rosfarizan, M., Herng, L. S., Madihah, S. and Karim, M. I. A. 1997. Kinetics and modelling of kojic acid production by *Aspergillus flavus* Link in batch fermentation and resuspended mycilial system. World J. Microbiol. Biotech. 13 : 195-201.

Arnstein, H. R. V. and Bentley, R. 1953. The biosynthesis of kojic acid. Biochem. J. 54 : 493-508.

Arsennoult. R., Trottler, M., Chomet, R. and Jollez, P. 1996. Process of aqueous extraction of maltol. US Patent, 5,646,312.

Barhracharya, L. N. and Mudgett, L. 1980. Organic acid fermentation . Fermentation technology. pp. 659-663. New York: Academic Press, Inc.

Barham, H. N. and Smith, B. L. 1936. Kojic acid – A review. Trans. Kansas. Acad. Sci. 37 : 91-113. Cited in Bajpai, P., Agrawala, K. and Vishwanathan, L. 1982. Kojic acid : Synthesis and properties. J. Sci. Ind. Res. 41: 105-194.

Bajpai, P., Agrawala, P. K. and Vishwanathan, L. 1981. Enzymes relevant to kojic acid biosynthesis in *Aspergillus flavus*. J. Gen. Microbiol. 127 : 131-136.

Bajpai, P., Agrawala, K. and Vishwanathan, L. 1982 a. Kojic acid : Synthesis and properties. J. Sci. Ind. Res. 41 : 105-194.

Bajpai, P., Agrawala, K. and Vishwanathan, L. 1982 b. Production of kojic acid by resuspended mycelia of *Aspergillus flavus*. Can. J. Microbiol. 28 : 1340-1346.

Baregaard, P., Heldt - Hansen, H. P. and Diderichsen, B. 1992. On the safety of *A.oryzae* : a review. Appl. Microbiol. Biotech. 36 : 569-572.

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

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

Bhatia, T., Kaushik, N. K. and Sodhi G. S. 1988. Thermal studies of organomercury (II) complexes of kojic acid and maltol. J. Phys. C: Solid State Phys. 21 : 4681-4685.

Cabanes, J., Soledad, C. and Garcia-Carmona, F. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. J. Pharm. Pharmacol. 46 : 982-985.

Cabanne, F. and Gagnebien, F. 1995. Compositions and methods for combating blemishes and/or ageing of the skin. FRX patent , 5,547,678.

Campbell, F. and Miyano, M. 1989. Kojic acid ether – ester derivatives. US Patent, 4,812,474.

Caravan, P. Gelmini, L., Glover, N., Herring, F. G., Li, H. L., Mcneill, J. H., Rittig, S. J., Setyarati, I. A., Shuter, E., Sun, Y., Tracey, S. S. and Yuen, V. G. 1995. Reaction Chemistry of BMOV, Bis (maltolato)oxovanadium (IV)-A potent insulin mimetic agent. J. American Chem. Soc. 117 : 12759-12770.

Challenger, F., Klein, L. and Walker, T. K. 1929. The Production of kojic acid from pentose by *Aspergillus oryzae*. J. Chem. Soc. 1499-1505.

Chen, J. S., Wei, C. and Marshall, M. R. 1991. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. J. Agric. Food. Chem. 36 : 1867-1901. Cited in Nishimura, T., Kometani, H., Takii, H., Yoshimobu, Y. and Okada, S. 1994. J. Ferment. Bioeng. 78 (1) : 37-41.

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

Crueger, W. and Crueger, A. 1990. Organic acids in T. D. Brock. (ed.) Biotechnology : A textbook of industrial microbiology, pp. 148. Sunderland: Sinaure associates, Inc.

Dowd, P. F. 1990. Kojic acid and esters as insecticide synergists. US Patent, 49,585,455.

Down, P. E. 1990. Kojic acid and esters as insecticide synergists. IL Patent , 4,956,353.

El-Sharkawy, S. H. 1995. Kojic acid production from cocoa juice by *Aspergillus flavus* entrapped in calcium alginate. Bolletino Chim. Faimac. 134(6) : 316-9.

Foster, J. W. and Karow, E. O. 1945. Toxicity and antibiotic activity of kojic acid produced by *Aspergillus luteo-virescens*. J. Bact. 49 : 19-25. Cited in Beelik, A. 1956. Adv. Carbohydr. Chem. 11 : 145-183.

Fugimoto, N., Watanabe, H., Nakatani, T., Roy, G. and Ito, A. 1998. Induction of thyroid tumours in (C57BL/6N×C3H/N)F-1 mice by oral administration of kojic acid. Food Chem. Toxic. 36(8) : 697-703.

Gagnebien, C. F. 1993. Composition and methods for combating blemish and/or aging of skin. FRX Patent, 5,547,678.

Griat, J. 1996. Stable acidic oil-in-water type emulsions and composition conditioning. FRX Patent, 5,531,993.

Gray, W. D. 1959. Synthesis of kojic acid . The relation of fungi to human affairs. pp. 248-257. New York: Henty Holt and company, Inc.

Gupta, S. R., Viswanathan, L. and Venkitasubramanian, T. A. 1971. A Comparative study of toxigenic and non-toxigenic strains of *Aspergillus flavus*. J. Gen. Microbiol. 65 : 243-247.

Hansen, R. S. and Phillips, J. A. 1981. Chemical composition. In P. Gerhardt (eds.). Manual of methods for general bacteriology. pp. 328-336. Washington American Society for Microbiology.

Hara, W. Composition for external application. US Patent , 4948577.

Hatae, S. 1990 a. Method of minimizing erythema and elastosis. JPX Patent.4,919,921.

Hatae, S. 1990 b. Compositions for topical use having melanin synthesis inhibiting activity. JPX Patent, 4,949,921.

Hatae, S. and Nakashima, K. 1989. Whitening cosmetic. JPX Patent ,4,847,074.

Higa, Y. 1987. Melanin inhibiting cosmetics composition. US Patent, 4,696,813.

Imose, J., Nonomura, S. and Tatsumi, C. 1970. Studies on kojic acid metabolism by microorganisms. Agr. Biol. Chem. 41 : 156-162.

Ishihara, K., Honma, N., Matsumoto, I., Imai, s., Nakazawa, S. and Iwafuchi, H. 1996. Comparison of volatile component in soy-source (Koikuchi shoyu) produced using *Aspergillus-sijae* and *Aspergillus-oryzae*. J. the Japan Soc. Food Sci. Tech. Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi. 43 : 1603-1074.

Ishilawa, H., Hiromi, C. J. P. and Iwasa, I. C. J. P. 1996. Process for producing wheat flour and wheat flour products. US Patent, 5,695,799.

Itaru, S. 1995. Whitening embellisher. JPX Patent, 5,427,775.

Izumi, N. 1981. Cosmetic composition containing kojic acid ester. US Patent, 4,278,656.

Izumi, N. 1983. Cosmetic composition containing kojic acid ester. US Patent, 4,369,174.

Junko, W. 1998. Synthetic medium for production of kojic acid. JPX Patent, 10,165,172A.

Katagiri, H. and Kitahara, K. 1933. Formation of kojic acid by *Aspergillus oryzae*. Mem. Coll. Agric. Kyoto Imp. Univ. 26 (1933) : 1-29. Chem. Abst. 27 : 3235.

Kavanagh, F. 1947. Activities of twenty-two antibacterial substances against nine species of Bacteria. J. Bact. 54 : 761-766.

Kayahara, H., Shibata, N., Tadasa, K., Maeda, H., Kotani, T. and Ichimoto, I. 1990. Amino acid and peptide derivatives of kojic acid and their antifungal properties. Agric. Biol. Chem. 54 : 24412442.

Kitao, S. and Sekine, H. 1994. Synthesis of two kojic acid glucosides with sucrose phosphorylase from leuconostoc mesenteroides. Biosci .Biotech. Biochem. 58 : 419-420.

Kobayashi, Y., Kayahara, H., Tadasa, K., Nakamura, T. and Tanaka, H. 1995. Synthesis of amino acid derivatives of kojic acid and their tyrosinase inhibitory activity. Biosci. Biotech. Biochem. 59(9) : 1745-1746.

Koji, A. 1997. Cultivation of kojic acid producing bacterium. JPX Patent, 9,220,095A.

Kondo, K. 1949. Fermentation products of l-sorbose by acetic acid bacteria. J. Ferment. Technol. 27 : 1-5.

Kouno, N. and Suzuki, J. 1994. Acid dye stainning method. JPX Patent, 5,284,560.

Kwak, M. Y. and Joon, S. R. 1992. Controlled mycilial growth for kojic acid production using Ca-alginate immobilized fungal cell. Appl.

.Microbiol. Biotechnol. 36 : 578-583. Cited in Cabanes, J., Soledad, C. and Garcia-Carmona, F. 1994 . J. Pharm. Pharmacol. 46 : 982-985.

LeBlanc, D. T. and Akers, H. A. 1989. Maltol and ethyl maltol : From the larch Tree to successful food additives. Food Tech. 48 : 72-83.

Lim, J. T. E. 1999. Treatment of melasma using Kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. Derma. Surg. 25(4) : 282-284.

Lin, M. T., Mahajan, J. R., Dianese, J. C. and Takatsu, A. 1976. High production of kojic acid crystals by *Aspergillus parasiticus* UNBF A12 in liquid medium. Appl. Environ. Microbiol. 32 : 298-299.

Liu, K. J. and Shaw, J. F. 1998. Lipase-catalyzed synthesis of kojic acid esters in organic solvents. J. American Oil Chem. Soc. 75(11) : 1507-1511.

Lokaj, J., Kozisck, J., Koren, B., Uher, M. and Vrabel, B. 1991. Structure of kojic acid. Acta Cryst. 47 : 193-194.

Masateru, M. and Shone, E. L. 1989. Aralkoxy and aryloxyalkoxy kojic acid derivatives. IL Patent, 4,812,584.

May, O. E., Moyer, A. J., Wells, P. A. and Herrick, H. T. 1937. The production of kojic acid by *Aspergillus flavus* J. American Chem. Soc. 53 : 774-782.

McCulloch, C. R. 1961. Polyurethane chelates from kojic acid. US Patent, 2,986,553. 1961. Chem. Abst. 55 : 19332.

McNeill, J. H. 1996. Bis(maltolato)oxobanadium compositions for the treatment of elevated blood sugar. CAX Patent, 5,527,790.

Merck, 1989. Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. In S. Budavari, M. J. O., N. Smith and P. E. Heckelman (eds.), The Merck index. pp. 838. New Jersey: Merk & Co. Inc.

Meybeck, A. 1994. Pharmaceutical of cosmetic composition containing hydriquinone and kojic acid. US Patent,.5,279,834.

Mitsumori, K., Onodera, H., Takahashi, M., Funakoshi, T., Tamura,t, Yasuhara, K., Takegawa, K. and Takahashi, M. 1999. Promoting effects of kojic acid due to serum TSH elevation resulting from reduced serum thyroid hormone levels on development of thyroid proloferative lesions in rats initiated with N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine. Carcinogenesis. 20(1) : 173-176.

Miyano, M., Deason, J. R., Nakao, A., Stealey, M. A., Vilamil, C. L., Sohn, D. D. and Mueller, R. A. 1988. (Acyloxy)benzophenones and 9 Acyloxy)-4-pyrones. A New Class of Inhibitors of Human Neutrophile Elastase. J. Med. Chem. 31 : 1052-1061.

Morisaki, K. and Ozaki, S. 1996. Design of novel hybrid vitamin C derivatives-thermal stability and biological activity. Chem. Phama. Bulletin. 44(9) : 1647-1655.

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

Motono, M. 1991. External preparations free of discoloration. US Patent, 4,985,455.

Murray, R. K., Grawner, D. K., Mayers, P. A. and Rodwell, V. W. 1993. Biosynthesis and inhibition of tyrosine. Harper's biochemistry. pp. 193-196. New York: Appleton and Lange, Inc.

Naranong, N. and Saithi, S., " Influence of aeration and agitation rate on the production of kojic acid from *Aspergillus oryzae*" Paper presented at the 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999 and the 11th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Phuket, Thailand, 15-18 November 1999.

Niwa, Y., Akamatsu, H. 1991. Kojic acid scarvenges free radical white potentiating leukocyte function including free radical generation, Inflam. 15 : 303-315.

No, J. K., Soung, D. Y., Kim, Y. J., Shim, K. H., Jun, Y. S., Rhee, S. H., Yokozawa, T. and Chung, H. Y. 1999. Inhibition of tyrosinase by green tea components. Life Sci. 65(21) : 241-246.

Ogawa, A. and Niwa, Y. 1995 a. Production of kojic acid by membrane surface liquid culture of *A.oryzae* NRRL 484. J. Ferment. Biol. 80 : 41.

Ogawa, A. and Niwa, Y. 1995 b. Production of kojic acid from *A.oryzae Var. Oryzae* by membrane surface liquid culture. Biotechnol. Tech. 9 : 153-156.

Ohawa, A., Morita, Y., Tanaka, T., Sakayama, T. and Nakanishi, K. 1995. Production of kojic scid from *Aspergillus oryzae Var.Oryzae* by membrane-surface liquid culture. Biotechnol. Technol. 9 : 153-156.

Oyama, Y. 1991. Compositions for topical use having melanin synthesis inhibiting activity. JPX Patent, 4,990,330.

Parrish, F. W., Wiley, B. J., Simmons, E. G. and Long, L. Jt. 1966. Production of aflatoxins and kojic acid by species *of Aspergillus* and *pennicillium.* Appl. Microbiol. 14 : 139-140.

Prescott, S. C. and Dunn, C. G. 1959. The kojic acid fermentation, In C. G. Dunn (ed.), Industrial. microbiology. pp. 609-617. New York: McGraw-Hill book company.

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

Rosfarizan, M. and Ariff, A. B. 2000. Kinetics of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources. J. indust. Microbiol. Biotechnol. 25(1) : 20-24.

Saito, K. 1907. Uber die Saurebildung bei *Aspergillus oryzae*. Botan. Mag. Tokyo. 21 : 240. Cited in Gray, D. W. 1959. The relation of fungi to human affairs. pp. 248-255. New York: Hinry Holt And Company,Inc.

Sakaguchi, K., Asia, I. and Ikeda, Y. (1948). Kojic acid fernentation. J. Agric. Chem. Soc. Japan. 19(1943) : 711-712. Chem. Abst. 42 : 5508c. Cited in Cited in Beelik, A. 1956. Adv. Carbohydr. Chem. 11 : 145-183.

Sakai, M. 1995. Whitening embillsher. US Patent ,5,427,775.

Sato, K., Sakamoto, S., Maitano, T. and Yamada, T. 2000. Effect of cooking and other treatments on residual kojic acid in shrimps. J. Food Hyg. Soc. Japan. 41(2) : 122-125.

Scheved, F., Pierson, M. D. and Juven, B. J. 1996. Sensitization of Escherichia coli to nisin by maltol and ethyl maltol. Lett. Appl. Microbiol. 22(3) : 189-191.

Shigetaka, M. 1995. Production of kojic acid glucoside and production of kojic acid monoglucoside. JPX Patent ,7,236,496A.

Shih, Y. and Zen, J. M. 1999. Voltammetric determination of kojic acid in cosmetic bleaching products using a disposable screen printed carbon electrode. Electroanalysis. 11(4) : 229-233.

Suh, D. Y., Han, Y. N. and Han, B. H. 1996. Maltol and antioxidant component of korean red ginseng shows little prooxidant activity. Archives Pharm. Res. 19(2) : 112-115.

Takahashi, T. and Toshinobu, T. 1933. The productions of fructose and kojic acid from mannitol by the acetic acid bacteria. II. Effect of pH of the culture solution and the addition of calcium carbonate. J. Agr. Chem. Soc. Japan. 9(1993) : 369-374. Chem. Abst. 27 : 3735.

Takamizawa, K., Nakashima, S., Yahashi, Y., Kubata, K. B., Suzuki, T., Kawai, K. and Joritsu, H. 1996. Optimization of kojic acid production rate using the Box-Wilson method. J. Ferment. Bioeng. 82(4) : 414-416.

Tamiya, I. H. (1928). Metabolism of *Aspergillus oryzae*. Acta phytochim. 3 (1927) : 51-67. Chem. Abst. 22 : 1990.

Tamura, T., Mitsumori, K., Onodera, H., Fujimoto, N., Yasuhara, K., Takegawa, K. and Takahashi, M. 1999. Inhibition of thyroid iodine uptake and organification on rats treated with kojic acid. Toxic. sci. 47 (2) : 170-175.

Turner, W. B. 1971. Secondary metabolites derived from glucose. In W. B. Turner (ed.). Fungus metabolites. pp. 2. London and NewYork : Acedemic press.

Uchino, K., Nagawa, M., Tonosaki, Y., Oda, M. and Fuluchi, A. 1998 . Kojic acid as an antispeck agent. Agri. Biol. Chem. 52 : 2609-2610.

Ushijima, S., Nakadai, T. and Uchida, K. 1990. Further evidence on the interspecific protoplastofusion between *Aspergillus sojae* and subsequent haplodization, with special reference to their production of some hydrolyzing enzymes. Agri. Biol. Chem. 54 : 2393-2399.

Walter , C. O. K. and Glen, H. 1949. Fungicidal compositions. Chem. Abst. 24 : 4419 .

Wei, C. I., Huang, T. S., Chen, J. S., Marshall, M. T. and Chung, K. T. 1991. Production of kojic acid by *Aspergillus candidus* in three culture media. J. Food Prot. 54 : 546-518.

Yabuta, T. 1916. A new organic acid (kojic acid) formed by *Aspergillus oryzae*. Chem. Soc. 37 : 1185-1233.

Yabuta, T. 1913. Kojic acid, a new organic acid formed by *Aspergillus oryzae* .Orig. Com. Intern. Congr. Appl. chem. 25(1912) : 455-462 . Chem. Abst. 7 : 2191.

Yamamoto, S. 1991. External proparations. US Patent ,4,990,532.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็งโปเตโตเด็กซ์โตรส (Potato Dextrose Agar)

   ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

   มันฝรั่งหั่น 200 กรัม
   เด็กซ์โตรส 20 กรัม
   วุ้นผง 20 กรัม

เตรียมโดยนำฝรั่งล้างให้สะอาด ปอกเปลือก และหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนักให้ได้ 200 กรัม ต้มในน้ำเดือดนาน 15-20 นาที กรองเอาส่วนน้ำออกมาเติมส่วนประกอบที่เหลือ ละลายให้เข้ากัน เติมน้ำปลอดประจุให้ครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอก

   ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

   น้ำตาลซูโครส 10 กรัม
   สารสกัดจากยีสต์ 1 กรัม

เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดโคจิก
ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตรประกอบด้วย

น้ำตาลทรายขาว 100 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต 0.24 กรัม

เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

วิธีเตรียมสารเคมีที่สำคัญที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายเฟอริกคลอไรด์

   เตรียมโดยละลายเฟอริกคลอไรด์ 5 กรัม ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาในตู้เย็น

2. สารละลายฟีนอล

   เตรียมโดยละลายฟีนอลปริมาณ 25 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก

   เตรียมกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 5 กรัมละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บนอ่างน้ำร้อน คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เติมโซเดียมโปตัสเซียมตาร์เตรต 150 กรัม คนให้ละลายจนหมด เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 500 มิลลิลิตร เก็บขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

4. สารละลายอะซิโตรไนไตรล์เข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์

   เตรียมอะซิโตรไนไตรล์ปริมาตร 75 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปไล่ฟองอากาศโดยใช้เครื่องดูดสูญญากาศ (เตรียมสารละลายใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

5. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.5 นอร์มัล

ตวงกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 41.45 มิลลิลิตร เทลงในน้ำกลั่น ปริมาณ 1,000 มิลลิลิตรเก็บในขวดสีชา

6. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.5 นอร์มัล

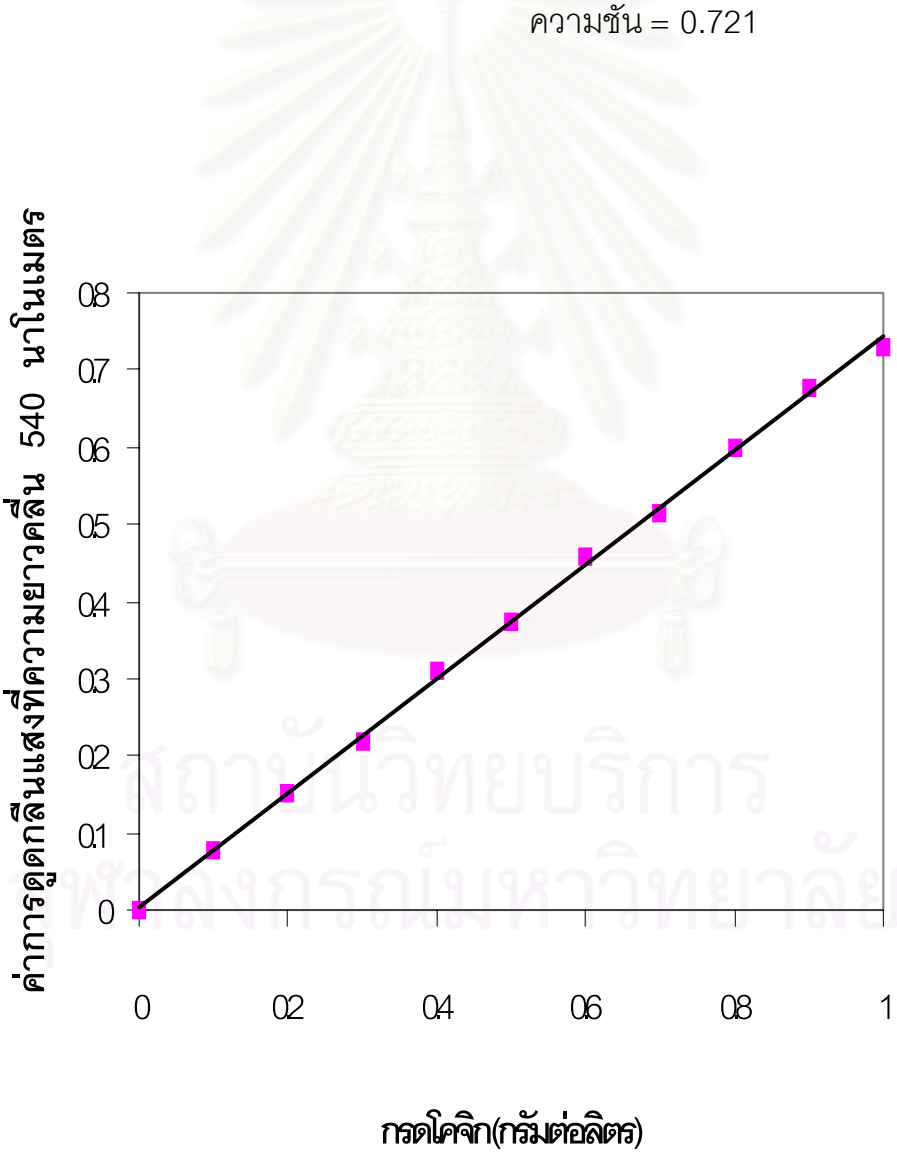
เตรียมสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 20.5 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดพลาสติกทนด่าง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

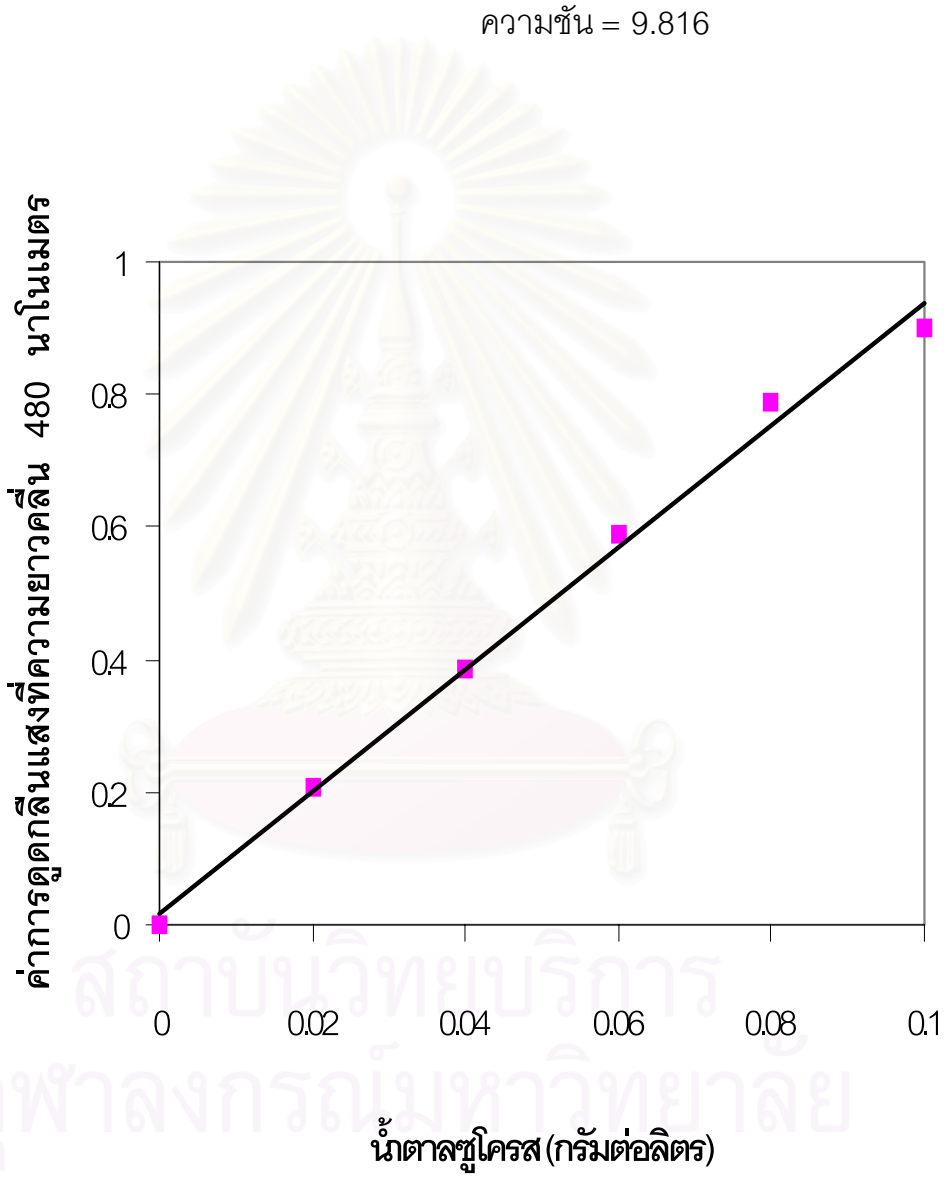
ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของกรดโคจิก เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกด้วยวิธีของ Bentley (1957)

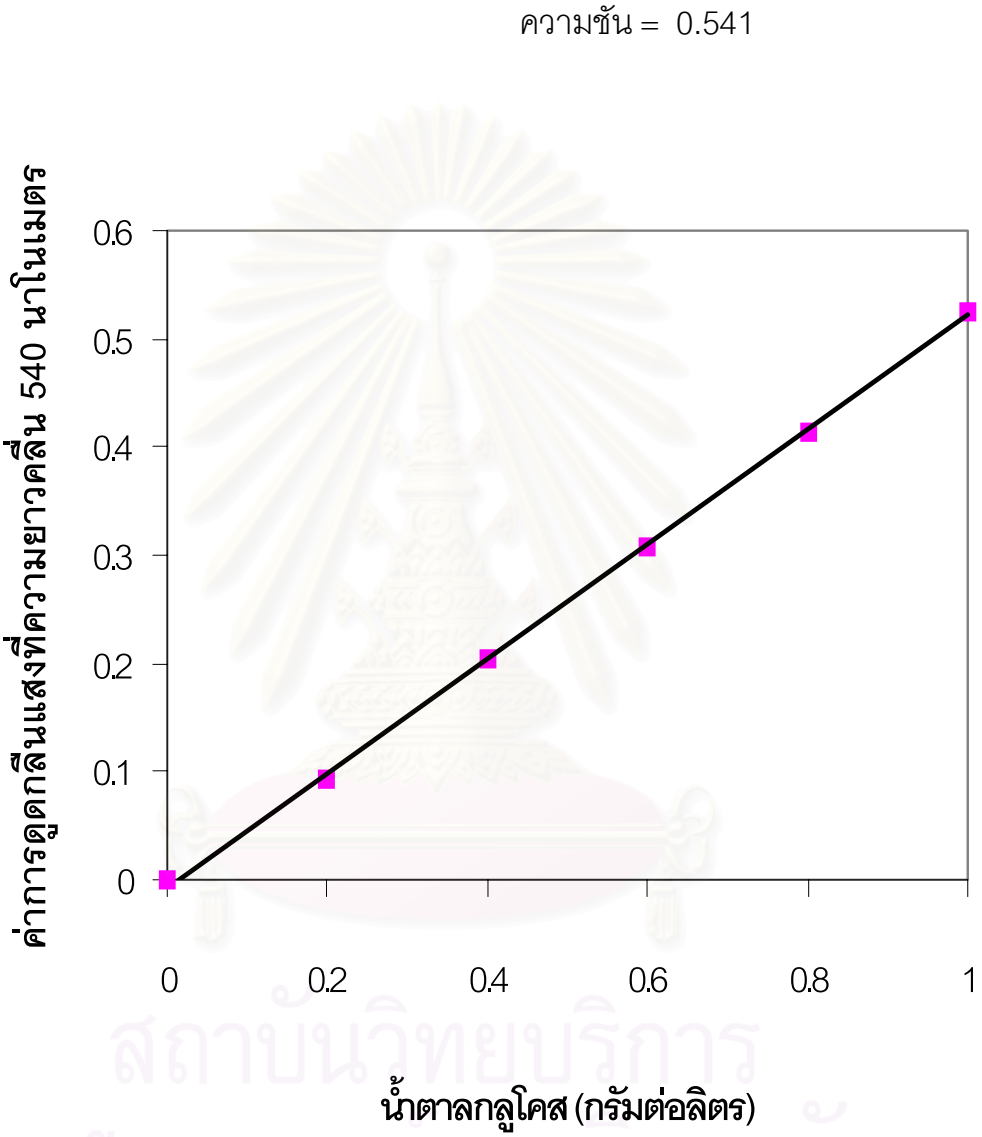


2. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์โดยใช้การทำปฏิกิริยาของฟีนอล และกรดกำมะถันเข้มข้น กับน้ำตาลซูโครส (Hansen และ Phillips,1981)



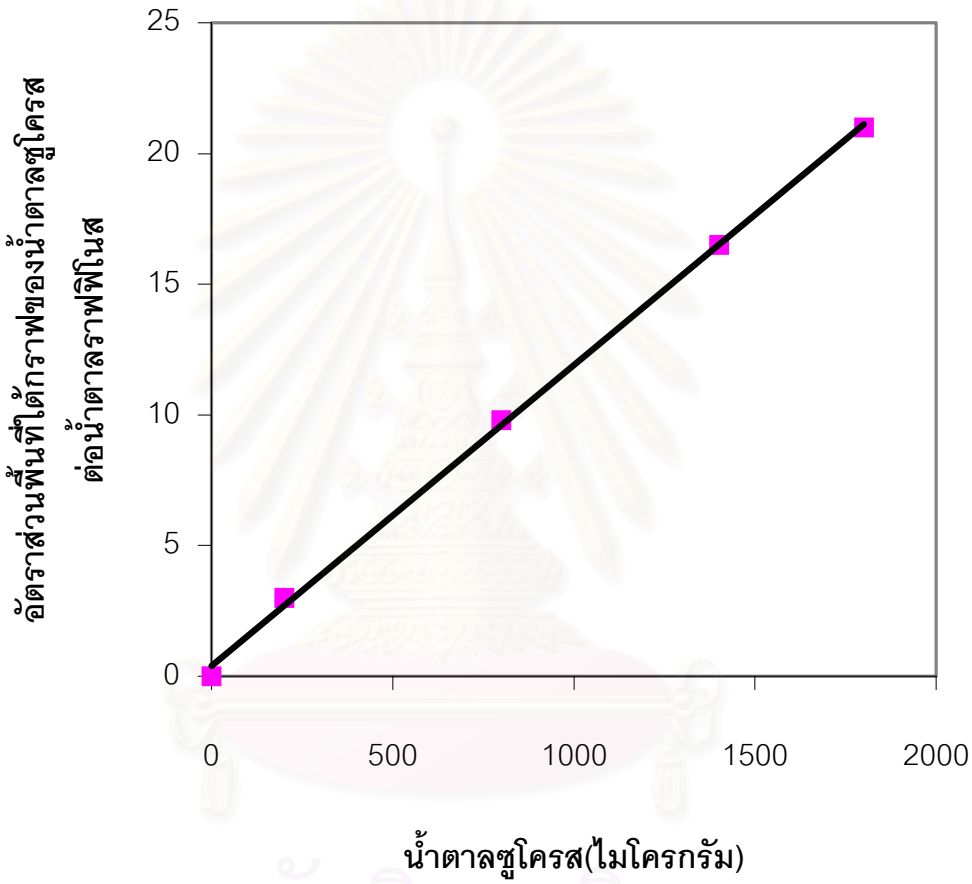
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Bernfeld (1955)



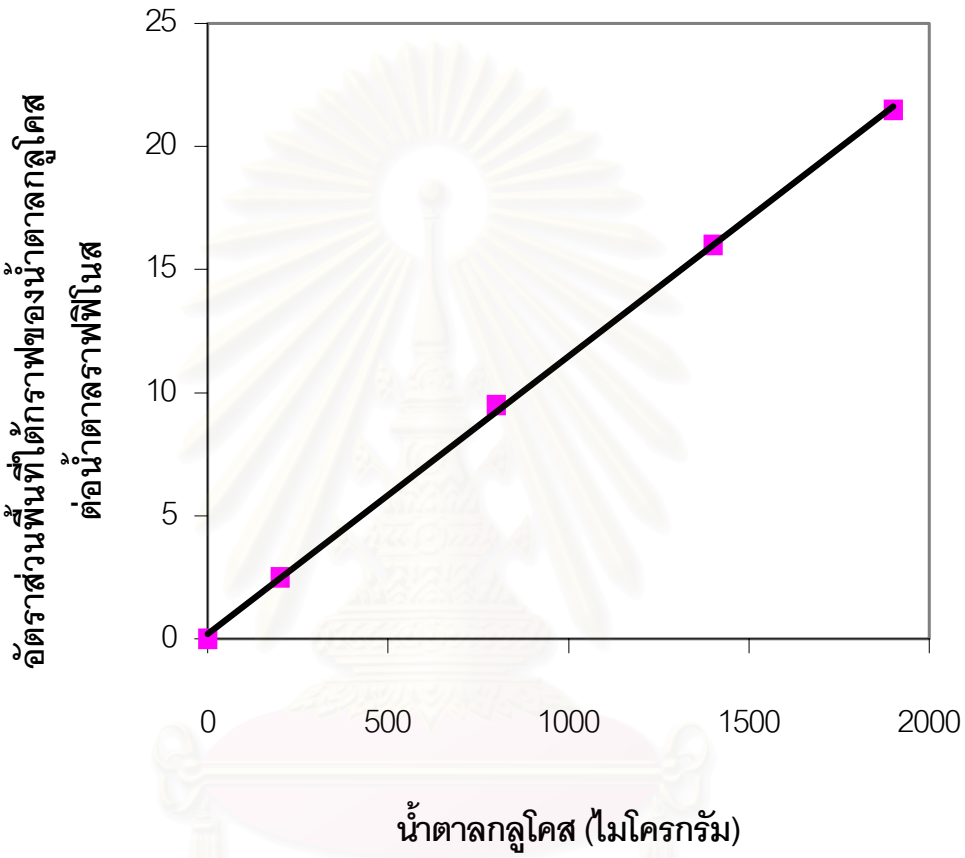
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. กราฟมาตรฐานของการหาปริมาณน้ำตาลซูโครส เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



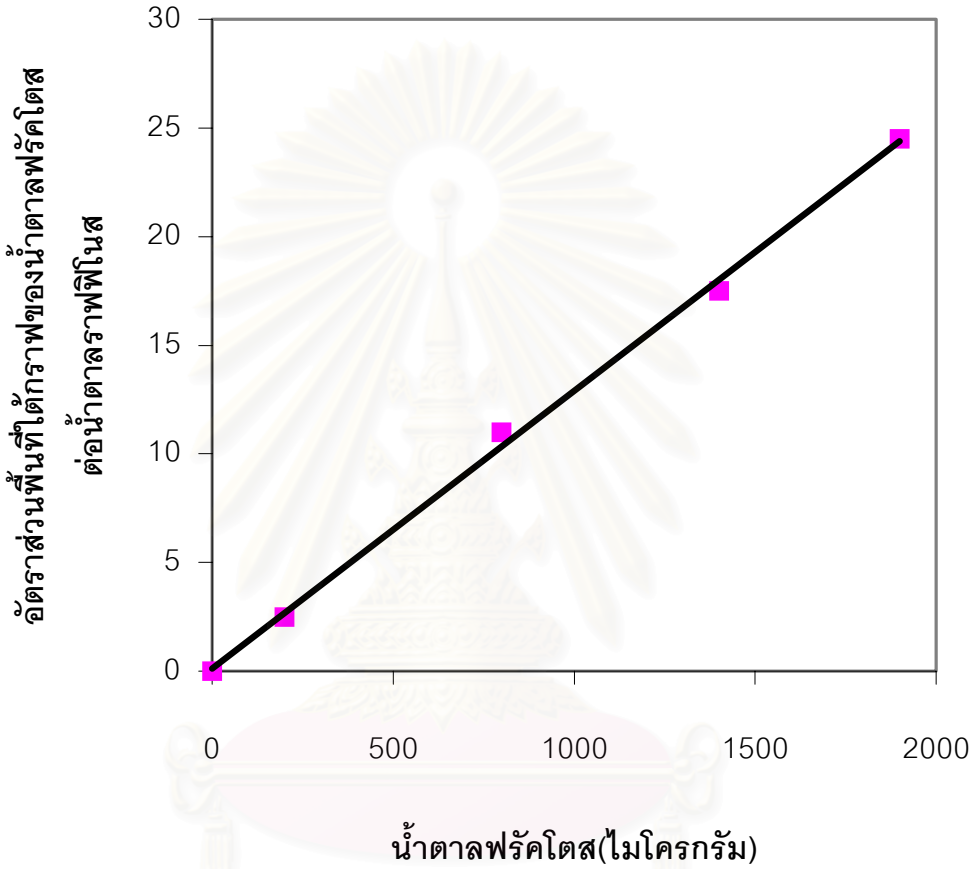
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. กราฟมาตรฐานของการหาปริมาณน้ำตาลกลูโคส เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. กราฟมาตรฐานของการหาปริมาณน้ำตาลฟรัคโตส เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาว อุษา สรรค์วัฒนา เกิดวันที่ 25 เมษายน พ.ศ. 2518 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนสตรีศรีสุริโยทัย จังหวัดกรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ. 2536 ต่อมาสำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีวิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2539 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2540

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย