สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1

KOJIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH BY *Aspergillus* sp. BR1

T061200

อภิชญา ทองทับ

APHICHAYA THONGTHAP

วพ.
ด 249ก
2548

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 61200
วัน,เดือน,ปี 17 ก.ค. 2549

b. 11914652
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2548

ISBN 974-15-2064-6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KOJIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH BY *Aspergillus* sp. BR1

APHICHAYA THONGTHAP

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2005

ISBN 974-15-2064-6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2005

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1
นักศึกษา	นางสาวอภิชญา ทองทับ
รหัสประจำตัว	45064558
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2548
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

Aspergillus sp. BR1 เป็นเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้า และสามารถผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังได้ในปริมาณสูง การศึกษาอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่า พบว่า อาหารสูตร Starch medium ที่เหมาะสมประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 2.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 11.62 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.078 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตกรดโคจิก (Q_p) เท่ากับ 3.873 กรัมต่อลิตรต่อวัน อัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะ (q_p) เท่ากับ 0.566 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ต่อวัน และมีผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.214 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล ผลการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกระหว่างเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 และ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในอาหาร Starch medium สูตรเหมาะสมที่ใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร แทนแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร พบว่า เชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ผลิตกรดโคจิกได้ 24.25 กรัมต่อลิตร ส่วนเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 ผลิตกรดโคจิกได้ 18.72 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 มีอัตราการผลิตกรดโคจิก(Q_p) และอัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะ (q_p) มากกว่าเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 ถึง 2 เท่า เมื่อนำเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 มาเลี้ยงในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาดความจุ 5 ลิตร เพื่อศึกษาผลของการกวนและการให้อากาศที่มีต่อการผลิตกรดโคจิก พบว่า เชื้อมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 16.36 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.097 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตกรดโคจิก (Q_p) เท่ากับ 4.091 กรัมต่อลิตรต่อวัน อัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะ (q_p) เท่ากับ 0.533 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ต่อวัน และมีผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.218 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Kojic Acid Production from Cassava Starch by *Aspergillus* sp. BR1
Student	Miss Aphichaya Thongthap
Student ID	45064558
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2005
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nuanphan Naranong

ABSTRACT

Aspergillus sp. BR1, isolated from lookpang-lao, showed high level of kojic acid production using cassava starch as a carbon source. In this study, the optimal medium for kojic acid production in shaking flask was investigated. It was found that the optimal Starch medium contained (g/l) : cassava starch, 60 ; yeast extract, 2.5 ; $NaNO_3$, 2.5 ; KH_2PO_4, 1.0 ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 and initial pH of 3.5. The highest kojic acid production was 11.62 g/l on day 3 of cultivation with the specific growth rate (μ) of 0.078 h^{-1}. In this medium, the productivity (Q_p), the specific production rate (q_p) and product yield based on sugar consumed ($Y_{p/s}$) were 3.873 g/l.d, 0.566 g kojic acid/g cell.d and 0.214 g kojic acid/g sugar, respectively. The comparison of kojic acid production between *Aspergillus* sp. BR1 and *Aspergillus oryzae* NRRL 484 in the optimal medium using 100 g/l glucose instead of 60 g/l cassava starch was also studied. From the results, the kojic acid concentration produced by *Aspergillus* sp. BR1 and *A. oryzae* NRRL 484 were 24.25 g/l and 18.72 g/l, respectively. Moreover, the productivity (Q_p) and the specific production rate (q_p) by *Aspergillus* sp. BR1 were 2.0 times higher than those of *A. oryzae* NRRL 484. The cultivation of *Aspergillus* sp. BR1 in a 5 litre stirred-tank fermenter was studied to determine the influence of agitation speed and aeration rate on growth and kojic acid production. The maximum kojic acid production was 16.36 g/l on day 4 of cultivation at the agitation speed of 500 rpm and aeration rate of 1.5 vvm with the specific growth rate (μ) of 0.097 h^{-1}. The productivity (Q_p), the specific production rate (q_p) and product yield based on sugar consumed ($Y_{p/s}$) were 4.091 g/l.d, 0.533 g kojic acid/g cell.d and 0.218 g kojic acid / g sugar, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ผศ. วีนา ชูโชติ และ รศ.อรไท สุขเจริญ ซึ่งเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนข้อชี้แนะในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านการติดต่อประสานงาน และอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์และสารเคมี

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ และน้อง ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้ข้อคิดเห็น และเป็นกำลังใจที่ดี

ที่สำคัญขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ที่คอยเป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนตลอดมา

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้แด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

อภิชญา ทองทับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญภาพ.....XI

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....1

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 แหล่งที่พบในธรรมชาติและการผลิตกรดโคจิก.....3

2.2 โครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติของกรดโคจิก.....8

2.3 การสังเคราะห์กรดโคจิก.....8

2.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก.....11

2.5 ประโยชน์ของกรดโคจิก.....15

2.6 แป้งมันสำปะหลัง.....17

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....20

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....20

3.2 วิธีการวิจัย.....21

3.2.1 เชื้อจุลินทรีย์.....21

3.2.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส
และกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* ในอาหารแข็ง.....22

3.2.2.1 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส.....22

3.2.2.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตกรดโคจิก.....22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.3 การศึกษาการผลิตกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว.....22
3.2.4 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่า.....23
3.2.4.1 การศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง.....23
3.2.4.2 การศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ แทนยีสต์สกัด.....2 3
3.2.4.3 การศึกษาการใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ.....23
3.2.4.4 การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม.....23
3.2.5 การเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus* ที่คัดเลือกได้กับเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....2 4
3.2.6 การศึกษาการผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบตช์.....24
3.2.6.1 การเตรียมกล้าเชื้อ.....24
3.2.6.2 การศึกษาความเร็วในการกวนที่เหมาะสม.....24
3.2.6.3 การศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม.....24
3.2.7 การศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA (ELISA test kit).....25
3.3 วิธีการวิเคราะห์.....25

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....26
4.1 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* ในอาหารแข็ง.....26
4.1.1 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส.....26
4.1.2 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดโคจิก.....27
4.2 ผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว.....29
4.3 ผลการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่า.....33
4.3.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง.....33
4.3.2 ผลการศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ แทนยีสต์สกัด.....37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.3 ผลการศึกษาการใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ.....41
4.3.4 ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม.....46
4.4 ผลการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ที่คัดเลือกได้ กับเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....50
4.5 ผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบตช์.....53
4.5.1 ผลการศึกษาความเร็วในการกวนที่เหมาะสม.....53
4.5.2 ผลการศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม.....57
4.6 ผลการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซิน โดยวิธี ELISA (ELISA test kit).....61

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....63

บรรณานุกรม.....65

ภาคผนวก ก.....71
ภาคผนวก ข.....72
ภาคผนวก ค.....73
ภาคผนวก ง.....82
ภาคผนวก จ.....83

ประวัติผู้เขียน.....98

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 รายงานการค้นพบกรดโคจิก....4
2.2 เชื้อราที่ผลิตกรดโคจิก....5
2.3 แหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์กรดโคจิก....11
2.4 ความเข้มข้นของแร่ธาตุชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ....14
2.5 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังโดยทั่วไป....18
4.1 แหล่งที่มาและการกำหนดรหัสของเชื้อ *Aspergillus*....26
4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซอะไมเลสของเชื้อราในอาหารแข็ง....27
4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราในอาหารแข็ง....28
4.4 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราทั้ง 5 รหัส....32
4.5 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญ และการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ กัน....36
4.6 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ กัน....36
4.7 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญ และการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ....40
4.8 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ....41
4.9 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญ และการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ....43
4.10 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ....46
4.11 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญ และการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างๆ กัน....49
4.12 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างๆ กัน....49
4.13 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญ และการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 กับเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน....52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.14 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญ และการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และมีการแปรผันความเร็วในการกวนระดับต่างๆ กัน....56

4.15 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และมีการแปรผันความเร็วในการกวนระดับต่างๆ กัน....57

4.16 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญ และการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีการแปรผันอัตราการให้อากาศในระดับต่างๆ กัน....59

4.17 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่ใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาทีและมีการแปรผันอัตราการให้อากาศในระดับต่างๆ กัน....61

จ.1 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรารหัส UD1....83

จ.2 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรารหัส UB1....83

จ.3 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรารหัส NP1....84

จ.4 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรารหัส RE3....84

จ.5 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรารหัส BR1....85

จ.6 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือและน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน....85

จ.7 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือและน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 4 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน....86

จ.8 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือและน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 6 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน....86

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

จ.9 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน....87
จ.10 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน....87
จ.11 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน....88
จ.12 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน....88
จ.13 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน....89
จ.14 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน....89
จ.15 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน....90
จ.16 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน....90
จ.17 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5....91
จ.18 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5....91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

จ.19 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5.....92

จ.20 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....93

จ.21 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....94

จ.22 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และความเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที.....95

จ.23 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และความเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที.....95

จ.24 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที.....96

จ.25 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม.....96

จ.26 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม.....97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 โครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก....8
2.2 การสังเคราะห์กรดโคจิกจากกลูโคส....9
2.3 แผนภาพกระบวนการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแล็กโทน....9
2.4 แผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus flavus*....10
4.1 ลักษณะการเกิดบริเวณใสของเชื้อ *Aspergillus*....26
4.2 ลักษณะการเกิดสีแดงรอบโคโลนีของเชื้อ *Aspergillus*....28
4.3 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรารหัส UD1....30
4.4 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรารหัส UB1....30
4.5 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรารหัส NP1....31
4.6 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรารหัส RE3....31
4.7 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรารหัส BR1....32
4.8 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน....33
4.9 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน....35
4.10 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 6 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน....35
4.11 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน....38
4.12 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน....38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.13 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน....39
4.14 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน....39
4.15 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน....42
4.16 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน....42
4.17 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน....44
4.18 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ น้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน....44
4.19 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5....47
4.20 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5....47
4.21 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5....48
4.22 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน....51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.23 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน....51
4.24 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และความเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที....54
4.25 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และความเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที....55
4.26 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที....55
4.27 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม....58
4.28 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม....58
4.29 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม....59
ค.1 กราฟมาตรฐานกรดโคจิก....74
ค.2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส....76
ค.3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมด....78
ค.4 กราฟมาตรฐานแป้ง....80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดโคจิก (kojic acid) เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolism) ผลิตได้จากเชื้อราสกุล *Aspergillus* หลายสายพันธุ์ที่มีความสำคัญทางการค้าซึ่งมีการใช้เชื้อรานี้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรม กรดโคจิกเป็นส่วนประกอบของอาหารเพื่อสุขภาพที่มีขายทั่วไปในประเทศญี่ปุ่น (Niwa and Akamatsu. 1991) ใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรส (Blanc and Akers. 1989) และประโยชน์อื่นๆ อีกมากในอุตสาหกรรมอาหาร ในทางการแพทย์กรดโคจิกสามารถนำมาเป็นส่วนผสมในยาบรรเทาอาการปวด และป้องกันการอักเสบของแผลได้ (Kayahara *et al.* 1990) ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางยังใช้เป็นสารเพิ่มความขาวพร้อมทั้งป้องกันแสงอัลตร้าไวโอเลตในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวอีกด้วย (Ohyama and Mishima. 1990)

ปัจจุบันมีการนำกรดโคจิกมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างกว้างขวาง แต่สำหรับประเทศไทยยังไม่มีการผลิตกรดโคจิกขึ้นเอง ส่วนใหญ่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ การผลิตกรดโคจิกนิยมใช้เชื้อราในสกุล *Aspergillus* spp. โดยเฉพาะเชื้อ *A. flavus, A. oryzae* และ *A. parasiticus* ซึ่งมีรายงานว่าสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูง (Coupland and Niehaus. 1987 ; Kwak and Rhee. 1992a ; Ariff *et al.* 1996) ที่ผ่านมามีการศึกษาการผลิตกรดโคจิกมากมายจากแหล่งคาร์บอนหลายชนิด เช่น กลูโคส ซูโครส อะซีเตท เอทานอล อะราบิโนส และไซโลส (Kitada *et al.* 1967 ; Bassapa *et al.* 1970) และเป็นที่ทราบกันดีว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด เพราะมีความคล้ายคลึงทางโครงสร้างระหว่างกรดโคจิก แต่เนื่องจากกลูโคสเป็นวัตถุดิบที่มีราคาสูง ดังนั้นการนำแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ราคาถูกและหาได้ง่ายมาใช้ในการศึกษา รวมถึงการใช้เชื้อราจากลูกแป้งเหล้าที่มีความสามารถในการหมัก การย่อยแป้ง ตลอดจนความสามารถในการผลิตกรดโคจิกจะเป็นจุดเริ่มต้นที่ดีในการส่งเสริมให้มีการผลิตกรดโคจิกขึ้นเองภายในประเทศ และการนำสายพันธุ์ของเชื้อราที่มีอยู่มาปรับปรุงพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมต่างๆ ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส และการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* ที่คัดเลือกมาจากลูกแป้งเหล้า

1.2.2 ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลัง

1.2.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังในถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส และกรดโคจิกในอาหารแข็ง และอาหารเหลวของเชื้อ *Aspergillus* ที่คัดเลือกมาจากลูกแป้งเหล้า

1.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ชนิดของแหล่งไนโตรเจน และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* ในอาหารเหลว

1.3.3 เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกระหว่างเชื้อ *Aspergillus* ที่คัดเลือกได้กับเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

1.3.4 ขยายกำลังการผลิตกรดโคจิกจากฟลาสก์แบบเขย่าเป็นการผลิตในถังหมักแบบแบตช์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถนำเชื้อราสกุล *Aspergillus* ที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ลูกแป้งเหล้าของไทยมาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดโคจิก

1.4.2 สามารถนำแป้งมันสำปะหลังมาเป็นวัตถุดิบแทนการใช้กลูโคสเพื่อลดต้นทุนในการผลิตกรดโคจิก

1.4.3 เป็นประโยชน์ในการวางแนวทางในการผลิตกรดโคจิกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แหล่งที่พบในธรรมชาติและการผลิตกรดโคจิก

กรดโคจิกผลิตจากการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตโดยเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดในกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic process) ซึ่งมีรายงานการค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1907 โดย Saito จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* ในกระบวนการหมักข้าวนึ่ง (koji) จากนั้นได้มีการค้นคว้าเกี่ยวกับกรดโคจิกมากขึ้นโดย Yabuta (1913) ทั้งเรื่องของสับสเตรท (substrate) ที่ใช้ในการผลิตและคุณสมบัติอื่นๆ จากนั้นจึงได้เริ่มมีการค้นพบการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นจากการใช้สับสเตรทในธรรมชาติของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.1

Kharchenco (1999) ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus flavus* Link จำนวน 98 สายพันธุ์ พบว่า มี 14 สายพันธุ์ที่ให้การผลิตกรดโคจิกในปริมาณสูง โดยการผลิตกรดโคจิกสูงสุดจะเกิดขึ้นในช่วงระยะที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด (exponential growth phase) แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ดีได้แก่ กลูโคส (glucose) แซคคาโรส (saccharose) มอลโตส (maltose) และกาแลกโตส (galactose) มีผลได้ของกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 8.5-9.5 กรัมกรดโคจิกต่อกิโลกรัมสับสเตรท เมื่อทำการหมักในอาหารแข็งบนเมล็ดพืชที่มีโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตปริมาณสูง

Ogawa *et al.* (1995) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* และ *A. oryzae* IFO 30113 โดยเพาะเลี้ยงบนเมมเบรน (membrane-surface liquid culture) แบบถึงแบตช์ซึ่งมีการเติมกลูโคสเพิ่มลงไปในระหว่างการหมัก พบว่า มีปริมาณการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นมากกว่าการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่าถึง 50 เท่า

Rosfarizan *et al.* (1998a) สามารถคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *Aspergillus flavus* S33-2 ได้จากดอกไม้ (morning glory flower) ซึ่งสามารถเจริญบนอาหารแป้ง และผลิตกรดโคจิกได้ โดยเจริญได้ดีบนแป้งสาคู แป้งมันฝรั่ง และแป้งข้าวโพด เชื้อสายพันธุ์ S33-2 นี้ผลิตกรดโคจิกได้ดีที่สุดในอาหารแป้งข้าวโพด และดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 19.2 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แป้งข้าวโพด 75 กรัมต่อลิตรในการเพาะเลี้ยง มีผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้แป้ง และอัตราการผลิตกรดโคจิกทั้งหมดเท่ากับ 0.256 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมแป้ง และ 0.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

Futamura *et al.* (2001a) ได้ทำการศึกษา *Aspergillus oryzae* สายพันธุ์ MK107-39 พบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณมาก เนื่องจากเป็นสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้จากวิธีการแบบใหม่ โดยปริมาณกรดโคจิกที่ *Aspergillus oryzae* MK107-39 ผลิตได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่าเท่ากับ 28 กรัมต่อลิตร จากการใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร สูงกว่าปริมาณกรดโคจิกที่เชื้อสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พ่อแม่ผลิตได้ถึง 7.7 เท่า ผลได้ของกรดโคจิกต่อมวลเซลล์ และจำนวนกลูโคสที่ใช้ไปสูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ 9.8 และ 6.0 เท่า ตามลำดับ เป็นผลให้มีการผลิตกรดโคจิกในถังหมักขนาด 3 ลิตรได้มากกว่า 110 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังสามารถทำการเพิ่มการผลิตกรดโคจิกในถังหมักขนาด 600 ลิตรของโรงงานต้นแบบได้สำเร็จ และมีผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้กลูโคส ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.43 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมกลูโคส

ตารางที่ 2.1 รายงานการค้นพบกรดโคจิก

แหล่งธรรมชาติ	ความเข้มข้น	เชื้อจุลินทรีย์	อ้างอิง
รำข้าวสาลี, ถั่วเหลือง		*Aspergillus flavus*	Kharchenko *et al.* 1986
ข้าว		*Aspergillus*	L'vova *et al.* 1984
อาหารสัตว์	37.6-40.5	*A. flavus*	Kharchenko and
	ppm	*A. oryzae*	Yatsyshin.1984
		A. nidulans	
		A. fumigatus	
อาหารหมักของญี่ปุ่น	40 mg/ml	*A. oryzae*	Manabe *et al.* 1981
		A. tamari	
		A. flavus	
ข้าวโพด		*A. flavus*	Scott. 1978 ; Lee *et al.* 1986
Danish blue cheese		*A. fumigatus Fres.*	Moubasher *et al.* 1979
เนยถั่วอัดก้อน		*Penicillium*	Torrey and Marth. 1977
เครื่องเทศ		*Aspergillus*	Torrey and Marth. 1977
ผิวหนังมนุษย์		*Aspergillus* spp. (14 isolates) *and* *Penicillium* spp. (6 isolates)	Kandem and Percefois. 1980
Yeast extract-sucrose	57-59	*A. candidus*	Wei *et al.* 1991
medium	mg/ml	ATCC44054	
	0.133-3.4	*A. flavus*	Gupta *et al.* 1971
	mg/ml		
น้ำมะพร้าว	22 mg/ml	*A. flavus* ATCC9179	El-Sharkawy. 1995
แป้งสาคู	23.5 mg/ml	*A. flavus*	Rosfarizan *et al.* 1998b

ที่มา : Burdock *et al.* (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดโคจิกนอกจากพบได้ตามธรรมชาติแล้ว ยังสามารถผลิตขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการโดยเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 เชื้อราที่ผลิตกรดโคจิก

เชื้อจุลินทรีย์	อ้างอิง
Aspergillus oryzae (19 isolates)	Manabe *et al.* 1984a
A. parasiticus (SRRC 162) mutant	Ansari and Shrivastava. 1991
A. flavus (46 isolates)	Manabe *et al.* 1984a
A. tamarii (9 isolates)	Manabe *et al.* 1984a
A. sojae (3 isolates)	Manabe *et al.* 1984a
A. flavus Link	Lin *et al.* 1976
A. parasiticus (UNBF A12)	El-Khadem *et al.* 1976
A. flavus	Kharchenko *et al.* 1993; Moubasher *et al.* 1977
A. fumigatus	Kharchenko *et al.* 1993; Moubasher *et al.* 1977
A. luteo-virescens	Manabe *et al.* 1984b
A. albus	Manabe *et al.* 1984b
A. effusus	Manabe *et al.* 1984b
A. lutescens	Manabe *et al.* 1984b
A. alliaceus	Manabe *et al.* 1984b
A. awamori	Manabe *et al.* 1984b
A. candidus	Manabe *et al.* 1984b
A. clavatus	Manabe *et al.* 1984b
A. giganteus	Manabe *et al.* 1984b
A. gymosardae	Manabe *et al.* 1984b
A. nidulans	Manabe *et al.* 1984b
A. ustus	Manabe *et al.* 1984b
Penicillium citrinum.	Manabe *et al.* 1984b
P. daleae	Manabe *et al.* 1984b
P. griseofulvum	Manabe *et al.* 1984b
P. rubrum	Manabe *et al.* 1984b
P. purpurogenum	Manabe *et al.* 1984b

ที่มา : Burdock *et al.* (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดโคจิกผลิตได้จากเชื้อราในสกุล *Aspergillus* หลายสายพันธุ์ ในปี 1913 Yabuta สามารถแยกกรดโคจิกได้จากอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *A. albus* *A. candidus* และ *A. nidulans* นอกจากนี้กรดโคจิกยังผลิตได้จากเชื้อ *A. flavus* *A. gymnosardae* *A. awamori* *A. clavatus* *A. fumigatus* และ *A. giganteus* โดยเฉพาะเชื้อในกลุ่มของ *A. flavus-oryzae-tamarii* ที่มีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกอย่างเห็นได้ชัด ส่วนเชื้อที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางที่สุดคือ *A. flavus* และ *A. oryzae*

กรดโคจิกส่วนมากผลิตจากเชื้อราโดยใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน และเชื้อต้องการอากาศในการเจริญ (Bentley. 1957) ในปี ค.ศ. 1966 Parrish ทำการศึกษาการผลิตสารอะฟลาทอกซิน และกรดโคจิกจากเชื้อราสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* โดยทำการศึกษาสายพันธุ์ของ *Aspergillus* ได้แก่ *A. clavatus* *A. effuses* *A. flavus* *A. fumigatus* *A. nidulans* *A. oryzae* *A. parasiticus* *A. tamarii* และ *A. ustus* ส่วนสายพันธุ์ของ *Penicillium* ที่นำมาทำการศึกษานั้นได้แก่ *P. citrinum* *P. griseofulvum* *P. purpruogenum* และ *P. rubrum* พบว่าเชื้อราทั้ง 4 สายพันธุ์ผลิตกรดโคจิกได้ และไม่มีสายพันธุ์ใดที่ผลิตสารอะฟลาทอกซินเลย จึงสรุปว่าทุกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกได้ไม่จำเป็นต้องผลิตสารอะฟลาทอกซินได้ทั้งหมด

Bajpai *et al.* (1982) รายงานว่ากรดโคจิกเริ่มผลิตครั้งแรกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* และจากนั้นได้ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้เชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้คือ *A. oryzae* *A. gymnosardae* *A. flavus* *A. awamori* *A. clavatus* *A. fumigatus* *A. giganteus* *A. albus* *A. nidulans* *A. parasiticus* *A. effuses* *A. tamarii* *A. luteovirescens* *A. lutescens* *A. wentii* และ *A. alliaceus* เป็นต้น

Tadera *et al.* (1985) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อราสกุล *Aspergillus* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *A. oryzae* K *A. oryzae* IAM2024 *A. oryzae* IFO5239 *A. flavus* IAM2001และ *A. tamarii* IFO4099 พบว่า *A. flavus* IAM2001 สามารถผลิตกรดโคจิกได้มากที่สุดเท่ากับ 17.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เปปโตน 6 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.01 กรัมต่อลิตร และไซคาซิน 2 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 4.5

Kwak and Rhee (1992a) ได้ทำการปรับปรุงการผลิตกรดโคจิกโดยการตรึงเส้นใยของ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ที่ประกอบด้วย แมงกานีสซัลเฟต 2 เปอร์เซ็นต์ เฟอรัสซัลเฟต 2 เปอร์เซ็นต์ และซิงค์ซัลเฟต 3 เปอร์เซ็นต์หลังจากนั้นทำการปรับพีเอชของอาหารเป็น 6.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 นอร์มอล พบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงของ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 สามารถผลิตกรดโคจิกได้ นอกจากนี้ยังพบว่า แหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนโตรเจนและขนาดของเซลล์ที่ถูกตรึงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตกรดโคจิก โดยเซลล์ที่มีขนาดเล็กจะมีการผลิตกรดโคจิกสูงกว่าเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ และพบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน

ต่อมา Kwak and Rhee (1992b) ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมโดยการเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตกับการเพาะเลี้ยงเส้นใยโดยตรงในอาหารเหลว พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบตรึงเซลล์สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงเส้นใยโดยตรงในอาหารเหลว โดยการเพาะเลี้ยงแบบตรึงเซลล์จะผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 22 วัน ขณะที่การเพาะเลี้ยงเส้นใยโดยตรงในอาหารเหลวผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 25 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน

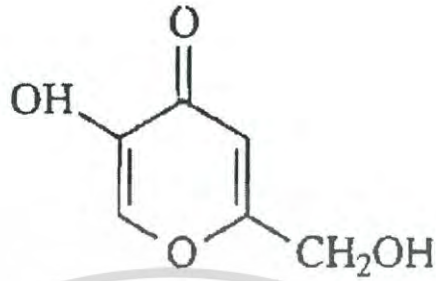
Ogawa *et al.* (1995) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยเลี้ยงบนเมมเบรน (membrane-surface liquid culture : MSLC) ในอาหาร 1 ลิตรที่มีองค์ประกอบคือ กลูโคส 100 กรัม ยีสต์สกัด 0.5-1.0 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียม-ซัลเฟต 0.5 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.5 กรัม และเฟอรัสฟอสเฟต 0.01 กรัม ที่พีเอช 6.0 จากการทดลองเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยงบนเมมเบรนกับบนเครื่องเขย่า พบว่าการเพาะเลี้ยงบนเมมเบรนผลิตกรดโคจิกได้มากกกว่าการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า โดยผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าได้กรดโคจิกสูงสุดเพียง 20.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเพาะเลี้ยงบนเมมเบรนที่มีกระบวนการหมักแตกต่างกัน 3 แบบ คือ การหมักแบบแบตช์ (batch MSLC) การหมักแบบกึ่งแบตช์ซึ่งมีการเติมสารอาหารลงไปโดยไม่มีการถ่ายออก (fed batch MSLC) และการหมักแบบกึ่งแบตช์ที่มีการเติมอาหารซ้ำ (repeated fed batch) เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า พบว่าการหมักแบบกึ่งแบตช์ที่มีการเติมอาหารซ้ำให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 14.2 กรัมต่อลิตรต่อวัน และการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าให้ปริมาณกรดโคจิกน้อยที่สุดเท่ากับ 1.6 กรัมต่อลิตรต่อวัน

Ariff *et al.* (1996) ทำการศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* Link44-1 ในถังหมักที่มีการกวนขนาด 2 ลิตร โดยการควบคุมระดับปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ (dissolved oxygen tension, DOT) ในอาหารเหลวระดับต่างๆ กัน ทำการหมักโดยใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตามลำดับ เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีระบบควบคุมพีเอช อุณหภูมิ และออกซิเจนที่ละลายได้ กำหนดพีเอชเป็น 3.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วในการกวน 600 รอบต่อนาที ควบคุมการให้อากาศโดยใช้อัตราการพ่นให้อากาศต่างกัน พบว่าการควบคุมการให้อากาศแบบสองระยะจะทำให้การผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นถึง 28.9 กรัมต่อลิตร มากกว่าการหมักที่ไม่มีการควบคุมการให้อากาศเลยถึง 2 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 โครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติของกรดโคจิก

กรดโคจิก หรือมีชื่อเรียกอีกอย่างว่า 5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4-pyrone หรือ 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-γ-pyrone มีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก

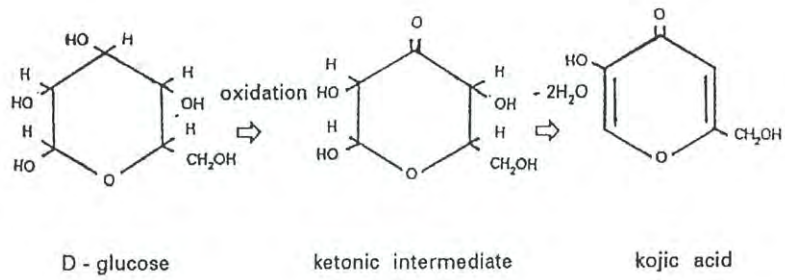
ที่มา : Bajpai *et al.* (1982)

กรดโคจิกเป็นสารประกอบของไพโรน (pyrone) ที่ขาดกลุ่มคาร์บอกซิล (carboxyl) โมเลกุลของกรดโคจิกประกอบขึ้นด้วย คาร์บอน 6 ตัว ไฮโดรเจน 6 ตัว และออกซิเจน 4 ตัว จึงมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_6O_4$ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 142.11 และมีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 153-154 องศาเซลเซียส กรดโคจิกบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผลึกทรงปริซึมรูปเข็ม ไม่มีสี ละลายได้ง่ายในน้ำ (3.95 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรที่ 20 องศาเซลเซียส) เอทานอล และอะซีโตน ละลายได้เล็กน้อยในอีเทอร์ เอทิลอะซิเตท คลอโรฟอร์มและไพริดิน (Budavari *et al.* 1989) การทำให้กรดโคจิกบริสุทธิ์ทำได้โดยการตกผลึกซ้ำ (recrystallization) ในอะซีโตน เอทานอล-อีเทอร์ เมทานอล และเอทิลอะซีเตท หรือการทำให้บริสุทธิ์ภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 150-200 องศาเซลเซียส (Bajpai *et al.* 1982)

2.3 การสังเคราะห์กรดโคจิก

เนื่องจากกลไกการสังเคราะห์กรดโคจิกในระหว่างกระบวนการหมักนั้น ยังไม่เป็นที่แน่ชัด และการทดลองใช้ระบบเซลล์อิสระในการผลิตกรดโคจิกยังไม่ประสบความสำเร็จ (Pratima *et al.* 1982) ดังนั้นจึงเป็นที่ทราบกันเพียงว่า เชื้อราสกุล *Aspergillus* หลายสายพันธุ์ต่างกันสามารถผลิตกรดโคจิกได้จากกลูโคสโดยการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพหลายขั้นตอน (Bajpai *et al.* 1982) และกรดโคจิกมีโครงสร้างคล้ายสารมอนอแซ็กคาไรด์ (monosaccharide) เพราะสังเคราะห์ได้จากน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) การสังเคราะห์เริ่มจากกลูโคสถูกออกซิเดชันเป็นสารคีโตนิกอินเทอร์มิเดียต (ketonic intermediate) จากนั้นจึงเปลี่ยนไปเป็นกรดโคจิกโดยการกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 2 โมเลกุลดังภาพที่ 2.2

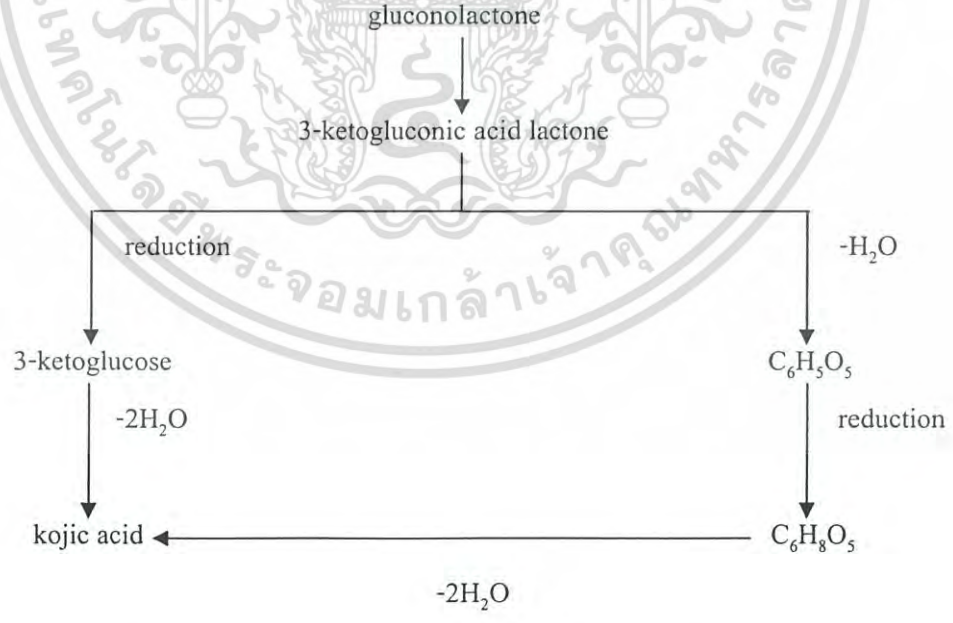
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 การสังเคราะห์กรดโคจิกจากกลูโคส

ที่มา : Bajpai *et al.* (1982)

Arnteins and Bentley (1953) พบว่า กรดโคจิกสังเคราะห์ได้โดยตรงจากกลูโคส โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพื้นฐาน โดยเริ่มจากกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคโนแล็กโทน (gluconolactone) ตามด้วย 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทน (3-ketogluconicacidlactone) แล้วจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิก 2 วิถีทางคือ วิถีที่ 1 เปลี่ยน 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทนเป็น 3-คีโตกลูโคส (3-ketoglucose) ก่อนแล้วจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิก วิถีที่ 2 สาร 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทนจะถูกกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 1 โมเลกุล โดยการรีดักชัน (reduction) และเกิดการกำจัดโมเลกุลของน้ำอีก 1 โมเลกุล ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2.3



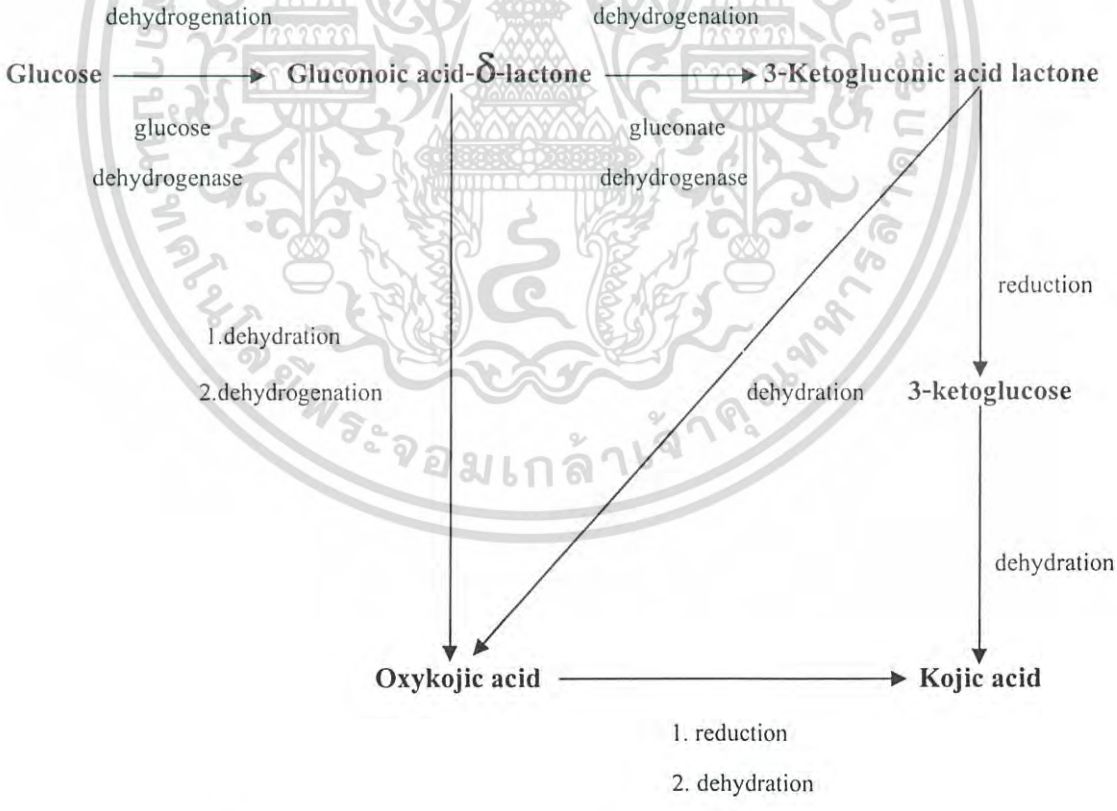
ภาพที่ 2.3 แผนภาพกระบวนการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแล็กโทน

ที่มา : Arnteins and Bentley (1953)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bassapa *et al.* (1970) พบว่าการสังเคราะห์กรดโคจิก และสารอะฟลาทอกซินมีวิถีการสังเคราะห์แยกออกจากกัน และกรดโคจิกไม่ได้เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ที่เกิดขึ้นในระหว่างการสังเคราะห์สารอะฟลาทอกซิน โดยการทดลองได้ใช้เซลล์ระยะพักตัว (resting cells) ของเชื้อ *Aspergillus flavus* และทำการทดสอบโดยใช้ ดี-ไซโลส (D-xylose) และเอทานอล (ethanol) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกรดโคจิกเกิดขึ้น แต่ไม่มีสารอะฟลาทอกซินเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า การผลิตกรดโคจิก และสารอะฟลาทอกซินนั้นขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าพีเอช อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวหน้าต่อปริมาตร (surface volume ratio) ของอาหารเลี้ยงเชื้อและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

Bajpai *et al.* (1981) ได้ทำการศึกษาวิถีการสังเคราะห์กรดโคจิกเมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นจากเชื้อ *Aspergillus flavus* สายพันธุ์บี ซึ่งพบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างกระบวนการผลิตกรดโคจิก ได้แก่ เฮกโซไคเนส (hexokinase) กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 6-ฟอสเฟตกลูโคเนต ดีไฮโดรจีเนส (6-phosphategluconate dehydrogenase) กลูโคสออกซิเดส (glucose-oxidase) และกลูโคเนต ดีไฮโดรจีเนส (gluconate dehydrogenase) เอนไซม์ดังกล่าวสัมพันธ์กับกระบวนการผลิตกรดโคจิกดังแสดงในภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 แผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus flavus*

ที่มา : Bajpai *et al.* (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก

2.4.1 แหล่งคาร์บอน

กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน และต้องเลือกใช้แหล่งคาร์บอนให้เหมาะสม (Stanbury *et al.* 1995) โดยแหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์กรดโคจิกแสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์กรดโคจิก

จำนวนคาร์บอนอะตอม	สารประกอบ
2	เอทานอล ไกลซีน โซเดียมอะซีเตท
3	1,3-ไดไฮดรอกซี-2-โพรพาโนน กลีเซอรอลดีไฮด์ กลีเซอรอล โซเดียมอะซีเตท โซเดียมไพรูเวท
4	กรดทาร์ทาริก
5	ไรบิทอล อะราบิโนส ไซโลส
6	2-ดีออกซีกลูโคส ฟรักโทส กาแลกโทส กรดกลูโคนิก กลูโคโนแลคโทน กลูโคส อิโนซิทอล ซอร์บิทอล
7	กรดคิวนิก กรดชิกิมิก
12	กรดแลกโตบิโนิก แลคโทส มอลโทส ซูโครส ทรีฮาโลส
18	แรฟฟีโนส
6n	เด็กทรินซ์ อินูลิน เปปติน แป้ง

ที่มา : Bajpai *et al.* (1982)

May *et al.* (1931) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลเด็กซ์โทรสที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ดังนี้คือ 10 15 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร ไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรท 1.125 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วันพบว่า เมื่อใช้น้ำตาลเด็กซ์โทรสร้อยละ 20 ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 48.2 เปอร์เซ็นต์

Wei *et al.* (1991) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus candidus* ATCC 44054 ในอาหารเหลวที่แตกต่างกัน 3 ชนิดคือ อาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek-Dox liquid medium ซึ่งใช้กลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน อาหารของ Tadera *et al.* (1985) ซึ่งใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และอาหาร Yeast Extract Sucrose (YES) ซึ่งใช้ซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที พบว่าผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดถึง 57-59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร YES เป็นเวลา 7-9 วัน และไม่มีสารอะฟลาทอกซินเกิดขึ้น

สุกัญญา สายธิ (2541) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในน้ำมะพร้าวโดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอาหารสูตรดัดแปลงที่เหมาะสมที่สุดประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 175 กรัม แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) 2 กรัม ยีสต์สกัด (yeast extract) 1 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 1 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.25 กรัม และน้ำมะพร้าว 1 ลิตร เพาะเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่าได้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 34 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 และให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 37 กรัมต่อลิตรในถังหมักแบบแบตช์

Kharchenko (1999) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus flavus* Link พบว่าจากทั้งหมด 98 สายพันธุ์ มี 14 สายพันธุ์ที่มีการสังเคราะห์กรดโคจิกได้สูง โดยการผลิตสูงสุดจะเกิดขึ้นในช่วงที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด (exponential growth phase) จากการใช้แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดเช่น กลูโคส แซคคาโรส มอลโตส และกาแลกโตส จากวิธีการหมักแบบอาหารแข็งบนเมล็ดพืชที่มีส่วนประกอบของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตปริมาณสูงทำให้ได้ผลิตผลกรดโคจิกสูงสุด 8.5-9.5 กรัมต่อกิโลกรัมสับสเตรท

วรรณี สุวรรณเวช (2546) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 จากการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย น้ำอ้อย 1 ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.25 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.25 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ได้ปริมาณกรดโคจิก 24.32 กรัมต่อลิตรจากการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่า ได้ปริมาณกรดโคจิก 45.15 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร

2.4.2 แหล่งไนโตรเจน

ในการผลิตกรดโคจิกแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่มาจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ โดยแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัด ทริปโตน ส่วนแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ได้แก่ เกลือแอมโมเนียม และเกลือไนเตรทเช่น แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรท เป็นต้น เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มีราคาสูง ดังนั้นจึงมักมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแทน จากการผลิตกรดโคจิกส่วนมากใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนหรืออาจมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

May *et al.* (1931) ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยมีการใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกันได้แก่ แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) และโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.75 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรท 0.7 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดคือ 18.6 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงทำการศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียม-ไนเตรท 7 ระดับคือ 0.142 0.281 0.563 0.75 1.125 2.250 และ 4.5 กรัมต่อลิตรตามลำดับพบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรทเข้มข้น 0.563 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 30.2 เปอร์เซ็นต์

Wei *et al.* (1991) ใช้อาหาร 3 ชนิดที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันคือ อาหารที่ดัดแปลงจาก Czapek-Dox liquid medium มีส่วนประกอบของโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) 0.1 เปอร์เซ็นต์และยีสต์สกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน อาหารของ Tadera *et al.* (1985) ที่มีส่วนประกอบของเปปโตน 0.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหาร Yeast Extract Sucrose (YES) ที่มีส่วนประกอบของยีสต์สกัด 2 เปอร์เซ็นต์พบว่าอาหาร YES ให้ปริมาณกรดโคจิกมากที่สุด 57-59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Kwak and Rhee (1992a) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยการควบคุมการเจริญเติบโตของเส้นใยที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนตเจล โดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของยีสต์สกัด และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยการใช้ยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0.137 0.183 0.275 0.367 และ 0.55 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.275 กรัมต่อลิตรให้อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุดคือ 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน

Ogawa *et al.* (1995) ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนเมมเบรนหรือวิธี MSLC เปรียบเทียบกับการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดที่มีความเข้มข้นต่างกันดังนี้ คือ 0.05 0.01 0.25 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า เมื่อใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้น 0.05-0.5 เปอร์เซ็นต์ให้กรดโคจิกสูงสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 10 และในอาหารที่มียีสต์สกัด 1.0 เปอร์เซ็นต์ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 20.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง

Rosfarizan and Ariff (2000) ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus flavus* Link 44-1 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ กลูโคส ไซโลส ซูโครส แป้ง มอลโตส แลกโตส และฟรักโตส ส่วนแหล่งไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไทโอซัลเฟต ($(NH_4)_2S_2O_8$) แอมโมเนียมไนเตรท ($(NH_4)_2NO_3$) และยีสต์สกัด หรือเปปโตน โดยใช้ปริมาณเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตรและ 5 กรัมต่อลิตรตามลำดับ พบว่า ปริมาณการผลิตกรดโคจิกสูงสุด 39.90 กรัมต่อลิตรได้จากการใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร โดยพบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์นั้นเหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกมากกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Futamura *et al.* (2001a) ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* MK107-39 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันคือ เมล็ดฝ้ายบด กลูเตน ถั่วเหลืองบด จมูกข้าวสาลี และเมล็ดทานตะวัน พบว่าเมื่อใช้จมูกข้าวสาลี 7 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 30 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณจมูกข้าวสาลีเป็น 1.3 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เกิดผลได้ของกรดโคจิกสูงสุด โดยที่ความเข้มข้นของจมูกข้าวสาลีที่ทำการศึกษาอยู่ระหว่าง 0-3.1 เปอร์เซ็นต์

2.4.3 แร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีความสำคัญที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ แมกนีเซียม (Mg) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) ซัลเฟอร์ (S) แคลเซียม (Ca) และคลอไรด์ (Cl) นอกจากนี้ยังมี โคบอลต์ (Co) คอปเปอร์ (Cu) แมกนีเซียม (Mg) โมลิบดินัม (Mo) และสังกะสี (Zn) เป็นต้น แร่ธาตุที่เติมลงไปส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปสารอนินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ความเข้มข้นของแร่ธาตุชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

แร่ธาตุ	ปริมาณที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)
KH_2PO_4	1.0-4.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25-3.0
KCl	0.5-12.0
$CaCO_3$	5.0-17.0
$FeSO_4 \cdot 4H_2O$	0.01-0.1
$ZnSO_4 \cdot 8H_2O$	0.1-1.0
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.01-0.1
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.003-0.01
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.01-0.1

ที่มา : Stanbury *et al.* (1995)

Challenger *et al.* (1929) ได้ค้นพบอาหาร K ซึ่งมีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) เป็นส่วนประกอบ ต่อมามีการค้นพบอาหารที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกคือ อาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek-Dox liquid medium ที่มีการเสริมแหล่งอาหารคือ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) แมกนีเซียม-ซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) ลงในอาหารเหลว (Bentley. 1957)

May *et al.* (1931) มีการใช้แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 48.2 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อมา Tadera *et al.* (1985) ได้ศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวที่มีการเสริมแร่ธาตุ คือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) แคลเซียม-คลอไรด์ ($CaCl_2$) และเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 17.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 14

Kwak and Rhee (1992a) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีการเสริมแร่ธาตุจำพวกได-โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot 7H_2O$) และซิงก์ซัลเฟต ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) ลงไป พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน

2.5 ประโยชน์ของกรดโคจิก

2.5.1 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

Wei *et al.* (1991) พบว่ากรดโคจิกสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลหรือปฏิกิริยาบราว-นิ่ง (browning reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์มาเกี่ยวข้องเช่น ในผักผลไม้เมื่อมีรอยตำหนิเสียหายที่เกิดจากรอยช้ำ รอยปอก หั่น แช่แข็ง รอยตำหนิเหล่านี้เมื่อสัมผัสถูกอากาศจะเกิดเป็นสีน้ำตาลขึ้นเนื่องจากกลุ่มของเอนไซม์ที่เรียกชื่อรวมว่า ฟีนอลเลส (phenolase) โดยที่กรดโคจิกสามารถยับยั้งการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ทำให้สีน้ำตาลเกิดช้าลง ในประเทศญี่ปุ่นใช้กรดโคจิก กรดแอสคอร์บิก และกรดซิตริกเพื่อยับยั้งเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase : PPO) ในเห็ด มันฝรั่ง และแอปเปิ้ล (Chen *et al.* 1991) นอกจากนี้ยังใช้เสริมกลิ่นหอมของผลไม้ วานิลลา อาหาร เครื่องดื่มรสช็อคโกแลต รวมทั้งใช้ในเครื่องดื่ม และของหวานด้วย (กล้าณรงค์ ศรีรอต และจุนทนี จิตต์รำพึง. 2540)

2.5.2 ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

Ohyama and Mishima (1990) รายงานว่า มีการนำกรดโคจิกมาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง โดยกรดโคจิกจะทำหน้าที่ขัดผิวหรือทำให้ผิวขาวขึ้น (whitening) และสามารถป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลตจากแสงแดดได้ ในปี ค.ศ. 1995 Nakagawa and Kawai รายงานว่ามีการทดลองนำกรดโคจิกไปใช้ในผลิตภัณฑ์บำรุงรักษาผิว (skin care product) โดยใช้กรดโคจิกร้อยละ 1 เป็นส่วนผสมเพื่อให้ทำหน้าที่เป็นตัวเปลี่ยนเม็ดสีผิว (skin-depigment) ทำให้ผิวขาวขึ้น

2.5.3 ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง

Bajpai *et al.* (1982) รายงานว่ากรดโคจิกมีคุณสมบัติคล้ายแทนนิน (tannin) ซึ่งพบทั่วไปในพืช และส่วนใหญ่จะเป็นพวกไกลโคไซด์ (glycosides) มีมากในเปลือกต้นโอ๊กและฝาง มีความสามารถในการฟอกหนังสัตว์ได้โดยทำหน้าที่ในการตกตะกอนโปรตีนและแอลคาลอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4 ใช้ในอุตสาหกรรมเคมี

กรดโคจิกมีคุณสมบัติเป็นเรซินสังเคราะห์ ใช้เป็นสารสำหรับวิเคราะห์ธาตุต่างๆ เช่น เหล็ก ทองคำ สังกะสี และวานาเดียม (Bajpai *et al.* 1982)

2.5.5 ใช้เป็นสารยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา

กรดโคจิกสามารถต้านทานกิจกรรมของแบคทีเรียพวก *Staphylococcus aureus* 209P. และยังพบว่าสามารถต้านการเจริญของเชื้อราพวก *Pythium graminicola Fusarium oxysporum* รวมทั้ง *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำลายเมล็ดธัญพืช ถั่ว และฝักมะขามเทศได้ (Kayahara *et al.* 1990)

2.5.6 ใช้เป็นสารปฏิชีวนะ

Yabuta (1913) รายงานว่ากรดโคจิกร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ ต่อมา Morton *et al.* (1945) ได้ทำการศึกษาการใช้กรดโคจิกความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบแบคทีเรีย 166 สายพันธุ์ พบว่ามีแบคทีเรียบางสายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus mycoides Chromobacterium indicum Clostridium novyi Micrococcus roseus Salmonella enteritidis* และ *Serratia marcescens* ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้กรดโคจิกเข้มข้นในอัตรา 1 ใน 500 ส่วน ต่อมามีรายงานว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งเชื้อ *Leptospira canicola* อย่างสมบูรณ์เมื่อมีกรดโคจิกเพียง 1 ในล้านส่วนเป็นต้น ต่อมามีรายงานว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้มากกว่าแกรมบวก

Minami (1994) รายงานว่า มีการใช้กรดโคจิกเป็นส่วนผสมในสารทำลายแมลงพวกนิโคทีน (nicotine insecticides) โดยทำการทดสอบกับหนอน 2 ชนิดคือ *Diaphania hyalinata* L. และ *Prodenia eridania* Cram. โดยกรดโคจิกไม่เป็นสารพิษ และไม่เป็นอันตรายต่อพืช ในการทดลองจะใช้กรดโคจิกร่วมกับสารพิษนิโคทีน โดยใช้สารนิโคทีนซัลเฟตไพโรไฟไลต์ (nicotinesulphate pyrophyllite) ในปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ นิโคทีนเบนโทไนต์ (nicotinebentonite) 5 เปอร์เซ็นต์ และกรดโคจิก 5 เปอร์เซ็นต์จากการศึกษาพบว่า ยากำจัดแมลงสามารถควบคุมศัตรูพืชให้น้อยลงโดยทำให้แมลงตายหรือเป็นโรค และมีรายงานว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน (amino acids) โดยทำการทดลองกับตับและไตหนู กรดโคจิกจะไปยับยั้งเอนไซม์จากตับและไตหนูจึงทำให้โปรตีนที่หนูรับประทานเข้าไปไม่สามารถย่อยสลายไปเป็นกรดอะมิโน และไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ต่อมามีการค้นพบว่า กรดโคจิกสามารถต้านการเกิดเป็นปุ่มหรือตุ่มของโรควัณโรค (tubercle) โดยทำการทดสอบกับแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่ทำให้เกิดวัณโรค โดยใช้กรดโคจิก 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร ต่อมาได้มีการค้นพบว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งการสังเคราะห์กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) หรือวิตามินซีในสัตว์ทดลองทำให้หลอดเลือดเปราะและเกิดโรคลักปิดลักเปิด (scurvy) เพราะไม่มีเอนไซม์กลูโคโนแล็กโทนออกซิเดส (L-gluconolactone oxidase) ที่ใช้ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแอสคอร์บิก (Bajpai *et al.* 1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.5.7 ใช้ในทางการแพทย์

มีการนำเอากรดโคจิกมาใช้เป็นส่วนผสมในยาขยายหลอดลม ยาที่ใช้รักษาโรคโลหะเป็นพิษ ยาสลบ และยาสีฟัน (Bajpai *et al.* 1982) นอกจากนี้ยังมีการนำเอากรดโคจิกมาใช้บรรเทาอาการปวด และป้องกันการอักเสบของแผลด้วย (Kayahara *et al.* 1990)

2.6 แป้งมันสำปะหลัง

แป้งมันสำปะหลังผลิตได้จากรากที่มีลักษณะคล้ายหัวของต้นมันสำปะหลัง มีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot utilisisma* ในภาษาอังกฤษจะเรียกว่า Tapioca starch Cassava starch หรือ Manioc starch (Lyon. 1974)

2.6.1 โครงสร้างของโมเลกุลแป้งมันสำปะหลัง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจน ในอัตราส่วน 6:10:5 มีสูตรเคมีคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ โดยทั่วไป แป้งจะประกอบไปด้วยโมเลกุลโพลีแซคคาไรด์ 2 ชนิด คือ อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพกติน (amylopectin) ซึ่งทั้ง 2 โมเลกุลนี้เป็นโฮโมไกลแคน (homoglycan) ของดี-กลูโคส (D-glucose) ต่างกันที่โมเลกุลของอะไมโลสเป็นสายตรงของกลูโคส โดยแต่ละหน่วยในอะไมโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-(1-4)-glucosidic linkage ส่วนโมเลกุลของอะไมโลเพคตินมีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขา บริเวณที่แตกสาขาเกิดจากการเชื่อมต่อของหน่วยกลูโคสด้วยพันธะ α-(1-6)-glucosidic linkage (Schoonhoven. 1974) ในโมเลกุลของแป้งมันสำปะหลังจะมีอะไมโลส และอะไมโลเพคตินประกอบอยู่ในอัตราส่วน 17 ต่อ 83 และมีขนาดโมเลกุลหรือระดับขั้นการเกิดพอลิเมอร์ (degree of polymerization, DP) โดยเฉลี่ยของอะไมโลสและอะไมโลเพกตินเท่ากับ 3000 และ 2×10^6 ตามลำดับ (Lyon. 1974)

2.6.2 สมบัติทางกายภาพและเคมีของแป้งมันสำปะหลัง

2.6.2.1 โครงสร้างของเม็ดแป้งมันสำปะหลัง

เม็ดแป้งมันสำปะหลังมีลักษณะคล้ายรูปถ้วยมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-35 ไมครอน เส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยเท่ากับ 20 ไมครอน เมื่อตรวจดูเม็ดแป้งด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโพลาไรซ์จะเห็นลักษณะกากบาทสีดำเรียกว่า birefringence ภายในเม็ดแป้งประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพกติน ซึ่งมีการเรียงตัวต่างกัน แบ่งได้เป็น 2 แบบ โดยแบบแรก สายโพลีเมอร์ของอะไมโลสเรียงตัวขนานกันอย่างเป็นระเบียบ มีอะไมโลสบางส่วนเรียงขนานกับส่วนที่เป็นสายตรงส่วนนอกของอะไมโลเพกติน และยึดติดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนทำให้โมเลกุลบริเวณนี้จับกันอย่างหนาแน่น และมีแรงยึดเหนี่ยวสูง บริเวณนี้เรียกว่าส่วนผลึก (crystalline regions) ซึ่งมีความสามารถในการดูดน้ำและพองตัวต่ำมาก ส่วนแบบที่สอง โมเลกุลเรียงตัวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
61200

อย่างไม่เป็นระเบียบ แรงดึงดูดระหว่างสายโพลีเมอร์ของอะไมโลสกับอะไมโลเพกตินต่ำกว่าแบบแรก บริเวณที่มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลแบบนี้เรียกว่า ส่วนอสัณฐาน (amorphous regions) เป็นส่วนที่ดูดน้ำได้ดีและพองตัวได้ง่าย (Shoonhoven. 1974)

2.6.2.2 องค์ประกอบของแป้งมันสำปะหลัง

แป้งมันสำปะหลังมีไขมันต่ำกว่าแป้งจากธัญพืชโดยทั่วไป ส่วนองค์ประกอบอื่นนั้นมีในปริมาณใกล้เคียงกันกับแป้งชนิดอื่น องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังโดยทั่วไป

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละ)
ความชื้น	13.0
แป้ง	87.0
ไขมัน	0.1
โปรตีน	0.1
เถ้า	0.2
ฟอสฟอรัส	0.01
สารที่ให้กลิ่นรส	ต่ำมาก

ที่มา : Lyon (1974)

2.6.2.3 ลักษณะเฉพาะของการเกิดเจลาติไนเซชันของแป้งมันสำปะหลัง

ในโมเลกุลแป้งโดยทั่วไปจะมีกลุ่มที่ชอบน้ำ (hydrophilic group) ในส่วนอสัณฐานซึ่งสามารถจับน้ำจากสิ่งแวดล้อมได้ ด้วยเหตุนี้แป้งโดยทั่วไปจึงมีความชื้นอยู่ 12 ถึง 14 เปอร์เซ็นต์ และถ้าผสมน้ำเย็นลงในแป้งอาจทำให้แป้งมีความชื้นได้ถึง 30 เปอร์เซ็นต์โดยที่ไม่ปรากฏลักษณะที่แยกชั้นของแป้ง การผสมน้ำในปริมาณที่มากกว่านี้โดยไม่มีการคนตลอดเวลาจะทำให้แป้งตกตะกอน ถ้ามีการให้ความร้อนพร้อมทั้งคนตลอดเวลาเม็ดแป้งจะเริ่มพองตัวจนเมื่อถึงอุณหภูมิของการเกิดเจลาติไนเซชัน แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลภายในเม็ดแป้งจะถูกทำลาย เม็ดแป้งจะพองตัวมากกว่าเดิมและสูญเสียลักษณะ Birefringence เรียกว่าเกิดเจลาติไนเซชันของแป้ง อุณหภูมิของการเกิดเจลาติไนเซชันของแป้งมันสำปะหลังจะอยู่ในช่วง 68-92 องศาเซลเซียส และความหนืดสูงสุดของแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์จะอยู่ในช่วง 500-1500 brabender units ส่วนกำลังการพองตัว (swelling power) และความสามารถในการละลาย (solubility) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 97 และ 39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Shoonhoven. 1974)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3 ประโยชน์ของแป้งมันสำปะหลัง

ในประเทศไทย อุตสาหกรรมแป้งถือได้ว่าเป็นอุตสาหกรรมแปรรูปทางเกษตรกรรมหลักของประเทศ แป้งที่มีการผลิตมากที่สุด คือ แป้งมันสำปะหลัง ซึ่งได้มีการผลิตเป็นแป้งคุณภาพสูง (มีสิ่งแปลกปลอมน้อย) ปัจจุบันมีโรงงานอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังที่จดทะเบียนกับสมาคมการค้าอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังไทยอยู่ 54 โรงงาน การผลิตสำรวจในช่วง พ.ศ. 2530-2540 สามารถผลิตแป้งมันสำปะหลังได้ในปริมาณ 2 ล้านตัน ส่งออกจำหน่ายต่างประเทศประมาณ 1 ล้านตัน การใช้แป้งมันสำปะหลังภายในประเทศ (ประมาณ 1 ล้านตัน) นั้น มีการนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ ได้แก่ การผลิตผงชูรส ใช้บริโภคภายในครัวเรือน ใช้ผลิตสารให้ความหวาน ใช้ทำสาคู ใช้ในการประกอบอาหาร ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ สิ่งทอ และไม้อัด เป็นต้น (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2546)

นอกจากนี้ยังมีการนำแป้งมันสำปะหลังมาใช้ในงานวิจัยดังรายงานของฐิติมา ศรีสกุณี (2543) ซึ่งศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR3086 และทำการคัดเลือกเชื้อราลูกผสมในอาหาร Starch agar พบว่ามีเชื้อลูกผสม 3 สายพันธุ์จาก 198 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยเชื้อราสายพันธุ์ที่ 49 สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุดจากการใช้แป้งข้าวโพดและแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 4.72 กรัมต่อลิตรในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และ 4.09 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ

คึกฤทธิ์ ศิลาลาย (2547) ได้ศึกษาการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. RE3 ซึ่งคัดแยกได้จากลูกแป้งเหล้าของจังหวัดร้อยเอ็ดในอาหาร Glucose-peptone ที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด 7.87 หน่วยต่อมิลลิลิตรในวันที่ 3 และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 4.50 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) TOMY SS-325 ; Tomy Seiko

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) INNOVA 4330 ; New Brunswick Scient

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) UV1601 ; Shimadzu

ตู้ถ่ายเชื้อ (larminar air flow) BVT123 ; International Scientific Supply

เครื่องชั่งละเอียด 3 ตำแหน่ง PG5002 ; Mettler-Toledo

เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง BP221S ; Scientific Promotion

เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) Falcon 6/300 ; MSE

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) Cyberscan 2000 ; Eutech

ตู้อบลมร้อน (hot air oven) UML600 ; Memmert

ตู้บ่มเชื้อ (incubator) BE600 ; Memmert

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) ; Memmert

กล้องจุลทรรศน์ CH300 ; Olympus

โถดูดความชื้น (desiccator) GL32 ; Glaswerk Wertheim

ชุดกรองสุญญากาศ ; Geman Science

เฮมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ; Boeco

เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) ; Scientific Industries

ไมโครปิเปต Pipetman ; Gilson

ถังหมักขนาด 5 ลิตร (BIOSTAT B) ; B. Braun Biotech International

หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 10 มิลลิลิตร

เครื่องแก้วชนิดต่างๆ

คิวเวทแก้วขนาด 10 มิลลิเมตร LP1G10

ค็อกบอร์เรอร์เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร (Cock borror)

กระดาษกรองเบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 55 มิลลิเมตร ; Whatman

3.1.2 สารเคมี

กรดโคจิกมาตรฐาน ; Sigma

มอลโตสมาตรฐาน ; Labchem

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ; Unilab

ทวีน 80 (tween80) ; Merck

แป้งมันสำปะหลัง ตราต้นสน ; Siam Quality Starch

ไอโอดีน ; Carlo Erba

ยีสต์สกัด ; Schalua

โพแทสเซียมโซเดียมทาเทรท ; Univar

แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ; Fluka

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ; Merck

แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ; Merck

ไดไนโตรซาลิไซลิก แอซิด (DNS) ; Sigma

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ; Carlo Erba

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ; Fluka

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ; Carlo Erba

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) ; Merck

โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) ; Analar

โพแทสเซียมไตรไอโอไดด์ (KIO_3) ; Fluka

กรดซัลฟิวริก ; Analar

กรดไฮโดรคลอริก ; Merck

กรดแอซิติก ; Merck

ฟีนอล ; Fluka

กรดซิตริก ; Merck

สารกำจัดฟอง (anti-foam) ; NOF corporation

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ได้แก่เชื้อ *Aspergillus* สปอร์สีเขียวที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 5 จังหวัดได้แก่ จังหวัดอุดรธานี อุบลราชธานี นครพนม ร้อยเอ็ด และบุรีรัมย์ จังหวัดละ 3 ไอโซเลต (isolate) เป็นจำนวนทั้งหมด 15 ไอโซเลต ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากคุณคึกฤทธิ์ ศิลาลาย มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ และเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยความอนุเคราะห์จากสถาบัน Northern Regional Research Laboratory ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำการเก็บเชื้อราในอาหารวุ้นเอียง PDA (PDA slant) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 4 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส และกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* ในอาหารแข็ง

3.2.2.1 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

นำเชื้อราสกุล *Aspergillus* จากข้อ 3.2.1 ทั้ง 15 ไอโซเลตมาเลี้ยงในอาหาร PDA (ภาคผนวก ก.1) เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นใช้ค็อกบอร์เรอร์ตัดปลายเส้นใยนำมาวางลงตรงกลางจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Starch medium ซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังปริมาณความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนแทนแป้งละลายน้ำ (soluble starch) (ภาคผนวก ก.2) ทำการทดลองตัวอย่างละ 5 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำจานเพาะเชื้อทั้งหมดมาทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลสด้วยสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ข.4) เพื่อดูบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น โดยเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งได้จะเกิดบริเวณใสรอบๆ โคโลนีหลังจากราดด้วยสารละลายไอโอดีน ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและบริเวณใส เพื่อนำมาคำนวณหาขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้นแล้วบันทึกผล

3.2.2.2 การศึกษาความสามารถในการผลิตกรดโคจิก

นำเชื้อราจากข้อ 3.2.1 ทั้ง 15 ไอโซเลตมาเลี้ยงในอาหาร PDA เป็นเวลา 1 วัน จากนั้นใช้ ค็อกบอร์เรอร์ตัดปลายเส้นใย นำมาวางลงตรงกลางจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง Starch medium ซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังปริมาณความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการทดลองตัวอย่างละ 5 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดมาทดสอบการผลิตกรดโคจิกโดยราดด้วยสารละลายเฟอริกคลอไรด์ (ภาคผนวก ข.2) ถ้าเชื้อรามีการผลิตกรดโคจิกจะปรากฏสีแดงขึ้นรอบๆ โคโลนี ทำการบันทึกผล

3.2.3 การศึกษาการผลิตกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว

นำเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลสได้ดีจากข้อ 3.2.2 มาเลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมาเตรียมเป็นสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspention) โดยเติมน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อที่มีทวีน 80 เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ลงไป ขูดสปอร์ด้วยช้อนสแตนเลสด้ามยาว และกรองเอาสารละลายสปอร์ผ่านสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำสารละลายที่ได้มานับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ให้ได้ปริมาณ 1×10^{6} สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลว Starch medium ที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาตรอาหาร 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0 ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของพีเอช วิเคราะห์หาปริมาณกรดโคจิก และกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส คัดเลือกเชื้อราที่ผลิตกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลสได้ดีที่สุดไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่า

3.2.4.1 การศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2.3 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Starch medium โดยแปรผันความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังดังนี้คือ 2 เปอร์เซ็นต์ 4 เปอร์เซ็นต์ และ 6 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเป็น 6.0 ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่าตามข้อ 3.2.3 เป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช วิเคราะห์หาปริมาณกรดโคจิก กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.2.4.2 การศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ แทนยีสต์สกัด

นำเชื้อราจากข้อ 3.2.3 มาศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนโดยใช้สูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 3.2.4.1 โดยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่นำมาใช้แทนยีสต์สกัดได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) โดยใช้ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตรทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4.1 เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช วิเคราะห์หาปริมาณกรดโคจิก กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.2.4.3 การศึกษาการใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ

นำเชื้อราจากข้อ 3.2.3 มาศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยใช้สูตรอาหารเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4.2 แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ใช้คือยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร ส่วนแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ใช้ปริมาณ 2.5 กรัมต่อลิตรเช่นกัน ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4.1 เพื่อนำมาวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช วิเคราะห์หาปริมาณกรดโคจิก กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.2.4.4 การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราจากข้อ 3.2.3 ในอาหาร Starch medium ที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง และชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.4.1 และ 3.2.4.2 หรือ 3.2.4.3 โดยทำการแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ 3.5 4.5 และ 5.5 ด้วย กรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4.1 นำมาวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช วิเคราะห์หาปริมาณกรดโคจิก กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ และน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 การเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus* ที่คัดเลือกได้กับเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

ทำการทดลองโดยใช้สูตรอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลองจากข้อ 3.2.4 โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* ที่คัดเลือกได้เปรียบเทียบกับเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากันคือ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรทุกวัน เป็นเวลา 15 วัน เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช วิเคราะห์หาปริมาณกรดโคจิก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.2.6 การศึกษาการผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบตช์

3.2.6.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เลี้ยงเชื้อราในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำมาเตรียมเป็นสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspention) โดยเติมน้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อที่มีทวีน 80 เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ลงไป ขูดสปอร์ด้วยช้อนสแตนเลสด้ามยาว และกรองเอาสารละลายสปอร์ผ่านสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำสารละลายที่ได้มานับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ให้ได้ปริมาณ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเหลว Starch medium ที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการศึกษาต่อไป

3.2.6.2 การศึกษาความเร็วในการกวนที่เหมาะสม

เตรียมอาหาร Starch medium สูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.2.4 ปริมาตร 3 ลิตร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นให้ได้ค่าที่ต้องการด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ใส่สารกำจัดฟอง (anti-foam) ลงไป 1-2 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที เมื่ออาหารเย็นเติมกล้าเชื้อจากข้อ 3.2.6.1 ลงไป 150 มิลลิลิตร ศึกษาความเร็วในการกวนที่ระดับต่างๆ ดังนี้คือ 300 400 และ 500 รอบต่อนาทีตามลำดับ โดยมีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 วีวีเอ็ม ควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 8 มิลลิลิตร ทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวัดการเปลี่ยนแปลงพีเอช วิเคราะห์หาปริมาณกรดโคจิก กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.2.6.3 การศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม

นำความเร็วในการกวนที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดจากข้อ 3.2.6.1 มาใช้ในการหาอัตราการให้อากาศที่ระดับ 1.0 วีวีเอ็ม 1.5 วีวีเอ็ม และ 2.0 วีวีเอ็มตามลำดับ ทำการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่นเดียวกับข้อ 3.2.6.1 โดยวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช วิเคราะห์หาปริมาณกรดโคจิก กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.2.7 การศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA (ELISA test kit)

นำตัวอย่างน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* ที่คัดเลือกได้ ในวันที่เชื้อมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด ไปตรวจวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซินที่เชื้ออาจมีการสร้างขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยวิธี ELISA ที่สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร

3.3 วิธีการวิเคราะห์

3.3.1 การวิเคราะห์กรดโคจิก (ภาคผนวก ค.1)

3.3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (ภาคผนวก ค.2)

3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ภาคผนวก ค.3)

3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ (ภาคผนวก ค.4)

3.2.5 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ค.5)

3.2.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

โดยวิธีการวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New Multiple Range Test (DMRT)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส และกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* ในอาหารแข็ง

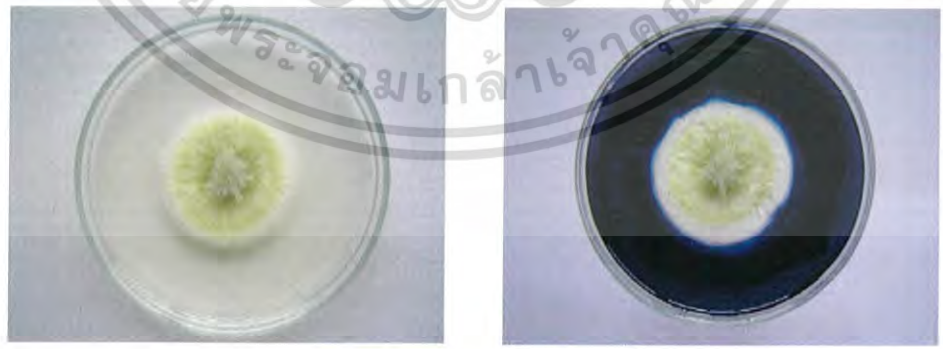
4.1.1 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

เชื้อ *Aspergillus* ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าของทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือทั้ง 5 จังหวัด มีการกำหนดรหัสของเชื้อดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แหล่งที่มา และการกำหนดรหัสของเชื้อ *Aspergillus*

จังหวัด	รหัสเชื้อ
อุดรธานี	UD1 UD2 UD3
อุบลราชธานี	UB1 UB2 UB3
นครพนม	NP1 NP2 NP3
ร้อยเอ็ด	RE1 RE2 RE3
บุรีรัมย์	BR1 BR2 BR3

หลังจากทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสบนอาหารแข็ง Starch medium ที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ของเชื้อ *Aspergillus* ทั้ง 15 ไอโซเลต หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน โดยก่อนราดด้วยสารละลายไอโอดีนเพื่อดูการเกิดบริเวณใส (clear zone) แสดงดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 ลักษณะการเกิดบริเวณใสของเชื้อ *Aspergillus*

ผลปรากฏว่า เชื้อราทั้ง 15 ไอโซเลตได้แก่ รหัส UD1 UD2 UD3 UB1 UB2 UB3 NP1 NP2 NP3 RE1 RE2 RE3 และ BR1 BR2 BR3 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสทุก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัว โดยเชื้อแต่ละตัวมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้แตกต่างกันไปจากผลต่างระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสและโคโลนี แสดงดังตารางที่ 4.2 ซึ่งเชื้อราที่มีขนาดของบริเวณใสมากที่สุดได้แก่ รหัส BR1 โดยมีขนาดเท่ากับ 0.47 เซนติเมตร นอกจากนี้ยังมีเชื้อราที่มีขนาดของบริเวณใสรองลงมาได้แก่ เชื้อรารหัส UD1 RE3 NP1 และ UB1 ซึ่งมีขนาดของบริเวณใสเท่ากับ 0.46 เซนติเมตร 0.38 เซนติเมตร 0.36 เซนติเมตร และ 0.35 เซนติเมตร ตามลำดับ

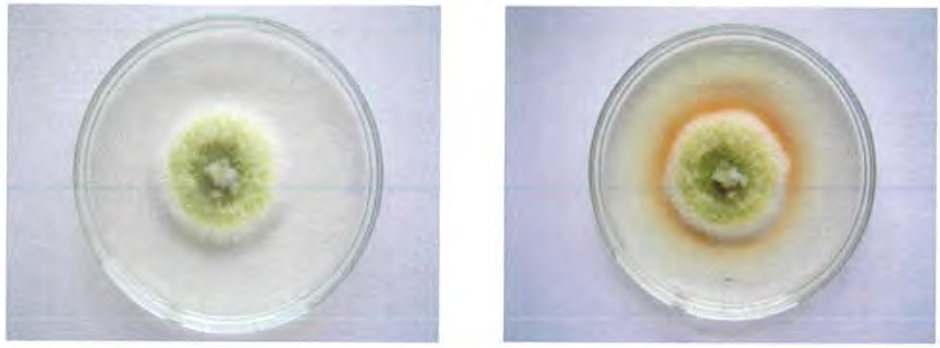
ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซอะไมเลสของเชื้อราในอาหารแข็ง

รหัสเชื้อรา	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (เซนติเมตร)	ผลต่างระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส และโคโลนี (เซนติเมตร)
UD1	4.51	4.05	0.46
UD2	4.08	3.88	0.20
UD3	4.20	3.96	0.24
UB1	4.72	4.37	0.35
UB2	4.56	4.36	0.20
UB3	4.32	4.00	0.32
NP1	4.44	4.08	0.36
NP2	4.34	4.05	0.29
NP3	4.20	3.90	0.30
RE1	4.44	4.10	0.31
RE2	4.02	3.92	0.10
RE3	4.34	3.96	0.38
BR1	4.42	3.95	0.47
BR2	4.21	3.96	0.25
BR3	4.32	3.99	0.33

4.1.2 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดโคจิก

การทดสอบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งของเชื้อ *Aspergillus* ทั้ง 15 ไอโซเลต ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง Starch medium ที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน โดยราดสารละลายเฟอริกคลอไรด์ลงบนอาหารแข็งที่เชื้อราเจริญอยู่ ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ซึ่งเหล็ก (Fe) จะทำปฏิกิริยากับกรดโคจิกเกิดเป็นสารสีแดงเข้ม ถ้าเกิดสีแดงขึ้นรอบๆ โคโลนีของเชื้อรา แสดงว่าเชื้อนั้นสามารถผลิตกรดโคจิกได้ แสดงดังภาพที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 ลักษณะการเกิดสีแดงรอบโคโลนีของเชื้อ *Aspergillus*

นอกจากนี้ เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่ายังพบว่าเชื้อราทั้ง 15 ไอโซเลต มีความเข้มของการเกิดสีแดงรอบๆ โคโลนีแตกต่างกัน โดยเชื้อราที่มีความเข้มของการเกิดสีแดงอย่างเด่นชัดกว่าเชื้อราตัวอื่นได้แก่ เชื้อรารหัส UD1 UB1 NP1 RE3 และ BR1 ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราในอาหารแข็ง

รหัสเชื้อรา	การผลิตกรดโคจิก
UD1	++
UD2	+
UD3	+
UB1	++
UB2	+
UB3	+
NP1	++
NP2	+
NP3	+
RE1	+
RE2	+
RE3	++
BR1	++
BR2	+
BR3	+

การผลิตกรดโคจิก : ++ มีการผลิตกรดโคจิกมาก (สีแดงเข้ม); + มีการผลิตกรดโคจิกน้อย (สีแดงอ่อน)

จากผลการทดสอบพบว่าเชื้อราทั้ง 15 ไอโซเลต สามารถผลิตกรดโคจิกได้ เพราะเป็นเชื้อราในกลุ่มที่มีสปอร์สีเขียวสอดคล้องกับ Bajpai *et al.* (1982) ซึ่งรายงานว่ากรดโคจิกผลิตได้โดยเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aspergillus หลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะในกลุ่มของ *A. flavus* *A. oryzae* และ *A. tamarii* และรายงานของ Rosfarizan and Ariff (2000) ที่พบว่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* Link 44-1 ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียว มีความสามารถผลิตกรดโคจิกได้เช่นกัน รวมทั้งรายงานของคึกฤทธิ์ ศิลาลาย (2547) ที่ได้รายงานผลการศึกษาเชื้อ *Aspergillus* spp. สปอร์สีดำ และสปอร์สีเขียวที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวนทั้งหมด 60 ตัวอย่าง ว่ามีเฉพาะเชื้อราที่มีสปอร์สีเขียวเท่านั้นที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้

ผลจากการทดสอบเชื้อรา *Aspergillus* ทั้ง 15 ไอโซเลต พบว่าเชื้อรา 5 ไอโซเลต คือรหัส UD1 UB1 NP1 RE3 และ BR1 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส และกรดโคจิกในอาหารแข็ง Starch medium ที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าเชื้อรารหัสอื่นๆ เนื่องจากมีขนาดความแตกต่างของโคโลนี และบริเวณใสมากเมื่อทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน และมีความเข้มของการเกิดสีแดงรอบๆ โคโลนีมากเมื่อทดสอบด้วยสารละลายเฟอริกคลอไรด์ ดังนั้นจึงเลือกเอาเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตนี้มาทำการทดสอบในอาหารเหลวต่อ เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสได้ดีที่สุด

4.2 ผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว

เมื่อนำเชื้อ *Aspergillus* ที่สามารถผลิตกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสได้ดีในอาหารแข็งจากข้อ 4.1 ได้แก่เชื้อรารหัส UD1 UB1 NP1 RE3 และ BR1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว Starch medium ที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้ดีที่สุด โดยเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรทุกวัน เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของพีเอช การผลิตกรดโคจิก และกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

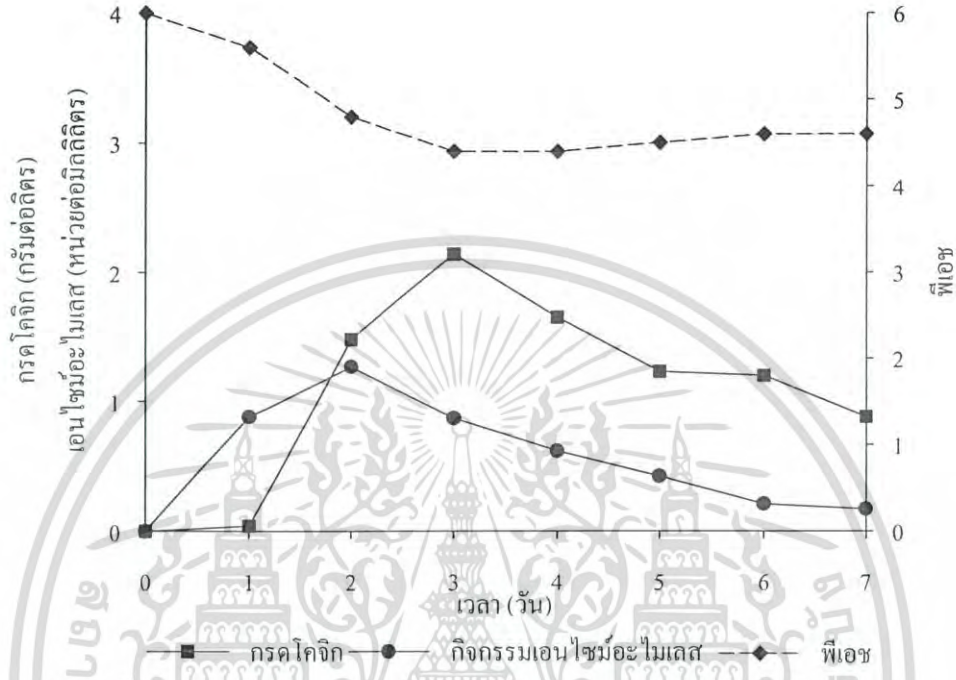
ผลการศึกษาพบว่า จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรารหัส UD1 เป็นเวลา 7 วัน เชื้อมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดในวันที่ 2 เท่ากับ 1.27 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเริ่มมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 3 โดยมีปริมาณเท่ากับ 2.14 กรัมต่อลิตร ส่วนค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงลดลงเท่ากับ 4.4 ในวันที่มีปริมาณกรดโคจิกสูงสุด จากพีเอชเริ่มต้น 6.0 (ภาพที่ 4.3)

ผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรารหัส UB1 พบว่าเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 0.90 หน่วยต่อมิลลิลิตรในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ 1.50 กรัมต่อลิตร ส่วนค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงลดลงต่ำสุดเท่ากับ 4.7 ในวันที่เชื้อมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 4.4)

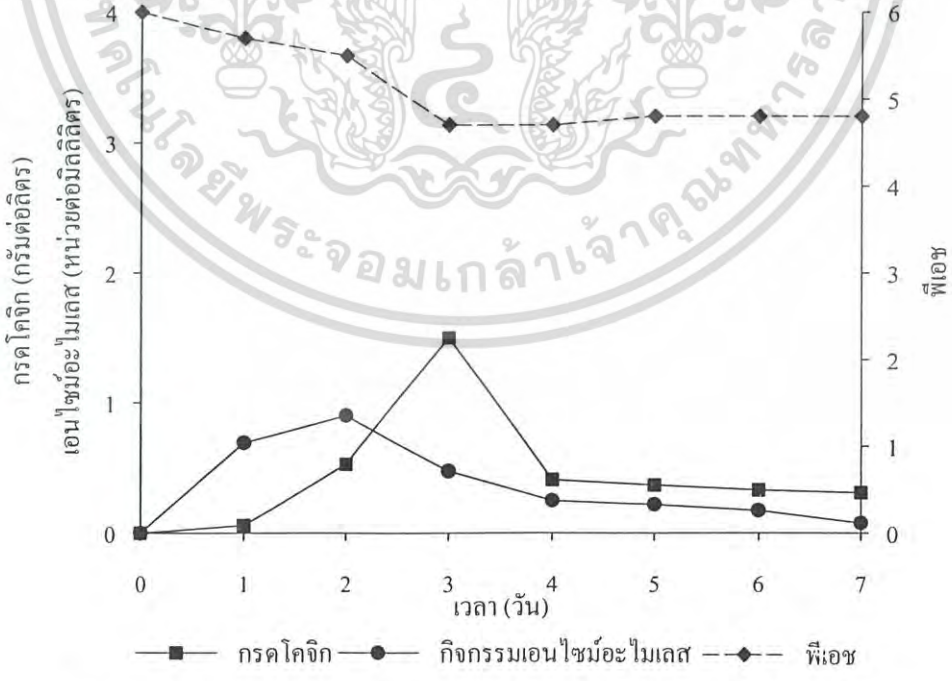
ผลของการเพาะเลี้ยงเชื้อรารหัส NP1 พบว่า เชื้อเริ่มมีผลิตเอนไซม์อะไมเลสตั้งแต่วันแรก โดยมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 2 เท่ากับ 1.13 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 1.67 กรัมต่อลิตรในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และมีค่าพีเอชลดลงเท่ากับ 4.7 ในวันเดียวกัน (ภาพที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรารหัส RE3 เชื้อมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 2 เช่นเดียวกัน โดยมีปริมาณเท่ากับ 1.29 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 1.99 กรัมต่อลิตรในวันที่ 3 ส่วนค่าพีเอช มีการเปลี่ยนแปลงลดลงจนถึง 4.5 ในวันเดียวกัน จากนั้นจึงเริ่มคงที่ (ภาพที่ 4.6)

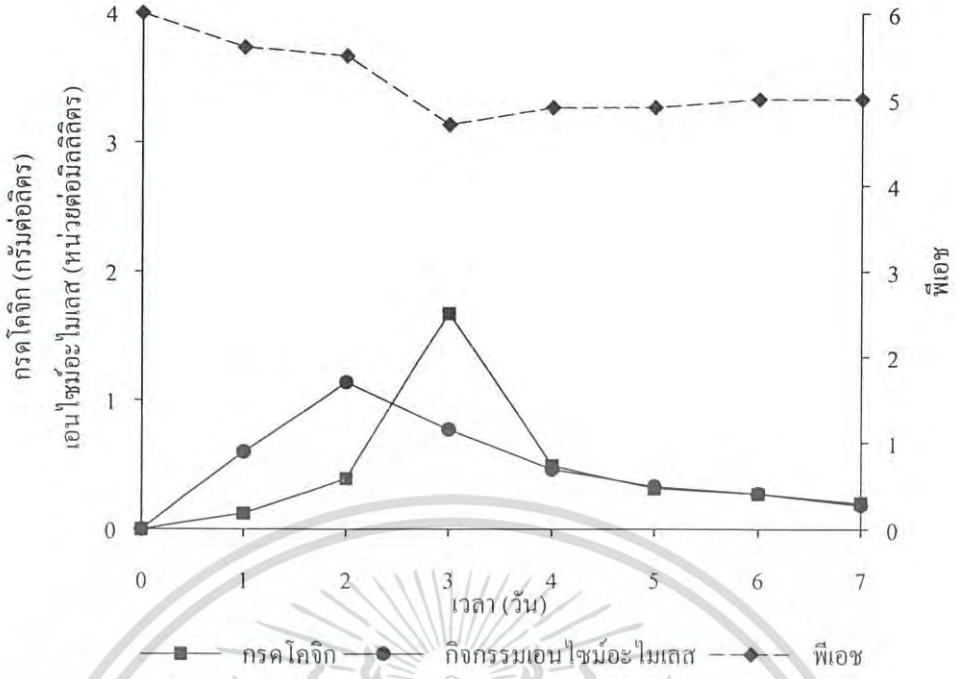


ภาพที่ 4.3 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลส ของเชื้อรารหัส UD1

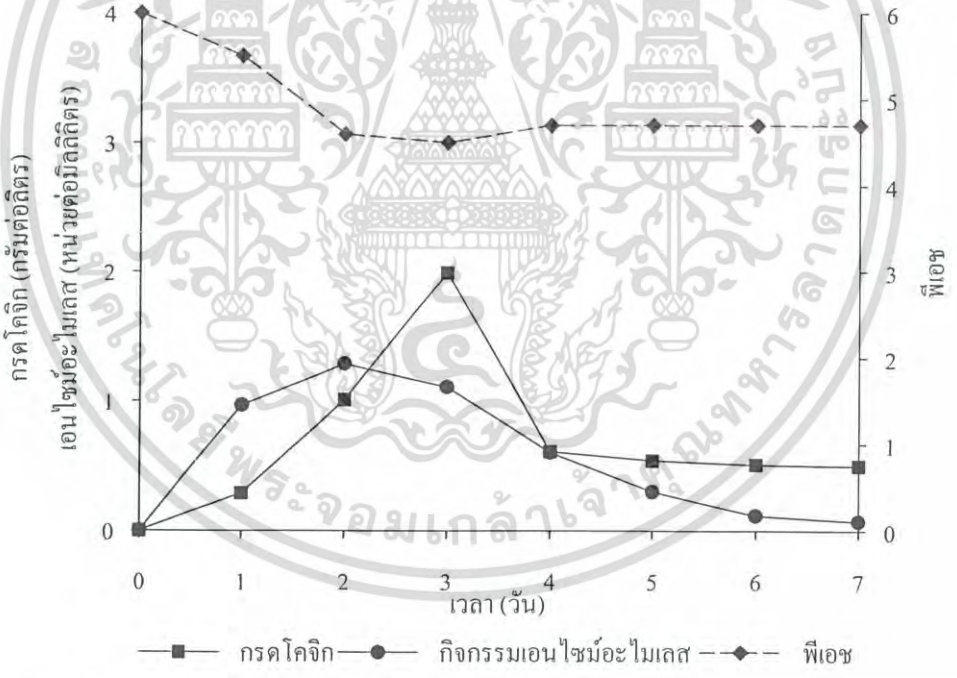


ภาพที่ 4.4 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลส ของเชื้อรารหัส UB1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



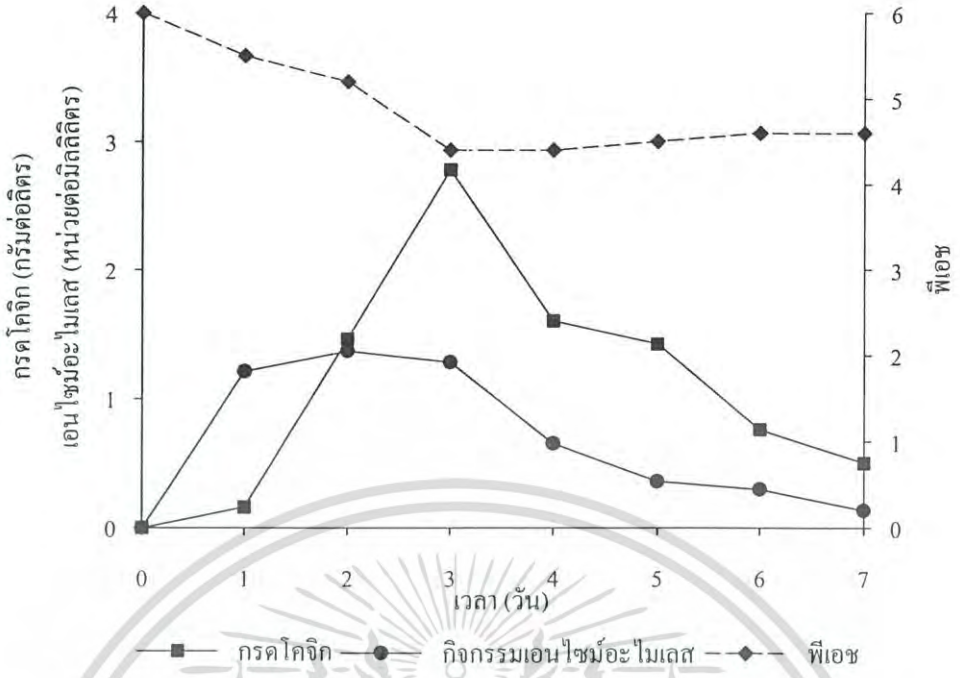
ภาพที่ 4.5 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลส ของเชื้อรารหัส NP1



ภาพที่ 4.6 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลส ของเชื้อรารหัส RE3

สำหรับผลการเพาะเลี้ยงเชื้อรารหัส BR1 พบว่า มีปริมาณการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 1.37 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 2 และมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 2.78 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงลดลงต่ำสุดเท่ากับ 4.4 จากพีเอชเริ่มต้น 6.0 ในวันที่มีปริมาณกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุด (ภาพที่ 4.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลส ของเชื้อรารหัส BR1

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อ *Aspergillus* ทั้ง 5 ไอโซเลต จะมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสออกมาก่อนเพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลแล้วนำไปใช้ในการเจริญ และการผลิตกรดโคจิก ส่วนค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงลดลงจากค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เนื่องจากเชื้อมีการผลิตกรดโคจิกออกมา จากนั้นจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรือคงที่ เมื่อเปรียบเทียบผลการผลิตกรดโคจิกทางสถิติพบว่า เชื้อราทั้ง 5 รหัสมีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราทั้ง 5 รหัส

รหัสเชื้อรา	UD1	UB1	NP1	RE3	BR1
ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	2.14^{b}	1.50^{e}	1.67^{d}	1.99^{c}	2.78^{a}

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

และเมื่อพิจารณาผลการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* ทั้ง 5 ไอโซเลต ได้แก่รหัส UD1 UB1 NP1 RE3 และ BR1 พบว่าเชื้อรารหัส BR1 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส และกรดโคจิกได้สูงที่สุด โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 1.37 หน่วยต่อมิลลิลิตรในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดเท่ากับ 2.78 กรัมต่อลิตรในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนเชื้อราที่มีการผลิตกรดโคจิกรองลงมาได้แก่ เชื้อรารหัส UD1 RE3 NP1 และ UB1 โดยมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 2.14 กรัมต่อลิตร 1.99 กรัมต่อลิตร 1.67 กรัมต่อลิตร และ 1.50 กรัมต่อลิตร

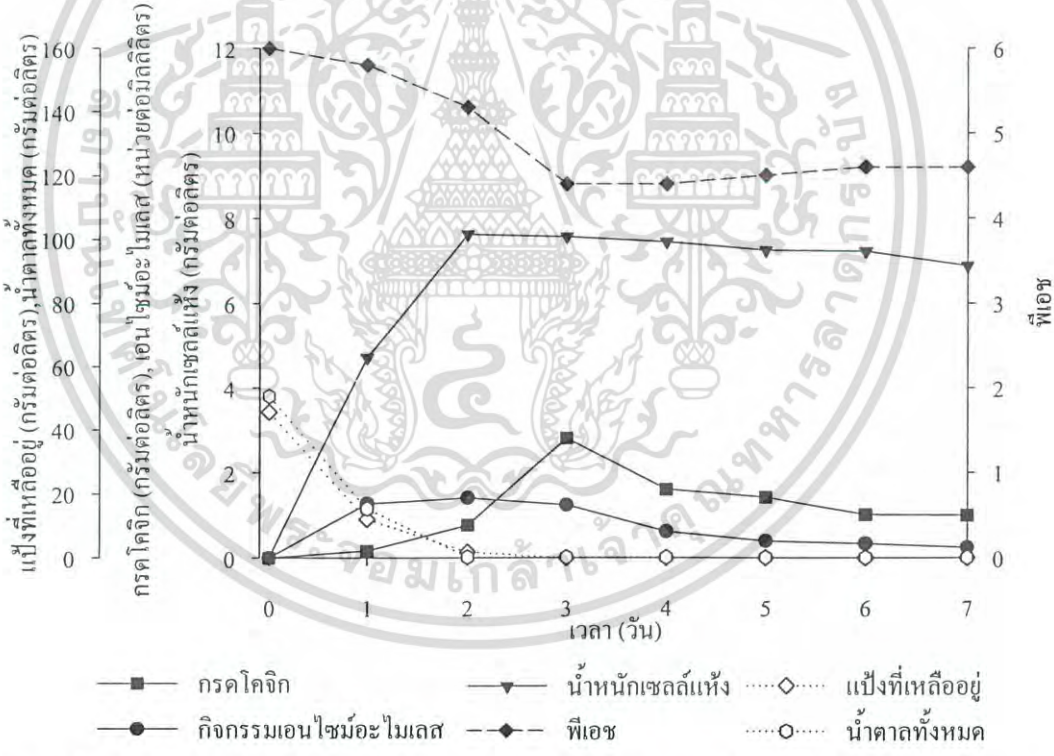
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกเชื้อราที่มีการผลิตกรดโคจิกได้ดีที่สุดคือ *Aspergillus* sp. BR1 ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.3 ผลการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่า

4.3.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหาร Starch medium ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 2 เปอร์เซ็นต์ 4 เปอร์เซ็นต์ และ 6 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการทดลองคือ เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์พบว่า จากระยะเวลาการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 7 วัน เชื้อเริ่มมีการเจริญเพิ่มจำนวนเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) ในวันที่ 2 มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 1.41 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 7.62 กรัมต่อลิตร ปริมาณการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเกิดขึ้นในวันที่ 3 เท่ากับ 2.80 กรัมต่อลิตร ในขณะเดียวกันปริมาณแป้งที่เหลือในอาหารเริ่มหมด ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดค่อยๆ ลดลง จากปริมาณเริ่มต้น 50.71 กรัมต่อลิตร ส่วนค่าพีเอชลดลงต่ำสุดเท่ากับ 4.4 (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.8 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

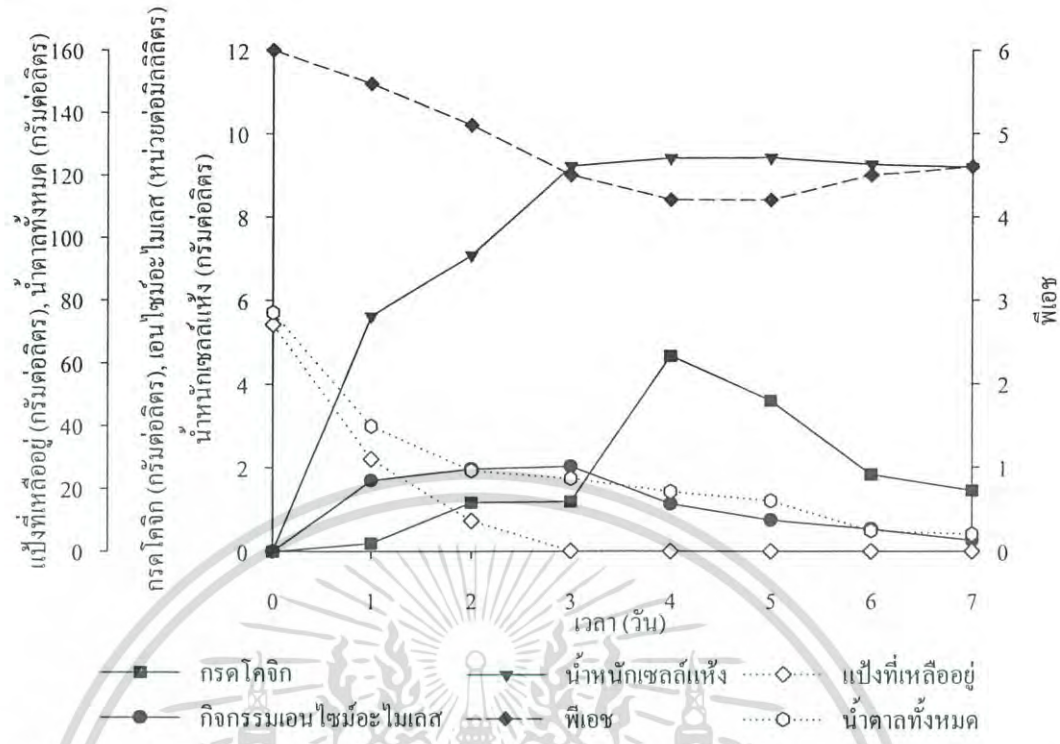
ผลการศึกษาการใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า จากระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วันเชื้อรามีการเจริญเพิ่มจำนวนในช่วง 2 วันแรก และเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 3 ซึ่งมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 2.03 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นแป้งที่มีอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

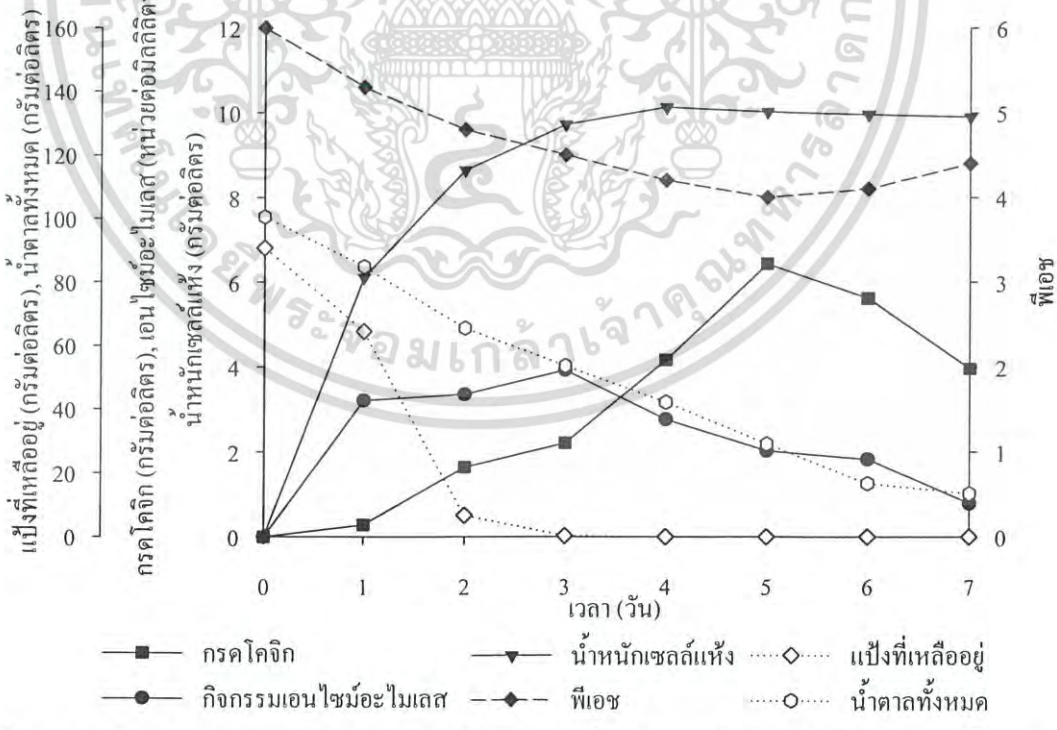
ในอาหารเริ่มหมด และมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 4.66 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 รวมทั้งมีน้ำหนักแห้งสูงสุดเท่ากับ 9.40 กรัมต่อลิตร ในวันเดียวกัน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดค่อยๆ ลดลง จากปริมาณเริ่มต้น 76.16 กรัมต่อลิตร และมีค่าพีเอชลดลงเท่ากับ 4.2 ในวันที่มีปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (ภาพที่ 4.9) ส่วนผลการศึกษาการใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า ในช่วง 2 วันแรก เชื้อราจะมีการเจริญในระยะเพิ่มจำนวน และเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 3 ซึ่งมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 3.92 หน่วยต่อมิลลิลิตร แป้งที่เหลืออยู่ในอาหารเริ่มหมดในวันที่ 4 และเชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 10.12 กรัมต่อลิตร มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด 6.43 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงเรื่อยๆ จากปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 100.59 กรัมต่อลิตร สำหรับการเปลี่ยนแปลงของพีเอชที่เกิดขึ้น จะลดลงเรื่อยๆ จากวันแรกที่พีเอชเริ่มต้น 6.0 จนถึง 4.0 ในวันที่มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด จากนั้นจะเริ่มคงที่หรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (ภาพที่ 4.10)

จากผลการทดลองใช้แป้งมันสำปะหลังที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน จะเห็นได้ว่า เชื้อรามีการผลิตกรดโคจิก รวมทั้งเอนไซม์อะไมเลส และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 6 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 6.43 กรัมต่อลิตร มากกว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 4 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ถึง 1.4 เท่า และ 2.3 เท่า ซึ่งมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 4.66 กรัมต่อลิตร และ 2.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเข้มข้นขึ้น ทำให้เชื้อมีแหล่งคาร์บอนที่จะนำไปใช้ในการเจริญมากขึ้น โดยเชื้อจะสามารถเปลี่ยนแป้งที่มีอยู่ในอาหารไปเป็นน้ำตาลได้มากขึ้นโดยสังเกตได้จากปริมาณของเอนไซม์อะไมเลสที่ผลิตออกมา และน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้น จึงทำให้มีปริมาณการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นด้วย เช่นเดียวกับรายงานของ Bajpai *et al.* (1982) ซึ่งได้ศึกษาการนำเส้นใยของเชื้อ *Aspergillus flavus* มาเลี้ยงในอาหาร 4 สูตร โดยแต่ละสูตรใช้น้ำตาลซูโครส และกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้เติมน้ำตาล พบว่าอาหารที่เติมน้ำตาลเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ให้ผลผลิตกรดโคจิก 70-80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และอาหารที่ไม่ได้เติมน้ำตาลไม่พบว่ามีกรดโคจิกเกิดขึ้นเลยในระหว่างการหมัก ต่อมา Wei *et al.* (1991) ได้นำเชื้อ *Aspergillus candidus* ATCC44054 มาเลี้ยงในอาหารชนิดต่างๆ ซึ่งมีปริมาณแหล่งคาร์บอนต่างกัน ได้แก่ อาหารสูตร YES ที่มีซูโครส 200 กรัมต่อลิตร อาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek-Dox ที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และอาหารของ Tadera ที่มีกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหาร YES ที่มีซูโครส 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนให้ปริมาณการผลิตกรดโคจิกสูงสุดคือ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Rosfarizan *et al.* (1998a) ที่ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus flavus* S33-2 พบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวโพดเข้มข้น 25 30 50 และ 75 กรัมต่อลิตร ในการเพาะเลี้ยงให้ผลการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด 19.2 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ความเข้มข้น 75 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 4 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 4.10 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 6 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) อัตราการผลิตกรดโคจิก (Q_p) ผลได้ของกรดโคจิกจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) ผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาล ($Y_{p/s}$) และอัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะ (q_p) ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญ และการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ กัน

ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง (เปอร์เซ็นต์)	μ (ต่อชั่วโมง)	Q_p (กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน)	$Y_{p/x}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์)	$Y_{x/s}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{p/s}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล)	q_p (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ต่อวัน)
2	0.065	0.933	0.370	0.151	0.055	0.247
4	0.072	1.165	0.496	0.164	0.081	0.248
6	0.075	1.286	0.642	0.173	0.090	0.257

จากตารางจะเห็นได้ว่า อาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.075 ต่อชั่วโมง สูงกว่าที่ได้จากการใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ 4 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเมื่อใช้แป้งปริมาณมากขึ้น ทำให้เชื้อสามารถเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาลเพื่อใช้ในการเจริญได้เพิ่มขึ้น โดยมีผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.173 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล และเมื่อมีปริมาณเซลล์มากขึ้น การผลิตกรดโคจิกก็จะเพิ่มขึ้นตามโดยมีผลได้ของกรดโคจิกจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) เท่ากับ 0.642 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ ส่งผลให้มีอัตราการผลิตกรดโคจิก (Q_p) เท่ากับ 1.286 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน และมีอัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะ (q_p) เท่ากับ 0.257 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ต่อวัน ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของการใช้แป้งมันสำปะหลังทั้ง 3 ความเข้มข้นทางสถิติ พบว่า ให้ผลการผลิตกรดโคจิกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่างๆ กัน

ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง (เปอร์เซ็นต์)	2	4	6
ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	2.80^{c}	4.66^{b}	6.43^{a}

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

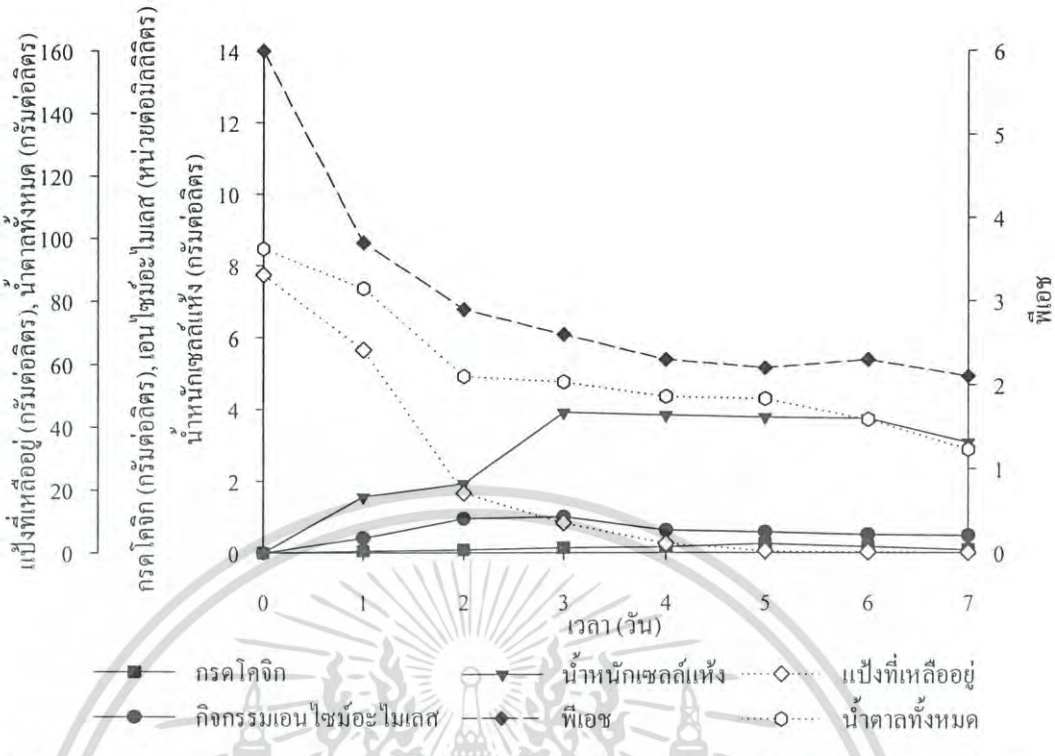
ดังนั้นความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 มากที่สุดคือ การใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ปริมาณการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 6.43 กรัมต่อลิตรในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาได้แก่ การใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 4.66 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 และการใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดโคจิกน้อยที่สุดคือ 2.80 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง

4.3.2 ผลการศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ แทนยีสต์สกัด

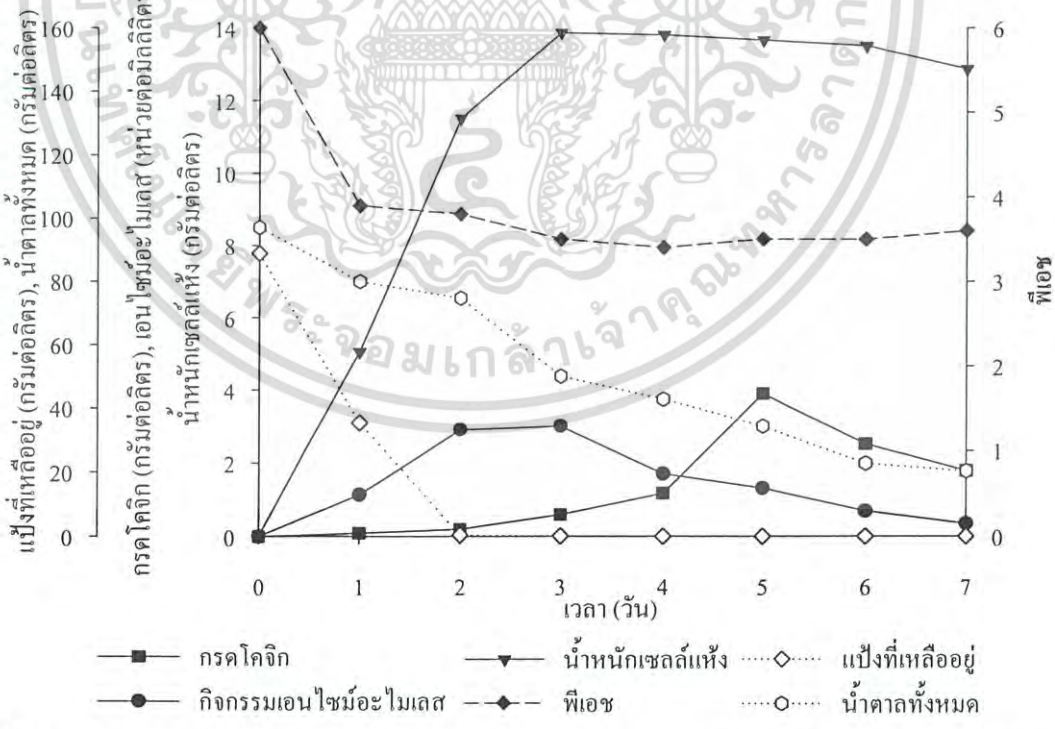
ผลการศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) แทนการใช้ยีสต์สกัดในอาหาร Starch medium ที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อมีการเจริญเพิ่มจำนวนน้อยมากในช่วง 2 วันแรก และเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 3 ซึ่งมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเพียง 0.99 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.90 กรัมต่อลิตร และมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเพียง 0.24 กรัมต่อลิตร โดยแป้งเริ่มหมดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงจากปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 88.44 กรัมต่อลิตร และมีการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชลดลงอย่างมากอยู่ในช่วง 2.1-2.3 ตั้งแต่วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4.11) ผลจากการใช้แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า เชื้อราเริ่มมีการเจริญเพิ่มจำนวนในช่วง 2 วันแรก จากนั้นจะเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 3 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 13.86 กรัมต่อลิตร และมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 3.01 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีปริมาณแป้งลดลงจากวันแรก 88.95 กรัมต่อลิตร จนเริ่มหมดในวันที่ 4 และมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 3.90 กรัมต่อลิตรในวันที่ 5 พีเอชมีการเปลี่ยนแปลงลดลงอยู่ในช่วง 3.4-3.5 (ภาพที่ 4.12)

สำหรับการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า เชื้อรามีการเจริญน้อยมาก โดยใน 2 วันแรก เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพียง 1.72 กรัมต่อลิตร และเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 3 ซึ่งมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสูงสุดเพียง 0.81 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 2.78 กรัมต่อลิตร และมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 เพียง 0.10 กรัมต่อลิตร ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ในอาหารเริ่มหมดในวันที่ 7 จากปริมาณเริ่มต้น 88.55 กรัมต่อลิตร ส่วนค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงลดลงอย่างมากอยู่ในช่วง 2.2-2.3 (ภาพที่ 4.13) เมื่อใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า เชื้อราเริ่มมีการเจริญคงที่ในวันที่ 3 และมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 3.26 หน่วยต่อมิลลิลิตร แป้งเริ่มหมดในวันที่ 4 จากปริมาณแป้งเริ่มต้น 89.55 กรัมต่อลิตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 10.60 กรัมต่อลิตรในวันเดียวกัน มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 4.75 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชลดลงอยู่ในช่วง 4.5-4.6 จากพีเอชเริ่มต้น 6.0 (ภาพที่ 4.14)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

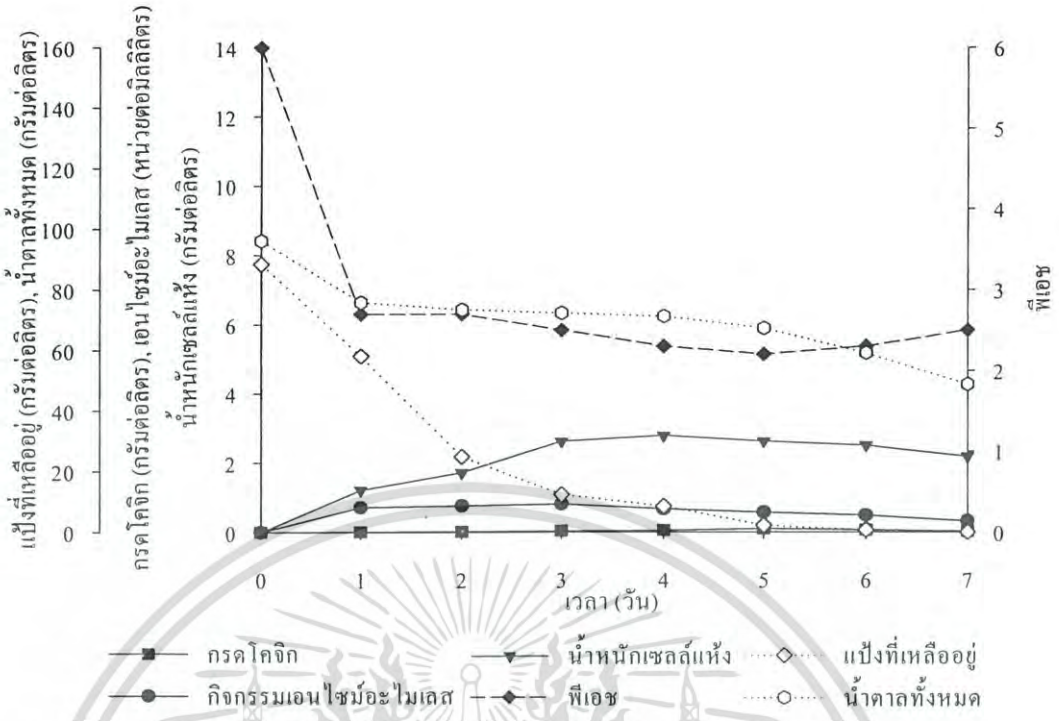


ภาพที่ 4.11 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

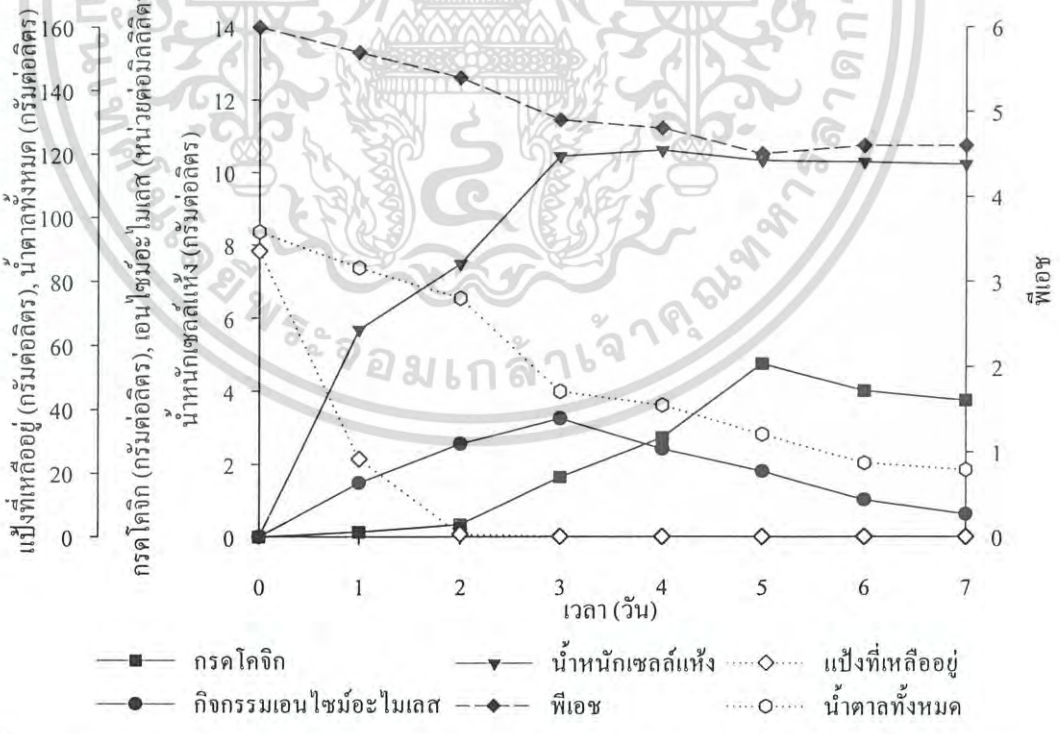


ภาพที่ 4.12 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.13 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 4.14 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาผลการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ทั้ง 4 ชนิดแทนยีสต์สกัด พบว่า การใช้โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) เป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลการผลิตกรดโคจิกดีที่สุดคือ 4.75 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 3.90 กรัมต่อลิตร ส่วนแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ให้ผลการผลิตกรดโคจิกน้อยมากคือ 0.24 กรัมต่อลิตร และ 0.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนแล้ว พบว่า การใช้ยีสต์สกัดซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ให้ปริมาณการผลิตกรดโคจิกสูงกว่าที่ได้จากการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด โดยมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 6.43 กรัมต่อลิตร อาจเนื่องมาจากแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของสารประกอบอนินทรีย์เช่น เกลือแอมโมเนียม อย่างแอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์นั้นจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาวะเป็นกรดมากขึ้น สังเกตได้จากค่าพีเอชที่ลดลงอยู่ในช่วง 2.1-2.5 เพราะแอมโมเนียมเมื่ออยู่ในสารละลายจะอยู่ในรูปแอมโมเนีย (NH_4^+) มีผลไประงับกิจกรรมของเอนไซม์บางตัวที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลส ทำให้เชื้อเจริญได้น้อยลงจึงส่งผลให้มีการผลิตกรดโคจิกลดลงไปด้วย(Ariff and Webb. 1998) นอกจากนี้ Kitada *et al.* (1967) และ Kwak and Rhee (1992a) ได้รายงานว่าการเจริญ และการผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ได้ผลดีกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่นเดียวกับรายงานของ Rosfarizan and Ariff (2000) ที่ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนพบว่า แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์คือ ยีสต์สกัด และเปปโตนให้ผลการเจริญและการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *A. flavus* ได้ดีที่สุด เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) อัตราการผลิตกรดโคจิก (Q_p) ผลได้ของกรดโคจิกจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) ผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาล ($Y_{p/s}$) และอัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะ (q_p) ให้ผลดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญ และการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ

แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ (5 กรัมต่อลิตร)	μ (ต่อชั่วโมง)	Q_p (กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน)	$Y_{p/x}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์)	$Y_{x/s}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{p/s}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล)	q_p (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ต่อวัน)
$(NH_4)_2SO_4$	0.019	0.049	0.065	0.092	0.005	0.026
NH_4NO_3	0.068	0.780	0.286	0.294	0.062	0.114
NH_4Cl	0.008	0.019	0.037	0.111	0.003	0.015
$NaNO_3$	0.072	0.950	0.460	0.212	0.075	0.184

จากตารางจะเห็นได้ว่า การใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนให้อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดคือ 0.950 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน และมีอัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะเท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.184 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ต่อวัน เนื่องจากเชื้อมีอัตราการเจริญสูงถึง 0.072 ต่อชั่วโมง ใกล้เคียงกับการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งมีอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงกว่าคือ 1.286 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน รองลงมาได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรทที่มีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.780 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน ส่วนแอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์นั้นไม่มีการส่งเสริมการเจริญของเชื้อเลย สังเกตได้จากอัตราการเจริญซึ่งมีค่าเพียง 0.019 และ 0.008 ต่อชั่วโมง สอดคล้องกับผลการทดลองของ Davis (1962) ซึ่งทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus flavus* NTCC10124 โดยใช้แหล่งไนโตรเจน 26 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคาร์บอเนต นอกจากจะไม่มีการผลิตกรดโคจิกแล้วยังพบว่าเชื้อไม่มีการเจริญอีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ แทนยีสต์สกัดทางสถิติพบว่า ให้ผลการผลิตกรดโคจิกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ

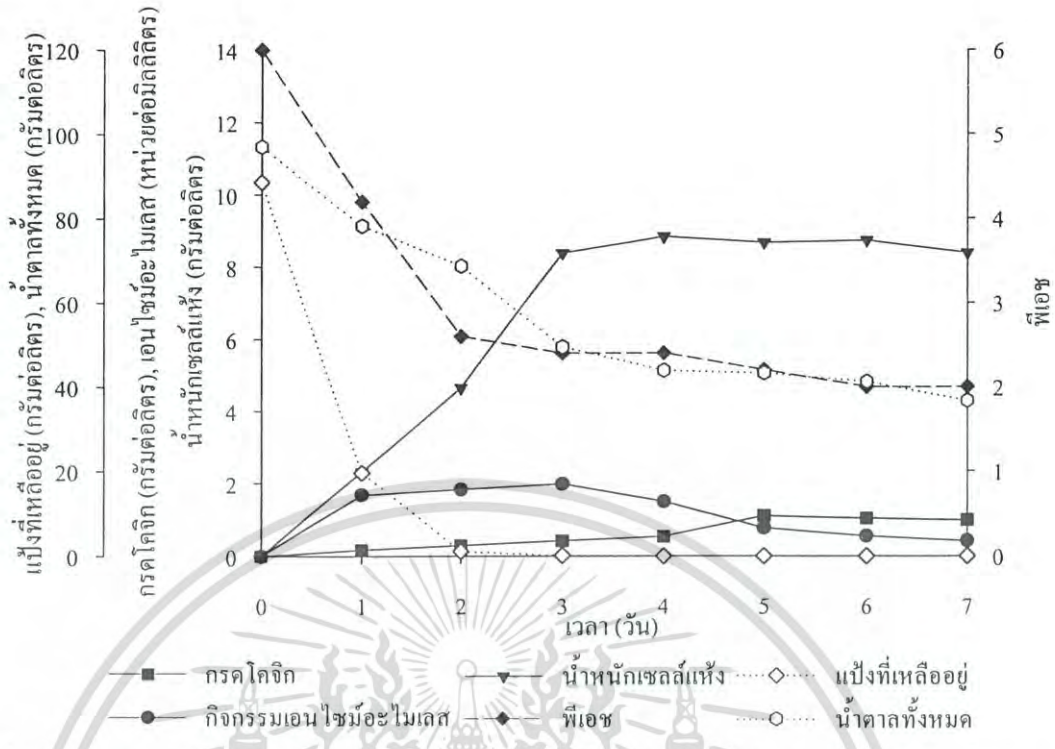
แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์	$((NH_4)_2SO_4)$	(NH_4NO_3)	(NH_4Cl)	$(NaNO_3)$
ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	0.24^{c}	3.90^{b}	0.10^{d}	4.75^{a}

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99
ตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

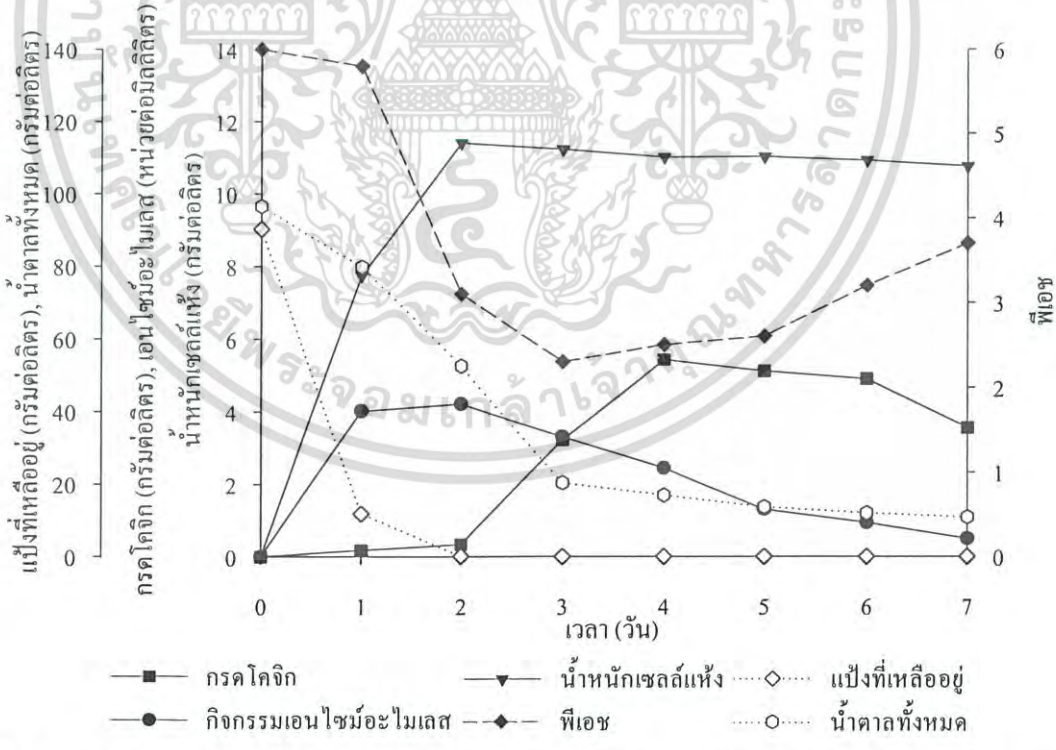
4.3.3 ผลการศึกษาการใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหาร Starch medium ที่ใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต $((NH_4)_2SO_4)$ แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และโซเดียมไนเตรท $(NaNO_3)$ พบว่า เมื่อใช้ยีสต์สกัดกับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อรามีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 3 มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 1.97 หน่วยต่อมิลลิลิตร แป้งเริ่มหมดในวันที่ 4 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 8.82 กรัมต่อลิตร มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 1.10 กรัมต่อลิตร ส่วนพีเอชมีค่าลดลงอยู่ในช่วง 2.0-2.4 ตั้งแต่วันที่ 2 จากพีเอชเริ่มต้น 6.0 (ภาพที่ 4.15) ผลจากการใช้แอมโมเนียมไนเตรทร่วมกับยีสต์สกัดพบว่า เชื้อรามีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่อย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 4.22 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 11.40 กรัมต่อลิตร ในวันเดียวกัน แป้งเริ่มหมดในวันที่ 4 และมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 5.42 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชลดลงอยู่ในช่วง 2.3-2.6 (ภาพที่ 4.16)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมดเมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 4.16 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมดเมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์กับยีสต์สกัดแสดงดังภาพที่ 4.17 โดยเชื้อรามีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 3 ซึ่งมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 1.80 หน่วยต่อมิลลิลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 6.56 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง แป้งเริ่มหมดในวันที่ 5 และมีการผลิตกรดโคจิกเกิดขึ้นสูงสุดเพียง 0.64 กรัมต่อลิตร เนื่องจากพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงทำให้มีความเป็นกรดมากเกินไป มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสที่จะช่วยในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล ทำให้เชื้อนำแหล่งอาหารไปใช้ในการเจริญและการผลิตกรดโคจิกได้น้อยลง

สำหรับผลจากการใช้ยีสต์สกัดและโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า เชื้อรามีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 4.71 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 11.52 กรัมต่อลิตร โดยแป้งเริ่มหมดในวันที่ 4 และมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 8.45 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชลดลงเพียงเล็กน้อยอยู่ในช่วง 4.3-4.5 (ภาพที่ 4.18)

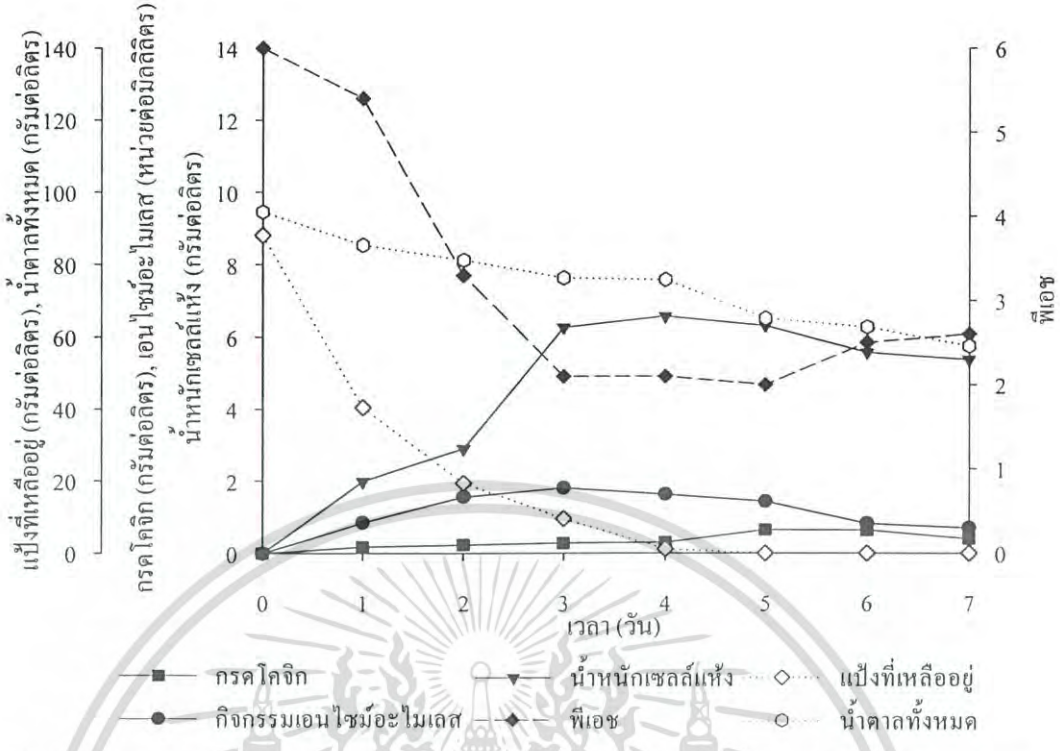
เมื่อพิจารณาผลของการใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด จะเห็นได้ว่า การใช้ยีสต์สกัดร่วมกับโซเดียมไนเตรทให้ผลการผลิตกรดโคจิกดีที่สุด เนื่องมาจากยีสต์สกัดมีองค์ประกอบเป็นสารอาหาร และกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ที่อุดมสมบูรณ์ และยังได้แร่ธาตุเสริมเพิ่มเติมจากโซเดียมไนเตรทซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อทำให้มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสออกมาย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลที่มีโมเลกุลเล็กลง และนำน้ำตาลที่ได้ไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดโคจิกได้ดีขึ้น อีกทั้งยังช่วยให้พีเอชในอาหารมีค่าคงที่ เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เชื้อผลิตออกมาอีกด้วย

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) อัตราการผลิตกรดโคจิก (Q_p) ผลได้ของกรดโคจิกจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) ผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาล ($Y_{p/s}$) และอัตราการเจริญจำเพาะ (q_p) ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.9

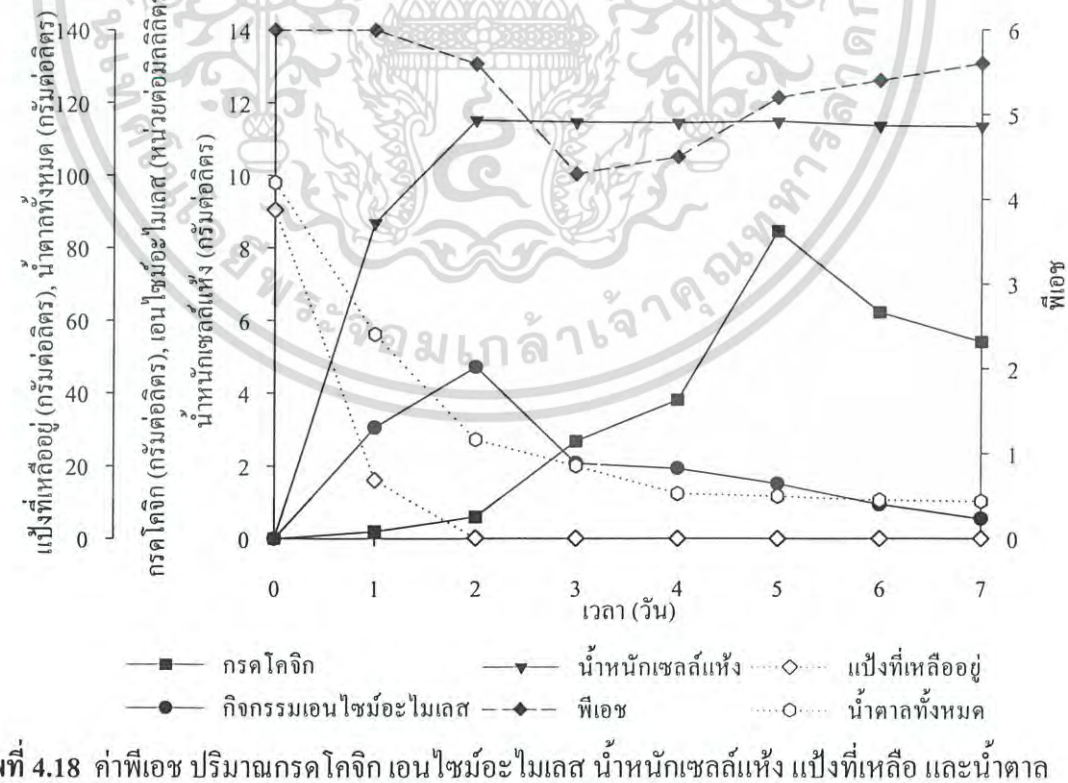
ตารางที่ 4.9 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ

แหล่งไนโตรเจน	μ (ต่อชั่วโมง)	Q_p (กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน)	$Y_{p/x}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์)	$Y_{x/s}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{p/s}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล)	q_p (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ต่อวัน)
yeast extract + $((NH_4)_2SO_4$	0.035	0.219	0.127	0.166	0.020	0.051
yeast extract +(NH_4NO_3)	0.085	1.355	0.493	0.259	0.068	0.246
yeast extract + (NH_4Cl)	0.028	0.128	0.102	0.349	0.022	0.041
yeast extract + $(NaNO_3)$	0.090	1.690	0.736	0.771	0.098	0.294

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.17 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมดเมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 4.18 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมดเมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.9 จะเห็นได้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ยีสต์สกัดร่วมกับโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนให้อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดคือ 1.690 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน มากกว่าการใช้ยีสต์สกัดเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งไนโตรเจนถึง 1.3 เท่า และให้อัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะเท่ากับ 0.294 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ต่อวัน เนื่องจากเชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญได้ดีโดยมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.090 ต่อชั่วโมง มีผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.771 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล และมีผลได้ของกรดโคจิกจากมวลเซลล์เท่ากับ 0.736 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ และยังส่งเสริมให้เชื้อสามารถนำน้ำตาลไปใช้ในการผลิตกรดโคจิกได้มากขึ้น เห็นได้จากการมีผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลสูงถึง 0.098 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งสูงกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอื่นๆ แสดงว่า การใช้ยีสต์สกัดร่วมกับโซเดียมไนเตรท มีผลส่งเสริมให้เชื้อมีการเจริญ และมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้น โดยทั่วไปแล้วเชื้อจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน และในกระบวนการหมักสำหรับผลิตสารทุติยภูมิ ถ้าใช้สารประกอบไนโตรเจนที่เชื้อย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว อาจทำให้สร้างผลผลิตที่ต้องการได้น้อย (สมใจ ศิริโภค. 2537) และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนหลายชนิดเชื้อจะใช้แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ง่ายที่สุดก่อน เมื่อสารนั้นหมดแล้วจึงใช้สารประกอบตัวอื่นต่อไป (Stanbury *et al.* 1995) ดังนั้นเชื้อราจึงสามารถใช้ยีสต์สกัดในการเจริญเติบโต และใช้โซเดียมไนเตรทที่เหลือในการผลิตกรดโคจิกได้ สอดคล้องกับรายงานของ May *et al.* (1931) ที่ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus flavus* ในอาหารที่ประกอบด้วยเด็กซ์โทรส 20 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 2.0 กรัมต่อลิตร โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือโซเดียมไนเตรทที่ความเข้มข้น 3 ระดับคือ 0.62 1.66 และ 5.0 กรัมต่อลิตร พบว่า อาหารที่มีโซเดียมไนเตรท 1.66 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 23.7 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคืออาหารที่มีโซเดียมไนเตรท 5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 20.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีการทดลองของ Bently (1957) ที่ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus* โดยใช้อาหาร Czapex-Dox สูตรดัดแปลงที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์สกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์ กับแอมโมเนียมไนเตรท 0.2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า ผลิตกรดโคจิกได้ 7-10 กรัมต่อลิตร ส่วน Kwak and Rhee (1992a) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* ในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของยีสต์สกัด และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการใช้ยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.275 กรัมต่อลิตรให้อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุด 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน แสดงให้เห็นว่าการผลิตกรดโคจิกส่วนมากนิยมใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนหรือมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นลงไปเพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิต

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของการใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ ทางสถิติพบว่า ให้ผลการผลิตกรดโคจิกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งดังแสดงในตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่างๆ

แหล่งไนโตรเจน	yeast extract + $((NH_4)_2SO_4)$	yeast extract + (NH_4NO_3)	yeast extract + (NH_4Cl)	yeast extract + $(NaNO_3)$
ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	1.10^{d}	5.42^{c}	0.64^{e}	8.45^{a}

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

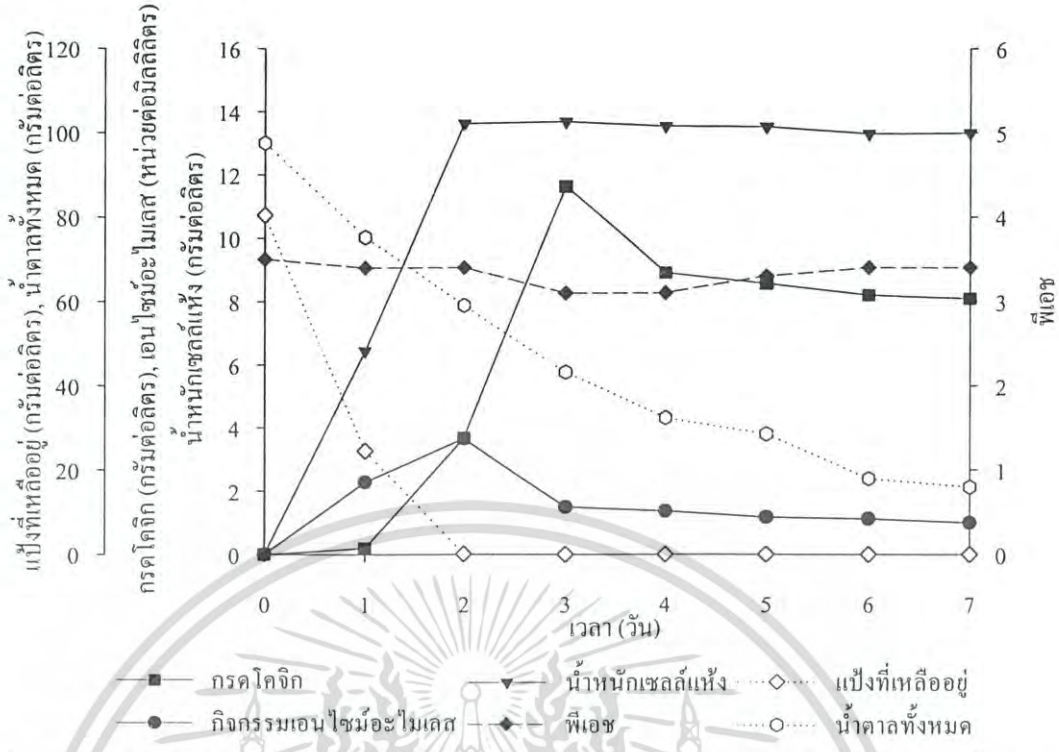
จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้ แสดงให้เห็นว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 คือการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์คือยีสต์สกัดร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์คือโซเดียมไนเตรท อย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร โดยให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดถึง 8.45 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์คือ ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 6.43 กรัมต่อลิตร และการใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแอมโมเนียมไนเตรท อย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 5.42 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์อย่างแอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคลอไรด์นั้นไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

4.3.4 ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม

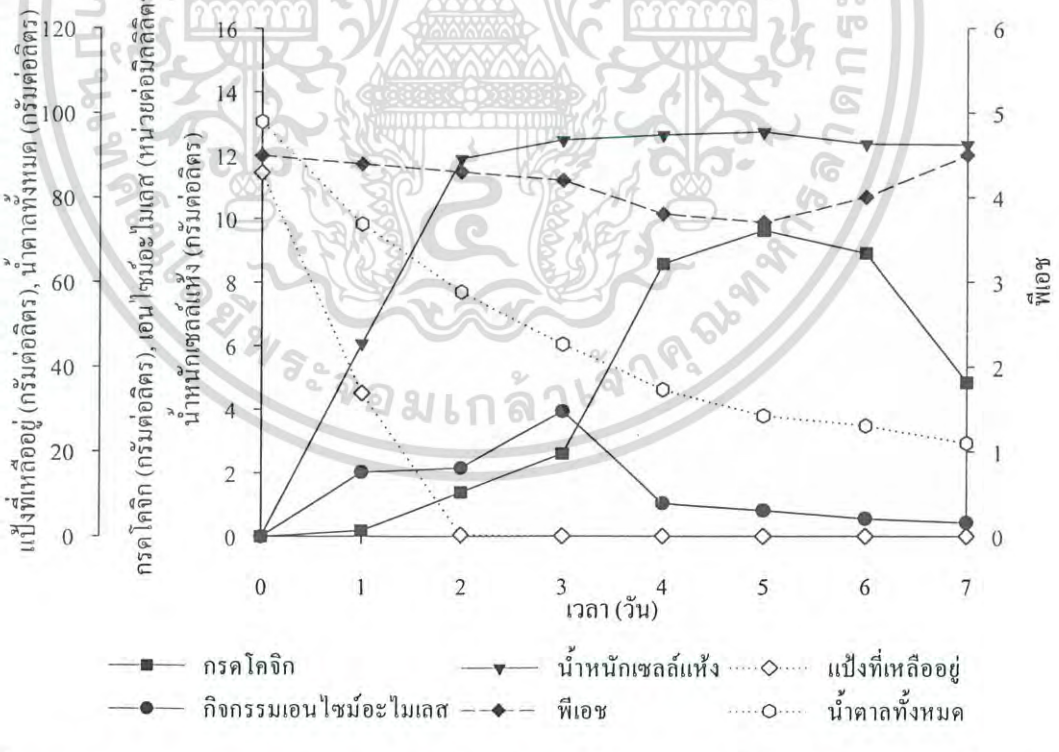
ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่ระดับต่างๆ กันคือ 3.5 4.5 และ 5.5 โดยทำการปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนทำการนึ่งฆ่าเชื้อ พบว่า เมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5 ให้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.19 โดยเชื้อรามีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 3.65 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนในวันที่ 3 พบว่า ปริมาณแป้งมีในอาหารเริ่มหมดลง จากปริมาณแป้งเริ่มต้นเท่ากับ 80.45 กรัมต่อลิตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 13.68 กรัมต่อลิตร มีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเกิดขึ้นมีค่าเท่ากับ 11.62 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 และค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงลดลงต่ำสุดเท่ากับ 3.1 ในวันเดียวกัน

เมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 พบว่า เชื้อรามีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 3.92 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 ปริมาณแป้งในอาหารเริ่มหมดลงในวันที่ 5 จากปริมาณแป้งเริ่มต้นเท่ากับ 85.91 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 12.73 กรัมต่อลิตร และมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 9.61 กรัมต่อลิตร ในวันเดียวกัน ค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงลดลงต่ำสุดเท่ากับ 3.7 ในวันที่มีปริมาณกรดโคจิกสูงสุด ดังแสดงในภาพที่ 4.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



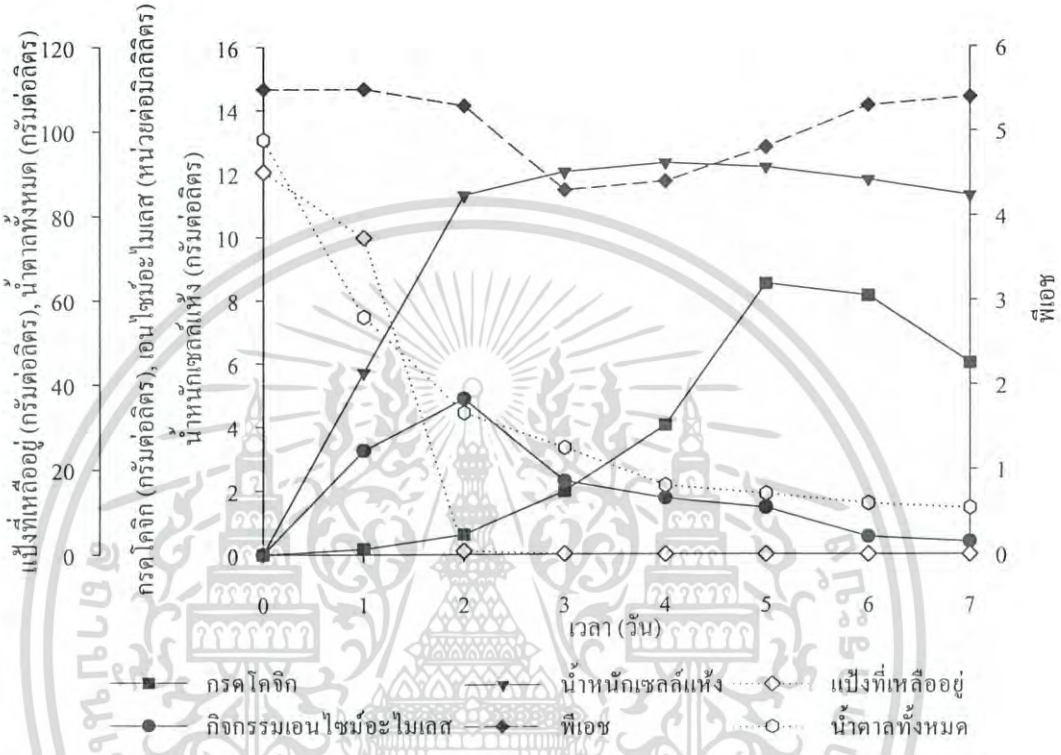
ภาพที่ 4.19 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5



ภาพที่ 4.20 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการใช้พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 พบว่า เชื้อมีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 2 เช่นเดียวกัน และมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 4.88 หน่วยต่อมิลลิลิตรในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง มีปริมาณแป้งเริ่มต้นเท่ากับ 90.36 กรัมต่อลิตร และแป้งเริ่มหมดในวันที่ 5 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 12.31 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 8.50 กรัมต่อลิตร ในวันเดียวกัน ค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงลดลงต่ำสุดเท่ากับ 4.3 ดังแสดงในภาพที่ 4.21



ภาพที่ 4.21 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5

เมื่อพิจารณาผลการทดลองทั้งหมดที่ได้พบว่า การใช้พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5 ส่งผลให้มีการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดเท่ากับ 11.62 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และ 5.5 ซึ่งให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 9.61 กรัมต่อลิตร และ 8.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าที่พีเอชเริ่มต้น 3.5 ใช้ระยะเวลาในการผลิตกรดโคจิกน้อยกว่าโดยมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนที่พีเอชเริ่มต้น 4.5 และ 5.5 มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 อาจเนื่องมาจากการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเป็นกรดก่อนทำการนึ่งฆ่าเชื้อ มีผลให้แป้งในอาหารถูกย่อยสลายไปบางส่วน และมีน้ำตาลเกิดขึ้น ทำให้เชื้อมีการเจริญได้ดี และอาจจะมีผลต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา จึงส่งผลให้มีการผลิตกรดโคจิกได้มากขึ้นด้วย สอดคล้องกับรายงานของ Rosfarizan *et al.* (2002) ที่ได้ศึกษาผลของการควบคุมพีเอชกับการผลิตกรดโคจิกในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. flavus* ในอาหารที่มีแป้งสาคูเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ในช่วงที่เชื้อมีการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในระยะเพิ่มจำนวนควรควบคุมให้มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.3-3.7 และพบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดโคจิกจะมีความคงตัวภายใต้สภาวะที่เป็นกรด จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 8 ลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 3.0 ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 31.07 กรัมต่อลิตร

เมื่อนำผลการทดลองทั้งหมดที่ได้มาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) อัตราการผลิตกรดโคจิก (Q_p) ผลได้ของกรดโคจิกจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) ผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาล ($Y_{p/s}$) และอัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะ (q_p) ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญ และการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างๆ กัน

พีเอชเริ่มต้น	μ (ต่อชั่วโมง)	Q_p (กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน)	$Y_{p/x}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์)	$Y_{x/s}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{p/s}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล)	q_p (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ต่อวัน)
3.5	0.078	3.873	0.850	0.252	0.214	0.566
4.5	0.075	1.922	0.755	0.183	0.138	0.302
5.5	0.073	1.700	0.698	0.150	0.101	0.279

โดยจะเห็นได้ว่าที่พีเอชเริ่มต้น 3.5 เชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ดี โดยมีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.078 ต่อชั่วโมง และมีผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.252 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล และเชื้อยังสามารถผลิตกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลได้มากขึ้น โดยมีผลได้ของกรดโคจิกต่อมวลเซลล์ และผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.850 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ และ0.214 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ นอกจากนี้ จากการที่เชื้อสามารถผลิตกรดโคจิกในระยะเวลาอันสั้นส่งผลให้มีอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงถึง 3.873 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน และมีอัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะเท่ากับ 0.566 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ต่อวัน ซึ่งมากกว่าที่พีเอชเริ่มต้น 4.5 และ 5.5 ถึง 2 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบผลของพีเอชเริ่มต้นทั้ง 3 ค่าทางสถิติพบว่า ให้ผลการผลิตกรดโคจิกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งดังตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นต่างๆ กัน

พีเอชเริ่มต้น	3.5	4.5	5.5
ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	11.62[a]	9.61[b]	8.50[c]

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99
ตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในฟลาสก์แบบเขย่าได้แก่ การใช้อาหาร Starch medium ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนคือ แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนคือ ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร และโซเดียมไนเตรท 2.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5 ซึ่งให้ปริมาณการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 11.62 กรัมต่อลิตรในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง

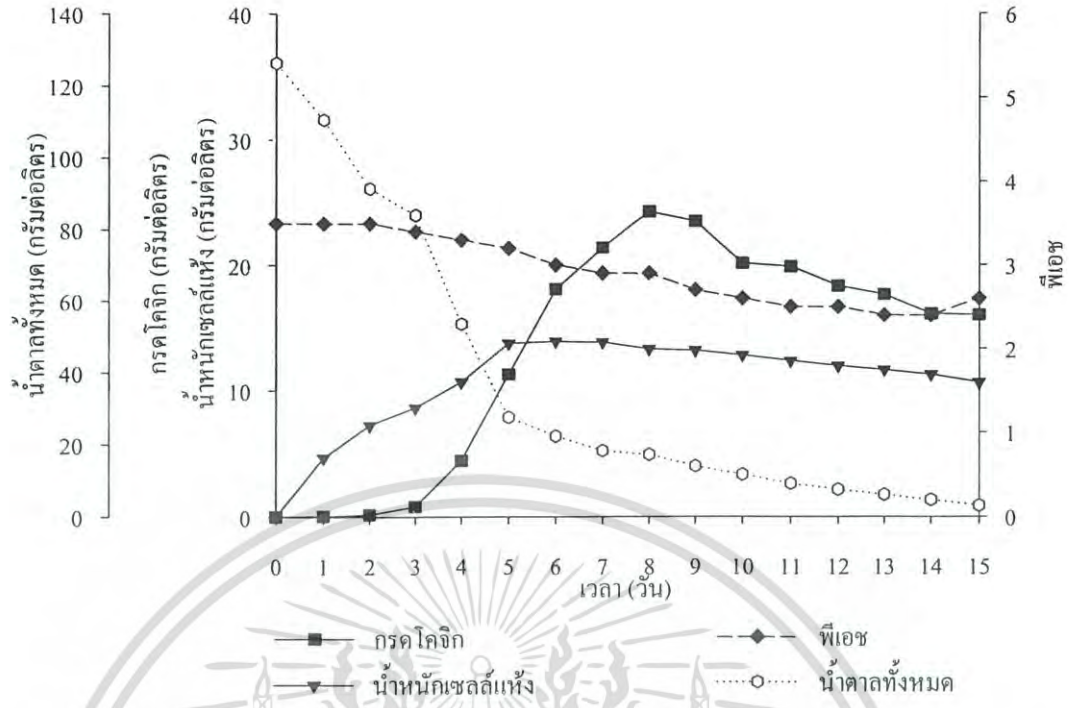
4.4 ผลการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus* ที่คัดเลือกได้กับเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อทำการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 กับเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในอาหาร Starch medium โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน พบว่า เชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 มีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 6 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 13.90 กรัมต่อลิตร และมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 8 เท่ากับ 24.25 กรัมต่อลิตร ส่วนค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงลดลงอยู่ในช่วง 2.4-2.7 แสดงดังภาพที่ 4.22

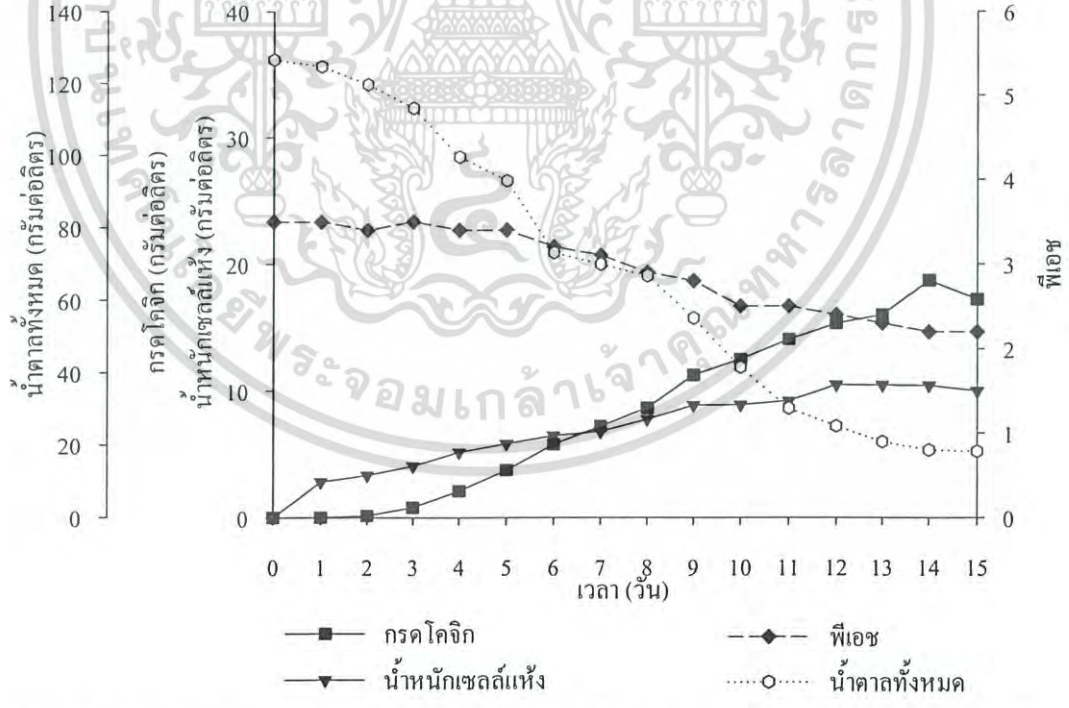
ส่วนเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 นั้นมีการเจริญช้าโดยค่อยๆ เพิ่มจำนวนเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง เห็นได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งที่ค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 10.49 กรัมต่อลิตร ก่อนที่จะเริ่มคงที่ เชื้อมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 18.72 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 และค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงลดลงเท่ากับ 2.2 ในวันเดียวกัน แสดงดังภาพที่ 4.23

โดยในรายงานการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ก่อนหน้านี้ของ Wakisaka *et al.* (1998) ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์แบบเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.75 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร ที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 พบว่า ให้ผลการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 24 กรัมต่อลิตร และในรายงานของ Kwak and Rhee (1992a) ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 โดยการตรึงเส้นใยด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในสูตรอาหารที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และยังมีการเสริมแร่ธาตุเช่น แมงกานีสซัลเฟต ลงไป พบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดถึง 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.22 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 4.23 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ วรรณี สุวรรณเวช (2546) ยังได้ทำการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 เช่นเดียวกัน ในอาหารสูตรของ Kwak and Rhee แต่ใช้น้ำอ้อย 1 ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ได้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดจากการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เท่ากับ 24.32 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งสูงกว่าที่ได้จากการทดลองนี้เล็กน้อย อาจเนื่องมาจากสูตรอาหาร และสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 จากการทดลองในครั้งนี้มีความใกล้เคียงสอดคล้องกับรายงานการทดลองที่ผ่านมาคือ อยู่ในช่วงวันที่ 13-15 ของการเพาะเลี้ยง และจากผลการเปรียบเทียบจะเห็นได้ว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ที่คัดแยกได้จากลูกแป้งเหล้าสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดเท่ากับ 24.25 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดเท่ากับ 18.72 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อพิจารณาในส่วนของการเจริญ พบว่า เชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 มีการเจริญในอาหาร Starch medium ที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่า จากน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่วัดได้เท่ากับ 13.90 กรัมต่อลิตร มากกว่าเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 9.39 กรัมต่อลิตร และยังใช้ระยะเวลาในการผลิตกรดโคจิกเร็วกว่าเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 ถึง 5 วัน อาจเนื่องมาจากเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เป็นเชื้อราที่คัดแยกได้ในธรรมชาติจึงเจริญได้ดีโดยไม่ต้องอาศัยธาตุอาหารเสริมมากนัก เช่นเดียวกันกับรายงานการทดลองของ Rosfarizan *et al.* (1998a) ซึ่งทำการทดสอบการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ S33-2 ที่แยกได้จากดอกไม้ (morning glory flower) โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยง และสูตรอาหารแบบเดียวกับที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เชื้อสายพันธุ์ S33-2 สามารถเจริญได้ดีในการใช้แป้งหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ แป้งสาคู แป้งมันฝรั่ง และแป้งข้าวโพด โดยให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุด 19.20 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณเซลล์สูงสุดถึง 12.8 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แป้งข้าวโพด 75 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และผลการผลิตกรดโคจิกจากการใช้กลูโคส 50 กรัมต่อลิตรได้เท่ากับ 12.10 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.13 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญ และการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 กับเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

เชื้อรา	μ (ต่อชั่วโมง)	Q_p (กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน)	$Y_{p/x}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์)	$Y_{x/s}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{p/s}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล)	q_p (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ต่อวัน)
Aspergillus sp. BR1	0.064	3.031	1.826	0.134	0.222	0.457
Aspergillus oryzae NRRL484	0.043	1.337	1.794	0.104	0.174	0.256

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) อัตราการผลิตกรดโคจิก (Q_p) ผลได้ของกรดโคจิกจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) ผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาล ($Y_{p/s}$) และอัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะ (q_p) ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.13 โดยจากตารางจะเห็นได้ว่าเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 มีอัตราการเจริญต่ำกว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 อย่างเห็นได้ชัด โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 มีอัตราการเจริญเท่ากับ 0.064 ต่อชั่วโมง มีผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.134 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล และมีผลได้ของกรดโคจิกจากมวลเซลล์ และจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 1.826 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ และ 0.222 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ ส่งผลให้มีอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงถึง 3.031 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน และมีอัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะเท่ากับ 0.457 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ต่อวัน ในขณะที่เชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 มีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 1.337 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน น้อยกว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ถึง 2.3 เท่า เนื่องจากกรดโคจิกสูงสุดที่ได้มีปริมาณน้อย และใช้เวลาในการผลิตนาน นอกจากนี้เชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 ยังมีอัตราการเจริญเพียง 0.043 ต่อชั่วโมง และมีผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเพียง 0.174 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล แสดงว่าความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อนอกจากปัจจัยในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมแล้ว ยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อด้วย

ในการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าเป็นเชื้อที่สามารถเจริญ และผลิตกรดโคจิกในอาหารสูตร Starch medium ที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 โดยสามารถนำผลการทดลองที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อพัฒนาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ต่อไป

4.5 ผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบตช์

4.5.1 ผลการศึกษาความเร็วในการกวนที่เหมาะสม

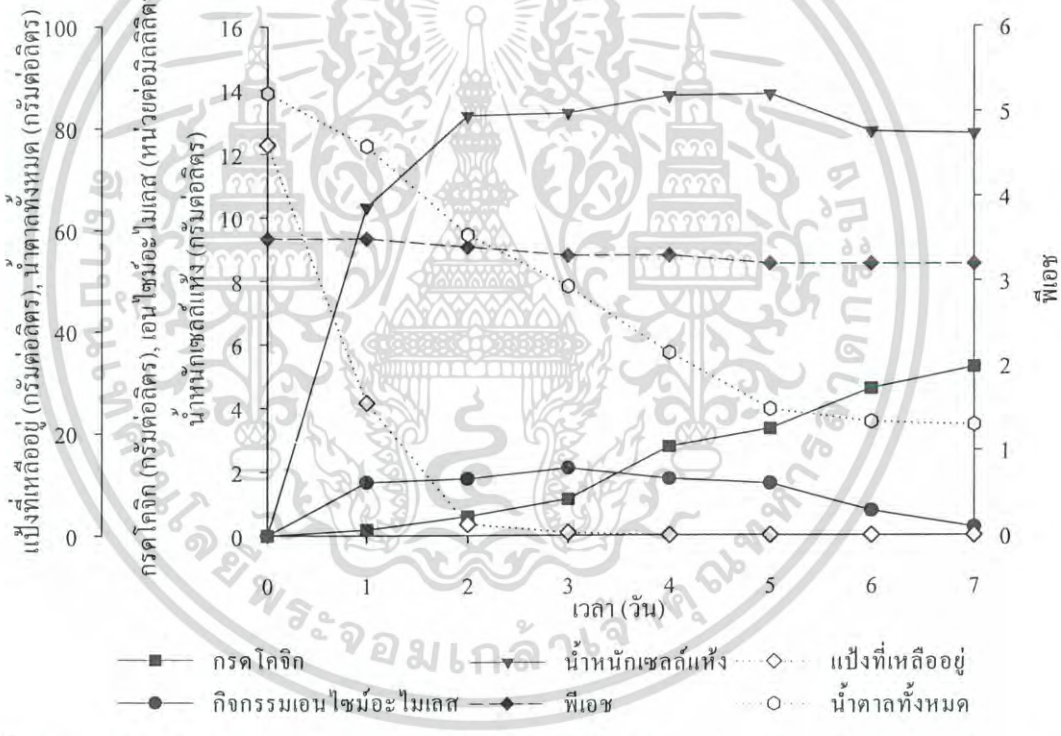
ผลจากการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วในการกวนที่ระดับต่างๆ กันคือ 300 400 และ 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศเท่ากันที่ 1.0 วีวีเอ็ม ให้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.24-4.26 ตามลำดับ

เมื่อใช้ความเร็วในการกวนที่ 300 รอบต่อนาที พบว่า จากระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วัน เชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 มีการเจริญเพิ่มจำนวนเข้าสู่ระยะคงที่อย่างรวดเร็วในวันที่ 2 และมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 2.11 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 3 แป้งเริ่มหมดในวันที่ 4 จากปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 76.82 กรัมต่อลิตร และมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5.28 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่วัดได้เท่ากับ 13.86 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่องจากวันแรก ส่วนค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงลดลงเล็กน้อย (ภาพที่ 4.24) และจากการใช้ความเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาทีพบว่า เชื้อมีการเจริญเพิ่มจำนวนเข้าสู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

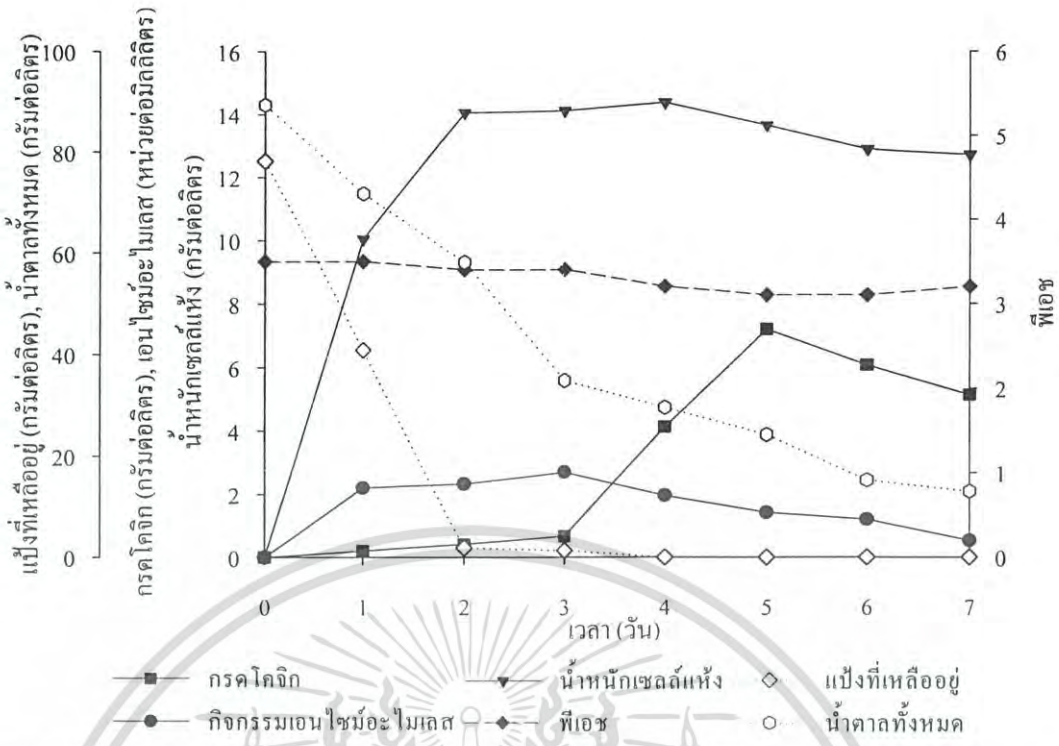
ระยะคงที่ในวันที่ 2 เช่นเดียวกัน และมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดในวันถัดมาเท่ากับ 2.69 หน่วยต่อมิลลิลิตร แป้งเริ่มหมดในวันที่ 4 จากปริมาณเริ่มต้น 78.18 กรัมต่อลิตร และวัดน้ำหนักเซลล์แห้งได้สูงสุดเท่ากับ 14.38 กรัมต่อลิตร การผลิตกรดโคจิกสูงสุดเกิดขึ้นในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.19 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงลดลงต่ำสุดเท่ากับ 3.1 จากพีเอชเริ่มต้น 3.5 (ภาพที่ 4.25)

ผลของการใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาทีพบว่า เชื้อมีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ตั้งแต่วันที่ 2 และมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 3.48 หน่วยต่อมิลลิลิตรในวันเดียวกัน จากนั้นในวันต่อมาปริมาณแป้งที่เหลือในอาหารก็เริ่มหมด เชื้อมีการเจริญได้ดีโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 15.48 กรัมต่อลิตร และมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 10.50 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการเปลี่ยนแปลงพีเอชมีค่าลดลงเท่ากับ 3.0 จากพีเอชเริ่มต้น 3.5 (ภาพที่ 4.26)

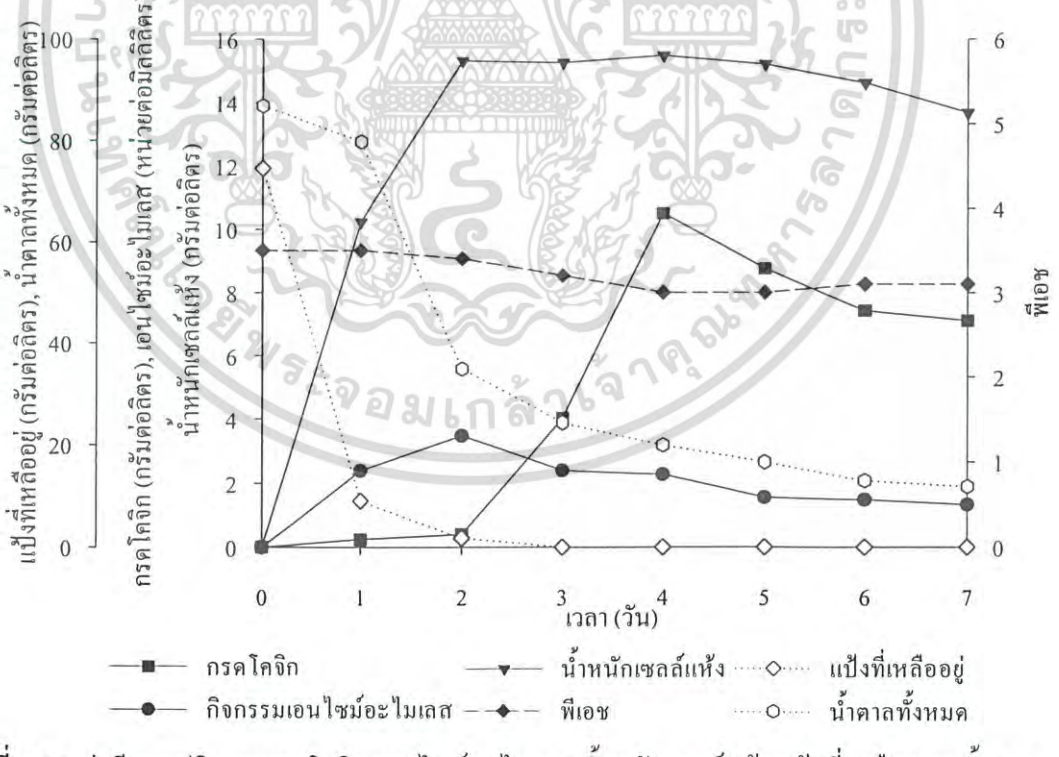


ภาพที่ 4.24 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และความเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.25 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และความเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที



ภาพที่ 4.26 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าการใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาทีให้ผลการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดคือ 10.50 กรัมต่อลิตร รองลงมาได้แก่ การใช้ความเร็ว 400 รอบต่อนาที และ 300 รอบต่อนาที ซึ่งให้ผลการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 7.19 กรัมต่อลิตร และ 5.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่า เมื่อเพิ่มความเร็วในการกวนให้สูงขึ้น เชื้อสามารถผลิตกรดโคจิกได้มากขึ้น อาจเนื่องมาจากการกวนด้วยความเร็วสูงจะช่วยให้อากาศกระจายตัวได้ดีในอาหารที่มีความหนืดจากแป้ง และเชื้อไม่เกาะกันเป็นก้อน ช่วยให้เชื้อมีการเจริญได้ดีขึ้นสังเกตได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อที่สูงถึง 15.48 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้เชื้อผลิตเอนไซม์อะไมเลส และกรดโคจิกได้มากขึ้นด้วย

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) อัตราการผลิตกรดโคจิก (Q_p) ผลได้ของกรดโคจิกจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) ผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาล ($Y_{p/s}$)และอัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะ (q_p) พบว่า การใช้ความเร็วในการกวนที่ระดับ 500 รอบต่อนาที ให้อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดคือ 2.625 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน เนื่องจากได้ปริมาณกรดโคจิกสูง และใช้เวลาในการผลิตน้อยกว่าการกวนในระดับอื่นโดยได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การใช้ความเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที มีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 และให้อัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 1.438 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน ส่วนการใช้ความเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที มีการผลิตกรดโคจิกช้ามากโดยมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 7 ทำให้มีอัตราการผลิตกรดโคจิกเพียง 0.754 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน ในขณะที่เชื้อมีอัตราการเจริญเท่ากัน อาจเนื่องมาจากการใช้ความเร็วการกวนในระดับต่ำจะทำให้ออกซิเจนละลายในอาหารได้น้อย และเชื้ออาจเกาะกันเป็นกลุ่มทำให้ได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอต่อการผลิตกรดโคจิก (ปราโมทย์ ศิริโรจน์. 2521) ซึ่งจะเห็นได้จากการมีผลได้ของกรดโคจิกจากมวลเซลล์เท่ากับ 0.418 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ และผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.081 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญ และการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และมีการแปรผันความเร็วในการกวนระดับต่างๆ กัน

ความเร็วในการกวน (รอบต่อนาที)	μ (ต่อชั่วโมง)	Q_p (กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน)	$Y_{p/x}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์)	$Y_{x/s}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{p/s}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล)	q_p (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ต่อวัน)
300	0.097	0.754	0.418	0.223	0.081	0.119
400	0.096	1.438	0.527	0.240	0.110	0.211
500	0.097	2.625	0.679	0.231	0.157	0.339

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และจากการเปรียบเทียบผลของความเร็วในการกวนทั้ง 3 ระดับทางสถิติ พบว่า ให้ผลการผลิตกรดโคจิกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังแสดงในตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และมีการแปรผันความเร็วในการกวนระดับต่างๆ กัน

ความเร็วในการกวน (รอบต่อนาที)	300	400	500
ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	5.28^{c}	7.19^{b}	10.50^{a}

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ99

ตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

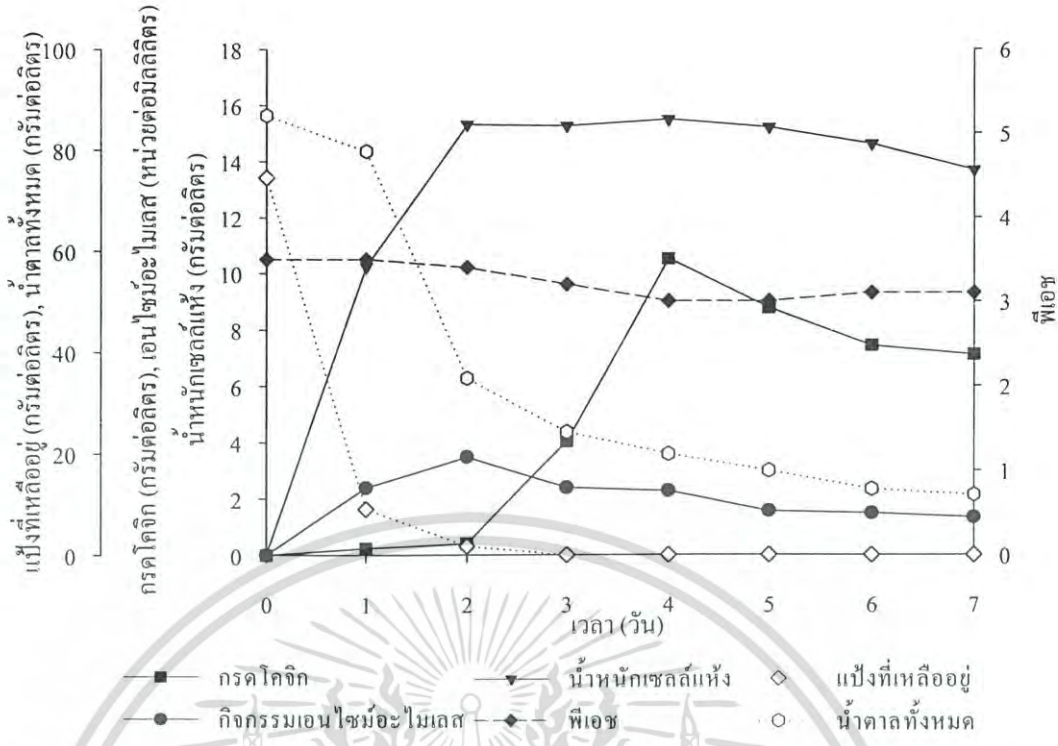
ดังนั้นความเร็วในการกวนที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อการผลิตกรดโคจิกคือ ความเร็ว 500 รอบต่อนาที สอดคล้องกับรายงานของสุกัญญา สายธิ (2541) ที่ได้ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากน้ำมะพร้าวโดยเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักแบบแบตช์ขนาด 2 ลิตร มีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม และแปรผันความเร็วในการกวน 300 500 และ 600 รอบต่อนาที พบว่าความเร็วในการกวนที่เหมาะสมคือ 500 รอบต่อนาที ซึ่งให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 29.98 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง

4.5.2 ผลการศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม

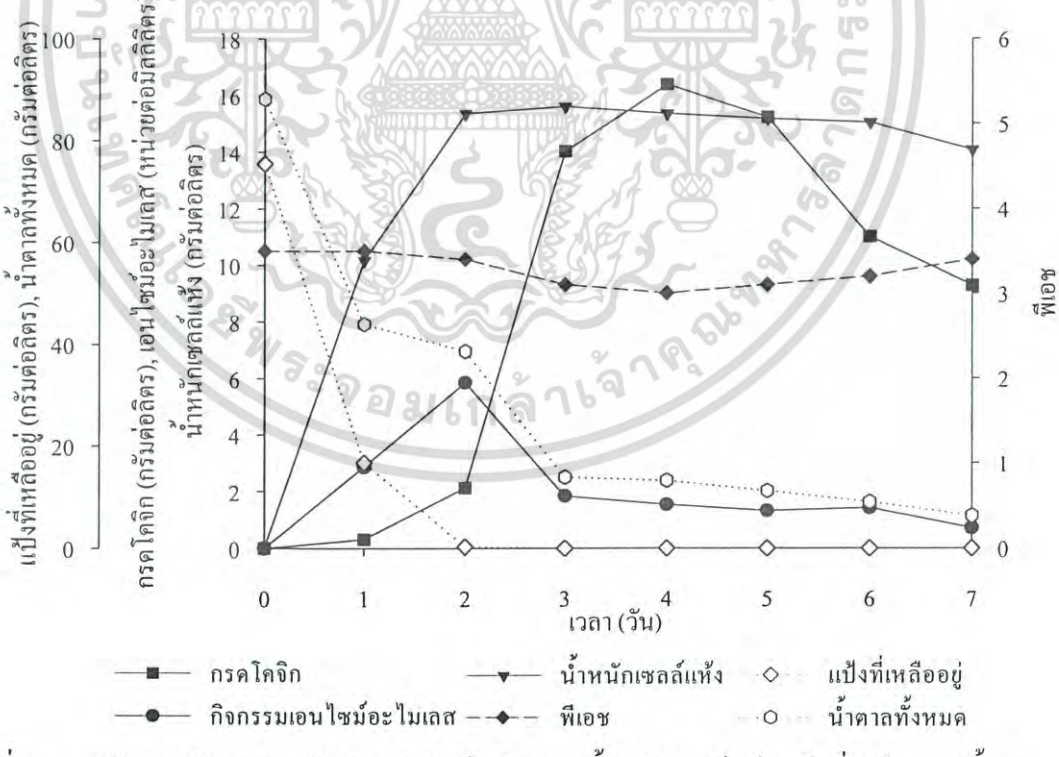
จากผลของความเร็วในการกวนที่เหมาะสมที่ได้คือ ความเร็วเท่ากับ 500 รอบต่อนาที นำมาใช้ในการศึกษาหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม โดยแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 1.0 1.5 และ 2.0 วีวีเอ็ม ตามลำดับ ให้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.27-4.29 โดยเมื่อให้อากาศในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 1.0 วีวีเอ็ม พบว่า เชื้อรามีการเจริญได้ดีโดยเริ่มมีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ตั้งแต่วันที่ 2 ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นสูงสุดอย่างรวดเร็วในวันเดียวกันเท่ากับ 3.48 หน่วยต่อมิลลิลิตร แป้งที่มีอยู่ในอาหารเริ่มหมดในวันที่ 3 จากปริมาณแป้งเริ่มต้น 74.55 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 10.50 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 15.48 กรัมต่อลิตร พีเอชมีการเปลี่ยนแปลงลดลงต่ำสุดเท่ากับ 3.0 จากพีเอชเริ่มต้น 3.5 (ภาพที่ 4.27)

สำหรับการใช้อัตราการให้อากาศที่ 1.5 วีวีเอ็ม พบว่า เชื้อมีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 2 มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดเท่ากับ 5.85 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดถึง 15.59 กรัมต่อลิตรในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณแป้งในอาหารจากปริมาณเริ่มต้น 75.45 กรัมต่อลิตร เริ่มหมดในวันเดียวกัน ส่วนการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเกิดขึ้นในวันที่ 4 โดยมีปริมาณเท่ากับ 16.36 กรัมต่อลิตร และพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงลดลงต่ำสุดเท่ากับ 3.0 (ภาพที่ 4.28)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



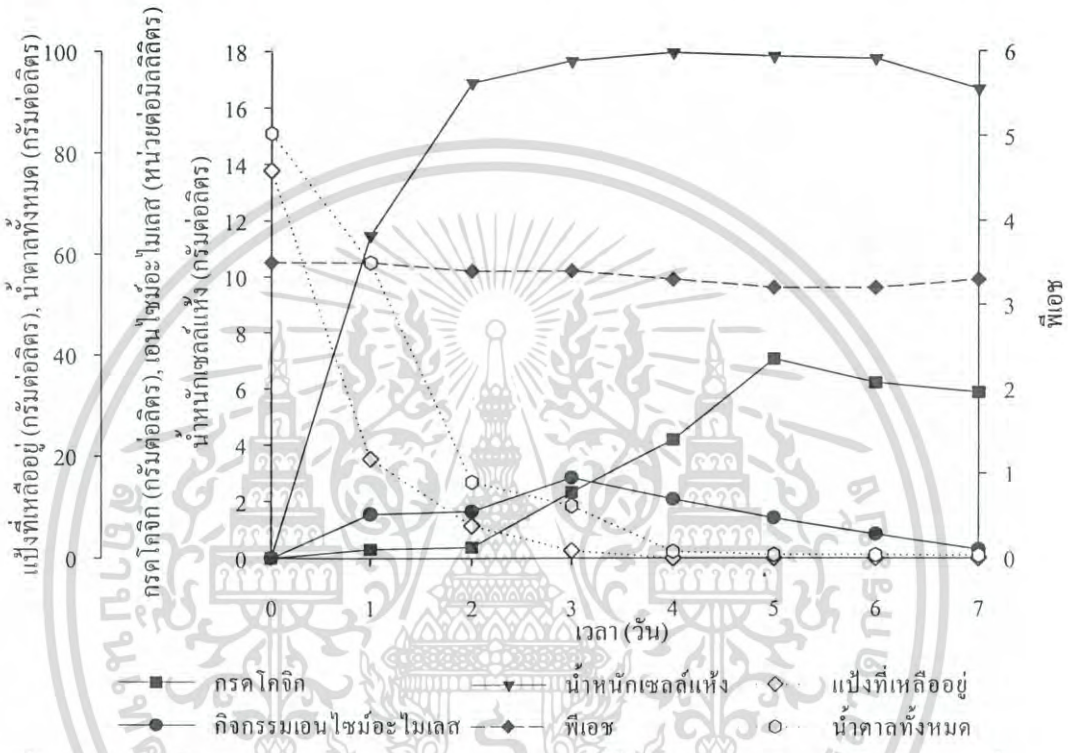
ภาพที่ 4.27 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม



ภาพที่ 4.28 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของการให้อากาศในอัตรา 2.0 วีวีเอ็มนั้น วันแรกเชื้อมีการเจริญเพิ่มจำนวนจนเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ในวันที่ 2 และมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดในวันที่ 3 เท่ากับ 2.84 หน่วยต่อมิลลิลิตร แป้งเริ่มหมดในวันที่ 4 จากปริมาณแป้งเริ่มต้น 76.55 กรัมต่อลิตร พร้อมกับที่เซลล์มีการเจริญสูงสุดโดยวัดน้ำหนักเซลล์แห้งได้เท่ากับ 17.94 กรัมต่อลิตร และมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.06 กรัมต่อลิตร มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชลดลงเท่ากับ 3.2 จากค่าพีเอชเริ่มต้น 3.5 ในวันที่มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด (ภาพที่ 4.29)



ภาพที่ 4.29 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม

ตารางที่ 4.16 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญ และการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีการแปรผันอัตราการให้อากาศในระดับต่างๆ กัน

อัตราการให้อากาศ (วีวีเอ็ม)	μ (ต่อชั่วโมง)	Q_p (กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน)	$Y_{p/x}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์)	$Y_{x/s}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{p/s}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล)	q_p (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ต่อวัน)
1.0	0.097	2.625	0.679	0.231	0.157	0.339
1.5	0.097	4.091	1.067	0.210	0.218	0.533
2.0	0.102	1.412	0.397	0.234	0.095	0.159

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนผลการคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) อัตราการผลิตกรดโคจิก (Q_p) ผลได้ของกรดโคจิกจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) ผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) ผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาล ($Y_{p/s}$)และอัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะ (q_p) ให้ผลแสดงดังตารางที่ 4.16 และจากตารางจะเห็นได้ว่า ที่อัตราการให้อากาศในระดับ 1.5 วีวีเอ็ม กับ 1.0 วีวีเอ็มนั้น เชื้อมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากันคือ 0.097 ต่อชั่วโมง และมีผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาลใกล้เคียงกัน แต่ที่อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็มนั้น เชื้อสามารถผลิตกรดโคจิกได้มีประสิทธิภาพกว่า โดยมีผลได้ของกรดโคจิกจากมวลเซลล์ และผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลสูงกว่า ส่งผลให้เชื้อมีอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 4.091 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน มากกว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.0 ถึง 1.6 เท่า แสดงให้เห็นว่าในขณะที่เซลล์มีการเจริญ และมีปริมาณเซลล์ใกล้เคียงกัน แต่การให้อากาศที่มากขึ้นจากเดิมส่งผลให้เชื้อมีการเจริญได้เร็วขึ้น เนื่องจากเชื้อราต้องการออกซิเจนในการเจริญ และมีการใช้แหล่งอาหารได้มากขึ้นด้วย ส่วนการใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.0 วีวีเอ็มให้ปริมาณการผลิตกรดโคจิกน้อยที่สุด อาจเนื่องมาจากการที่เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ทำให้อากาศกระจายตัวได้น้อยลง เพราะมีปริมาณเซลล์ในถังหมักมากเกินไป โดยวัดน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดได้ถึง 17.94 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้มีการผลิตกรดโคจิกลดลง สอดคล้องกับรายงานของ Ariff *et al.* (1996) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* Link 44-1 เพื่อการผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบตช์ขนาด 2 ลิตร โดยใช้อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 3.5 ในอาหาร Starch medium ที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมีการควบคุมอัตราการให้อากาศระหว่างที่เซลล์เจริญเพิ่มจำนวนเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และระหว่างที่เซลล์มีการเจริญคงที่เท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 28.90 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าที่ได้ในการทดลองครั้งนี้ เนื่องจากความแตกต่างของแหล่งคาร์บอน และสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้ นอกจากนี้ ยังมีรายงานของ Rosfarizan *et al.* (2002) ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* Link 44-1 ในถังหมักขนาด 8 ลิตร โดยใช้อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีแป้งสาคู 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า ในการหมักแบบแบตช์ (batch fermentation) มีการลดลงของปริมาณออกซิเจนจากอัตราเริ่มต้น 80 เปอร์เซ็นต์เป็น 0 เปอร์เซ็นต์ หลังทำการหมักเป็นเวลา 2 วัน เป็นผลให้เชื้อมีการผลิตกรดโคจิกลดลง โดยมีปริมาณสูงสุดเพียง 4.51 กรัมต่อลิตร หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน แต่มีปริมาณเซลล์สูงสุดถึง 16.30 กรัมต่อลิตร เนื่องมาจากอาหารมีความหนืดสูง และมีการกวนผสมที่ไม่ดีในระหว่างช่วงต้นของการหมักทำให้มีอัตราการถ่ายเทออกซิเจนต่ำ เป็นผลให้ระดับออกซิเจนลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วนในการหมักแบบกึ่งแบตช์ (fed-batch fermentation) ที่มีการเติมแป้งสาคู 140 กรัมต่อลิตรลงไปในวันที่ 2 ของการหมัก พบว่าเชื้อมีการเจริญเหมือนในการหมักแบบแบตช์ แต่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงขึ้นเล็กน้อย ส่งผลให้เชื้อนำน้ำตาลไปใช้ในการผลิตกรดโคจิกได้มากกว่าเดิม ทำให้ได้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 16.43 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อลิตร โดยจะมีปริมาณออกซิเจนลดลงอยู่ในระดับ 40-50 เปอร์เซ็นต์ในช่วงที่เชื้อมีการเจริญ และลดลงเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ใกล้เคียงกับผลการทดลองที่ได้ในการศึกษานี้

เมื่อพิจารณาผลการทดลองทั้งหมดที่ได้พบว่า ที่การใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 วีวีเอ็ม ให้ผลการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดเท่ากับ 16.36 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือ อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดโคจิก 10.50 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 และอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็มซึ่งให้ปริมาณกรดโคจิกเพียง 7.06 กรัมต่อลิตรในวันที่ 5 ตามลำดับ โดยผลการผลิตกรดโคจิกที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ตารางที่ 4.17)

ตารางที่ 4.17 การเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่ใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาทีและมีการแปรผันอัตราการให้อากาศในระดับต่างๆ กัน

อัตราการให้อากาศ (วีวีเอ็ม)	1.0	1.5	2.0
ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	10.50^{b}	16.36^{a}	7.06^{c}

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99
ตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99

ดังนั้นจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหาร Starch medium ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในถังหมักขนาด 5 ลิตรพบว่า การใช้ความเร็วในการกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ให้ผลการผลิตกรดโคจิกดีที่สุด

4.6 ผลการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA (ELISA test kit)

ผลการนำตัวอย่างน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในระหว่างที่เชื้อมีการเจริญเติบโต และมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด ไปทำการตรวจหาสารพิษอะฟลาทอกซินด้วยวิธี ELISA ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ทาง Immunoassay ที่สามารถตรวจจับสารอะฟลาทอกซินได้ต่ำสุดถึง 0.4 พีพีบี โดยสำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร กรมวิชาการเกษตร

จากรายงานผลการวิเคราะห์ พบว่า ในตัวอย่างน้ำหมักมีสารอะฟลาทอกซินเท่ากับ 17.50 พีพีบี (ภาคผนวก ง) ต่ำกว่ามาตรฐานตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) ที่ได้กำหนดไว้ว่า ต้องมีสารอะฟลาทอกซินอยู่ในอาหาร และผลิตภัณฑ์ไม่เกิน 20 พีพีบี สอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Parrish *et al.* (1966) ที่ได้ทำการศึกษาการผลิตสารอะฟลาทอกซิน และกรดโคจิกจากเชื้อราสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* ได้แก่ *A. clavatus A. effuses A. flavus A. fumigatus A. nidulans A. oryzae A. parasiticus A. tamarii A. ustus P. citrinum P. griseofulvum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

P. purpruogenum และ *P. rubrum* พบว่า เชื้อราทั้งหมดผลิตกรดโคจิกได้ และไม่มีสายพันธุ์ใดที่ผลิตสารอะฟลาทอกซินเลย จึงสรุปว่า ทุกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกได้ไม่จำเป็นต้องผลิตอะฟลาทอกซินได้ทั้งหมด และรายงานของ Bassapa *et al.* (1970) ซึ่งพบว่า การสังเคราะห์กรดโคจิก และสารอะฟลาทอกซินมีวิถีการสังเคราะห์แยกออกจากกัน และกรดโคจิกไม่เป็นสารตัวกลางที่เกิดขึ้นในระหว่างการสังเคราะห์สารอะฟลาทอกซิน จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยใช้ดี-ไซโลส (D-xylose) และเอทานอล (ethanol) เป็นแหล่งคาร์บอน รวมถึง Lin *et al.* (1976) ที่ได้ศึกษาค่าพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิก และสารอะฟลาทอกซินของเชื้อ *Aspergillus parasiticus* UBNF A12 พบว่า ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และ 6.2 เชื้อสามารถผลิตกรดโคจิกได้ในปริมาณสูง ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 และ 4.5 ผลิตสารอะฟลาทอกซินได้ปริมาณสูง และค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.1 ผลิตสารอะฟลาทอกซินได้น้อยลง ส่วนค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.8 หรือสูงกว่า 6.8 ไม่พบการผลิตสารอะฟลาทอกซินเลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหาร Starch medium พบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด (yeast extract) 2.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) 2.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5 กรัมต่อลิตร และพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราในฟลาสก์แบบเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ให้ปริมาณการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 11.62 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.078 ต่อชั่วโมง มีอัตราการผลิตกรดโคจิก (Q_p) เท่ากับ 3.873 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน มีผลได้ของกรดโคจิกจากมวลเซลล์ ($Y_{p/x}$) เท่ากับ 0.850 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ ผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ($Y_{x/s}$) เท่ากับ 0.252 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.214 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล และมีอัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะ(q_p) เท่ากับ 0.566 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ต่อวัน

ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกระหว่างเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 กับ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในอาหาร Starch medium ที่มีกลูโคส100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 วัน พบว่า เชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ให้ปริมาณการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 24.25 กรัมต่อลิตรในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง และมีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 3.031 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน โดยมากกว่าเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 ซึ่งผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 18.72 กรัมต่อลิตรในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง และมีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 1.337 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ที่แยกได้ในธรรมชาติจากลูกแป้งเหล้าสามารถเจริญ และผลิตกรดโคจิกได้ดีกว่าเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการหมักแบบแบตช์ (batch fermentation) ในถังหมักแบบใบพัดกวน ขนาด 5 ลิตร โดยทำการแปรผันความเร็วในการกวนที่ระดับ 300 400 และ 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 1.5 และ 2.0 วีวีเอ็ม จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันพบว่า การใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 16.36 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เชื้อมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.097 ต่อชั่วโมง มีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 4.091 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน และมีอัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะเท่ากับ 0.533 กรัมกรดโคจิกต่อกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ต่อวัน ผลได้ของกรดโคจิกจากมวลเซลล์มีค่าเท่ากับ 1.067 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ มีผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล และผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.210 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล และ 0.218 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ และมีรายงานผลการวิเคราะห์สารอะฟลาทอกซินในน้ำหมักเท่ากับ 17.50 พีพีบี ซึ่งมีค่าอยู่ในเกณฑ์ต่ำกว่ามาตรฐานที่กระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดไว้

จากการศึกษาทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าของจังหวัดบุรีรัมย์นั้น สามารถเจริญ และผลิตกรดโคจิกจากการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนได้เป็นอย่างดี และยังไม่มีการเกิดสารพิษอะฟลาทอกซินในระดับที่เป็นอันตราย ทั้งนี้หากมีการพัฒนากระบวนการผลิต หรือการปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น จะช่วยลดต้นทุนและระยะเวลาในการผลิตกรดโคจิกในระดับอุตสาหกรรมได้ดียิ่งขึ้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กล้าณรงค์ ศรีรอต และจุนทนี จิตต์รำพึง. 2540. "พจนานุกรม FOOD ADDITIVES." **วารสารจาร์พา.** ปีที่ 4 ฉบับที่ 33 :57-59.

กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2546. **เทคโนโลยีของแป้ง.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

คึกฤทธิ์ ศิลาลาย. 2547. "การศึกษาคุณลักษณะบางประการของเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. จากลูกแป้งเหล้า." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ฐิติมา ศรีสกุณี. 2543. "การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *Aspergillus oryzae* TISTR3086 เพื่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารแป้ง." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ดวงพร คันธโชติ. 2530. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ปราโมทย์ ศิริโรจน์. 2521. "การคัดเลือกสายพันธุ์และการเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่มีโปรตีนสูงในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปอาหารถั่วเหลือง." ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรรณี สุวรรณเวช. 2546. "การผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus* NRRL 484 จากน้ำอ้อย." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุกัญญา สายธิ. 2541. "การผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus* NRRL 484 จากน้ำมะพร้าว." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สมใจ ศิริโภค. 2537. **เทคโนโลยีการหมัก.** กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

Ansari, A.A., and A.K. shrivastava. 1991. "High performance liquid chromatographic analysis of norsolorinic acid produced by *Aspergillus parasiticus* mutant." **Biol. Sci.** 57 : 403-405.

Ariff, A.B., and C. Webb. 1998. "Effect of initial carbon and nitrogen sources concentrations on growth of *Aspergillus awamori* and glucoamylase production." **Asia. Pac. J. Mol. Biol. Biotecnol.** 6 : 161-169.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

Bajpai, P., P.K. Agrawala, and L. Vishwanathan. 1982. "Kojic acid : synthesis and properties." **J. Sci. Ind. Res.** 41 : 185 – 194.

Bassapa, S.C., V. Screenivasamurthy, and H.A.B. Parpia. 1970. "Aflatoxin and kojic acid production by resting cells of *Aspergillus oryzae* Link." **J. Gen. Microbiol.** 61 : 81 – 86.

Bentley, R. 1957. "Preparation and analysis of kojic acid." **Method Enzymol.** 3 :238 – 241.

Bernfeld, P. 1955. **Amylase α and β Method in Enzymology.** New York : Academic Press, Inc.

Blanc, D.T., and H.A. Akers. 1989. "Maltol and ethyl maltol from larch tree to successful food additive." **Food Technol.** 26 : 78 – 84.

Budavari, S., M.J. O'Neil, A. Smith, and P.E. Helkelman. (Eds.). 1989. **The Merck Index.** 11th ed. Merck & Co., Inc., Rahway, NJ.

Burdock, G.A., G.S. Madhusudan, and G.C. Ioana. 2001. "Evaluation of health aspect of kojic acid in food." **Reg. Toxicol. Pharmacol.** 33 : 80-101.

Challenger, F., L. Klein, and T.K. Walker. 1929. "The production of kojic acid from pentose by *Aspergillus oryzae*." **J. Chem. Soc.** 26 : 1498 – 1505.

Chen, J.S., C. Wei, and M.R. Marshall. 1991. "Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase." **J. Agric. Food Chem.** 39(11) : 1897 – 1901.

Coupland, K., and W.G. Niehaus. 1987. "Effect of nitrogen supply, Zn^{2+} and salt concentration on kojic acid and versicolorin biosynthesis by *Aspergillus parasiticus*". **Exp. Mycol.** 11 : 206-213.

Davis, D. 1962. "Growth and kojic acid production by *Aspergillus flavus* growing on peanut oil." **Eco. Bot.** 17. 263-269.

Dubois, M. 1956. "Colorimetric method for determination of sugars and related substances." **Anal. Chem.** 31 : 350-356.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

El-Khadem, M., M.S. Tewfix, and Y.A. Hamdi. 1976. "The stimulatory effect of kojic acid on the production of aflatoxin by isolates of *Aspergillus flavus* Link." **Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infekt. Hyg**. 2 131 : 497-500.

El-Sharkawy, S.H. 1995. "Kojic acid production from cocoa juice by *Aspergillus flavus* entrapped in calcium alginate." **Bull. Chim. Farm**. 134 : 316-319.

Futamura, T., M. Okabe, T. Tamura, K. Toda, T. Matsunobu, and Y.S. Park. 2001a. "Improvement of production of kojic acid by a mutant strain *Aspergillus oryzae* MK107 – 39." **J. Biosci. Bioeng.** 91 : 272 – 276.

Futamura, T., M. Okabe, T. Tamura, K. Toda, T. Matsunobu, and Y.S. Park. 2001b. "Kojic acid production in an airlift bioreactor using partially hydrolyzed raw corn starch." **J. Biosci. Bioeng.** 92 : 360 – 365.

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

Kandem, L., and G. Percefois. 1980. "Conditions for the production of aflatoxins and kojic acid by *Aspergillus* and *Penicillium* strains isolated from human skin layers." **Bull. Acad. Soc. Lorraines Sci.** 19 : 11-19.

Kayahara, H., N. Shibata, K. Tadasa, H. Maeda, T. Kotani, and I. Ichimoto. 1990. "Amino acid and peptide derivatives of kojic acid and their antifungal properties." **Agric. Biol. Chem.** 54(9) : 2441 – 2442.

Kharchenko, S.N. 1999. "The biosynthesis of kojic acid by *Aspergillus flavus* Link stains isolated from feed." **Mikrobiol. Zh. (Ukrainian)**. 61 : 15-21.

Kharchenko, S.N., and A.I. Yatsyshin. 1984. "Species of the genus *Aspergillus Mich.* producing kojic acid on mixed feeds and the role of this mycogoxin in animal pathology." **Mikrobiol. Zh.** 46 : 41-47.

Kharchenko, S.N., A.I. Yatsyshin, E.M. Tea, N.K. Potoskii, and O.I. Pavlenko. 1993. "The species composition of the micromycetes in feed and their role in animal kojic acid toxicosis." **Microbial. Zh. (Ukraine).** 55 : 78-84.

Kharchenko, S.N., A.I. Yatsyshin, and L. Magdenko. 1986. "Koetoxicosis (kojic acid poisoning) in poultry." **Veterinariya (Moscow).** 9 : 70-73.

Kitada, M., H. Ueyama, E. Sazuki, and T. Fukumbara. 1967. "Studies on kojic acid fermentation. I. cultural condition in submerged culture." **J. Ferment. Technol.** 45 : 1101-1107.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kwak, M.Y., and J.S. Rhee. 1992a. "Controlled mycelial growth for kojic acid production using Ca – alginate imobilized fungal cells." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36 : 578 – 583.

Kwak, M.Y., and J.S. Rhee. 1992b. "Cultivation characteristics of immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production." **Biotechnol. Bioeng**. 39 : 903-906.

Lee, L.S., F.W. Parrish, and T.J. Jacks. 1986. "Substrate depletion during formation of aflatoxin and kojic acid on corn inoculated with *Aspergillus flavus*." **Mycopathologia**. 93 : 105-107.

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

Lodder, J. 1970. **The Yeasts, A Taxonomic study**. North-Holland Publishing Co., Amsterdam and London. 156-157.

L'vova, L.S., Z.K. Bystryakova, E.M. Merkulov, T.I. Shatilova, and O.E. Kizlenko. 1984. "Study of the possibility of contamination of rice grain by mycotoxins under moderate climatic conditions." **Vopr. Pian**. 1 : 64-68.

Lyon, W.E. 1974. "A green cassava mite recently found in Africa." **FAQ Plant Protection Bulletin**. 22(1) :11-13.

Manabe, M., T. Goto, K. Tanaka, and S. Matsuura. 1981. "The capabilities of the *Aspergillus flavus* group to produce aflatoxins and kojic acid." **Rep. Natl. Food Res. Inst**. 38 : 115-120.

Manabe, M., K. Tanaka, T. Goto, and S. Matsuura. 1984a. "Producing capability of kojic acid and aflatoxin by koji mould." 4-14. **In Toxigenic Fungi—Their toxins and Health Hazard**. Amsterdam : Elsevier.

Manabe, M., K. Tanaka, T. Goto, and S. Matsura. 1984b. "Producing capability of kojic acid and aflatoxin by koji mould." **Dev. Food Sci.** 7 : 4-14.

Maurer, K. 1930. "Formation of kojic acid." **Ber. Dt. Chem. Ges**. 63 : 25.

May, O.E., H.T. Herrick, A.J. Moyer, and P.A. Wells. 1931. "The production of kojic acid by *Aspergillus flavus*." **J. Am. Chem. Soc**. 53 : 774–782.

Minami, K. 1994. "Clinical effect of a kojic acid containing cream on hyperpigmentation of the skin." **Skin Res.** 36(5) : 707-709.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Moubasher, A.H., M.I.A. Abdel-Daker, and I.A. El-Dady. 1979. "Toxigenic fungi isolated from roquefort cheese." **Mycopathologia**. 66 : 187-190.

Moubasher, A.H., I.A. El-Kady, and A. Shoriet. 1977. "Toxigenic *Aspergilli* isolated from different sources in Egypt." **Ann. Nutr. Aliment.** 31 : 607-615.

Nakagawa, M. and K. Kawai. 1995. "Contact allergy to kojic acid in skin care products." **Skin Res.** 32 (1) : 9-13.

Niwa, Y. and H. Akamatsu. 1991. "Kojic acid scavenges free radicals while potentiating leukocyte functions including free radical generation." **Inflammation**. 15 : 303-315.

Ogawa, A., Y. Wakisaka, T. Tanaka, T. Sakiyama, and K. Nakanishi. 1995. "Production of kojic acid by membrane – surface liquid culture of *Aspergillus oryzae* NRRL 484." **J. Ferment. Bioeng.** 80(1) : 41–45.

Ohyama, Y., and Y. Mishima. 1990. "Melanosis – inhibitory effect of kojic acid and its action mechanism." **J. Fragrance.** 6 : 53-58.

Parrish, F.W., B.J. Wiley, E.G. Simmons, and L.J. Long. 1966. "Production of aflatoxins and kojic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillium*." **Appl. Microbiol**. 14 :139-141.

Pratima, B., P.K. Agrawal, and L. Vishwanathan. 1982. "Production of kojic acid by resuspended mycelia of *Aspergillus flavus*." **Can. J. Microbiol.** 28 : 1340-1346.

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

Rosfarizan, M., A.B. Ariff, M.A. Hassan, M.I.A. Karim, H. Shimizu, and S. Shioya. 2002. "Importance of carbon source feeding and pH control strategies for maximum kojic acid production from sago starch by *Aspergillus flavus*." **J. Biosci. Bioeng.** 94(2) : 99-105.

Rosfarizan, M., S. Madihah, and A.B. Ariff. 1998a. "Isolation of a kojic acid-producting fungus capable of using starch as a carbon source." **Lett. Appl. Microbiol.** 26 : 27-30.

Rosfarizan, M., A.B. Ariff, M.A. Hassan, and M.I. Karim 1998b. "Kojic acid production by *Aspergillus flavus* using gelatinized and hydrolyzed sago starch as a carbon source." **Fol. Microbiol. (Phara).** 43 : 459-464.

Saito, K. 1907. "Über die Säurebinding von *Aspergillus oryzae*." **Bot. Mag**. 21 : 7-11.

Schoonhoven, A. Van. 1974. "Resistance to thrips damage in cassava." **J. Eco. Entomol.** 67(6) : 428-430 .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Scott, P.M. 1978. "Mycotoxins in feeds and ingredients and their origin." **J. Food Prot.** 41 : 385-398.

Stanbury, P.F., A. Whitaker, and S.J. Hall. 1995. **Principle of fermentation technology.** Oxford : Elsevien Science.

Tadera, K., F. Yahi, and A. Kobayashi. 1985. "Effects of cycasin on kojic acid producing moulds." **Agric. Biol. Chem.** 49 (1) : 203-205.

Torrey, G.S., and E.H. Marth. 1977. "Isolation and toxicity of moulds from foods stored in homes." **J. Food Prot.** 40 : 187-190.

Wakisaka, Y., T. Segawa, K. Imamura, T. Sakiyama, and K. Nakanishi. 1998. "Development of a cylindrical apparatus for membrane-surface liquid culture and production of kojic acid using *Aspergillus oryzae* NRRL 484." **J. Ferment. Bioeng.** 85 (5) : 488-497.

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

Yabuta, T. 1913. "Kojic acid new organic acid formed by *Aspergillus oryzae.*" **Chem. Abstr.** 7 : 2191-2192.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร PDA (Potato Dextrose Agar)

มันฝรั่ง (potato)	200 กรัม
เด็กซ์โทรส (dextrose)	20 กรัม
วุ้น (agar)	15 กรัม

หั่นมันฝรั่งเป็นก้อนขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่นจนก้อนมันฝรั่งเริ่มนิ่ม จากนั้นกรองเอาแต่น้ำใสเติมน้ำตาลเด็กซ์โทรส และวุ้นละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

2. อาหาร Starch medium สูตรของ Rosfarizan *et al.* (1998)

ยีสต์สกัด (yeast extract)	5 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5 กรัม
แป้ง (soluble starch)	50 กรัม

เตรียมส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนโดยให้แป้งสุกทั่วก่อนทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หากเตรียมเป็นอาหารแข็งให้เติมวุ้น (agar) ลงไป 20 กรัมต่อลิตร ละลายให้เข้ากันก่อนทำการนึ่งฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. ซิเตรท-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (citrate-phosphate buffer) พีเอช 5.0

A : กรดซิตริก (citric acid) 0.1 โมลาร์

(ละลายกรดซิตริก 21.01 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

B : ไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (dibasic sodium phosphate) 0.2 โมลาร์

(ละลาย $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ผสมสารละลาย A 24.3 มิลลิลิตรกับสารละลาย B 25.7 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 1 %

ชั่งเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 1 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 นอร์มอล และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. สารละลายไดไนโตรซาลิไซลิค (dinitrosalicylic acid solution, DNS)

ชั่งกรดไดไนโตรซาลิไซลิค (3,5-dinitrosalicylic acid) 1 กรัม ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2 นอร์มอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium-tatrate) 300 กรัม ละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา (Bernfeld. 1955)

4. สารละลายไอโอดีน

ชั่งไอโอดีน 1 กรัม และโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา (Lodder. 1970)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กรดโคจิกตามวิธีของ Bentley (1957)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและเหมาะสม โดยการใช้สารละลายเฟอริกคลอไรด์ทำปฏิกิริยากับสารประกอบแอลฟาไฮดรอกซิล (∝-hydroxyl) และสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ในกรดโคจิกให้สารละลายสีแดงเกิดขึ้น

สารเคมี

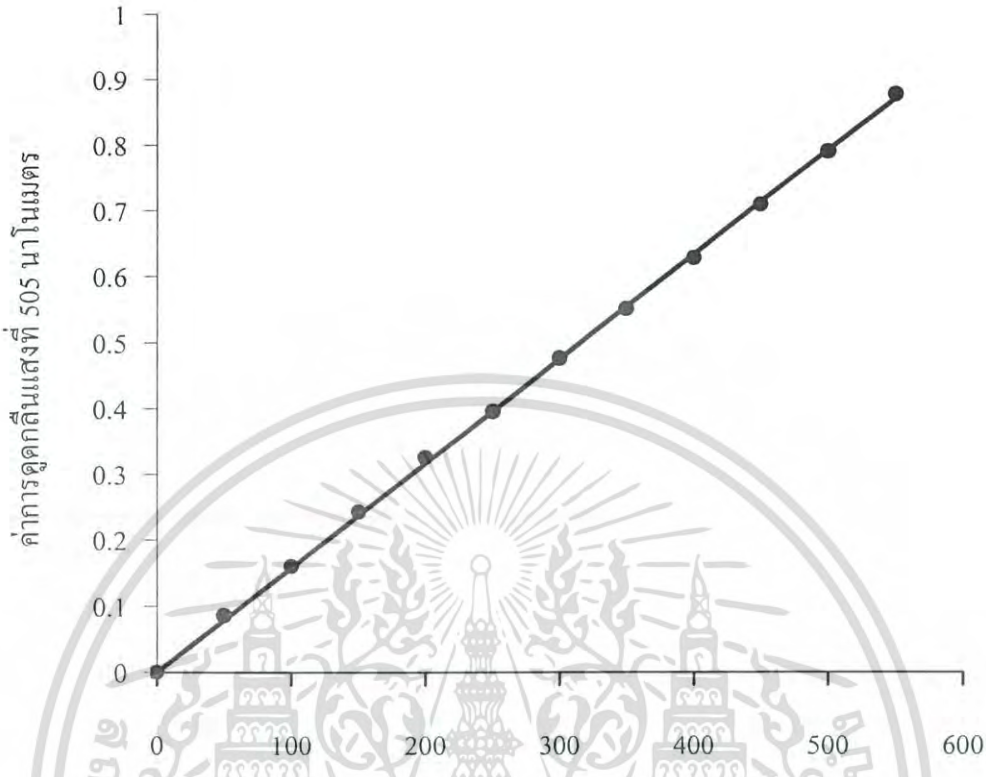
1. สารละลายเฟอริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข2)
2. สารละลายกรดโคจิกมาตรฐานของ Sigma

วิธีการ

1. ดูดสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ทำแบลงค์ (blank) ควบคู่กันไปด้วยโดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างเป็นตัวเปรียบเทียบ
2. เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ที่เตรียมไว้ลงไป 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer)
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับแบลงค์ ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร
4. ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกรดโคจิกมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 50 100 150 200 250 300 350 400 450 500 และ 550 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1-3 นำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดโคจิก ดังแสดงในภาพที่ ค.1
5. นำค่าการดูดกลืนแสง (A_{505}) ที่วัดได้จากตัวอย่างมาคำนวณหาปริมาณกรดโคจิกจากสูตร

$$\text{ปริมาณกรดโคจิก} = \frac{A_{505} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ค.1 กราฟมาตรฐานกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสตามวิธีของ Bernfeld (1955)

สารเคมี

1. สารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ (1% soluble starch)
2. สารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) (ภาคผนวก ข.3)
3. ซิเตรท-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 (ภาคผนวก ข.1)
4. สารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส

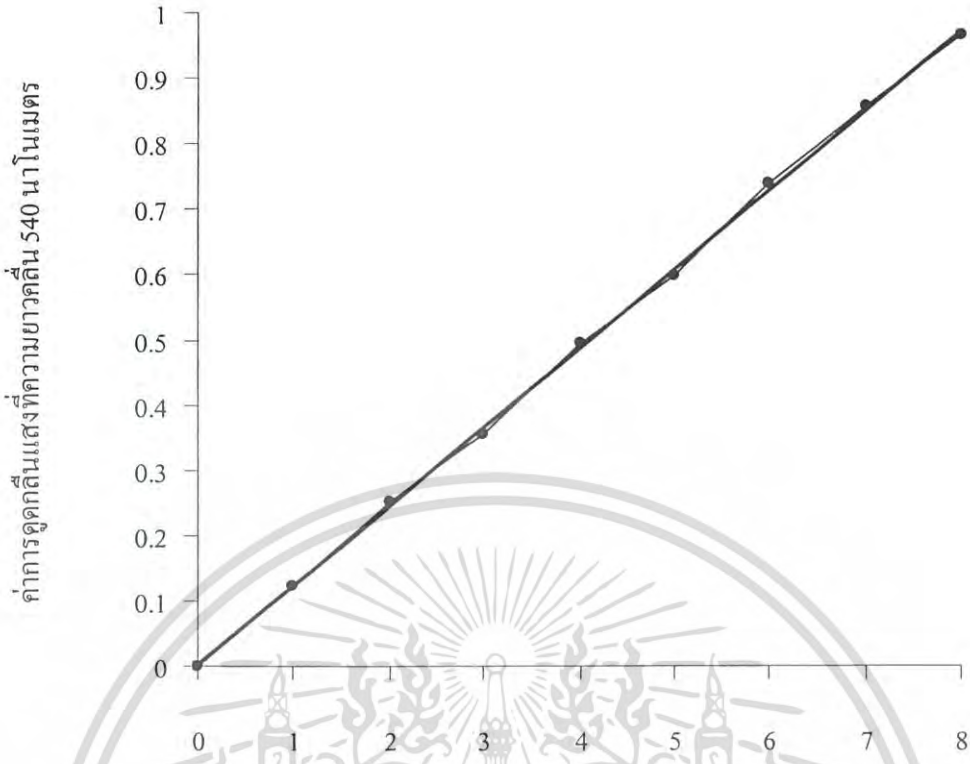
วิธีการ

1. ใส่สารตัวอย่าง (ที่ความเจือจางที่เหมาะสม) 1 มิลลิลิตร และซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
2. ทำหลอดควบคุม (control) โดยทำเช่นเดียวกัน แต่นำสารละลายตัวอย่างต้ม 5 นาทีก่อนใส่น้ำแป้งและบัฟเฟอร์ ทำแบลงค์ (blank) โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง
3. เติมน้ำแป้งอุ่น 50 องศาเซลเซียสลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที นำไปบ่มต่อในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที
5. นำสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย DNS มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำหลอดไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
7. ทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส โดยใช้สารละลายน้ำตาลมอลโตสที่ความเข้มข้น 0 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการในข้อ 4-5 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (A_{540}) และความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส ดังแสดงในภาพที่ ค.2
8. คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส} = \frac{A_{540} \times \text{ปริมาตรทั้งหมด} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลา}} \quad \begin{matrix}\text{หน่วย (unit)} \\ \text{ต่อมิลลิลิตร}\end{matrix}$$

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยแป้ง และให้น้ำตาลรีดิวซ์ (เทียบเท่าน้ำตาลมอลโตส) 1 ไมโครโมลภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ค.2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (phenol-sulfuric acid) ตามวิธีของ Dubois *et al.* (1956)

วิธีการนี้เป็นการใช้กรดเข้มข้นย่อยให้พอลิแซคคาไรด์เป็นโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งสามารถวัดน้ำตาลได้ประมาณ 1- 100 ไมโครกรัม และเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอย่างไม่เฉพาะเจาะจงเพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์หรือ neutral sugar ทั้งชนิดที่เป็นโมโนแซคคาไรด์ และพอลิแซคคาไรด์ สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีนี้

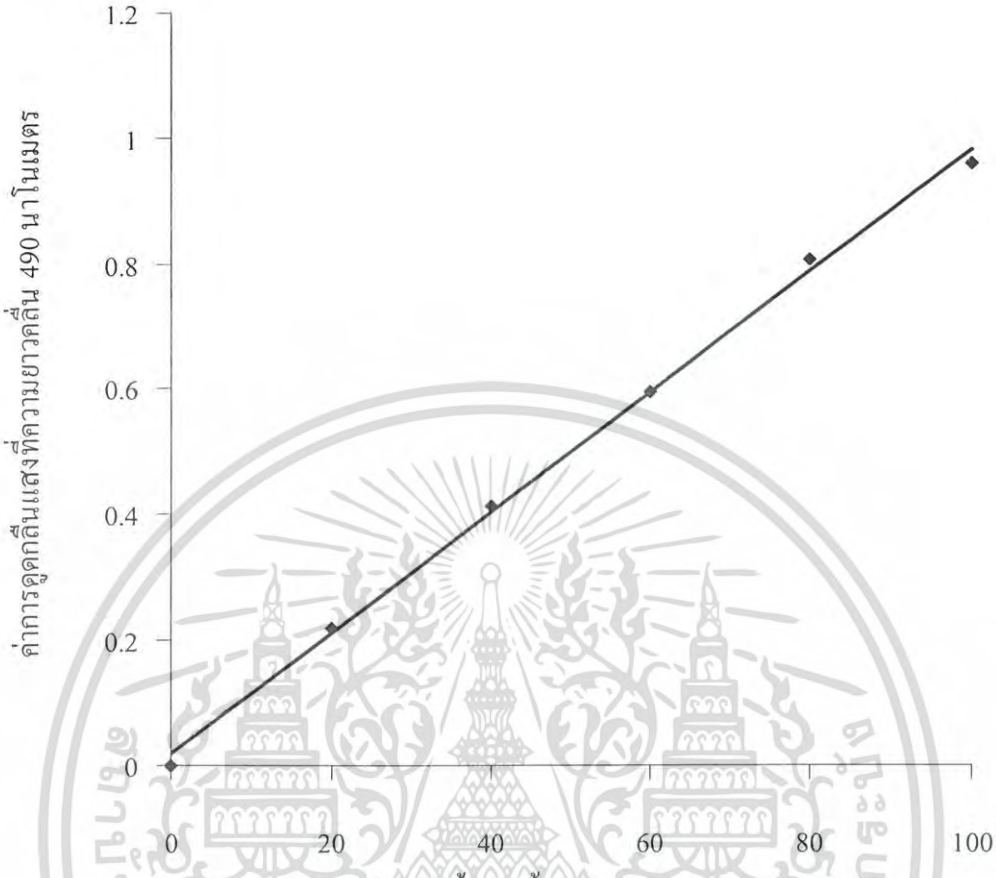
สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4)
2. สารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์
   เตรียมโดยละลายฟีนอล (C_6H_5OH) 5 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
3. สารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส

วิธีการ

1. ดูดสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ทำแบลงค์ (blank) ควบคู่กันไปโดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่างเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ
2. เติมสารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่หลอดทดสอบในน้ำเย็น
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วเขย่าอีกครั้ง
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
5. ทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตสที่ความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการในข้อ 1-4 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (A_{490}) และความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส ดังแสดงในภาพที่ ค.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ค.3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ ตามวิธีของกล้าณรงค์และเกื้อกูล (2546)

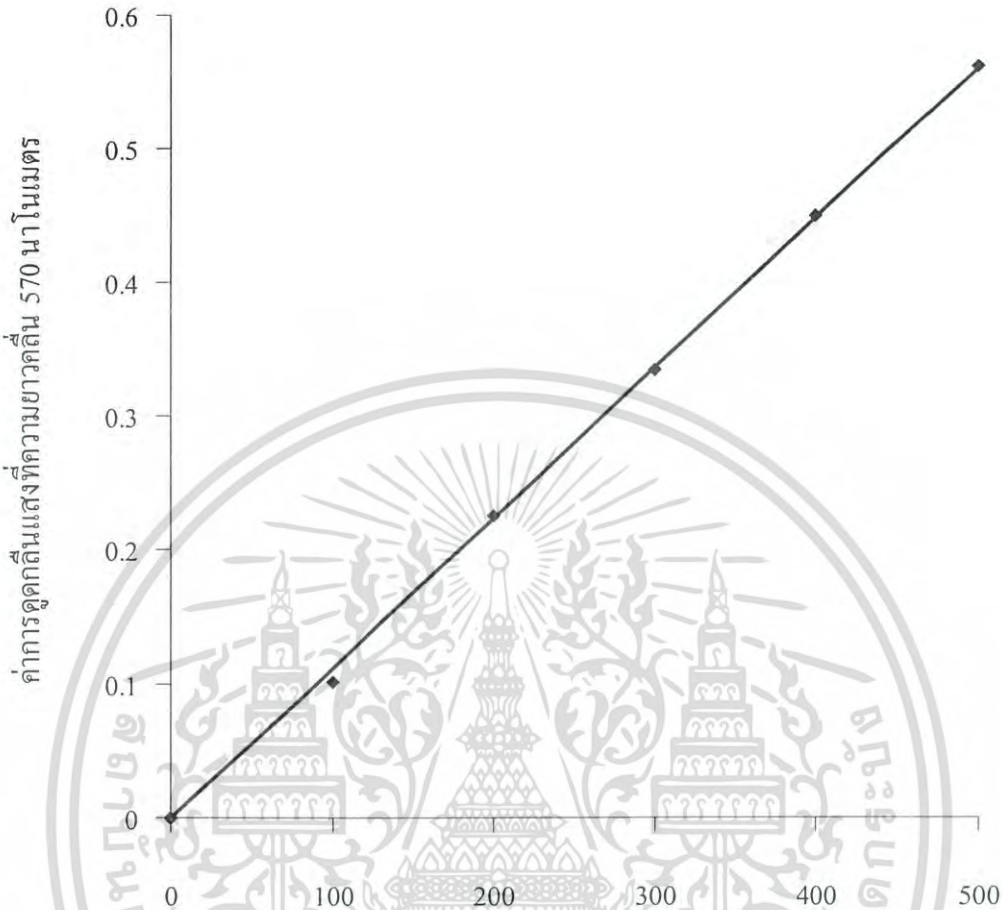
สารเคมี

1. กรดแอซิติกเข้มข้น 2 นอร์มอล
2. สารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์
3. สารละลายโพแทสเซียมไตรไอโอเดต (KIO_3) เข้มข้น 1/600 โมลาร์

วิธีการ

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานความเข้มข้นแป้งกับค่าการดูดกลืนแสง
   1.1 ชั่งแป้ง (soluble starch) จำนวน 50 มิลลิกรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร
   1.2 นำสารละลายนี้ไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรแล้ว กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1
   1.3 ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย soluble starch ความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 100 200 300 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
   1.4 เติมกรดแอซิติกเข้มข้น 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 1.25 มิลลิลิตร เติมสารละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโพแทสเซียมไตรไอโอเดทเข้มข้น 1/600 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม
   1.5 นำสารละลายข้างต้นไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารละลายแบลงค์ซึ่งเตรียมโดยใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรแทนสารละลายตัวอย่าง
   1.6 นำค่าที่วัดได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของแป้งดังแสดงในภาพที่ ค.4
2. การวิเคราะห์สารละลายตัวอย่าง
   2.1 เตรียมสารละลายตัวอย่าง โดยเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม
   2.2 ปิเปตสารละลายตัวอย่างมาปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเช่นเดียวกันกับข้อ 1.4
   2.3 นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร โดยเทียบกับสารละลายแบลงค์ นำค่าที่วัดได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณหาปริมาณแป้งที่เหลืออยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ค.4 กราฟมาตรฐานแป้ง (soluble starch)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การหาน้ำหนักเซลล์แห้งดัดแปลงจากวิธีของ Kwak and Rhee (1992a)

วิธีการ

1. นำสารตัวอย่างกรองด้วยชุดกรอง ผ่านกระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 1 ที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว
2. นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ทิ้งให้เย็นในเดซิกเคเตอร์
3. นำไปชั่งน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) จากสูตร

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง} = \frac{(W2-W1)}{V} \times 1000$$

W1 คือ น้ำหนักกระดาษกรอง (กรัม)

W2 คือ น้ำหนักเซลล์กับกระดาษกรอง (กรัม)

V คือ ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

รายงานผลการวิเคราะห์

สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร
กรมวิชาการเกษตร
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์ : 0 2940 7166
โทรสาร : 0 2940 7448

กลุ่มงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี
หลังการเก็บเกี่ยว (กพล.)

รายงานผลการวิเคราะห์

ผู้ส่งตัวอย่าง คุณอภิชญา ทองทับ	หมายเลขวิเคราะห์ CP.No.2810/48
ที่อยู่ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาภรณ์ 1 ชั้น 4 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง 10520	วันที่รับตัวอย่าง 30 สิงหาคม 2548
โทรศัพท์ 01-6819329 โทรสาร : -	วันที่วิเคราะห์ 31 สิงหาคม 2548
ชนิดและลักษณะของตัวอย่าง น้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อรา	วิธีการสุ่มตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ 2 ซ้ำต่อตัวอย่าง
สภาพตัวอย่างเมื่อได้รับ ปกติ	วิธีทดสอบ วิเคราะห์โดยวิธี ELISA

รายงานผลวิเคราะห์ :

ลำดับที่	ตัวอย่าง	ชนิดของสารพิษ	ปริมาณสารแอฟลาทอกซิน(พีพีบี)	หมายเหตุ
1	น้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อรา Aspergillus sp. รหัส BR1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน (วันผลิต 30/08/48)	แอฟลาทอกซิน	17.50	

ผลการวิเคราะห์นี้รับรอง เฉพาะตัวอย่างที่ส่งมานี้เท่านั้น
ห้ามนำไปโฆษณาเพื่อการค้าใด ๆ ทั้งสิ้น

หมายเหตุ : รายงานผลการทดสอบต้องไม่ถูกทำสำเนาเฉพาะเพียงบางส่วน (ยกเว้นทำทั้งฉบับ) โดยไม่ได้รับความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษรจากห้องปฏิบัติการ

รายงานที่ 33/48

วันที่รายงาน 2 กันยายน 2548

.....หัวหน้า
.....ผู้วิเคราะห์
.....ผู้อำนวยการสำนัก
(นายวิชา ชิดประเสริฐ)
ผู้อำนวยการสำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ จ.1 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรารหัส UD1

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	6	0.00	0.00
1	5.6	0.04	0.88
2	4.8	1.48	1.27
3	4.4	2.14	0.87
4	4.4	1.65	0.62
5	4.5	1.23	0.42
6	4.6	1.20	0.21
7	4.6	0.88	0.17

(ภาพที่ 4.3)

ตารางที่ จ.2 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรารหัส UB1

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	6.0	0.00	0.00
1	5.7	0.06	0.70
2	5.5	0.53	0.90
3	4.7	1.50	0.48
4	4.7	0.41	0.25
5	4.8	0.37	0.22
6	4.8	0.33	0.17
7	4.8	0.31	0.08

(ภาพที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.3 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรารหัส NP1

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	6.0	0.00	0.00
1	5.6	0.12	0.59
2	5.5	0.39	1.13
3	4.7	1.67	0.77
4	4.9	0.49	0.46
5	4.9	0.31	0.33
6	5.0	0.27	0.27
7	5.0	0.20	0.18

(ภาพที่ 4.5)

ตารางที่ จ.4 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรารหัส RE3

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	6.0	0.00	0.00
1	5.5	0.29	0.97
2	4.6	1.01	1.29
3	4.5	1.99	1.11
4	4.7	0.61	0.60
5	4.7	0.54	0.30
6	4.7	0.51	0.12
7	4.7	0.50	0.07

(ภาพที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.5 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรารหัส BR1

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
0	6.0	0.00	0.00
1	5.5	0.16	1.21
2	5.2	1.46	1.37
3	4.4	2.78	1.28
4	4.4	1.60	0.65
5	4.5	1.42	0.36
6	4.6	0.76	0.30
7	4.6	0.50	0.13

(ภาพที่ 4.7)

ตารางที่ จ.6 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.00	0.00	45.64	50.71	0.00
1	5.8	0.17	1.27	12.05	15.35	4.72
2	5.3	0.77	1.41	0.85	0.21	7.62
3	4.4	2.80	1.24	0.00	0.17	7.56
4	4.4	1.60	0.61	0.00	0.15	7.44
5	4.5	1.42	0.39	0.00	0.07	7.24
6	4.6	1.01	0.33	0.00	0.06	7.22
7	4.6	1.00	0.24	0.00	0.05	6.88

(ภาพที่ 4.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.7 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 4 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.00	0.00	72.31	76.16	0.00
1	5.6	0.19	1.69	29.36	39.90	5.62
2	5.1	1.16	1.96	9.73	25.66	7.08
3	4.5	1.19	2.03	0.13	23.13	9.22
4	4.2	4.66	1.12	0.00	18.89	9.40
5	4.2	3.59	0.74	0.00	15.96	9.42
6	4.5	1.83	0.53	0.00	6.57	9.26
7	4.6	1.44	0.26	0.00	5.45	9.20

(ภาพที่ 4.9)

ตารางที่ จ.8 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 6 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.00	0.00	90.81	100.59	0.00
1	5.3	0.28	3.21	64.55	84.85	6.10
2	4.8	1.64	3.36	6.73	65.56	8.64
3	4.5	2.21	3.92	0.32	53.64	9.72
4	4.2	4.16	2.76	0.00	42.22	10.12
5	4.0	6.43	2.02	0.00	29.19	10.02
6	4.1	5.62	1.83	0.00	16.77	9.96
7	4.4	3.96	0.79	0.00	13.64	9.90

(ภาพที่ 4.10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.9 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.00	0.00	88.44	96.77	0.00
1	3.7	0.05	0.41	64.55	84.04	1.56
2	2.9	0.08	0.94	18.91	56.06	1.92
3	2.6	0.13	0.99	9.38	54.24	3.90
4	2.3	0.16	0.62	2.92	49.60	3.82
5	2.2	0.24	0.57	0.51	48.89	3.76
6	2.3	0.17	0.49	0.16	42.32	3.74
7	2.1	0.08	0.47	0.00	32.73	3.06

(ภาพที่ 4.11)

ตารางที่ จ.10 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมดเมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.00	0.00	88.95	97.17	0.00
1	3.9	0.09	1.13	35.45	80.00	5.06
2	3.8	0.20	2.91	0.36	74.75	11.50
3	3.5	0.59	3.01	0.14	50.10	13.86
4	3.4	1.17	1.70	0.00	42.83	13.80
5	3.5	3.90	1.31	0.00	34.34	13.66
6	3.5	2.52	0.69	0.00	22.73	13.50
7	3.6	1.79	0.35	0.00	20.30	12.86

(ภาพที่ 4.12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.11 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.00	0.00	88.55	96.16	0.00
1	2.7	0.01	0.72	58.18	75.96	1.22
2	2.7	0.02	0.76	24.91	73.54	1.72
3	2.5	0.03	0.81	12.41	72.32	2.62
4	2.3	0.06	0.67	8.48	71.21	2.78
5	2.2	0.10	0.57	2.24	67.27	2.62
6	2.3	0.07	0.48	0.75	59.09	2.50
7	2.5	0.03	0.32	0.00	48.79	2.18

(ภาพที่ 4.13)

ตารางที่ จ.12 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.00	0.00	89.55	95.56	0.00
1	5.7	0.13	1.48	24.55	84.24	5.69
2	5.4	0.33	2.57	0.75	74.75	7.48
3	4.9	1.64	3.26	0.09	45.66	10.44
4	4.8	2.73	2.42	0.00	41.31	10.60
5	4.5	4.75	1.80	0.00	32.22	10.32
6	4.6	4.01	1.01	0.00	23.23	10.28
7	4.6	3.75	0.62	0.00	21.11	10.22

(ภาพที่ 4.14)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.13 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.00	0.00	88.64	97.02	0.00
1	4.2	0.17	1.68	19.64	78.28	2.32
2	2.6	0.29	1.83	1.09	68.69	4.64
3	2.4	0.42	1.97	0.13	49.49	8.38
4	2.4	0.53	1.49	0.00	43.84	8.82
5	2.2	1.10	0.77	0.00	43.23	8.66
6	2.0	1.03	0.54	0.00	41.21	8.72
7	2.0	0.98	0.42	0.00	36.67	8.38

(ภาพที่ 4.15)

ตารางที่ จ.14 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.00	0.00	90.27	96.57	0.00
1	5.8	0.18	4.02	11.82	79.80	7.74
2	3.1	0.33	4.22	0.08	52.53	11.40
3	2.3	3.22	3.31	0.03	20.40	11.22
4	2.5	5.42	2.44	0.00	16.97	11.00
5	2.6	5.11	1.31	0.00	13.74	11.02
6	3.2	4.90	0.94	0.00	12.06	10.92
7	3.7	3.56	0.49	0.00	10.91	10.76

(ภาพที่ 4.16)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.15 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและแอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.00	0.00	88.09	94.55	0.00
1	5.4	0.18	0.84	40.45	85.35	1.98
2	3.3	0.23	1.55	19.36	81.21	2.90
3	2.1	0.28	1.80	9.50	76.26	6.26
4	2.1	0.30	1.63	1.15	75.76	6.56
5	2.0	0.64	1.43	0.00	65.05	6.30
6	2.5	0.63	0.81	0.00	62.63	5.56
7	2.6	0.40	0.69	0.00	57.37	5.36

(ภาพที่ 4.17)

ตารางที่ จ.16 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มียีสต์สกัดและโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.00	0.00	90.45	94.34	0.00
1	6.0	0.20	3.06	16.09	56.16	8.68
2	5.6	0.60	4.71	0.15	27.27	11.52
3	4.3	2.68	2.07	0.05	20.00	11.46
4	4.5	3.81	1.92	0.00	12.32	11.44
5	5.2	8.45	1.50	0.00	11.62	11.48
6	5.4	6.22	0.94	0.00	10.56	11.36
7	5.6	5.40	0.54	0.00	10.20	11.34

(ภาพที่ 4.18)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.17 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.5

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	3.5	0.00	0.00	80.45	97.53	0.00
1	3.4	0.19	2.28	24.55	75.25	6.45
2	3.4	3.67	3.65	0.09	59.09	13.61
3	3.1	11.62	1.48	0.00	43.23	13.68
4	3.1	8.90	1.36	0.00	32.32	13.53
5	3.3	8.56	1.16	0.00	28.48	13.51
6	3.4	8.20	1.12	0.00	17.88	13.30
7	3.4	8.09	0.99	0.00	15.89	13.33

(ภาพที่ 4.19)

ตารางที่ จ.18 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	4.5	0.00	0.00	85.91	97.98	0.00
1	4.4	0.18	2.02	33.82	73.74	6.06
2	4.3	1.38	2.15	0.31	57.58	11.89
3	4.2	2.59	3.92	0.05	45.25	12.48
4	3.8	8.56	1.03	0.03	34.55	12.64
5	3.7	9.61	0.80	0.00	28.38	12.73
6	4.0	8.90	0.54	0.00	26.05	12.35
7	4.5	4.84	0.42	0.00	21.95	12.33

(ภาพที่ 4.20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.19 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	5.5	0.00	0.00	90.36	98.00	0.00
1	5.5	0.18	3.26	74.82	56.06	5.71
2	5.3	0.63	4.88	0.85	33.33	11.31
3	4.3	1.98	2.29	0.14	25.05	12.04
4	4.4	4.04	1.75	0.00	16.16	12.31
5	4.8	8.50	1.46	0.00	14.21	12.18
6	5.3	8.13	0.54	0.00	11.95	11.79
7	5.4	6.01	0.39	0.00	10.88	11.30

(ภาพที่ 4.21)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.20 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหารที่มีกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	3.5	0.00	126.26	0.00
1	3.5	0.04	110.51	4.68
2	3.5	0.16	91.41	7.24
3	3.4	0.80	83.94	8.64
4	3.3	4.44	53.54	10.68
5	3.2	11.28	27.51	13.74
6	3.0	18.06	22.27	13.90
7	2.9	21.38	18.23	13.82
8	2.9	24.25	17.14	13.28
9	2.7	23.48	13.99	13.18
10	2.6	20.15	11.64	12.82
11	2.5	19.87	9.15	12.36
12	2.5	18.32	7.51	11.96
13	2.4	17.65	6.07	11.64
14	2.4	16.12	4.63	11.30
15	2.6	16.03	3.05	10.66

(ภาพที่ 4.22)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.21 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	3.5	0.00	126.57	0.00
1	3.5	0.01	124.75	2.83
2	3.4	0.13	119.70	3.34
3	3.5	0.78	113.13	4.08
4	3.4	2.09	99.55	5.16
5	3.4	3.75	92.93	5.81
6	3.2	5.76	73.03	6.45
7	3.1	7.19	69.90	6.78
8	2.9	8.65	66.67	7.75
9	2.8	11.23	55.05	8.86
10	2.5	12.49	41.41	8.89
11	2.5	14.06	30.10	9.20
12	2.4	15.34	25.25	10.49
13	2.3	16.01	20.91	10.48
14	2.2	18.72	18.69	10.44
15	2.2	17.22	18.28	9.99

(ภาพที่ 4.23)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.22 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในถังหมักที่มีอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	3.5	0.00	0.00	76.82	86.87	0.00
1	3.5	0.18	1.67	26.00	76.53	10.33
2	3.4	0.59	1.77	2.18	59.09	13.19
3	3.3	1.14	2.11	0.58	48.89	13.28
4	3.3	2.78	1.76	0.00	35.76	13.81
5	3.2	3.34	1.62	0.00	24.70	13.86
6	3.2	4.60	0.76	0.00	22.22	11.45
7	3.2	5.28	0.25	0.00	21.64	11.26

(ภาพที่ 4.24)

ตารางที่ จ.23 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในถังหมักที่มีอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	3.5	0.00	0.00	78.18	89.39	0.00
1	3.5	0.20	2.20	40.91	71.72	10.04
2	3.4	0.41	2.32	1.82	58.15	14.05
3	3.4	0.66	2.69	1.27	34.85	14.11
4	3.2	4.12	1.95	0.00	29.55	14.38
5	3.1	7.19	1.41	0.00	24.20	13.65
6	3.1	6.06	1.18	0.00	15.20	12.89
7	3.2	5.12	0.52	0.00	12.98	12.71

(ภาพที่ 4.25)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.24 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในถังหมักที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	3.5	0.00	0.00	74.55	86.87	0.00
1	3.5	0.24	2.39	9.09	79.80	10.24
2	3.4	0.40	3.48	1.73	34.85	15.31
3	3.2	4.02	2.39	0.00	24.24	15.25
4	3.0	10.50	2.27	0.00	19.90	15.48
5	3.0	8.76	1.55	0.00	16.62	15.20
6	3.1	7.43	1.48	0.00	12.99	14.61
7	3.1	7.11	1.33	0.00	11.87	13.68

(ภาพที่ 4.26, 4.27)

ตารางที่ จ.25 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในถังหมักที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	3.5	0.00	0.00	75.45	88.13	0.00
1	3.5	0.31	2.86	16.73	43.94	10.16
2	3.4	2.12	5.85	0.27	38.64	15.35
3	3.1	14.02	1.83	0.00	13.84	15.59
4	3.0	16.36	1.53	0.00	13.18	15.34
5	3.1	15.21	1.31	0.00	11.18	15.16
6	3.2	11.00	1.41	0.00	9.01	15.04
7	3.4	9.28	0.72	0.00	6.31	14.08

(ภาพที่ 4.28)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ จ.26 ค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก เอนไซม์อะไมเลส น้ำหนักเซลล์แห้ง แป้งที่เหลือ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อราในถังหมักที่มีอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม

เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	เอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	แป้งที่เหลืออยู่ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	3.5	0.00	0.00	76.55	83.84	0.00
1	3.5	0.31	1.55	19.45	58.33	11.48
2	3.4	0.38	1.65	6.36	25.00	16.89
3	3.4	2.32	2.84	1.45	20.35	17.65
4	3.3	4.18	2.07	0.00	10.35	17.94
5	3.2	7.06	1.41	0.00	9.74	17.80
6	3.2	6.22	0.84	0.00	5.65	17.73
7	3.3	5.88	0.30	0.00	3.51	16.65

(ภาพที่ 4.29)

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงในตารางได้จากการคำนวณหาค่าเฉลี่ยทั้งหมด 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวอภิชญา ทองทับ
วัน เดือน ปีเกิด	18 กรกฎาคม 2521
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษาวิทยาศาตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2543 และเข้าศึกษาต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้