สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตกรดโคจิกจากกลูโคสโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ที่ถูกตรึง

นางสาวบุษยา ประมวลทรัพย์

นายวสันต์ สมบูรณ์

วพ.
ว167ก1
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....83744
วัน,เดือน,ปี.....15 ก.ย. 2551

b.....11983431
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kojic acid production from glucose by immobilized *Aspergillus* sp. BR 1

Miss Busaya Pramualsub

Mr. Wason Somboon

A special project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตกรดโคจิกจากกลูโคสโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ที่ถูกตรึง

นักศึกษา นางสาวบุษยา ประมวลทรัพย์ รหัสนักศึกษา 47050514

นายวสันต์ สมบูรณ์ รหัสนักศึกษา 47050528

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์	
กรรมการ	ผศ. วีนา ชูโชติ	
กรรมการ	รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษเรื่อง	การผลิตกรดโคจิกจากกลูโคสโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ที่ถูกตรึง
นักศึกษา	นางสาวบุษยา ประมวลทรัพย์ นายวสันต์ สมบูรณ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2550
อาจารย์ผู้ที่ปรึกษา	รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยการตรึงเซลล์ *Aspergillus* sp. BR1 ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต โดยเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และโซเดียมไนเตรท 2.5 กรัมต่อลิตร ศึกษาผลของจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยใช้เซลล์เริ่มต้นอยู่ในช่วง $1.5x10^5$ ถึง $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรและจำนวนเม็ดบีดตั้งแต่ 40 ถึง 80 เม็ดต่อฟลาสก์ จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้เซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 0.63 กรัมต่อลิตรในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงและให้อัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.063 กรัมต่อลิตรต่อวัน และให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเมื่อใช้จำนวนเม็ดบีด 80 เม็ดต่อฟลาสก์ ศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกที่ 60 70 และ 80 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกรดโคจิกไม่เพิ่มขึ้นเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสจาก 60 ถึง 80 กรัมต่อลิตร เชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ที่ถูกตรึงผลิตกรดโคจิกได้เท่ากับ 1.26 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เซลล์อิสระนั้นผลิดกรดโคจิกได้เท่ากับ 8.54 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project	Kojic acid production from glucose by immobilized *Aspergillus* sp. BR 1
Name	Miss Busaya Pramualsub
	Mr. Wason Somboon
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2007
Special Project Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nuanphan Naranong

Abstract

The immobilized cells of *Aspergillus* sp. BR1 in calcium alginate gel beads were used for kojic acid production in shake flask using production medium containing (g/l) glucose 60.0, yeast extract 2.5, KH_2PO_4 1, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 and $NaNO_3$ 2.5 with pH 4.0. Effects of an initial cell concentrations ranging from $1.5x10^5$ to $1.5x10^7$ cells/ml and amount of immobilized cell beads in the range of 40-80 beads/flask were studied for kojic acid production. From the results, the maximum kojic acid of 0.63 g/l was obtained on day 10 of cultivation with the productivity of 0.063 g/l/day when initial cell concentration of $1.5x10^7$ cells/ml and 80 immobilized cell beads/flask were used. Moreover, the glucose concentrations of 60, 70 and 80 g/l in the medium were evaluated for kojic acid production. It was found that kojic acid production was not increased as glucose concentration increased from 60 g/l to 80 g/l The immobilized cells of *Aspergillus* sp. BR1 produced 1.26 g/l kojic acid from the medium, while free cell produced 8.54 g/l kojic acid.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาอังกฤษ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 กรดโคจิก	3
2.2 การผลิตกรดโคจิก	4
2.3 กระบวนการสังเคราะห์กรดโคจิก	7
2.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก	8
2.5 ประโยชน์ของกรดโคจิก	14
2.6 ความเป็นพิษของกรดโคจิก	15
2.7 การตรึงเซลล์	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	22
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	22
3.2 วิธีการทดลอง	23
3.3 วิธีการวิเคราะห์	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิก 26

4.2 ผลการศึกษาจำนวนเม็ดบีดที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิก 33

4.3 การศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิก 39

4.4 ผลการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์อิสระของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 45

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 50

เอกสารอ้างอิง 51

ภาคผนวก 56

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 56

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 เชื้อราที่ผลิตกรดโคจิก 6
ดารางที่ 2.2 แหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์กรดโคจิก 9
ตารางที่ 2.3 แสดงแหล่งแร่ธาตุในการผลิตกรดโคจิก 12
ตารางที่ 4.1 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวโดยใช้ปริมาณเซลล์ในระดับต่างกัน 30
ตารางที่ 4.2 แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้ปริมาณเซลล์ที่ระดับต่างกัน 31
ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบการผลิดกรดโคจิกของเชื้อราที่ถูกตรึงเมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นต่างกัน 31
ตารางที่ 4.4 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวโดยใช้จำนวนเม็ดบีดที่ต่างกัน 37
ตารางที่ 4.5 แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้ปริมาณเม็ดบีดที่ระดับต่างๆ 38
ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราที่ถูกตรึงเมื่อใช้จำนวนเม็ดบีดต่างกัน 38
ตารางที่ 4.7 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวโดยใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างกัน 43
ตารางที่ 4.8 แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ระดับต่างๆ 44
ตารางที่ 4.9 เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราที่ถูกตรึงเมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสต่างกัน 44
ตารางที่ 4.10 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณกรดโคจิกโดยเซลล์ที่ถูกตรึงและเซลล์อิสระ 47
ตารางที่ 4.11 แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราและผลได้ของกรดโคจิกโดยเซลล์ที่ถูกตรึงและเซลล์อิสระ 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 2.1 แสดงแผนภาพการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแล็กโตน 7
รูปที่ 2.2 แสดงแผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus flavus* 8
รูปที่ 2.3 รูปแบบการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ 19
รูปที่ 3.1 ลักษณะเม็ดบีดที่ได้จากการตรึงเซลล์ 23
รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ 27
รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1.5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ 27
รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 1.5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ 28
รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณกรดโคจิกและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเมื่อใช้เซลล์ เริ่มต้นต่างๆกัน 29
รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ปริมาณเม็ดบีด 40 เม็ดต่อฟลาสก์ 34
รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ปริมาณเม็ดบีด 60 เม็ดต่อฟลาสก์ 34
รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ปริมาณเม็ดบีด 80 เม็ดต่อฟลาสก์ 35
รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณกรดโคจิกและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเมื่อใช้จำนวนเม็ดบีดต่างๆกัน 36
รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้น้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร 40
รูปที่ 4.10 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้น้ำตาล 70 กรัมต่อลิตร 40
รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้น้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร 41
รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดโคจิกและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสต่างๆกัน 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ 4.13 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้เซลล์ที่ถูกตรึงของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 46

รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้เซลล์อิสระของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 46

รูปที่ ข.1 แสดงกราฟมาตรฐานกรดโคจิก 58

รูปที่ ข.2 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

กรดโคจิก (Kojic acid, $C_6H_6O_4$) เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolism) ของเชื้อราในหลายๆสกุล โดยกรดโคจิกนี้เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า 5-hydroxy -2-hydroxymethyl-4-pyrone มีการค้นพบกรดโคจิกครั้งแรกในปี 1907 โดย Saito ซึ่งสามารถแยกผลึกที่เกิดจาก *Aspergillus* sp. ที่เติบโตบนข้าวนึ่ง และต่อมา Yabuta ปี 1913 ได้ศึกษาสมบัติทางเคมีและตั้งชื่อว่ากรดโคจิก (Baijpai และคณะ, 1982) กรดโคจิกเป็นสารประกอบอีกชนิดที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างกว้างขวางซึ่งสามารถผลิตได้ทั้งกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี และการผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพ ในปัจจุบันการผลิตกรดโคจิกนิยมผลิตโดยกระบวนการหมักในสภาพอาหารเหลวเป็นส่วนใหญ่ เชื้อส่วนใหญ่ที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิก คือ *Aspergillus* spp. กรดโคจิกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร โดยอนุพันธ์ของกรดโคจิกที่มีชื่อว่า มอลทอล (maltol ; 3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone) และเอทิลมอลทอล (ethylmaltol ; 3-hydroxy-2-ethyl-4-pyrone) มีคุณสมบัติในการเพิ่มกลิ่นรสให้กับอาหารที่ต้องการกลิ่นผลไม้ประเภทเบอร์รี่ ลูกกวาดกลิ่นผลไม้ต่างๆ และในเครื่องดื่มจำพวก เหล้า เบียร์ ไวน์ ไอศกรีม เป็นต้น (กล้าณรงค์ และจุนทนี, 2540) นอกจากนี้ยังใช้ในผลไม้ที่ตัดแต่งแล้วเพื่อไม่ให้เกิด oxidative browning (ผิวหน้าผลไม้เป็นสีน้ำตาล) ในด้านอุตสาหกรรมเครื่องสำอางมีการนำกรดโคจิกมาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง พบว่ากรดโคจิกทำหน้าที่ขัดผิวหรือทำให้ผิวขาวขึ้น และยังสามารถป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลตจากแสงแดดได้ (Ohyama และ Mishima , 1990) และสุดท้ายในด้านการแพทย์ กรดโคจิกจัดเป็นสารที่เป็นยาปฏิชีวนะอย่างอ่อนๆชนิดหนึ่ง อนุพันธ์ของกรดโคจิกหลายชนิดก็มีสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะด้วย (Bhatia และคณะ, 1988) นอกจากนี้กรดโคจิกยังสามารถทำลายอนุมูลอิสระได้โดยไปทำให้มีการกระตุ้นในเซลล์เนื้อเยื่อและเลือด และยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเม็ดเลือดขาวทำให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันมากขึ้น (Niwa และ Akomatsu , 1991)

การผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อราในสกุล *Aspergillus* sp. พบว่าเชื้อนี้หลายสายพันธุ์สามารถผลิตกรดโคจิกได้จากน้ำตาลหลายชนิด สำหรับโครงงานนี้จะใช้เชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 มาทำการตรึงเซลล์และผลิตกรดโคจิกโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อเปรียบเทียบการผลิดกรดโคจิกของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงเพื่อใช้เป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในด้านการเก็บรักษา และในการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวโดยใช้เชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต
2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมบางประการในการตรึงเซลล์
3. เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์อิสระ

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ทำการตรึงเซลล์ในแคลเซียมอัลจิเนตเพื่อผลิตกรดโคจิกโดยหาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสม จำนวนเม็ดบีดที่เหมาะสม และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสม
2. ทำการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกของเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์อิสระ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1เพื่อผลิตกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 กรดโคจิก

กรดโคจิก (kojic acid) หรือ 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4-pyrone เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่ผลิตได้จากเชื้อราหลายสายพันธุ์มีการนำกรดโคจิกมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางอย่างแพร่หลายเพื่อใช้ผลิตครีมปรับสภาพผิวขาว (Majmudar และคณะ, 1998) อุตสาหกรรมการเกษตรโดยใช้เป็นยาปราบศัตรูพืช (pesticide) (Uher และคณะ, 1994) และอุตสาหกรรมเภสัชกรรมโดยใช้เป็นยาเบาเทาอาการปวด (Ozturk และคณะ, 2002) และถูกนำมาเป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์พลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (biodegradable plastics) (Tomita และคณะ, 1996)

จากการวิเคราะห์ทางรังสี (X-ray investigation) พบว่าลักษณะทั่วไปของกรดโคจิกบริสุทธิ์มีผลึกเป็นปริซึมรูปเข็ม ไม่มีสี (Bentley, 1957) มีจุดหลอมเหลว 153-154 องศาเซลเซียส และค่าการแตกตัวของกรด 7.90-8.30 (pKa) ผลึกละลายได้ง่ายในน้ำ (3.95 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 20 องศาเซลเซียส) เอทานอลและอะซิโตน ละลายได้เล็กน้อยในอีเทอร์ เอทิลอะซิเตต คลอโรฟอร์ม และไพริดีน ละลายยากมากในของเหลวชนิดอื่นๆ (Bajpai และคณะ, 1982)

กรดโคจิกเป็นสารประกอบของสารไพโรน (pyrone) ที่ขาดกลุ่มคาร์บอกซิล โมเลกุลของกรดโคจิกประกอบขึ้นด้วย คาร์บอน 6 อะตอม ไฮโดรเจน 6 อะตอม และออกซิเจน 4 อะตอม ดังนั้นกรดโคจิกจึงมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_6O_4$ (Bajpai และคณะ, 1982) กรดโคจิกมีมวลโมเลกุล 142.11 และทำให้บริสุทธิ์ได้โดยการตกผลึกซ้ำในอะซิโตน เอทานอลอีเทอร์ เมทานอลและเอทิลอะซิเตต หรือทำให้บริสุทธิ์ภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 150-200 องศาเซลเซียส

เนื่องจากโครงสร้างของกรดโคจิกนั้นคล้ายกับโครงสร้างของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไทโรซีน (tyrosine) ไปเป็นเมลานิน (melanin) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดสีในผิวหนังและในเนื้อเยื่อผักชนิดต่างๆ จึงทำให้เกิดการแย่งจับกับสารตั้งต้นแบบแข่งขัน (competitive inhibition) ในขั้นตอนต่างๆในกลไกการผลิตเมลานิน (Chen และคณะ, 1991)

กรดโคจิกในรูปโซเดียมโคเจต (sodium kojate) จะมีประสิทธิภาพในการหยุดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบได้ แต่มีฤทธิ์เพียงแค่ยับยั้งการเจริญเติบโตไม่ได้ทำลายแบคทีเรีย และมีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อรา (Bajpai และคณะ, 1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การผลิตกรดโคจิก

Bajpai และคณะ (1982) รายงานว่ากรดโคจิกเริ่มผลิตครั้งแรกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* และต่อมาได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้เชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์อื่นๆดังนี้ *A. oryzae, A. gymnosarde, A. flavus, A. awamori, A. clavatus, A. fumigatus, A. giganteus, A. albus, A. nidulans, A. parasiticus, A. effuses, A. tamari, A. luteovirescens, A. lutescens, A. wentii* และ *A. alliaceus* เป็นต้น

กรดโคจิกส่วนมากผลิตจากเชื้อราโดยใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนและเจริญได้ในสภาพที่มีอากาศ (Bentley, 1957) Bassapa และคณะ (1970) พบว่าการสังเคราะห์กรดโคจิกและสารอะฟลาทอกซินมีวิถีการสังเคราะห์แยกออกจากกันและกรดโคจิกไม่ได้เป็นสารตัวกลางที่เกิดขึ้นระหว่างการสังเคราะห์สารอะฟลาทอกซิน โดยการทดลองได้ใช้เซลล์ระยะพักตัว (resting cell) ของเชื้อ *Aspergillus flavus* และทำการทดสอบโดยใช้ดีไซโลส (D-xylose) และเอทานอล (ethanol) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกรดโคจิกเกิดขึ้นแต่ไม่มีสารอะฟลาทอกซินเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตกรดโคจิกและสารอะฟลาทอกซินนั้นขึ้นกับปัจจัยต่างๆได้แก่ อุณหภูมิ ค่าพีเอช อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวหน้าต่อปริมาตร (surface volume ratio) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และองค์ประกอบของสารอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

Parrish (1996) ทำการศึกษาการผลิตสารอะฟลาทอกซินและกรดโคจิกจากเชื้อราสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* โดยทำการศึกษาสายพันธุ์ *Aspergillus* ดังนี้ *A. clavatus, A. effuses, A. flavus, A. fumigatus, A. nidulans, A. oryzae, A. parasiticus, A. tamari* และ *A. ustus* พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดโคจิกได้ และมีเชื้อรา 2 สายพันธุ์ที่ผลิตสารอะฟลาทอกซินได้ คือ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ส่วนสายพันธุ์ของ *Penicillium* ที่ทำการศึกษาได้แก่ *P. citrinum, P. griseofulvum, P. purpruogenum* และ *P. rubrum* พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถผลิตกรดโคจิกได้ และไม่มีสายพันธุ์ใดที่ผลิตสารอะฟลาทอกซินเลย จากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าทุกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกได้ไม่จำเป็นที่จะต้องผลิตสารอะฟลาทอกซินได้ทั้งหมด

Kwak และ Rhee (1992) ได้ทำการปรับปรุงการผลิตกรดโคจิกโดยการตรึงเส้นใยของ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ที่ประกอบด้วยแมงกานีสซัลเฟต 2 เปอร์เซ็นต์ เฟอรัสซัลเฟต 2 เปอร์เซ็นต์ และซิงค์ซัลเฟต 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นปรับพีเอชของอาหารให้เป็น 6.0 ด้วย 2 N NaOH พบว่าถึงแม้เส้นใยของเชื้อชนิดนี้จะถูกตรึงไว้ก็ยังสามารถผลิตกรดโคจิกได้ นอกจากนี้พบว่าแหล่งไนโตรเจนและขนาดของเม็ดบีดที่ตรึงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตกรดโคจิก ขนาดของเม็ดบีดที่ตรึงมีผลต่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตกรดโคจิกโดยเม็ดบีดที่มีขนาดเล็กจะมีการผลิตกรดโคจิกสูงกว่าเม็ดบีดที่มีขนาดใหญ่ และยังพบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน

Wakisaka และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยเลี้ยงบนเมมเบรน SE 20 (Membrane-Surface Liquid Culture : MSLC) ที่ประกอบด้วยโพลีซัลโฟนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นเมมเบรนที่มีสปอร์ลอดผ่านเข้าไปได้ แต่เส้นใยลอดผ่านเข้าไปไม่ได้ ในอาหาร 1 ลิตรที่มีองค์ประกอบเป็นกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 6.0 เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกจากการเลี้ยงบนเมมเบรนกับการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าพบว่า การเลี้ยงบนเมมเบรนผลิตกรด โคจิกได้มากกว่าการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า โดยการเลี้ยงบนเมมเบรนที่มีพื้นที่ผิว 220 ตารางเซนติเมตรแบบแบตช์ผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 14 45 และ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 5 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ทำการเพาะเลี้ยง 15 18 และ 27 วัน ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าได้กรดโคจิกสูงสุดเพียง 24 และ 22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ทำการเพาะเลี้ยง 15 และ 18 วันตามลำดับ หลังจากนั้นทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยการเลี้ยงบนเมมเบรนแบบต่อเนื่อง (Continuous MSLC) พบว่าเซลล์ติดอยู่บนผิวหน้าเมมเบรนทำให้สามารถเพาะเลี้ยงได้นานกว่า 70 วัน เมื่ออัตราการเติมอาหารที่มีกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ยเท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อวัน ความเข้มข้นของกรดโคจิกในระยะคงตัวอยู่ระหว่าง 45-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การผลิตกรดโคจิกแบบ repeat-batch ในถังหมักกับเก็บเซลล์โดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* M3B9 นั้นถังหมักกักเก็บเซลล์จะถูกใช้สำหรับการผลิตกรดโคจิกขนาดนำร่องโดยใช้เชื้อ *A.oryzae* ที่ปรับปรุงสายพันธุ์แล้ว ในการหมักแบบ repeat batch การใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนซูโครสและยีสต์สกัดนั้นให้ผลเป็นกลุ่มก้อนของ fungi และมีการผลิตกรดโคจิกที่สูงขึ้น ในการเลี้ยงเชื้อจะใช้การแทนที่อาหารเลี้ยงเชื้อด้วยอัตราส่วน 75 เปอร์เซ็นต์ ที่ให้อัตราการผลิต 5.3 กรัมต่อลิตรต่อวัน หลังจากเลี้ยงเชื้อมา 11.5 วัน ในขณะที่ทำการเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ที่เขย่าซึ่งให้ผลในการผลิตเป็น 5.3 กรัมต่อลิตรต่อวัน จากเครื่องหมักขนาดนำร่อง โดยการเปลี่ยนจากการเลี้ยงแบบ batch ไปเป็น repeat batch ซึ่งช่วยลดเวลาของการทำความสะอาด การเติมและการฆ่าเชื้อถังหมักระหว่างแต่ละ batch จะถูกตัดออกไป และยังเพิ่มผลการผลิตกรดโคจิกให้มากขึ้น (Wan และคณะ, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 เชื้อราที่ผลิตกรดโคจิก

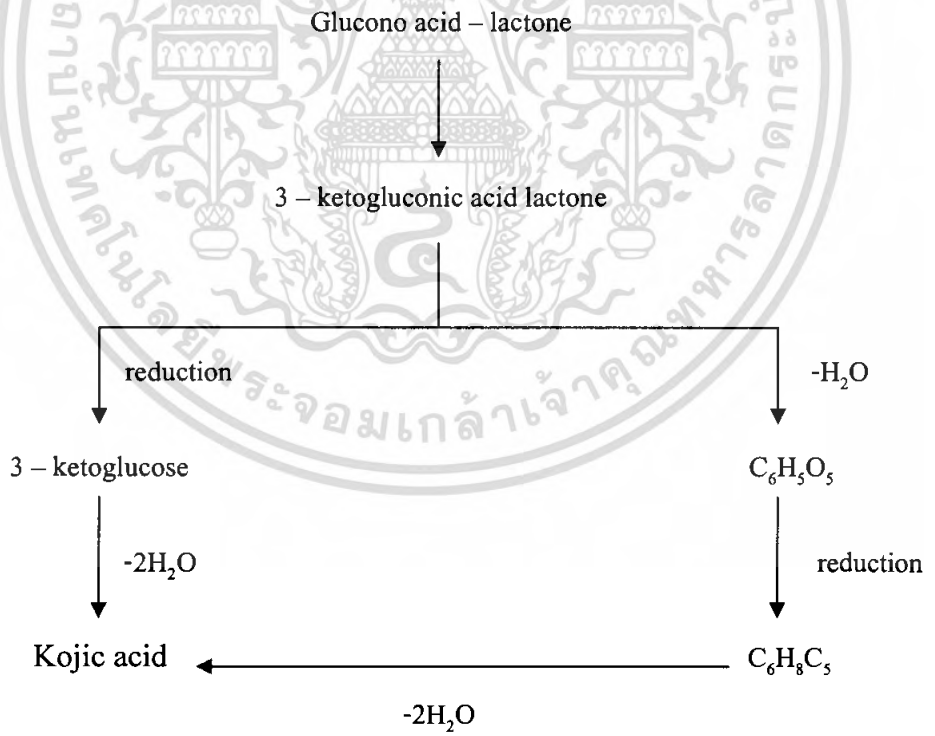
เชื้อจุลินทรีย์ (organism)	ที่มา (reference)
Aspergillus oryzae (19 isolate)	Manabe และคณะ 1984
A. paraciticus SRRC 162 mutant	Anasari and Shrivasta 1991
A. flavus (46 isolate)	Manabe และคณะ 1984
A. tamari (9 isolate)	Manabe และคณะ 1984
A. sojae (3 isolate)	Manabe และคณะ 1984
A. flavus link	Lin และคณะ 1976
A. paraciticus (UNBF A12)	El-Khadm และคณะ 1976
A. flavus	Kharchenko และคณะ 1993; Moubasher และคณะ 1977
A. fumigatus	Kharchenko และคณะ 1993; Moubasher และคณะ 1977
A. luteo-virescens	Manabe และคณะ 1984
A. albus	Manabe และคณะ 1984
A. effusus	Manabe และคณะ 1984
A. lutesens	Manabe และคณะ 1984
A. alliaceus	Manabe และคณะ 1984
A. awamori	Manabe และคณะ 1984
A. candidus	Manabe และคณะ 1984
A. clavatus	Manabe และคณะ 1984
A. gianteus	Manabe และคณะ 1984
A. gymosardae	Manabe และคณะ 1984
A. nidulan	Manabe และคณะ 1984
A. ustus	Manabe และคณะ 1984
A. wentii	Manabe และคณะ 1984
Penicillium critinum	Manabe และคณะ 1984
P. daleae	Manabe และคณะ 1984
P. geiseofulvum	Manabe และคณะ 1984
P. rubru	Manabe และคณะ 1984

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 กระบวนการสังเคราะห์กรดโคจิก

กรดโคจิกมีโครงสร้างคล้ายสารโมโนแซคคาไรด์เนื่องจากสังเคราะห์ได้มาจากน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) การสังเคราะห์เริ่มจากกลูโคสถูกออกซิไดซ์เป็นสารคีโตนิกอินเตอร์มิเดียด (ketonic- intermediate) จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิกโดยการกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 2 โมเลกุล (Bajpai และคณะ, 1982)

Arnteins และ Bently (1953) รายงานว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นสารเริ่มต้นในการผลิตกรดโคจิกจากการเปลี่ยนกลูโคสเป็นสาร 3-คีโตกลูโคส (3-ketoglucose) โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากนั้นเปลี่ยนไปเป็นกรดโคจิกโดยการกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 2 โมเลกุล นอกจากนี้ยังพบว่ากลูโคโนแลคโตน (gluconolactone) เป็นสารเริ่มต้นในกระบวนการผลิตกรดโคจิกได้โดยการเปลี่ยนไปเป็น 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทน (3 – ketogluconic acid lactone) แล้วจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิก 2 ทางคือ วิถีที่ 1 เปลี่ยน 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทนเป็น 3-คีโตกลูโคสก่อน แล้วจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิก วิถีที่ 2 คือสาร 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทนจะถูกกำจัดโมเลกุลของน้ำไป 1 โมเลกุล โดยการรีดักชันและเกิดการกำจัดโมเลกุลของน้ำอีก 1 โมเลกุลตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.1

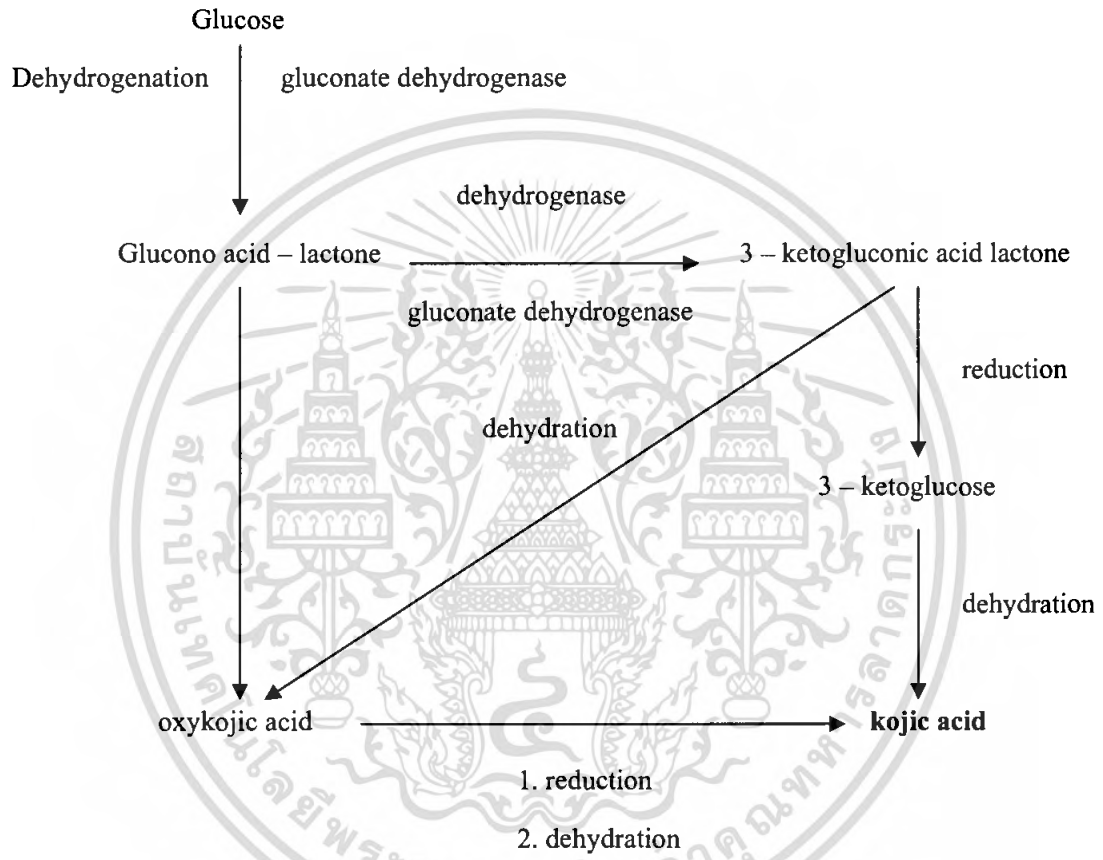


รูปที่ 2.1 แสดงแผนภาพการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแล็กโตน

ที่มา : Arnteins และ Bentley (1953)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bajpai และคณะ (1981) ได้ทำการศึกษาวิถีการสังเคราะห์กรดโคจิกเมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นจากเชื้อ *Aspergillus flavus* สายพันธุ์บี ซึ่งพบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างกระบวนการผลิตกรดโคจิก ได้แก่ เฮกโซไคเนส (hexokinase) กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glucosephosphate dehydrogenase) 6-ฟอสเฟตกลูโคเนตดีไฮโดนจีเนส (6-phosephategluconate dehydrogenase) กลูโคสออกซิเดส (glucoseoxidase) และกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส (gluconate dehydrogenase) เอนไซม์ดังกล่าวสัมพันธ์กับการสร้างการผลิตกรดโคจิกดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงแผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus flavus*
ที่มา : Bajpai และคณะ (1981)

2.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก

2.4.1 แหล่งคาร์บอน

กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน และต้องเลือกใช้แหล่งคาร์บอนให้เหมาะสม (Stanbury และคณะ, 1995) โดยแหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์กรดโคจิกแสดงได้ดังตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์กรดโคจิก

จำนวนคาร์บอน (อะตอม)	แหล่งคาร์บอน
2	เอทานอล, ไกลซีน, โซเดียมแอซีเตต
3	1, 3-ไดไฮดรอกซิล-2-โพรพานอล
	กลีเซอรอลดีไฮด์
	กลีเซอรอล
	โซเดียมแล็กเตต
4	โซเดียมไพรูเวต
5	กรดทาร์ทาริก
6	ลิบิทอล, อะราบิโนส, ไซโลส
	2-ดีออกซีกลูโคส
	กาแล็กโทส
	กรดกลูโคนิก
	กลูโคส
	กลูโคโนแล็กโทน
	อินโนซิทอล
	แมนนิทอล
	ฟรักโทส, แมนโนส
7	ซอร์บิทอล, ซอร์โบส
12	กรดคิวนิก, กรดชิคิมิก
	กรดแล็กโทไบโอนิก
	ทริทาโลส, ซูโครส
18	แล็กโทส, มอลโทส
	ราฟฟีโนส, เดกซ์ทริน
	อินซูลิน, เพกทิน, แป้ง

ที่มา : Bapai และคณะ (1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

May และคณะ (1931) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลเด็กซ์โทรสที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้นระดับต่างๆดังนี้คือ 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

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

สุกัญญา (2541) รายงานว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่าและในถังหมัก พบว่าในฟลาสก์เขย่ามีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดที่ 34 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 ของการผลิตบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และในถังหมักขนาด 2 ลิตร ซึ่งได้ทำการศึกษาการให้อากาศและการกวนต่อการผลิตกรดโคจิก พบว่าเมื่อแปรค่าการให้อากาศและการกวนปริมาณกรดโคจิกที่ได้สูงสุดคือ 37 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 ของการผลิต โดยอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที และอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที โดยมีการใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตกรดโคจิก 0.34 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของแหล่งคาร์บอน และได้อัตราการผลิตที่ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

วรรณี (2546) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 จากการใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย น้ำอ้อย 1 ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ได้ปริมาณกรดโคจิก 24.32 กรัมต่อลิตร จากการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่า ได้ปริมาณกรดโคจิก 45.15 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตร

Mohamad และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนใหม่ๆเพื่อการผลิตกรดโคจิกโดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* จากแป้งสาคูที่ผ่านการย่อยแล้ว เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิกพบว่าต้องมีการย่อยแป้งสาคูให้เป็นกลูโคสก่อนแล้วจึงนำไปผลิตกรดโคจิก เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างการผลิตในฟลาสก์และในถังหมัก พบว่าเมื่อใช้แป้งสาคูเป็นแหล่งคาร์บอน การผลิตในถังหมักจะมีปริมาณต่ำมาก เนื่องจากปริมาณอากาศภายในอาหารไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหมาะสม เพราะเนื้อแป้งเข้มข้นและหนืดทำให้อากาศละลายได้ไม่ดีเป็นผลให้ผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณต่ำ

Mohamad และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาความสามารถของเอนไซม์บริเวณเซลล์บาว (cell-bound) ของเชื้อ *Aspergillus flavus* Link 44-1 เพื่อผลิตกรดโคจิกได้มีการศึกษาในระบบที่ทำการแขวนลอยเซลล์ใหม่ โดยเซลล์จะถูกผลิตในกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง ซึ่งใช้ถังหมักที่มีใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร เซลล์เส้นใยที่ได้จะถูกทำเป็นสารแขวนลอยอีกครั้งในฟลาสก์ 250 มล. ที่บรรจุสารละลายแหล่งคาร์บอนหลายชนิด ระหว่างการทดสอบแหล่งคาร์บอนนั้นกลูโคสให้ปริมาณกรดโคจิกมากที่สุดโดยผลผลิตต่อคาร์บอนที่ถูกใช้ (0.365 กรัมต่อกรัม) ตามด้วยซูโครส (0.279 กรัมต่อกรัม) , แป้งที่ถูกย่อยแล้ว (0.212 กรัมต่อกรัม) และ ฟรักโตส (0.195 กรัมต่อกรัม) อัตราการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพนั้นเพิ่มขึ้นจากการเพิ่มเซลล์เส้นใย การผลิตกรดโคจิกโดยเปลี่ยนความเข้มข้นของกลูโคสและซูโครส จะผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดเมื่อใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และซูโครส 100 กรัมต่อลิตร โดยความเข้มข้นสุดท้ายของกรดโคจิกคือ 45.3 และ 33.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.4.2 แหล่งไนโตรเจน

ในการผลิตกรดโคจิกแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่มาจากแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอินทรีย์และอนินทรีย์ โดยแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัด ทริปโตน ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เป็นอนินทรีย์ได้แก่ เกลือแอมโมเนียม และเกลือไนเตรท

Wei และคณะ (1991) ใช้อาหาร 3 ชนิดที่มีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันคือ อาหารที่ดัดแปลงจาก Czapek-Dox liquid medium ที่มีส่วนประกอบของโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) 0.1 เปอร์เซ็นต์และยีสต์สกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน อาหารของ Tadera และคณะ (1985) ที่มีส่วนประกอบของเปปโตน 0.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหาร Yeast Extract Sucrose (YES) ที่มีส่วนประกอบของยีสต์สกัด 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอาหาร YES ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงที่สุดเท่ากับ 57-59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Mohamad and Ariff (2000) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus flavus* Link 44-1 ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ กลูโคส ไซโลส ซูโครส แป้ง มอลโตส แลกโตส และฟรักโตส ส่วนแหล่งไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไทโอซัลเฟต ($(NH_4)_2S_2O_8$) แอมโมเนียมไนเตรท ($(NH_4)_2NO_3$) และยีสต์สกัดหรือเปปโตน โดยใช้ปริมาณเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 39.90 กรัมต่อลิตร ได้จากการใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร โดยพบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์นั้นเหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกมากกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 แหล่งแร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีความสำคัญที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ แมกนีเซียม (Mg) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) ซัลเฟอร์ (S) แคลเซียม (Ca) และคลอรีน (Cl) นอกจากนี้ยังมีโคบอล (Co) คอปเปอร์ (Cu) เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) โมลิบดินัม (Mo) และสังกะสี (Zn) แร่ธาตุที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในรูปสารอนินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 2.3 (Stanbury และคณะ, 1995)

ตารางที่ 2.3 แสดงแหล่งแร่ธาตุในการผลิตกรดโคจิก

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

ที่มา : Stanbury และคณะ (1995)

มีการนำอาหารที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) เป็นส่วนประกอบ มาใช้เพื่อผลิตกรดโคจิก ต่อมามีการค้นพบอาหารที่ใช้ผลิตกรด โคจิก คือ อาหารสูตรดัดแปลงจากอาหารเหลว Czapex-Dox ที่มีการเสริมแหล่งแร่ธาตุ ได้แก่ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) และ เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ลงในอาหารเหลว (Bentley, 1957)

May และคณะ (1931) มีการใช้แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ให้ปริมาณกรดโคจิกในอาหารสูงสุดร้อยละ 48.2 ต่อมา Tareda และคณะ (1985) ได้ศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวที่มีการเสริมแร่ธาตุคือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) และ เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 17.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 14 ในปีค.ศ. 1991 Wei และคณะ ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aspergillus candidus ในอาหารเหลว 3 ชนิดคือ อาหารสูตรดัดแปลงจากอาหารเหลว Czapek – Dox อาหารของ Tareda เสริมแร่ธาตุพวกโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์ เฟอริกคลอไรด์ และอาหาร yeast extract sucrose (YES) ไม่มีแร่ธาตุเป็นส่วนประกอบในอาหารเหลว จากการใช้อาหารทั้ง 3 ชนิดเลี้ยงเชื้อพบว่าอาหาร YES ให้กรดโคจิกสูงสุด 57-59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ในปี ค.ศ. 1992 Kwak และ Rhee ได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการเสริมแร่ธาตุพวกไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.7H_2O$) และซิงก์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) พบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกสูงสุด 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน ต่อมาได้ทำการผลิตกรดโคจิกจากการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเสริมแร่ธาตุพวกไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และเฟอรัสซัลเฟต (FeSO4.7H2O) พบว่าได้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Ogawa และคณะ, 1995)

2.4.4 การให้อากาศ

ได้มีการศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *A. flavus* Link 44-1 โดยควบคุมค่าความเครียดของออกซิเจนที่ละลาย (dissolved oxygen tension (DOT)) โดยใช้ถังหมักแบบที่มีใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ในทุกการทดลองจะกำหนดความเร็วไว้ที่ 600 รอบต่อนาที และความคุมระดับความเครียดของออกซิเจนที่ละลายให้แตกต่างกัน โดยเพิ่มอัตราการให้อากาศ การควบคุมค่าความเครียดของออกซิเจนที่ละลายเพียงช่วงเดียวที่ระดับต่างกัน 3 ระดับ (30 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ของอากาศที่อิ่มตัว) กรดโคจิกที่ผลิตได้จากการหมักที่ควบคุมระดับความเครียดของออกซิเจนที่ละลายให้อยู่ในช่วงเดียวที่ 80 เปอร์เซ็นต์นั้น จะผลิดกรดโคจิกเท่ากันกับการหมักที่ไม่มีการควบคุมค่าความเครียดของออกซิเจนที่ละลาย การลดระดับค่าความเครียดของออกซิเจนที่ละลายให้ต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์นั้นจะทำให้การผลิดกรดโคลิกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่ามวลเซลล์ชีวภาพจะเพิ่มขึ้นก็ตาม เมื่อไหร่ก็ตามที่ควบคุมค่าความเครียดของออกซิเจนที่ละลายให้มีระดับสูง (80 เปอร์เซ็นต์) ระหว่างการเจริญและลดลงเป็นระดับต่ำ (30 เปอร์เซ็นต์) ระหว่างระยะการผลิต (การควบคุมแบบ 2 ช่วง) กรดโคจิกที่ผลิต (28.9 กรัมต่อลิตร) จะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักที่ไม่ควบคุมค่าความเครียดของออกซิเจนที่ละลาย (Ariff และคณะ, 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ประโยชน์ของกรดโคจิก

2.5.1 เป็นสารปฏิชีวนะ

ในปี ค.ศ. 1913 Yabuta รายงานว่ากรดโคจิกปริมาณร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้ในปี ค.ศ. 1945 Morton และคณะ ได้ทำการศึกษาการใช้กรดโคจิกความเข้มข้นต่างๆทดสอบแบคทีเรีย 166 สายพันธุ์พบว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์ เช่น *Bacillus mycoides*, *Chromobacterium indicum*, *Clostridium novyi*, *Micrococcus roseus*, *Salmonella enteritidis* และ *Serratia marcescens* ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้กรดโคจิกเข้มข้นในอัตราส่วน 1 ใน 500 ส่วน ยังพบว่า *Leptospiracanicola* ไม่ทนกรดจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อมีกรดโคจิกเพียง 1 ใน 1 ล้านส่วน เป็นต้น ต่อมามีรายงานว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งแบคทีเรียโดยพบว่ากรดโคจิกยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบเพราะแบคทีเรียแกรมบวกจะไวต่อโซเดียมโคเจต (sodium kojate) มากกว่าแกรมลบ (Bajpai และคณะ, 1982)

มีรายงานว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน (amino acids) โดยทำการทดสอบกับตับและไตหมู จากการทดลองกรดโคจิกไปยับยั้งเอนไซม์จากตับและไตหนูจึงทำให้โปรตีนที่หนูรับประทานเข้าไปไม่สามารถย่อยสลายไปเป็นกรดอะมิโนและไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เพราะโปรตีนจะถูกย่อยสลายได้ต้องอาศัยเอนไซม์ที่สร้างขึ้นจากกระเพาะและตับอ่อนจึงสามารถย่อยสลายให้เป็นกรดอะมิโนได้ต่อมามีการค้นพบว่ากรดโคจิกสามารถต้านการเกิดปุ่มหรือตุ่มของวัณโรค (tubercle) โดยทำการทดสอบกับแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่ทำให้เกิดวัณโรค โดยใช้กรดโคจิก 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร ต่อมาได้มีการค้นพบว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งการสังเคราะห์กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) หรือวิตามินซีในสัตว์ทดลอง ทำให้หลอดเลือดเปราะและเกิดโรคลักปิดลักเปิด (scurvy) เพราะไม่มีเอนไซม์กลูโคโนแล็กโทนออกซิเดส (L-gluconolactone oxidase) ที่ใช้ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแอสคอร์บิก (Bajpai และคณะ, 1982)

2.5.2 เป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

ในปี ค.ศ. 1990 Kayahara และคณะ มีรายงานว่ากรดโคจิกสามารถต้านกิจกรรมของแบคทีเรียพวก *Staphylococcus aureus* 209 P. ต่อมาพบว่ากรดโคจิกต้านการเจริญของเชื้อราพวก *Pythium graminicola*, *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำลายเมล็ดธัญพืช ถั่วและฝักมะขามเทศ

2.5.3 ใช้ในอุตสาหกรรมเคมี

กรดโคจิกมีคุณสมบัติเป็นเรซินสังเคราะห์ใช้เป็นสารสำหรับวิเคราะห์ธาตุต่างๆ เช่น เหล็ก ทองคำ สังกะสี และวานาเดียม (Bajpai และคณะ, 1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4 ใช้เป็นส่วนผสมในยา

ได้มีการนำกรดโคจิกมาใช้บรรเทาอาการปวดและป้องกันการอักเสบของแผล (Kayahara และคณะ, 1990)

2.5.5 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

2.5.5.1 ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล การเกิดสีน้ำตาลเกิดจากปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เกี่ยวข้อง เช่น เมื่อผักหรือผลไม้มีรอยตำหนิเสียหายซึ่งเกิดจากรอยช้ำ รอยปอก หั่นแช่แข็ง หรือเป็นโรค ส่วนของเนื้อเยื่อที่มีตำหนิซึ่งมีเอนไซม์อยู่เมื่อถูกอากาศจะเกิดเป็นรอยช้ำสีน้ำตาลขึ้น เอนไซม์ซึ่งเรียกชื่อรวมว่าฟีนอลเลส (phenolase) ซึ่งกรดโคจิกนั้นช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลนี้ได้

Uchino และคณะ (1988) รายงานว่ากรดโคจิกสามารถป้องกันรอยด่างได้โดยทดสอบกับแป้งสาลีจะเกิดการเปลี่ยนสีขึ้นระหว่างการเก็บรักษาก่อนที่จะนำไปผลิตเส้นบะหมี่ ซึ่งสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นเรียกว่า รอยด่าง (speck)

2.5.5.2 อนุพันธ์ของกรดโคจิกที่มีชื่อว่า มอลทอล (maltol ; 3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone) และเอทิลมอลทอล (ethylmaltol ; 3-hydroxy-2-ethyl-4-pyrone) มีคุณสมบัติในการเพิ่มกลิ่นรสให้กับอาหารที่ต้องการกลิ่นผลไม้ประเภทเบอร์รี่ ลูกกวาดกลิ่นผลไม้ต่างๆ และในเครื่องดื่มจำพวก เหล้า เบียร์ ไวน์ ไอศกรีม เป็นต้น (กล้าณรงค์ และจุนทนี , 2540)

2.5.6 ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

โดยใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ซึ่งทำหน้าที่ขัดผิวหรือทำให้ผิวขาวขึ้น (whitenning) และสามารถป้องกันแสงอัลตราไวโอเลตจากแสงแดด (Ohyama และ Mishima, 1990) ต่อมาได้มีการศึกษาการใช้กรดโคจิกในผลิตภัณฑ์รักษาผิว โดยใช้กรดโคจิกร้อยละ 1 เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ ทำหน้าที่เป็นตัวเปลี่ยนเม็ดสีผิว (skin-depigmenting) ทำให้ผิวขาวขึ้น ในทางการค้ามีการนำกรดโคจิกมาใช้ในผลิตภัณฑ์รักษาผิวตั้งแต่ปี ค.ศ. 1988 เป็นต้นมา (Nakagawa และ Kawai, 1995)

2.6 ความเป็นพิษของกรดโคจิก

ในปี ค.ศ. 1934 Friedeman ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของกรดโคจิกโดยใช้สุนัขเป็นสัตว์ทดลอง ทำการฉีดกรดโคจิกปริมาณ 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้สุนัขมีอาการน้ำลายฟูมปากอาเจียน ความดันเลือดสูง เกิดการง่วงนอนตลอดเวลาและอาจเกิดความพิการหรือผิดปรกติ ต่อมามีรายงานว่ามีการใช้เม็ดเลือดขาว (leucocytes) ทดลองโดยฉีดสารละลายโซเดียมโคเจต (sodium kojate) เข้มข้นร้อยละ 1 พีเอช 6.8 พบว่าเม็ดเลือดขาวถูกฆ่าภายในเวลา 3 ชั่วโมง ต่อมามีการทดลองกับเอมบริโอลูกไก่อายุ 12 วัน โดยฉีดกรดโคจิกปริมาณ 12 มิลลิลิตรต่อ 100 กรัมของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหนักไข่ พบว่าทำให้เอมบริโอลูกไก่อ่อนแอลง (Bajpai และคณะ, 1982) Morton และคณะ (1954) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของกรดโคจิกโดยใช้หนูเป็นสัตว์ทดลองทำการฉีดสารละลายกรดโคจิก (กรดโคจิกร้อยละ 5 เตรียมโดยละลายกรดโคจิก 5 กรัมในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 100มิลลิลิตร) ปริมาณ 30 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักหนู 17 กรัมพบว่าทำให้เยื่อกระเพาะหนูเกิดการอักเสบ

ผลเสียของเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. ที่มีต่อมนุษย์ การบุกรุกของ *Aspergillus* spp. พบในปอดและไซนัส นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถบุกรุกอวัยวะอื่นๆ ได้อีกด้วย เช่น สมอง และแพร่กระจายไปยังผู้ป่วยกลุ่มอื่นอีกด้วย การรักษานั้นเป็นเรื่องยาก พบว่าผู้ป่วย 1 ใน 25 คนที่เสียชีวิตในโรงพยาบาลที่ทันสมัยในยุโรป ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยที่เพิ่งได้รับการปลูกถ่ายอวัยวะ ผู้ป่วยโรคเอดส์ และผู้ที่ได้รับการรักษาโดยใช้สเตียรอยด์ มีอาการปอดบวมหรือไซนัสที่มีสาเหตุมาจาก *Aspergillus* spp. แต่หมอนที่ใช้ในโรงพยาบาลนั้นถูกครอบด้วยพลาสติก ซึ่งไม่น่าเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรค ผู้ป่วยจะถูกคุกคามจากโรคเมื่อกลับไปที่พักอาศัยเมื่อใช้หมอนใบเก่าที่มีเชื้อราปนเปื้อน ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดความเสี่ยงในการติดเชื้อ *Aspergillus* spp. นอกจากนี้ยังทำให้อาการหอบหืดแย่ลงไปได้อีกด้วย โดยเฉพาะผู้ใหญ่ที่มีอาการหอบหืดมาหลายปี และยังก่อให้เกิดอาการไซนัสควบคู่ไปกับอาการแพ้ที่รุนแรง เชื้อรายังสามารถเข้าไปยังช่องปอดของผู้ป่วยวัณโรคได้อีกด้วย ทำให้เกิดอาการเลือดออกในปอดและก่อให้เกิดโรคในพืชและสัตว์ได้อีกด้วย (www.sciencedaily.com)

เชื้อรา *Aspergillus* spp. บางสายพันธุ์สามารถสร้างสารพิษที่เรียกว่า อะฟลาทอกซิน ซึ่งสารพิษนี้ชักนำให้เกิดมะเร็งตับ เชื้อราชนิดนี้สามารถเกิดขึ้นได้ในอาหารบางอย่างซึ่งเก็บไม่ถูกวิธีและมีความชื้น เช่น ถั่ว พริกป่น ข้าวโพด ข้าวสาร เป็นต้น การศึกษาจากประเทศจีนตอนใต้พบว่าการเกิดมะเร็งตับในผู้ป่วยที่เป็นตับอักเสบแบบบีเรื้อรังในหมู่บ้านที่มีสารอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในอาหารสูงกว่ากลุ่มประชากรที่เป็นตับอักเสบแบบบีเรื้อรัง ที่บริโภคอาหารที่ไม่ได้ปนเปื้อนด้วยสารอะฟลาทอกซินอย่างชัดเจน (www.healthnet.in.th)

2.7 การตรึงเซลล์

2.5.1 ความหมายและประวัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงหมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขต หรือสถานที่ทางฟิสิกส์ให้อยู่ในบริเวณซึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำมาใช้ซ้ำได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์ที่กำลังเจริญ เซลล์ระยะพัก หรือเซลล์ที่ตายแล้ว (Chibata และคณะ, 1978)

การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงได้มีการศึกษามานานแล้ว โดยในปี ค.ศ. 1823 Schuetzenbach ได้ทำการผลิตน้ำส้มสายชูแบบรวดเร็ว โดยใช้ฟิล์มเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดอยู่บนเศษไม้เลื่อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากนั้นไม่มีผู้สนใจ จนกระทั่งประมาณปี ค.ศ. 1971 จึงได้เริ่มมีการสนใจอย่างจริงจังอีกครั้งหนึ่ง จนสามารถนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม เช่น การกำจัดน้ำเสียแบบ activated sludge และ Trickling filter นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการกำจัดแร่ที่มีคุณภาพต่ำในเหมืองแร่(Abbott, 1977)

ปี ค.ศ. 1973 Chibata และ Tosa ศึกษาและประสบความสำเร็จในการผลิตกรดแอล-แอสปาร์ติกแบบต่อเนื่องในระดับอุตสาหกรรมโดยใช้เซลล์ *Escherichia coli* ที่ถูกตรึงด้วยสารโพลีอะครีลาหมีด (polyacrylamide) นับเป็นอุตสาหกรรมแห่งแรกของโลกที่ใช้เซลล์ที่ถูกตรึง (Chibata and Tosa, 1977)

2.5.2 การเปรียบเทียบข้อดีข้อเสียของการตึงเซลล์กับวิธีอื่นๆ (Cheetham, 1980)

เซลล์ที่ถูกตรึงจัดเป็นตัวเร่งทางชีวเคมีชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ และมีข้อได้เปรียบหลายอย่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวเร่งหรือวิธีอื่นๆ

2.5.2.1 การเปรียบเทียบกับตัวเร่งทางเคมี เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับตัวเร่งทางเคมี คือ สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะปกติ และใช้พลังงานต่ำ ปฏิกิริยามีความจำเพาะและเกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราที่สูง ปัญหาการเกิดมลภาวะมีน้อย แต่เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียบางประการ คือ ต้องการสารประกอบเชิงซ้อน เช่น โคแฟคเตอร์ต่างๆในการเกิดปฏิกิริยา และมีความคงทนน้อยกว่าตัวเร่งทางเคมี

2.5.2.2 การเปรียบเทียบกับเซลล์หรือเอนไซม์อิสระ เซลล์ที่ถูกตรึงได้เปรียบกว่าเซลล์หรือเอนไซม์อิสระ คือ สามารถใช้เซลล์จำนวนมากๆศึกษาในถังปฏิกิริยาขนาดเล็กได้ ในการผลิตควบคุมปฏิกิริยาได้ง่าย สามารถแยกผลผลิตได้สะดวก และไม่มีปัญหาการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงทนสูง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้ลดต้นทุนการผลิตได้มาก แต่การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียคือ เสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์ และอาจสูญเสียความสามารถระหว่างการตรึงได้

2.5.2.3 การเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึง การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบกว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่ขบวนการผลิตนั้นต้องใช้ระบบเอนไซม์หลายชนิด โคแฟคเตอร์ และสารพลังงานสูงอื่นๆ นอกจากนี้การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงไม่ต้องใช้ขบวนการสกัดและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เป็นผลให้เอนไซม์ยังคงประสิทธิภาพสูง ทำให้ผลผลิตเพิ่มสูงขึ้นและเป็นการลดค่าใช้จ่ายด้วย แต่การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ เซลล์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ที่ไม่ต้องการออกมายับยั้งผลผลิตได้ และเซลล์ที่ถูกตรึงยังถูกจำกัดการซึมผ่านเข้าออกของสับสเตรทและผลผลิตโดยสารที่ใช้ตรึงเซลล์ (Abbott, 1977 ; Chibata และคณะ, 1978 ; Cheetham, 1980) นอกจากนี้อาจพบการปนเปื้อนของผลผลิตจากตัวเซลล์ หรือสารที่ถูกขับออกจากเซลล์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเองเนื่องจากเซลล์ถูกใช้เป็นเวลานาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

83744

หรือเซลล์รั่วไหลเนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงมีการเจริญเพิ่มจำนวน (Cheetham และคณะ, 1979 ; White และ Portno, 1978)

2.5.3 คุณสมบัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

2.5.3.1 ความจำเพาะต่อองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการผลิต เซลล์ที่ถูกตรึงจะมีความจำเพาะต่อองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงแตกต่างจากเซลล์อิสระ เนื่องจากสารตัวนำเป็นอุปสรรคต่อการซึมผ่านเข้าออกของสารอาหารและผลผลิต ในกรณีองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงโมเลกุลสูงความสามารถของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมักจะลดต่ำลงด้วย (Chibata และคณะ, 1978)

2.5.3.2 ความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง เมื่อเปรียบเทียบความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงอาจเปลี่ยนแปลงไปทางด้านความเป็นกรด ความเป็นด่าง หรือไม่เปลี่ยนแปลงเลย

2.5.3.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง เซลล์ที่ถูกตรึงมักมีความคงทนต่อความร้อนได้ดีกว่าเซลล์อิสระ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึงมักมีค่าสูงกว่าเซลล์อิสระ

2.5.3.4 ความคงตัวของเซลล์ที่ถูกตรึง มีความคงทนใช้งานได้สูงกว่าเซลล์อิสระคือสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ นอกจากนี้เซลล์ที่ถูกตรึงมีความสามารถทนต่อสารเคมีและการเสื่อมสภาพทางฟิสิกส์ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ (Cheetham และคณะ, 1979)

2.5.4 วิธีการตรึงเซลล์แบบต่างๆ

วิธีการตรึงจุลินทรีย์มีวิธีคล้ายกับการตรึงเอนไซม์ แบ่งออกเป็น 3 วิธีใหญ่ๆ ได้แก่ การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking method) และการห่อหุ้ม (entrapping method)

2.5.4.1 การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding) วิธีนี้ยังแบ่งออกเป็น 2 วิธีย่อยคือ

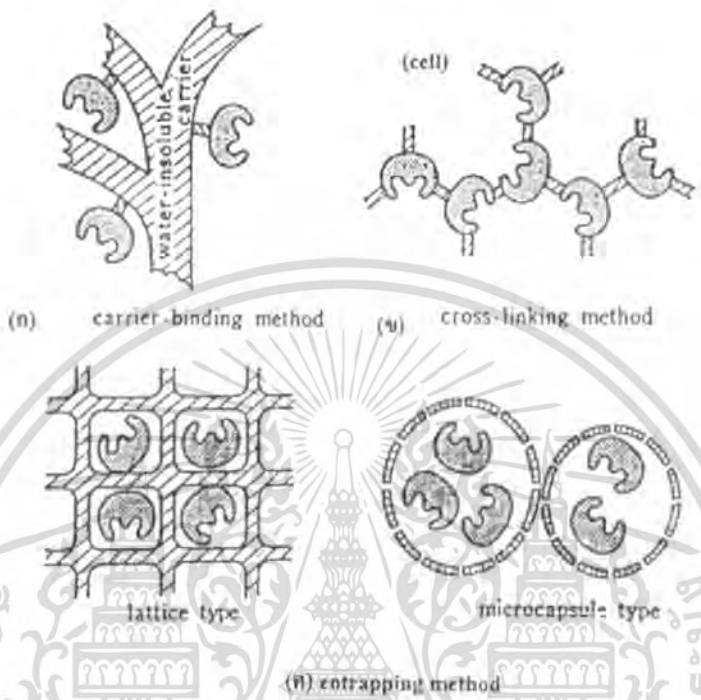
1) การดูดซับ (adsorption) การตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยตรงกับตัวนำไม่ละลายน้ำด้วยแรงอิออนนิก แรงดูดซับอย่างอ่อนๆ ตัวนำที่ใช้มีทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ เช่น การแลกเปลี่ยนอิออน (ion-exchange resin) ดีอีเอดี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose) โดเว็กซ์-1 (Dowex-1) โพลีไวนิลคลอไรด์ (polyvinyl chloride) ลูกแก้วรูพรุน (porecus glass) เป็นต้น

การตรึงด้วยวิธีนี้มีข้อดี คือ วิธีการตรึงทำได้ง่าย เซลล์จุลินทรีย์เจริญแบ่งตัวบนสารตัวนำได้ แต่มีข้อเสีย คือแรงยึดระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับสารตัวนำไม่แข็งแรง เซลล์หลุดออกปะปนกับผลผลิตได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของอิออน และอัตราการไหล (Cheetham, 1980)

2) การยึดด้วยแรงโควาเลนท์ (covalent coupling) เป็นวิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์กับสารตัวนำที่ถูกเร่ง โดยวิธีการแชร์ประจุระหว่างสารตัวนำกลุ่มต่างๆ เช่น กลุ่มอะมิโน ซัลฟาไฮดริล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอกซิล ไฮดรอกซิล อิมิดาโซล หรือกลุ่มฟีนอลของโปรตีนบนผิวเซลล์ (Cheetham, 1980) การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้มีข้อดี คือ แรงยึดเหนี่ยวกับสารตัวนำแข็งแรง แต่เป็นวิธีที่ไม่ค่อยนิยมเนื่องจากสารตัวนำที่ใช้ยึดส่วนใหญ่เป็นสารพิษ (Koshcheenko, 1981)



รูปที่ 2.3 รูปแบบการตรึงเซลล์จุลินทรีย์
ที่มา : Chibata และคณะ (1978)

2.5.4.2 การเชื่อมแบบไขว้ (cross-linking) เป็นวิธีเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์เข้าด้วยกันโดยใช้สารเคมี เช่น กลูทาร์รัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) โทลูอีน (toluene) ไดโอโซไซยาเนท (diisocyanate) การตรึงด้วยวิธีนี้แรงยึดระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับสารตัวเชื่อมแข็งแรง แต่วิธีการตรึงเซลล์มีความรุนแรงทำให้เซลล์สูญเสียกิจกรรมง่าย

2.5.4.3 การห่อหุ้ม (entrapping) วิธีนี้แบ่งย่อยออกเป็น 2 วิธี คือ

1) การห่อหุ้มแบบไมโครแคปซูล (microcapsule) หมายถึงการห่อหุ้มเซลล์ด้วยโพลีเมอร์เยื่อบางกึ่งซาบซึมได้ เช่น คอลลอเดียน (collodian) หรือ ซิลิโคน (silocone) สารอาหารและผลผลิตสามารถซึมผ่านได้อย่างอิสระ แต่มีข้อเสียคือเซลล์ที่ถูกตรึงในแคปซูลมีความเปราะไม่เหมาะนำมาใช้ในการอุตสาหกรรม ส่วนมากนำมาใช้ในการผลิตยารักษาโรค และงานวิเคราะห์ทั่วไป (Cheetham, 1980)

2) การห่อหุ้มแบบร่างแห (lattice) คือ การห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์ด้วยสารโพลีเมอร์ที่ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ (matrix) วิธีนี้นิยมใช้กันมากที่สุด สารที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ได้แก่ คอลลาเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(collagen) เซลลูโลส (cellulose) วุ้น (agar) คาร์ราจิแนน (carrageenan) เจลาติน (gelatin) แอลจิเนท (alginate) โพลีอะครีลาหมีด (polyacrylamide) โพลีสไตริน (polystyrene) และสารโพลีเมอร์อื่นๆ (Chibata และคณะ, 1978)

2.5.5 คุณสมบัติของแอลจิเนทและการใช้ประโยชน์

กรดแอลจินิก เป็นสารที่สกัดจากสาหร่ายสีน้ำตาลเช่น *Ascophyllum* เป็นต้น มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นโพลีเมอร์ร่วมของ D-mannuronic acid และ L-guluronic acid กรดแอลจินิกไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารละลายต่างๆ (โลหะไฮดรอกไซด์ หรือ คาร์บอเนท) เกิดเป็นเกลือแอลจิเนท ทำให้สารละลายมีลักษณะเหนียว อิออนของโลหะพวกโพลีวาเลนท์ เช่น แคลเซียมอิออน อะลูมิเนียมอิออน เมื่อทำปฏิกิริยากับแอลจิเนททำให้เกิดผลิตภัณฑ์ไม่ละลายน้ำมีลักษณะเป็นเจลแข็งหรือแผ่นฟิล์ม (Cheetham และคณะ, 1979)

คุณสมบัติความแข็งของแอลจิเนท เกี่ยวข้องกับปริมาณและการกระจายตัวของกรดแมนนูโรนิก และกรดกูลูโรนิก แอลจิเนทที่ประกอบด้วยโพลีเมอร์ของกูลูโรนิกในปริมาณสูงจะมีความแข็งของเจล (gel strength) สูง นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของสารละลายอิออนที่ใช้ในการเกิดเจลมีผลต่อความแข็งของเจลด้วย (Cheetham และคณะ, 1979) ในการตรึงเซลล์ โดยวิธีห่อหุ้มเซลล์ด้วยแอลจิเนท เซลล์จะแทรกอยู่ในช่องว่างของเจลโดยที่เจลมีรูพรุนขนาดใหญ่อยู่มากมาย สับสเตรทและผลผลิตสามารถซึมผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ แต่สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 5,000 จะมีอุปสรรคในการส่งผ่านเข้าออกภายในเจลเล็กน้อย (Kierstan and Bucke, 1977) ข้อดีของการตรึงเซลล์ด้วยแอลจิเนท คือวิธีการตรึงทำได้ง่าย โดยนำเซลล์มาผสมกับสารละลายโซเดียมแอลจิเนทแล้วผ่านลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เจลจะเกิดขึ้นทันที เจลที่ได้ควรแช่ในสารละลายเกลือคลอไรด์อย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เจลมีความแข็งคงทนมากขึ้น เจลที่ได้จะสามารถทนต่อแรงดันในคอลัมน์ได้ดี ขนาดของเม็ดเจลไม่มีผลต่ออัตราการไหลของสารคีเลทติ้ง (chelating agent) เช่น ฟอสเฟต อีดีทีเอ เป็นต้น และสามารถถูกแทนที่ด้วยประจุบวกอื่นๆ เช่น MG^{++}, K^{+}, Na^{+} ซึ่งคุณสมบัตินี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาตรวจนับการเจริญของเซลล์ในเจลได้ นอกจากนี้พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนทมีการแบ่งเซลล์ได้ภายในเจล และอาจหลุดรั่วออกนอกเจลได้ (Kierstan และ Bucke, 1977; Cheetham และคณะ, 1979) สำหรับการแก้ไขปัญหาการละลายของเจลเมื่อมีสารคีเลทติ้งนั้น ทำได้โดยใช้สตรอนเซียมหรือแบเรียมแทนแคลเซียมจะทำให้เกิดเจลที่มีความคงตัวมากกว่า (Paul และ Vignais, 1980) แต่ไม่เป็นที่ยอมรับในกรณีที่ผลผลิตที่ได้เกี่ยวข้องกับการใช้ในอาหาร

ปกติแอลจิเนทจะถูกนำมาใช้ในอุสาหกรรมอาหารทำให้สารละลายข้นและคงตัว ปัจจุบันใช้เป็นสารตัวนำในการตรึงเอนไซม์ เซลล์จุลินทรีย์ คลอโรพลาส ไมโตคอนเดรีย (Kierstan และ Bucke, 1977) และเนื้อเยื่อพืช (Brodelius และคณะ, 1979) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์จุลินทรีย์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถูกตรึงด้วยแอลจิเนทนิยมใช้ศึกษาประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์หลายชนิดในเซลล์กันมาก เช่น การย่อยสลายฟีนอล การผลิตแอลกอฮอล์ สารปฏิชีวนะ สเตอรอยด์ เป็นต้น และยังสามารถใช้สำหรับการจัดแต่งทรงผม ให้ทำเหยื่อปลอม เช่น ปลา และหอย ช่วยในการย้อมสีเส้นใย และยังใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ดูแลรักษาบำรุง เช่น แชมพู เครื่องสำอาง สบู่เจล (Mitchell, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) ; Hirayama รุ่น HA-300 MIV

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ; New Brunswick Scientific

ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina air flow) ; ISSCO รุ่น BVT 123

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ; Unico รุ่น 2800A

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) ; Nikon

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH Meter) ; Eutech

เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) ; Kiko works รุ่น MS-1

เครื่องชั่งละเอียด 3 ตำแหน่ง ; Libror รุ่น EB-4000H

เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ; Sartorius analytic รุ่น A2005

ชุดกรองสุญญากาศ ; Wheaton

ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ; BOECO

ไมโครปิเปต (Micropipet) ; Mainin

คิวเวทแก้ว

กระดาษกรองเบอร์ 1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 55 มิลลิเมตร ; Whatman NO.1

ฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร (Flask)

เครื่องแก้วชนิดต่างๆ

3.1.2 สารเคมี

น้ำตาลกลูโคส ; APS

โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ; Ajax Finechem

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ; Sigma

ยีสต์สกัด (yeast extract) ; Schalua

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ; Carlo Erba

เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ; Ajax Finechem

อาหาร PDA สำเร็จรูป ; Himedia

กรดโคจิก ; Sigma

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โซเดียมอัลจิเนต (Alginic acid sodium salt) ; Fluka

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ; Merck

ดีเอ็นเอส (3,5-Dinitrosalicylic acid) ; Fluka

3.1.3 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ได้แก่ เชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บนอาหารวุ้นเอียง PDA ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 4 เดือน

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1 มาเลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำมาเตรียมเป็นสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) โดยเติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อที่มี Tween 80 เข้มข้นร้อยละ 0.01 ลงไป ขูดสปอร์ด้วยช้อนสแตนเลสด้ามยาวและกรองเอาสารแขวนลอยสปอร์ผ่านสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำสารละลายมาตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ตามวิธีในภาคผนวก ข.3

3.2.2 การตรึงเซลล์

นำสปอร์ที่ได้จากข้อ 3.2.1 ไปเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงจาก อภิชญา (2548) (ภาคผนวก ก.2) ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปผสมกับสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 60 มิลลิลิตร โดยปรับให้จำนวนเซลล์เริ่มต้นในสารละลายเท่ากับ 10^8 10^9 และ 10^{10} เซลล์ต่อ 100 มิลลิลิตรของสารละลายอัลจิเนต หลังจากนั้นนำไปขึ้นรูปโดยเข็มฉีดยา โดยหยดลงในสารละลาย $CaCl_2$ 0.05 M ทิ้งไว้ให้เม็ดบีดแข็งตัวแล้วกรองเอาเม็ดบีดออกจากสารละลาย (Reyes และคณะ, 2006)

รูปที่ 3.1 ลักษณะเม็ดบีดที่ได้จากการตรึงเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การศึกษาปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิก

เตรียมอาหารสูตรดัดแปลงจาก อภิชญา (2548) (ภาคผนวก ก.2) โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร จากนั้นปรับพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นให้เท่ากับ 4.0 นำอาหารใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 60 มิลลิลิตร ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่ออาหารเย็นแล้วทำการเติมเม็ดบีทลงในแต่ละฟลาสก์ จำนวน 40 เม็ด โดยมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 1.5×10^5 1.5×10^6 และ 1.5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อตรวจพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด แต่ละชุดการทดลองทำ 2 ซ้ำ เลือกปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดไปศึกษาต่อ

3.2.4 การศึกษาจำนวนเม็ดบีดที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิก

ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2.3 หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเติมเม็ดบีดที่ตรึงเซลล์โดยให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.3 ลงในอาหารเหลวที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์จำนวน 40 60 และ 80 เม็ดต่อฟลาสก์ แต่ละชุดการทดลองทำ 2 ซ้ำ ทำการบ่มและเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาค่าต่างๆตามวิธีในข้อ 3.2.3

3.2.5 การศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2.3 โดยใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆกันคือ 60 70 และ 80 กรัมต่อลิตร หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใส่เม็ดบีดจำนวนที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.2.4 ลงในอาหารเหลวที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ แต่ละชุดการทดลองทำ 2 ซ้ำ ทำการบ่มและเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาค่าต่างๆตามวิธีในข้อ 3.2.3

3.2.6 การศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์อิสระของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1

เตรียมอาหารที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลอง ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และโซเดียมไนเตรท 2.5 กรัมต่อลิตร จากนั้นปรับพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นให้เท่ากับ 4.0 นำอาหารใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 60 มิลลิลิตร แต่ละชุดการทดลองทำ 2 ซ้ำ หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อเมื่ออาหารเย็นแล้วใส่เม็ดบีดที่ตรึงเซลล์ซึ่งมีจำนวนเซลล์เริ่มต้นและจำนวนเม็ดบีดที่เหมาะสมลงในฟลาสก์ ส่วนเซลล์อิสระทำการเติมสปอร์เริ่มต้นให้มีจำนวนเท่ากับเซลล์ที่ถูกตรึง ทำการบ่มและเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาค่าต่างๆตามวิธีในข้อ 3.2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีการวิเคราะห์

3.3.1 การวิเคราะห์กรดโดจิก (ภาคผนวก ข.1)

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ภาคผนวก ข.2)

3.3.3 การนับจำนวนเซลล์ (ภาคผนวก ข.3)

3.3.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

โดยใช้วิธีการวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

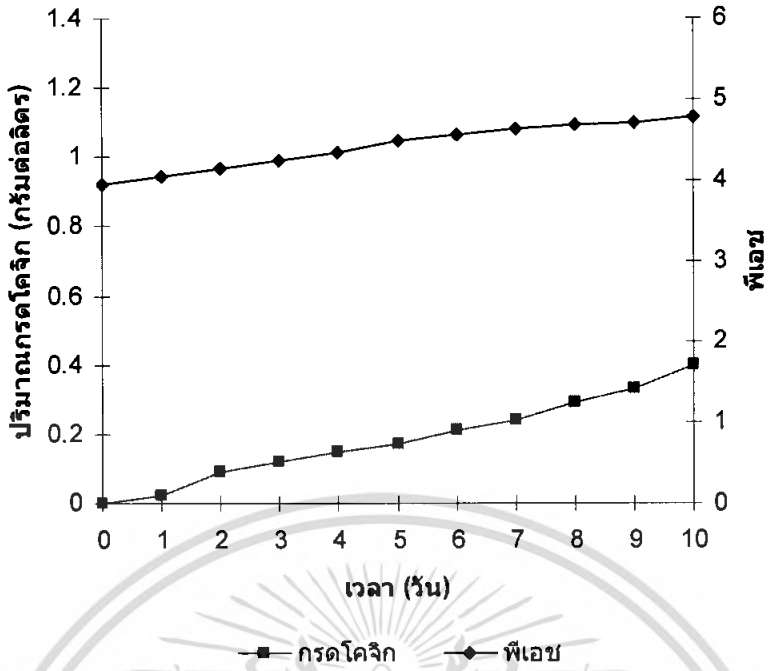
บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิก

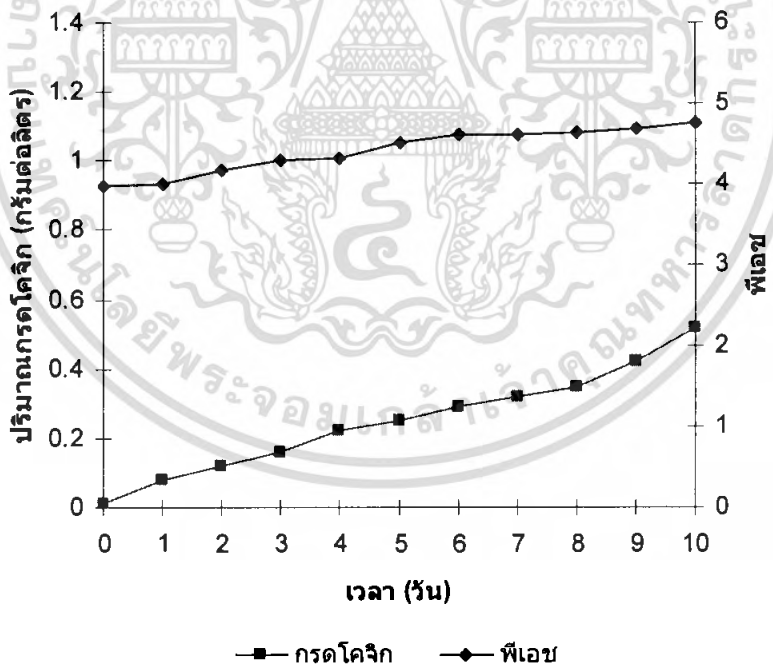
ผลการศึกษาปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหารสูตรดัดแปลงของ อภิชญา (2548) โดยใช้ปริมาณเซลล์แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ $1.5x10^5$ $1.5x10^6$ และ $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และใช้จำนวนเม็ดบีดเท่ากับ 40 เม็ดต่อฟลาสก์ อาหารเหลวที่ใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $1.5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 10 วัน พบว่าปริมาณกรดโคจิกสะสมสูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 0.40 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรดโคจิกนั้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวันแรกค่าพีเอชเริ่มต้น คือ 3.96 และเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 10 คือ 4.77 และเมื่อพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีปริมาณลดลงจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ 4.10 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.1) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณหาอัตราการผลิตกรดโคจิกและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.040 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.007 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

สำหรับอาหารเหลวที่ใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $1.5x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 10 วัน พบว่าปริมาณกรดโคจิกสะสมสูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 0.52 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรดโคจิกนั้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวันแรกค่าพีเอชเริ่มต้น คือ 3.98 และเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 10 คือ 4.75 และเมื่อพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีปริมาณลดลงจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ 1.26 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.1) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณหาอัตราการผลิตกรดโคจิกและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.052 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.009 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

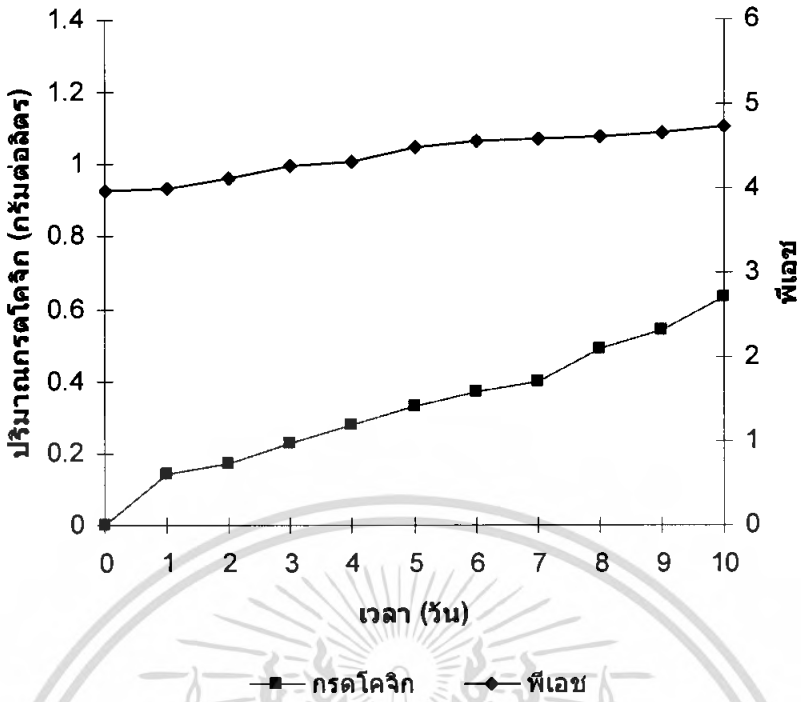


รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.5x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

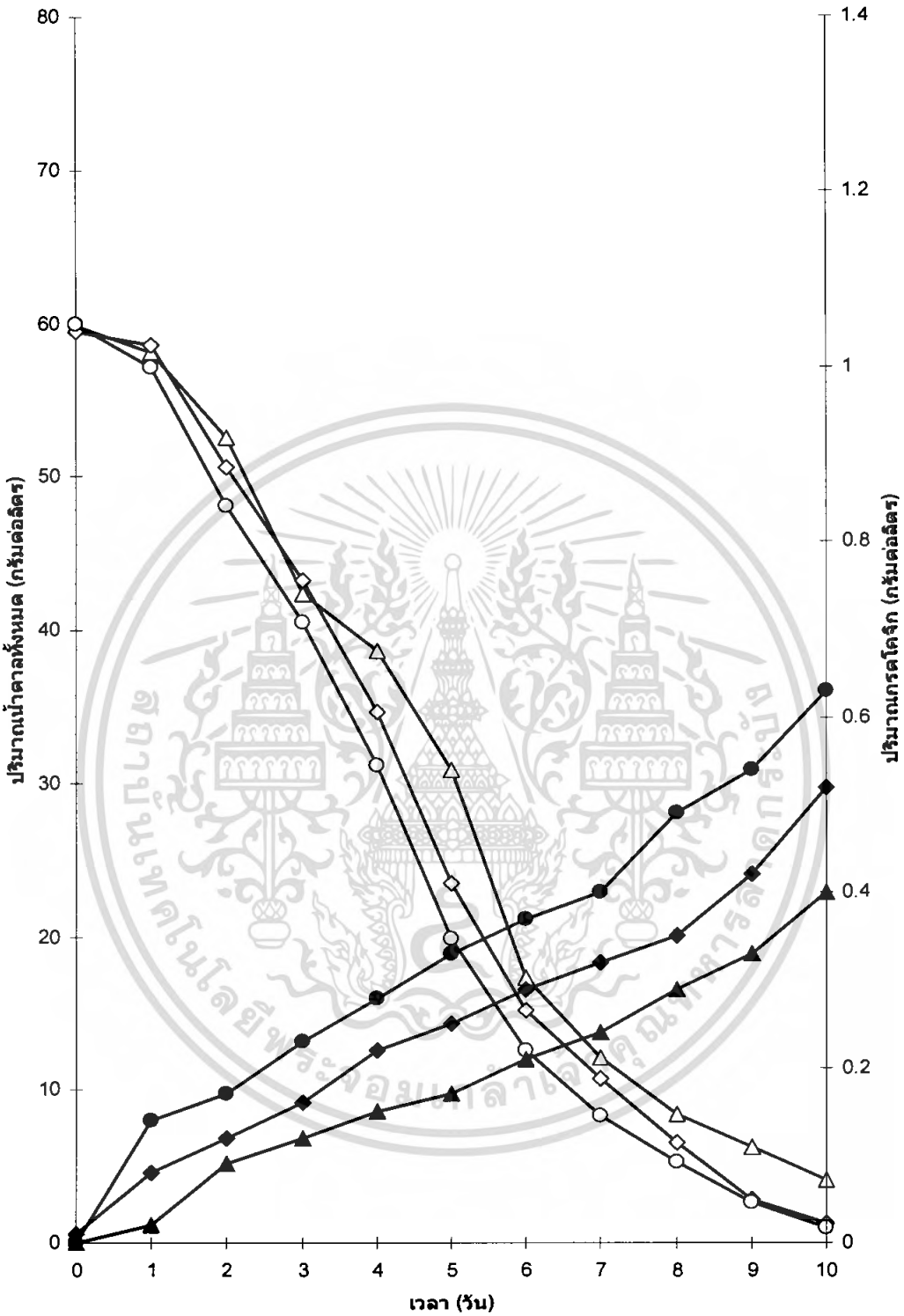


รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

สำหรับอาหารเหลวที่ใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ 60 มิลลิลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 10 วัน พบว่าปริมาณกรดโคจิกสะสมสูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 0.63 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรดโคจิกนั้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวันแรกค่าพีเอชเริ่มต้น คือ 3.97 และเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 10 คือ 4.73 และเมื่อพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีปริมาณลดลงจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ 1.02 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.1) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณหาอัตราการผลิตกรดโคจิกและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.063 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.011 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นทั้ง 3 ระดับทางสถิติ พบว่า การใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ผลการผลิตกรดโคจิกดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณกรดโคจิกและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเมื่อใช้เซลล์เริ่มต้นต่างๆกัน

เซลล์เริ่มต้น 1.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร : —▲— กรดโคจิก —△— น้ำตาลทั้งหมด

เซลล์เริ่มต้น 1.5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร : —◆— กรดโคจิก —◇— น้ำตาลทั้งหมด

เซลล์เริ่มต้น 1.5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร : —■— กรดโคจิก —○— น้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว โดยใช้ปริมาณเซลล์ในระดับต่างกัน

ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	เวลา (วัน)	พีเอช	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
1.5×10^5	0	3.96	59.88	0.00
	1	4.05	58.13	0.02
	2	4.14	52.51	0.09
	3	4.25	42.36	0.12
	4	4.34	38.62	0.15
	5	4.48	30.88	0.17
	6	4.56	17.35	0.21
	7	4.63	12.10	0.24
	8	4.68	8.36	0.29
	9	4.71	6.21	0.33
	10	4.77	4.10	0.40
1.5×10^6	0	3.98	59.46	0.01
	1	4.01	58.60	0.08
	2	4.16	50.61	0.12
	3	4.29	43.21	0.16
	4	4.31	34.63	0.22
	5	4.52	23.46	0.25
	6	4.60	15.21	0.29
	7	4.62	10.69	0.32
	8	4.64	6.51	0.35
	9	4.68	2.87	0.42
	10	4.75	1.26	0.52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	เวลา (วัน)	พีเอช	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
1.5×10^7	0	3.97	59.92	0.00
	1	4.01	57.10	0.14
	2	4.11	48.12	0.17
	3	4.26	40.51	0.23
	4	4.32	31.16	0.28
	5	4.48	19.81	0.33
	6	4.57	12.57	0.37
	7	4.59	8.31	0.40
	8	4.62	5.24	0.49
	9	4.66	2.67	0.54
	10	4.73	1.02	0.63

ตารางที่ 4.2แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้ปริมาณเซลล์ที่ระดับต่างกัน

ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	อัตราการผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	ผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาล (กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล)
1.5×10^5	0.040	0.007
1.5×10^6	0.052	0.009
1.5×10^7	0.063	0.011

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราที่ถูกตรึงเมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นต่างกัน

ปริมาณเซลล์ (เซลล์ต่อมิลิลิตร)	1.5×10^5	1.5×10^6	1.5×10^7
ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	0.40^c	0.52^b	0.63^a

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันแสดงว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นต่างกันจะเห็นได้ว่าเชื้อรามีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยให้ปริมาณกรดโคจิกสะสมเท่ากับ 0.63 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.063 กรัมต่อลิตรต่อวัน และมีผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.011 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล รองลงมาคือการทดลองที่ใช้ปริมาณปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.5x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยให้ปริมาณกรดโคจิกสะสมเท่ากับ 0.52 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.052 กรัมต่อลิตรต่อวัน และมีผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.009 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล และการทดลองที่ใช้ปริมาณปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยให้ปริมาณกรดโคจิกสะสมเท่ากับ 0.40 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.040 กรัมต่อลิตรต่อวัน และมีผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.007 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล จะเห็นได้ว่าการใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถผลิตกรดโคจิกได้มากกว่าการใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.5x10^6$ และ$1.5x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร อยู่ 1.21 และ 1.58 เท่า ตามลำดับ จึงเลือกใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

เมื่อใช้ปริมาณเซลล์เพิ่มมากขึ้นการผลิตกรดโคจิกก็จะเพิ่มสูงขึ้นเนื่องมาจากปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดโคจิกมากขึ้น จึงมีการสะสมกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ Ariff และคณะ (1997) ซึ่งได้ทำการทดลองโดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ในระดับต่างๆเท่ากับ 3.36 7.39 19.2 และ26.1 กรัมต่อลิตรในระบบที่มีการแขวนลอยเซลล์ใหม่ โดยมีปริมาณกรดโคจิกสะสมสูงสุดเท่ากับ 36.3 45.3 47.5 และ 48.1 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จากการทดลองจะเห็นได้ว่าถ้าเพิ่มมวลเซลล์ที่เหมาะสมจะทำให้ความสามารถในการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้น การใช้เซลล์ที่มีจำนวนมากจะช่วยเพิ่มการผลิตกรดโคจิกให้สูงขึ้น ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ รพี (2539) ที่ทำการศึกษาความเข้มข้นของหัวเชื้อที่ใช้ผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่า พบว่าขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมกับการผลิตคือ 4-$8x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

จากรายงานของ Sushil และคณะ (2004) ที่ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดออกซาลิคจากกลูโคสโดย *Aspergillus niger* ที่ถูกตรึง เมื่อใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ $5x10^3$ และ $5x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่ $5x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีความเหมาะสมและให้ผลผลิตของกรดออกซาลิคมากกว่าปริมาณเริ่มต้นที่ $5x10^3$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ruma และคณะ (2006) ที่ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดแลคติกด้วย *Rhizopus oryzae* ที่ถูกตรึงนั้นใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกันตั้งแต่ $1x10^6$–$5x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าเมื่อทำการเพิ่มปริมาณสปอร์เริ่มต้นมีผลทำให้ปริมาณกรดแลคติกที่ได้มีค่าเพิ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

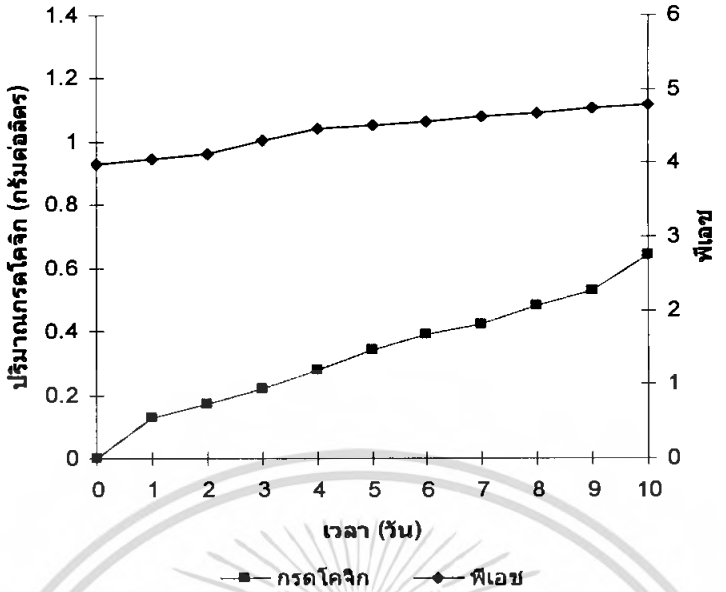
4.2 ผลการศึกษาจำนวนเม็ดบีดที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิก

ผลการศึกษาจำนวนเม็ดบีดที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหารสูตรดัดแปลงของ อภิชญา (2548) โดยใช้ปริมาณเม็ดบีดแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 40 60 และ 80 เม็ดต่อฟลาสก์ ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร และใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมซึ่งได้มาจากข้อ 4.1 เท่ากับ $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเหลวที่ใช้จำนวนเม็ดบีด 40 เม็ดต่อฟลาสก์ (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 10 วัน พบว่าปริมาณกรดโคจิกสะสมสูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 0.64 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรดโคจิกนั้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวันแรกค่าพีเอชเริ่มต้น คือ 3.98 และเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 10 คือ 4.79 และเมื่อพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีปริมาณลดลงจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ 1.15 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.4) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณหาอัตราการผลิตกรดโคจิกและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.064 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.011 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

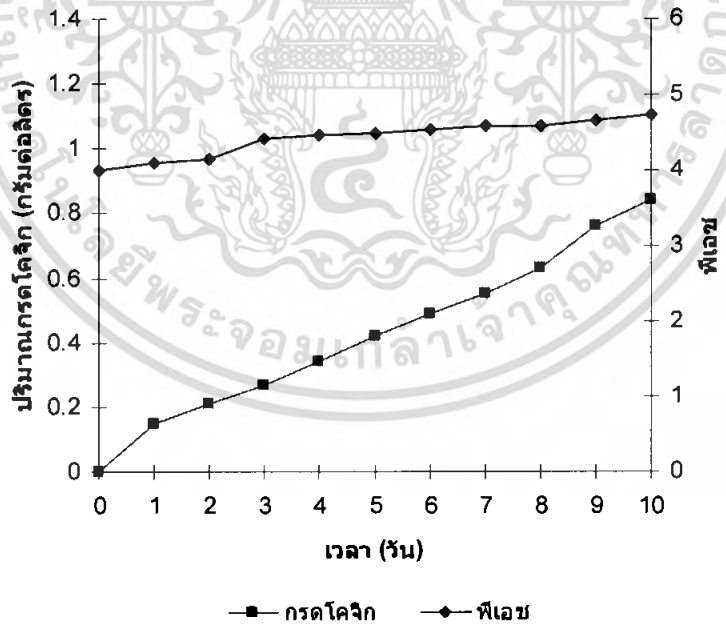
สำหรับอาหารเหลวที่ใช้จำนวนเม็ดบีด 60 เม็ดต่อฟลาสก์ (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $2.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 10 วัน พบว่าปริมาณกรดโคจิกสะสมสูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 0.84 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรดโคจิกนั้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาค่า พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวันแรกค่าพีเอชเริ่มต้น คือ 4.01 และเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 10 คือ 4.74 และเมื่อพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีปริมาณลดลงจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ 0.88 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.4) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณหาอัตราการผลิตกรดโคจิกและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.084 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.014 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

สำหรับอาหารเหลวที่ใช้จำนวนเม็ดบีด 80 เม็ดต่อฟลาสก์ (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $3.3x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 10 วัน พบว่าปริมาณกรดโคจิกสะสมสูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 1.26 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรดโคจิกนั้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวันแรกค่าพีเอชเริ่มต้น คือ 3.97 และเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 10 คือ 4.73 และเมื่อพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีปริมาณลดลงจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ 0.51 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.4) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณหาอัตราการผลิตกรดโคจิกและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.126 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.021 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล ตามลำดับ (ตารางที่ 4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

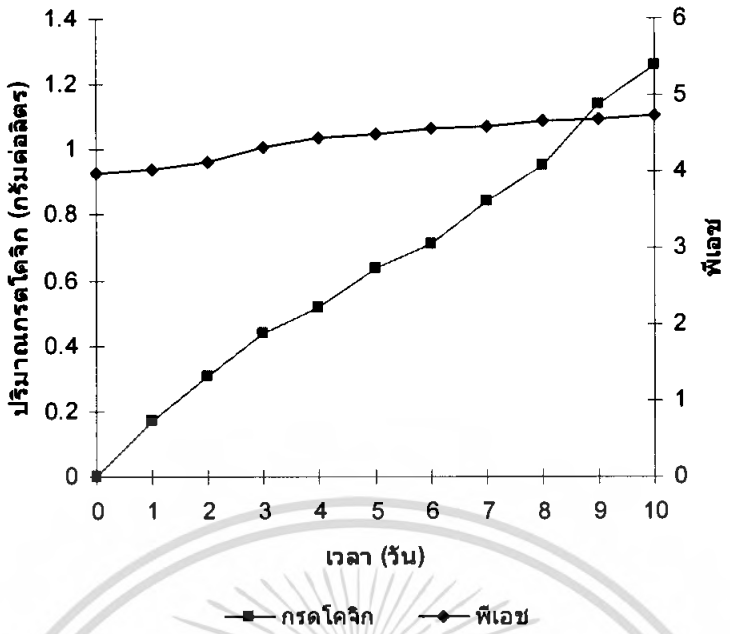


รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้จำนวนเม็ดบีด 40 เม็ดต่อฟลาสก์



รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้จำนวนเม็ดบีด 60 เม็ดต่อฟลาสก์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

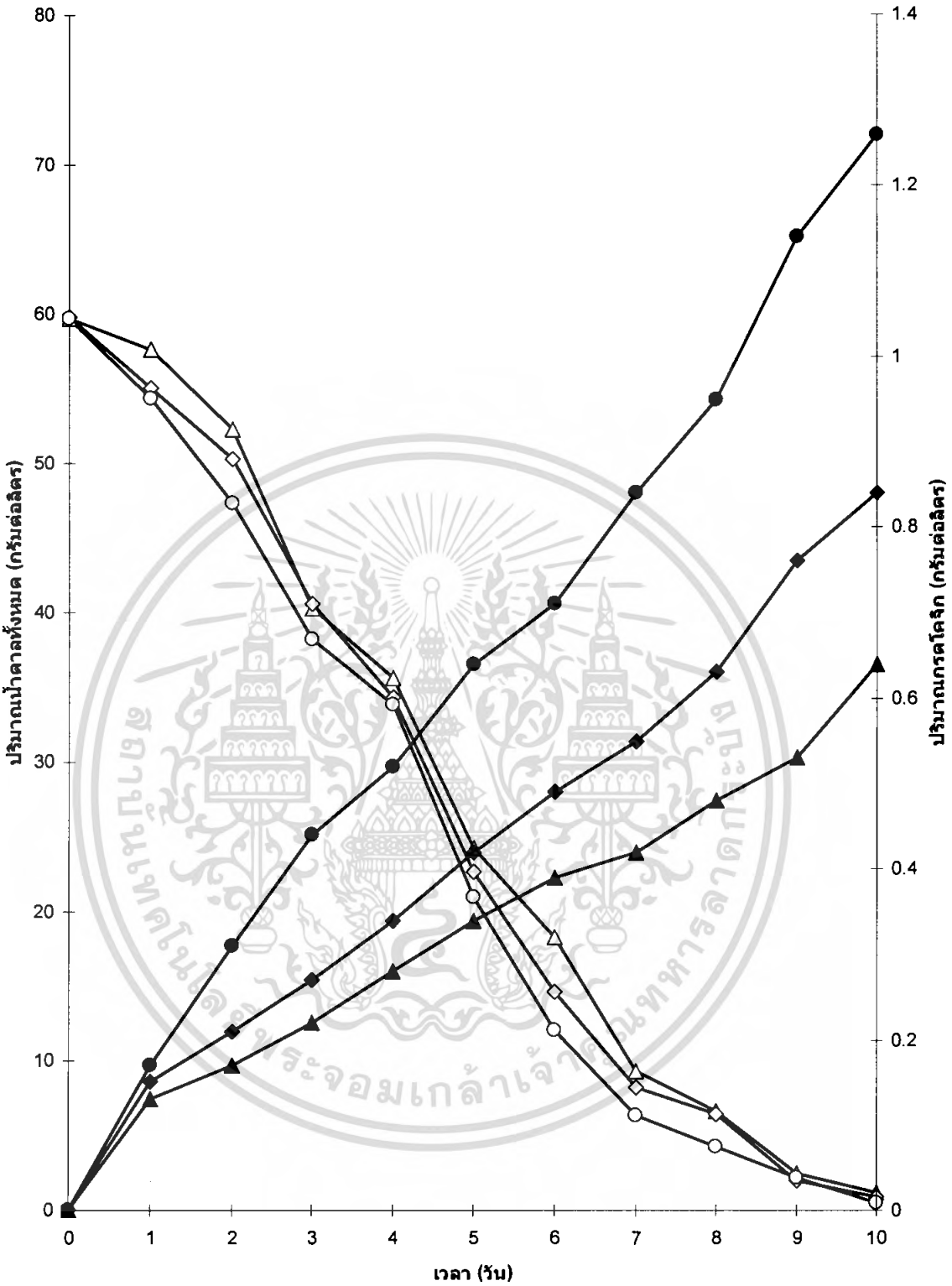


รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้จำนวนเม็ดบีด 80 เม็ดต่อฟลาสก์

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการใช้ปริมาณเม็ดบีดทั้ง 3 ระดับทางสถิติ พบว่าการใช้จำนวนเม็ดบีด 80 เม็ดต่อฟลาสก์ ให้ผลการผลิตกรดโคจิกดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4.6)

จากผลการทดลองใช้จำนวนเม็ดบีดที่แตกต่างกันจะเห็นได้ว่าเชื้อรามีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดที่จำนวนเม็ดบีดเท่ากับ 80 เม็ดต่อฟลาสก์ (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $3.3x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) โดยให้ปริมาณกรดโคจิกสะสมเท่ากับ 1.26 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.126 กรัมต่อลิตรต่อวัน และมีผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.021 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล รองลงมาคือการทดลองที่ใช้ปริมาณเม็ดบีด 60 เม็ดต่อฟลาสก์ (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $2.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) โดยให้ปริมาณกรดโคจิกสะสมเท่ากับ 0.84 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.084 กรัมต่อลิตรต่อวัน และมีผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.014 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล และสุดท้ายคือการทดลองที่ใช้ปริมาณเม็ดบีด 40 เม็ด(ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) โดยให้ปริมาณกรดโคจิกสะสมเท่ากับ 0.64 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตกรด โคจิกเท่ากับ 0.064 กรัมต่อลิตรต่อวัน และมีผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.011 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล จะเห็นได้ว่าการใช้ปริมาณเม็ดบีด 80 เม็ดนั้นสามารถผลิตกรดโคจิกได้มากกว่าการใช้จำนวนเม็ดบีด 60 และ 40 เม็ดอยู่ 1.5 และ 1.97 เท่า ตามลำดับ จึงเลือกใช้จำนวนเม็ดบีด 80 เม็ดในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณกรดโคจิกและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเมื่อใช้จำนวนเม็ดบีดต่างๆกัน

จำนวนเม็ดบีด 40 เม็ดต่อฟลาสก์ : กรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด

จำนวนเม็ดบีด 60 เม็ดต่อฟลาสก์ : กรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด

จำนวนเม็ดบีด 80 เม็ดต่อฟลาสก์ : กรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว โดยใช้จำนวนเม็ดบีดที่ต่างกัน

จำนวนเม็ดบีด (เม็ดต่อฟลาสก์)	เวลา (วัน)	พีเอช	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
40	0	3.98	59.68	0.00
	1	4.05	57.61	0.13
	2	4.12	52.26	0.17
	3	4.31	40.34	0.22
	4	4.46	35.67	0.28
	5	4.51	24.21	0.34
	6	4.55	18.32	0.39
	7	4.63	9.27	0.42
	8	4.68	6.67	0.48
	9	4.75	2.44	0.53
	10	4.79	1.15	0.64
60	0	4.01	59.84	0.00
	1	4.10	55.02	0.15
	2	4.15	50.32	0.21
	3	4.42	40.62	0.27
	4	4.47	34.39	0.34
	5	4.49	22.68	0.42
	6	4.53	14.67	0.49
	7	4.58	8.23	0.55
	8	4.59	6.42	0.63
	9	4.67	2.02	0.76
	10	4.74	0.88	0.84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนเม็ดบีด (เม็ดต่อฟลาสก์)	เวลา (วัน)	พีเอช	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
80	0	3.97	59.75	0.00
	1	4.02	54.31	0.17
	2	4.13	47.29	0.31
	3	4.32	38.17	0.44
	4	4.45	33.86	0.52
	5	4.49	21.03	0.64
	6	4.57	12.06	0.71
	7	4.59	6.30	0.84
	8	4.66	4.23	0.95
	9	4.68	2.15	1.14
	10	4.73	0.51	1.26

ตารางที่ 4.5 แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้จำนวนเม็ดบีดที่ต่างกัน

จำนวนเม็ดบีด (เม็ดต่อฟลาสก์)	อัตราการผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	ผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาล (กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล)
40	0.064	0.011
60	0.084	0.014
80	0.126	0.021

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราที่ถูกตรึงเมื่อใช้จำนวนเม็ดบีดต่างกัน

ปริมาณเม็ดบีด (เม็ดต่อฟลาสก์)	40	60	80
ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	0.63^{c}	0.85^{b}	1.26^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันแสดงว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

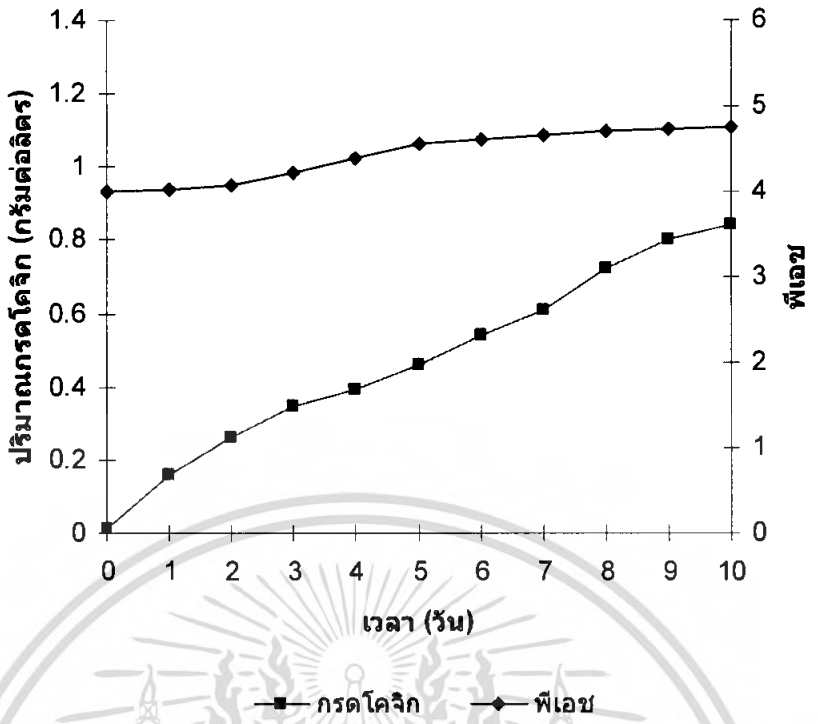
การใช้ปริมาณเม็ดบีดมากขึ้นทำให้ปริมาณเชื้อภายในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นผลให้ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดโคจิกมีมากยิ่งขึ้น ทำให้มีปริมาณกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Ariff และคณะ (1997) ที่พบว่า เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นอย่างเหมาะสมจะทำให้ผลผลิตกรดโคจิกมากขึ้นด้วย และในปี ค.ศ. 2007 Mohamad และคณะ ได้ทำการศึกษาผลของปริมาณเซลล์ที่มีต่อการผลิตกรดโคจิกและพบว่าถ้าเพิ่มจำนวนเซลล์มากทำให้การผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นด้วย จนถึงจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่สุดที่ให้กรดโคจิกสูงสุด เช่นเดียวกับรายงานของ Sushil (2004) และ Ruma (2006)

4.3 การศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิก

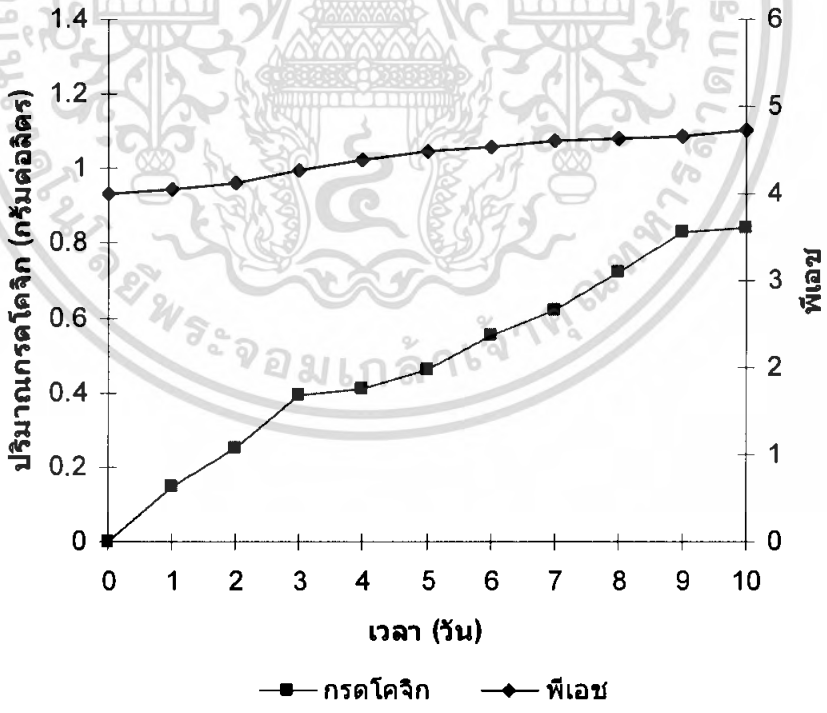
ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหารสูตรดัดแปลงของ อภิชญา (2548) โดยใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 60 70 และ 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณเม็ดบีดเท่ากับ 80 เม็ดต่อฟลาสก์ และใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเหลวที่ใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 10 วัน พบว่าปริมาณกรดโคจิกสะสมสูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 0.84 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรดโคจิกนั้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวันแรกค่าพีเอชเริ่มต้น คือ 4.00 และเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 10 คือ 4.76 และเมื่อพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีปริมาณลดลงจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ 0.75 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.7) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณหาอัตราการผลิตกรดโคจิกและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.084 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.014 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

สำหรับอาหารเหลวที่ใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 70 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 10 วัน พบว่าปริมาณกรดโคจิกสะสมสูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 0.84 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรดโคจิกนั้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวันแรกค่าพีเอชเริ่มต้น คือ 3.99 และเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 10 คือ 4.73 และเมื่อพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีปริมาณลดลงจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ 3.06 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.7) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณหาอัตราการผลิตกรดโคจิกและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.084 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.013 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

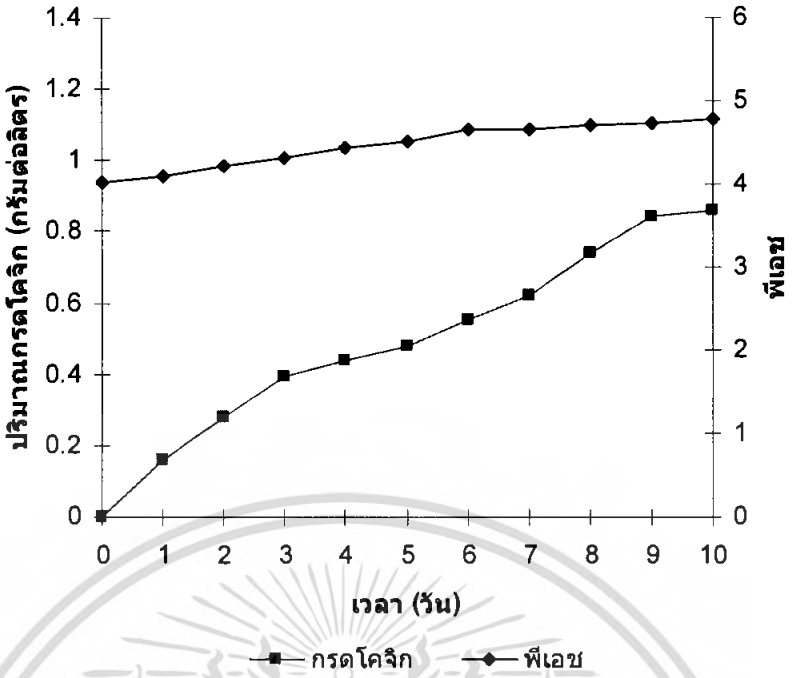


รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้น้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.10 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้น้ำตาล 70 กรัมต่อลิตร

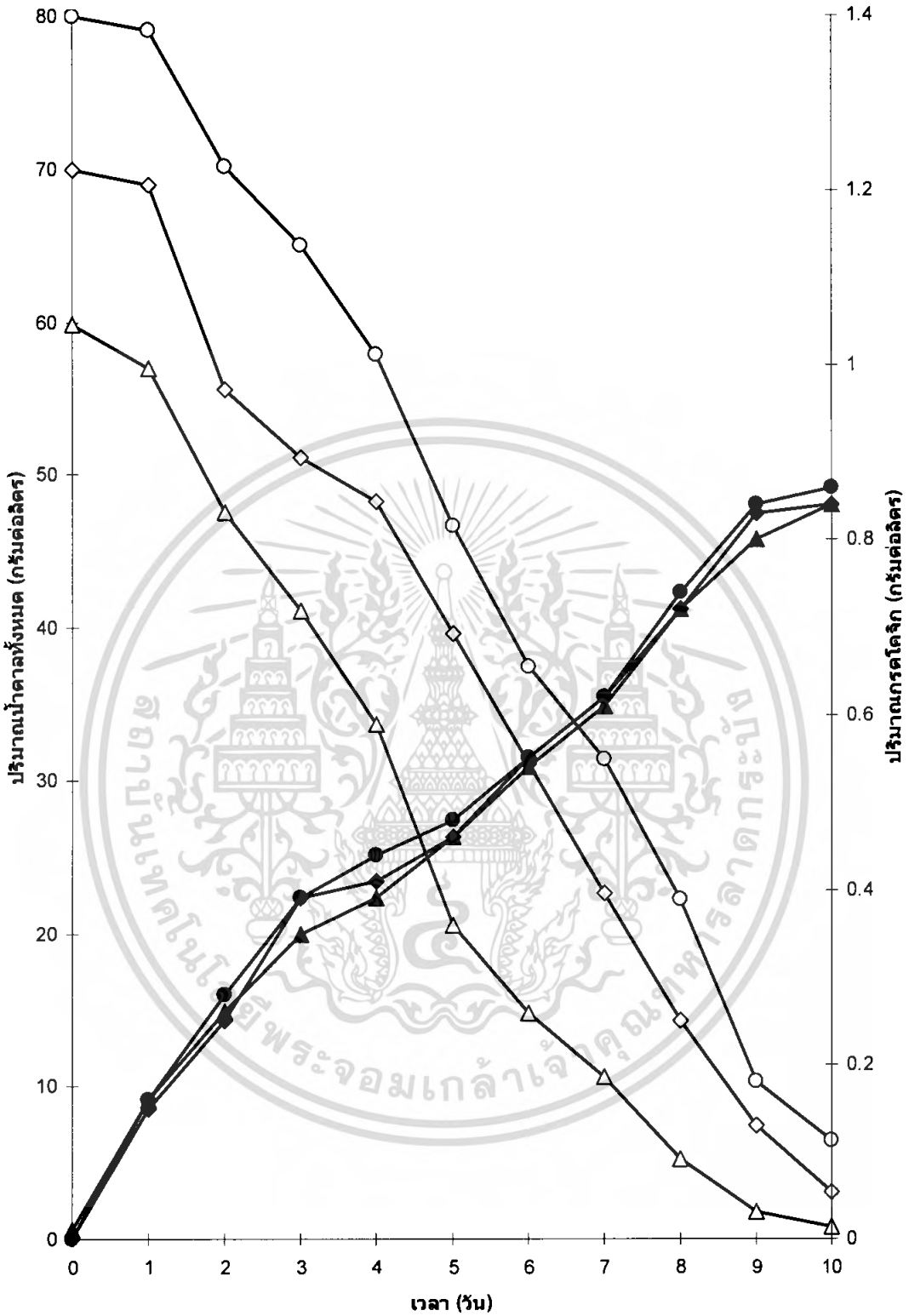
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้น้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร

สำหรับอาหารเหลวที่ใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 10 วัน พบว่าปริมาณกรดโคจิกสะสมสูงสุดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 0.86 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรดโคจิกนั้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวันแรกค่าพีเอชเริ่มต้น คือ 4.02 และเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 10 คือ 4.77 และเมื่อพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีปริมาณลดลงจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ 6.48 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.7) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณหาอัตราการผลิตกรดโคจิกและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.086 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.012 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดโคจิกและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสต่างๆกัน

ความเข้มข้นกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร : กรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด

ความเข้มข้นกลูโคส 70 กรัมต่อลิตร : กรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด

ความเข้มข้นกลูโคส 80 กรัมต่อลิตร : กรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว โดยใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	เวลา (วัน)	พีเอช	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
60	0	4.00	59.81	0.01
	1	4.02	57.01	0.16
	2	4.07	47.58	0.26
	3	4.21	41.06	0.35
	4	4.38	33.69	0.39
	5	4.55	20.51	0.46
	6	4.61	14.77	0.54
	7	4.67	10.64	0.61
	8	4.70	5.31	0.72
	9	4.72	1.83	0.80
	10	4.76	0.75	0.84
70	0	3.99	70.00	0.00
	1	4.06	69.01	0.15
	2	4.12	55.63	0.25
	3	4.26	51.12	0.39
	4	4.39	48.21	0.41
	5	4.50	39.62	0.46
	6	4.53	31.05	0.55
	7	4.62	22.64	0.62
	8	4.64	14.31	0.72
	9	4.66	7.43	0.83
	10	4.73	3.06	0.84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	เวลา (วัน)	พีเอช	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
80	0	4.02	79.98	0.00
	1	4.10	79.06	0.16
	2	4.21	70.15	0.28
	3	4.32	65.02	0.39
	4	4.43	57.89	0.44
	5	4.51	46.62	0.48
	6	4.65	37.43	0.55
	7	4.67	31.37	0.62
	8	4.70	22.26	0.74
	9	4.73	10.37	0.84
	10	4.77	6.48	0.86

ตารางที่ 4.8แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่ระดับต่างๆ

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	ผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาล (กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล)
60	0.084	0.014
70	0.084	0.013
80	0.086	0.012

ตารางที่ 4.9 เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราที่ถูกตรึงเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสต่างกัน

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	60	70	80
ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	0.84[a]	0.84[a]	0.86[a]

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันแสดงว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองใช้ปริมาณน้ำตาลที่แตกต่างกันจะเห็นได้ว่าเชื้อรามีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเมื่อใช้ปริมาณน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร โดยให้ปริมาณกรดโคจิกสะสมสูงสุดเท่ากับ 0.86 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.086 กรัมต่อลิตรต่อวัน และมีผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.012 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล รองลงมาคือการทดลองที่ใช้ปริมาณน้ำตาล 60 และ 70 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้ปริมาณกรดโคจิกสะสมสูงสุดเท่ากันคือ 0.84 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากันคือ 0.084 กรัมต่อลิตรต่อวัน และมีผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.014 และ 0.013 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล ตามลำดับ แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบผลการใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสทั้ง 3 ระดับทางสถิติ พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลมากขึ้น ไม่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิก อาจเนื่องมาจากการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตไม่เหมาะสม ทำให้เชื้อราที่ถูกตรึงอยู่ในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนตไม่เจริญและการดูดซึมสารอาหารเข้าสู่เม็ดเจลทำได้ยาก

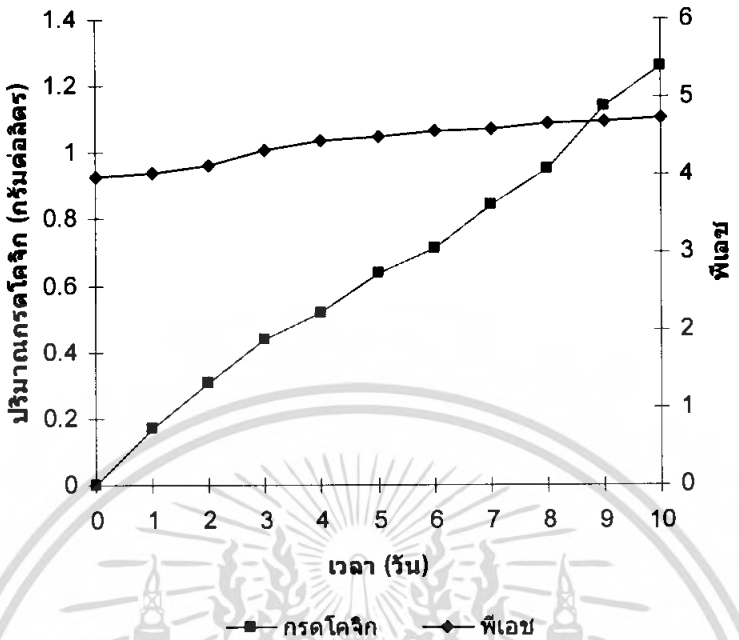
4.4 ผลการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์อิสระของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1

เมื่อทำการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์อิสระของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหารสูตรดัดแปลงของ อภิชญา(2548) โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ในส่วนเซลล์ที่ถูกตรึงใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมซึ่งได้มาจากข้อ 4.1 เท่ากับ $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และใช้จำนวนเม็ดบีดที่เหมาะสมซึ่งได้จากข้อ 4.2 เท่ากับ 80 เม็ดต่อฟลาสก์ ในส่วนของเซลล์อิสระใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 10 เท่ากับ 1.26 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรดโคจิกนั้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวันแรกค่าพีเอชเริ่มต้น คือ 3.97 และเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในวันที่ 10 คือ 4.73 และเมื่อพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีปริมาณลดลงจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ 0.51 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.10) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณหาอัตราการผลิตกรดโคจิกและผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.126 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.021 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11)

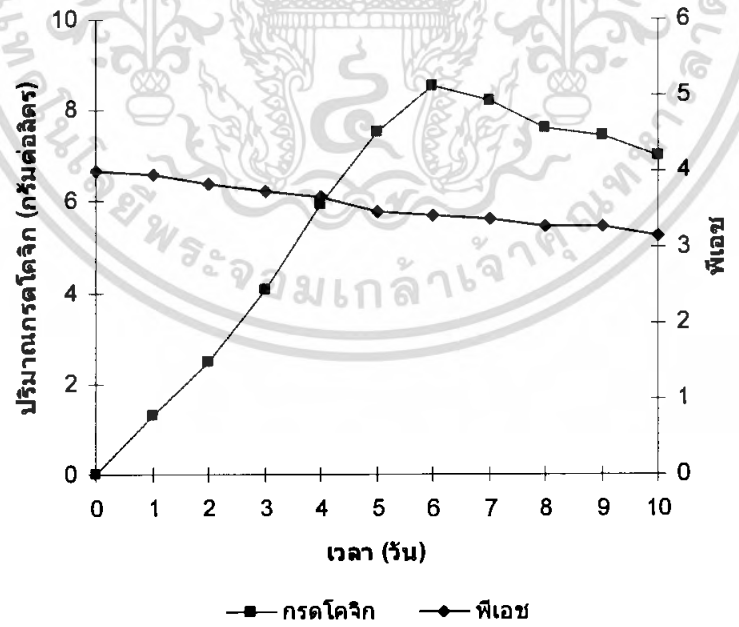
ส่วนเซลล์อิสระนั้นมีการผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 6 เท่ากับ 8.54 กรัมต่อลิตร และมีค่าลดลงในวันถัดมา เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจากวันแรกค่าพีเอชเริ่มต้น คือ 4.00 และลดลงจนมีค่าต่ำสุดในวันที่ 10 คือ 3.14 และเมื่อพิจารณาน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีปริมาณลดลงจากวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ 4.63 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.10) เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณหาอัตราการผลิตกรดโคจิกและผลได้ของกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โคจิกจากการใช้น้ำตาลพบว่ามีค่าเท่ากับ 1.423 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.207 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล ตามลำดับ (ตารางที่ 4.11)



รูปที่ 4.13 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้เซลล์ที่ถูกตรึงของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1



รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้เซลล์อิสระของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณกรดโคจิกโดยเซลล์ที่ถูกตรึงและเซลล์อิสระ

ชนิดของเซลล์	เวลา (วันที่)	พีเอช	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
เซลล์ที่ถูกตรึง	0	3.97	59.75	0.00
	1	4.02	54.31	0.17
	2	4.13	47.29	0.31
	3	4.32	38.17	0.44
	4	4.45	33.86	0.52
	5	4.49	21.03	0.64
	6	4.57	12.06	0.71
	7	4.59	6.30	0.84
	8	4.66	4.23	0.95
	9	4.68	2.15	1.14
	10	4.73	0.51	1.26
เซลล์อิสระ	0	4.00	59.57	0.00
	1	3.95	56.97	1.31
	2	3.82	45.24	2.46
	3	3.74	37.66	4.05
	4	3.66	28.17	5.93
	5	3.47	21.42	7.52
	6	3.41	18.48	8.54
	7	3.37	14.53	8.20
	8	3.28	10.21	7.62
	9	3.26	8.35	7.43
	10	3.14	4.63	7.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราและผลได้ของกรดโคจิกโดยเซลล์ที่ถูกตรึงและเซลล์อิสระ

ชนิดของเซลล์	อัตราการผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	ผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาล (กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล)
เซลล์ที่ถูกตรึง	0.126	0.021
เซลล์อิสระ	1.423	0.207

จากผลการทดลองจะเห็นว่าปริมาณของกรดโคจิกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงมีปริมาณที่น้อยเมื่อเทียบกับเซลล์อิสระ เนื่องจากเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ที่ถูกตรึงมีการเจริญได้น้อยกว่า ส่งผลให้ไม่สามารถผลิตกรดโคจิกได้ดีเท่าเซลล์อิสระ นอกจากนี้การซึมผ่านของสารอาหารและอากาศเข้าสู่ตัวเซลล์มีน้อย ทำให้เซลล์ไม่เจริญ เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า ค่าพีเอชมีค่าคงที่อยู่ระหว่าง 4.3 – 4.7 สำหรับเซลล์อิสระมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.3 - 3.7

สาเหตุอีกประการหนึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแคลเซียมอัลจิเนตที่ใช้ในการตรึงมีน้ำหนักโมเลกุลที่ไม่เหมาะสม เมื่อนำมาตรึงเซลล์แล้วจึงมีขนาดของรูเม็ดบีดที่เล็ก ทำให้การซึมผ่านของอาหารและอากาศเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง หรือ สารอาหารบางส่วนถูกเม็ดบีดดูดซับไว้ ทำให้เซลล์ไม่สามารถนำมาใช้ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mohamad และคณะ (2002) ที่ได้ศึกษาผลของการควบคุมพีเอชกับการผลิตกรดโคจิกในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* ในอาหารที่มีแป้งสาคูเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าในช่วงที่เชื้อมีการเจริญในระยะเพิ่มจำนวน (log phase) ควรควบคุมให้มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.3-3.7 และพบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดโคจิกจะมีความคงตัวภายใต้สภาวะที่เป็นกรด จากการเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 8 ลิตร ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 3.0 ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 31.07 กรัมต่อลิตร

ผลของอากาศที่มีต่อการผลิตกรดโคจิก ในการทดลองนี้ใช้เชื้อราที่ถูกตรึงในการผลิตกรดโคจิก ซึ่งเซลล์ที่ถูกตรึงจะถูกจำกัดการซึมผ่านเข้าออกของสับสเตรท ผลผลิต และปริมาณออกซิเจนโดยสารที่ใช้ตรึงเซลล์ (Chibata และคณะ, 1978) การถูกจำกัดการซึมผ่านของออกซิเจนนี้ทำให้เชื้อราได้รับออกซิเจนในปริมาณน้อย เป็นผลให้การผลิตกรดโคจิกลดลงด้วย จากรายงานของ Ariff และคณะ (1996) ซึ่งได้ทำการศึกษาปริมาณออกซิเจนละลายที่ต่างกัน 3 ระดับ (30 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ของอากาศที่อิ่มตัว)ภายในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าเมื่อทำการลดปริมาณออกซิเจนละลายลงจาก 80 เปอร์เซ็นต์ ไปเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ของอากาศที่อิ่มตัว นั้นปริมาณกรดโคจิกสะสมสูงสุดลดลงกว่า 2.5 เท่า จาก 14.6 ไปเป็น 5.7 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับรายงานของ Takafumi และคณะ (2001) ที่ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของออกซิเจนละลายที่มีต่อการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตกรดโคจิก พบว่าการผลิตกรด โคจิกลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อลดค่าความเข้มข้นของออกซิเจนละลายเหลือน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ของความเข้มข้นอิ่มตัว และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนละลายให้เพิ่มขึ้นมากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกรดโคจิกที่ถูกผลิตก็จะเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1 ที่ถูกตรึงในเม็ดแคลเซียมอัลจิเนต เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรดัดแปลงของ อภิชญา (2548) ที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยศึกษาปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ต่างกัน คือ $1.5x10^5$ $1.5x10^6$ และ $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1.5x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 0.63 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงมีอัตราการผลิตกรดโคจิก 0.063 กรัมต่อลิตรต่อวัน และผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.011 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล เมื่อทำการศึกษาจำนวนเม็ดบีดที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 40 60 และ 80 เม็ดต่อ ฟลาสก์ พบว่าการใช้จำนวนเม็ดบีด 80 เม็ดต่อฟลาสก์ (ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 3.3 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 1.26 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงมีอัตราการผลิตกรดโคจิก 0.126 กรัมต่อลิตรต่อวัน และผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.021 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล เมื่อศึกษาการใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ระดับต่างๆ คือ 60 70 และ 80 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณเม็ดบีด 80 เม็ดต่อฟลาสก์ ให้ปริมาณกรดโคจิก 0.84 , 0.84 และ0.86 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลผลิตกรดโคจิกมีความใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลมีค่าเท่ากับ 0.014 , 0.013 และ 0.012 กรัมของกรดโคจิกต่อกรัมของน้ำตาล

ศึกษาการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้อาหารเหลวระหว่างเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์อิสระของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 2.5 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน พบว่า เซลล์ที่ถูกตรึงให้ปริมาณการผลิตกรดโคจิกสูงสุด 1.26 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง และมีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.126 กรัมของกรดจิกต่อลิตรต่อวัน ซึ่งน้อยกว่าเซลล์อิสระที่ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 8.54 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และมีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 1.42 กรัมของกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน แสดงว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ที่เจริญในรูปเซลล์อิสระสามารถผลิตกรดโคจิกได้ดีกว่าเซลล์ที่ถูกตรึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอุต และ จุนทนี จิตต์รำพึง. 2540. พจนานุกรม FOOD ADDITIVES. วารสารจาร์พา.ปีที่ 4 ฉบับที่ 33 : 57-39.

รพี โรจนอุไร. 2539. ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergilus oryzae* K-13 ในระดับฟลาสก์เขย่า. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุกัญญา สายธิ. 2541. การผลิตกรดโคจิกจากน้ำมะพร้าวโดยเชื้อ *Aspergilus oryzae* NRRL 484. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

อภิชญา ทองทับ. 2548. การผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

Abbott, J.B. 1977. Immobilized cell. In Perlman, D., editor. 1977. Annual reports on fermentation processes. Vol. 1. New York : Academic Press.

Ansari, A.A., and shrivastava, A.K. 1991. High performance liquid chromatographic analysis of nor solorinic acid produced by *Aspergillus parasiticus* mutant. Biol. Sci. 57 : 403-405.

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

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

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

Bajpai , P. , Agrawala , P.K. and Vishwanathan , L. 1982. kojic acid : systhesis and propoties. J. Sci. Ind. Res. 41 : 185-194.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Bernfeld, P. 1955. Amylase alpha and beta Method in Enzymology. New York : Academic Press, Inc.

Bhatia ,T. , Kaushik , N.K. and Sochi , G.S. 1998 . Thermal studies of organomercury (II) complexes of kojic acid and maltol. J. Phys. C : Solid State Phys. 21 : 4681 -4685.

Brodelius, P., Deus, B., Mosbach, K. and Zenk, M.H. 1979. Immobilized plant cell for the production and transformation of natural products. FEBS Letters. 103 : 93-97.

Cheetham, P.S.J., Blunt, K.W. and Bucke, C. 1979. Physical studies in cell immobilization using calcium alginate gels. Biotechnol. Bioeng. 21 : 2155-2168.

Cheetham, P.S.J. 1980. Developments in the immobilization of microbial cell and their application. Topics in enzyme and fermentation biotechnology. 4 : 189-242.

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

Chibata, I. and Tosa, T. 1977. Transformation of organic compounds by immobilized microbial cells. Advances in Applied Microbiology. 22: 1-25.

Chibata, I. 1978. Immobilized enzymes, Research and Development. New York: Wiley. 73 - 80.

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

Friedemann, T.E. 1934. Chemical and physiological properties of kojic acid. Science 30 : 34.

Kayahara, H.,Tanabe, K. and Yamada, N. 1990. Amino acid and peptide derivativesof kojic acid and their antifungal properties. Agric. Biol. Chem. 54(9) : 2441 – 2442.

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

Kharchenko, S.N. 1999. Thebiosynthesis of kojic acid by *Aspergillus flavus* Link stains isolated from feed. Microbiol. Zh.(Ukraine). 61 : 15-21.

Kierstan, M. and Bucke, C. 1977. The immobilized of microbial cell, subcellular organelles and enzyme in calcium alginate gels. Biotechnol. Bioeng. 19 : 387-397.

Koshcheenko, K.A. 1981. Living immobilized cell as biocatalysts of transformation and biosynthesis of organic compounds. Appl. Microbiol. Biochem. 17 : 351-365.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kwak, M.Y. and Rhee, J. S. 1992. Controlled my celial growth for kojic acid production using Ca-algianate immobilized fungal cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 578-583.

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

Majmudar, G., Jacob, G., Laboy, Y. and Fisher, L.1998. An in vitro method for sceening skinwhitening product. J. Cosmet. Sci.49 : 361-367.

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

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

Mitchell, F. 1998. Alginate. [online]. Avaible: http;//www.botany.uwc.ac.za.

Mohamad, R., Madihah, S. and Ariff, A. B. 1998. Isolation of a kojic acid – producting fungus capable of using starch as a carbon source. Lette. Appl. Microbial. 26 : 27 – 30.

Mohamad, R. and Ariff, A. B. 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.

Mohamad, R., Ariff, A. B., Hassan, M.A., Karim, M.I.A., Shimizu, H. and Shioya, S. 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

Mohamad, R. and Ariff , A.B. 2007. Biotransformation of various carbon sources to kojic acid by cell – bound enzyme system of *A. flavus* Link 44-1. Biochem. Eng. J. 35 : 203-209.

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

Ogawa, A., Wakisaka, Y., Tanaka, T., Sakiyama, T. and Nakanishi, K. 1995. Production of kojic acid by membrane – surface liquid culture of *Aspergillus oryzae* NRRL 484. J. Ferment. Bioeng. 80 (1) : 139.

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

Ozturk, G., Erol, D.D., Aytemir, M.D. and Uzbay, T. 2002. New analgesic and anti-inflammatory agent 4(1H)-pyridinone derivatives. Eur. J. Med Chem. 37 : 829-834.

Parrish, F.W., Wiley, B.J., Simmons, E.G. and Long, L.J. 1996. Production of aflatoxins and kojic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillum.* Appl. Microbiol. 14:139.

Paul, F. and Vignais, P.M. 1980. Enz. Microb.technol. 2:281-287. in Bucke, C. 1982. Immbilized Cells. In UNESCO workshop on immobilized microbial enzymes and cells. 13-17 December 1982. Mahidol University Bangkok : Thailand.

Reyes, N., Rivas-Ruiz, I., Dom´ınguez-Espinosa, R. and Solis, S. 2006 Influence of immobilization parameters on endopolygalacturonaseproductivity by hybrid *Aspergillus* sp. HL entrapped in calcium alginate. Biochem. Eng. J. 32 : 43–48.

Ruma, G., Pallavi, D., Singh, R.P. 2006. Production of lactic acid with loofa sponge immobilized Rhizopus oryzae RBU2-10. Biores. Technol. 98: 1246-1251.

Stanbury, R.Y., Adelberg, E.A. and Ingraham, J. 1976. The Microbial World. 4th ed. Eagle wood : Prentice – hall. Inc

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

Sushil, K.M., Pataki, C.B. 2004. Submerged production of oxalic acid from glucose by immobilized *Aspergillus niger*. Prot. Biochem. 40: 1605-1610.

Tadera, K., Yahi, F. and Kobayashi, A. 1985. Effects of cycasin on kojic acid producing molds.

Agric. Biol. Chem. 49(1) : 203-205

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Takafumi, F., Hironori, I., Takayoshi, T., Tetsuya, Y., Guowei, H., Mami, K., Mitsuyasu, O., 2001. Kojic acid production in and airlift bioreactor use partially hydrolyzed raw corn starch. J. Biosci. Bioeng. 92: 360-365.

Tomita, I., Mitsuhashi, K. and Endo, T. 1996. Synthesis and radical polymerization of styrene derivative bearing kojic acid moieties. J. Polym. Sci. 34 : 271-276.

Uchino, K., Nagawa, M., Tonosaki, Y., Oda, M. and Fukuchi, A. 1988. Kojic acid as an antispeck agent. Agric. Biol. Chem. 52(10) : 2609-2610

Uher, M., Konecny, V. and Rajiniakova, O. 1994. Synthesis of 5-hydroxy -2-hydroxymethyl-4H-pyrone-4-one derivatives with pesticide activity. Chem. Paper 48 : 282-284.

Wakisaka, Y., Segawa, T., Imamura, K., Sakiyama, T. and Nakanishi, K. 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.

Wan, H.M., Chen, C.C., Giridhar, R., Chang, T.S. and Wu, W.T. 2005. Repeated-batch production of kojic acid in a cell-retention fermenter using *Aspergillus oryzae* M3B9. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32: 227–233.

Wei, C. I., Huangm, T. S., Chen, J. S., Marshall, M. R. and Chung, K. T. 1991. Production of kojic Acid by *Aspergillus cannidus* in three culture media. J. Food Prot. 54 : 546 – 548.

White, F.H. and Portno, A.D. 1978. Topics in enzyme. J. Inst. Brew. 84 : 228-230.

www.sciencedaily.com

www.healthnet.in.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร PDA (Potato Dextrose Agar)

ชั่งอาหาร PDA สำเร็จรูป 39 กรัม ละลายลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน บรรจุลงในภาชนะที่ต้องการ ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องจนวุ้นแข็ง

2. อาหารดัดแปลงจากสูตรอาหารของ อภิชญา (2548)

น้ำตาลกลูโคส (glucose)	60	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (yeast extract)	2.5	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	2.5	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนส่วนผสมละลายหมด ปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.0 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กรดโคจิก (Bentley, 1957)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและเหมาะสมโดยการใช้สารละลายเฟอริกคลอไรด์ทำปฏิกิริยากับสารประกอบแอลฟาไฮดรอกซิล (α - hydroxyl) และสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ในกรดโคจิกให้สารละลายสีแดงเกิดขึ้น

สารเคมี

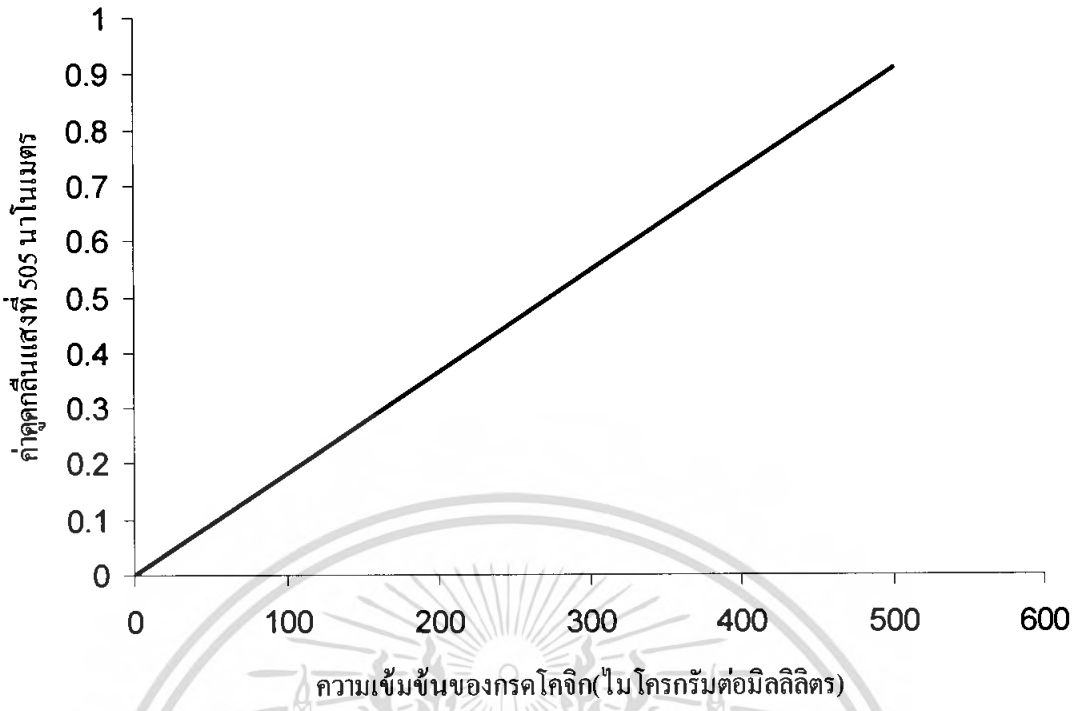
1. สารละลายเฟอริกเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3 . 6H_2O$) 1%
เตรียมโดยชั่ง $FeCl_3 . 6H_2O$ 1 กรัม ละลายใน 0.1 N HCL และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นแล้วเก็บในขวดสีชา
2. สารละลายกรดโคจิกมาตรฐานของ Sigma
ทำโดยเตรียมสารละลายกรดโคจิกที่มีความเข้มข้นต่างๆดังนี้คือ 50 100 200 300 400 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดโคจิก 0.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกรดโคจิกมาตรฐานความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. ดูดสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ทำแบลงค์ (blank) ควบคู่กันไปด้วย โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างเป็นตัวเปรียบเทียบ
2. เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ที่เตรียมไว้ลงไป 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับแบลงค์ ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร
4. ทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายกรดโคจิกมาตรฐานความเข้มข้น 50-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดโคจิก
5. นำค่าการดูดกลืนแสง(A_{505}) ที่วัดได้จากตัวอย่างมาคำนวณหาปริมาณกรดโคจิกจากสูตร

$$\text{ปริมาณกรดโคจิก (ไมโครกรัม / มิลลิลิตร)} = \frac{A_{505} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.1 แสดงกราฟมาตรฐานกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้ DNS (Bernfeld, 1955)

สารเคมี

1. สารละลาย 3, 5 - Dinitrosalicylic acid (DNS)

ละลาย 3, 5-Dinitrosalicylic acid (DNS) 1 กรัม และโพแทสเซียมโซเดียมตาเทรต (COOK $(CHOH)_2$ $COONa.4H_2O$) 300.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2.0 M ปริมาตร 200.0 มล. คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บสารละลายในขวดสีชา หรือ ขวดทึบแสง

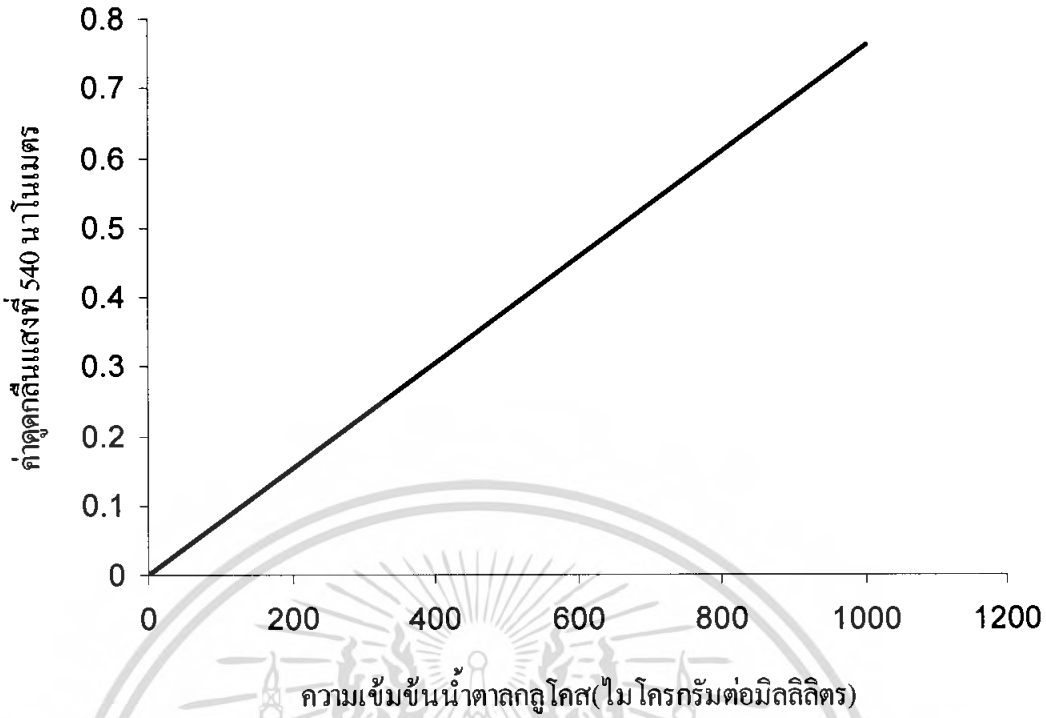
2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ดูดสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ทำแบลงค์ (blank) ควบคู่กันไปด้วย โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างเป็นตัวเปรียบเทียบ
2. เติมสารละลาย 3, 5 – dinitrosalicylic acid (DNS) ที่เตรียมไว้ลงไป 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer
3. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลานาน 10 นาที และทำให้เย็นทันที
4. นำไปวัดค่า OD (optical density) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร
5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด
6. นำสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ไมโครกรัมต่อ มล. ทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 2 – 4 เขียนกราฟระหว่างค่า OD และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.2 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การนับจำนวนเซลล์

ฮีมาไซโตมิเตอร์เป็นอุปกรณ์ขนาดเล็กมีลักษณะคล้ายสไลด์ แต่มีความหนามากกว่าสไลด์แก้วธรรมดา ตรงกลางมีร่องเป็นรูปตัว H ซึ่งทำให้เกิดบริเวณที่ใช้ในการตรวจนับขึ้น 2 บริเวณ ตรงกลางตัว H มีลักษณะเป็นสเกล เพื่อใช้ในการตรวจนับจำนวนเซลล์

วิธีการ

1. วางแผ่นปิดสไลด์บนฮีมาไซโตมิเตอร์ ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายสปอร์ประมาณ 9-10 ไมโครลิตร หยดสารละลายสปอร์ให้ไหลเข้าใต้แผ่นปิดสไลด์จนเต็มพื้นที่

2. นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนสปอร์ โดยใช้บริเวณกลางสไลด์ที่ประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยม 25 ช่อง นับทั้งหมด 9 ช่องในแนวทแยงให้เป็นรูปตัว X นับสปอร์ทั้งหมดที่อยู่บริเวณนี้รวมทั้งสปอร์ที่อยู่บริเวณขอบของตารางทุกช่อง นำจำนวนสปอร์ที่นับได้ทั้งหมดมาหาจำนวนสปอร์เฉลี่ยต่อช่อง (ในที่นี้ใช้แทนค่าเท่ากับ A) ดังนั้นจำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตรสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{จำนวนสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)} = 25A \times \text{ค่าความเจือจาง} \times 10^4$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้