การผลิตกรดโคจิกจากเชื้อกลายพันธุ์กลายของ *Aspergillus* sp.BR-1 โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

KOJIC ACID PRODUCTION FROM MUTANT STRAIN OF *Aspergillus* sp. BR-1 USING CASSAVA STARCH AS CARBON SOURCE

เทอดศักดิ์ ขจรบุญ

THIRDSAK KAJORNBOON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2556

KMITL-2013-SC-M-022-033

การผลิตกรดโคจิกจากเชื้อราสายพันธุ์กลายของ *Aspergillus* sp. BR-1 โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

KOJIC ACID PRODUCTION FROM MUTANT STRAIN OF *Aspergillus* sp. BR-1 USING CASSAVA STARCH AS CARBON SOURCE

เทอดศักดิ์ ขจรบุญ

THIRDSAK KAJORNBOON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2556

KMITL-2013-SC-M-022-033

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตกรดโคจิกจากเชื้อราสายพันธุ์กลายของ *Aspergillus* sp. BR-1 โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

เทอดศักดิ์ ขจรบุญ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL--2013-SC-M-022-033

KOJIC ACID PRODUCTION FROM MUTANT STRAIN OF *Aspergillus* sp. BR-1 USING CASSAVA STARCH AS CARBON SOURCE

THIRDSAK KAJORNBOON

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2013

KMITL--2013-SC-M-022-033

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2013

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตกรดโคจิกจากเชื้อราสายพันธุ์กลายของ *Aspergillus* sp. BR-1 โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน
Kojic acid production from mutant strain of *Aspergillus* sp. BR-1 using cassava starch as carbon source

นักศึกษา นายเทอดศักดิ์ ขจรบุญ
รหัสประจำตัว 51068302
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดวงใจ	โอชัยกุล	
ดร.สุทธิจิต	ศรีวัชรกุล	
ผศ.ดร.เหมือนหมาย	อภินทนาพงศ์	
ดร.วรภัทร์	สงวนไชยไผ่วงศ์	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 31 พฤษภาคม พ.ศ. 2556 เวลา 13.30-16.30 น.
สถานที่สอบ ณ ห้อง 611 ชั้น 6 อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุษฎี ธนะบริพัฒน์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
วันที่ 31 **เดือน** พ.ค. **พ.ศ.** 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยาพนธ์	การผลิตกรดโคจิกจากเชื้อราสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. BR-1 โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน
นักศึกษา	นายเทอดศักดิ์ ขจรบุญ
รหัสนักศึกษา	51068302
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พุทธศักราช	2556
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์

บทคัดย่อ

เพื่อเพิ่มการผลิตกรดโคจิก ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อ *Aspergillus* sp. BR-1 และปรับปรุงสูตรอาหารให้เหมาะสม โดยเริ่มจากการกลายพันธุ์เชื้อด้วยสาร N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้เชื้อกลายพันธุ์ทั้งหมด 180 ไอโซเลต จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดโคจิกสูงในอาหารแข็งสูตร Czapex dox starch อาหารแข็งสูตร Starch ดัดแปลง และอาหารเหลวสูตร Starch ด้วยจานเพาะเชื้อขนาด 24 หลุม ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ พบเชื้อสายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดโคจิกสูงสูด 3 ลำดับแรก คือ *Aspergillus* sp. N-2062 N-2134 และ N-2019 จากนั้นนำเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มาทำคัดเลือกในระดับฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรด้วยอาหารเหลวสูตร Starch ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062 ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดเท่ากับ 21.81 กรัมต่อลิตร

จากนั้น นำเชื้อสายพันธุ์ N-2062 มาทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแป้งมันสำปะหลังที่ 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผลที่ได้การศึกษา คือ เชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062 ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 33.16 กรัมต่อลิตร จากอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ต่อมา ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมประกอบด้วย เนื้อสกัด เคซีนไฮโดรไลเซต น้ำแช่ข้าวโพด เปปโตน ทริปโตน และยีสต์สกัด ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่ายีสต์สกัดและทริปโตนมีผลเพิ่มการผลิตกรดโคจิกของเชื้อสายพันธุ์ N-2062 มากที่สุดมีความเข้มข้น 33.16 และ 31.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่เมื่อพิจารณาค่ากำลังการผลิตชี้ให้เห็นว่ายีสต์สกัดให้ค่าสูงกว่าทริปโตนอย่างมีนัยสำคัญ มีค่าเท่ากับ 5.53 และ 5.18 กรัมต่อลิตรต่อวัน จึงเลือกยีสต์สกัดมาทำการศึกษาการใช้ยีสต์สกัดร่วมกับไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต ในอัตราส่วน 3:2 2.5:2.5 และ 2:3 (กรัมต่อกรัม) พบว่าการใช้ยีสต์สกัดร่วมกับโซเดียมไนเตรทให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยมีปริมาณการใช้ยีสต์สกัด 2 กรัม ต่อ ปริมาณโซเดียมไนเตรท 3 กรัม ให้กรดโคจิกเข้มข้น 31.32 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำมาเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าที่ความเร็วรอบใบพัด 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ให้กรดโคจิกสูงสุดเพียง 19.01 กรัมต่อลิตร

คำสำคัญ: กรดโคจิก สารที่ใช้กลายพันธุ์ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine *Aspergillus* sp. N-2062 ยีสต์สกัด โซเดียมไนเตรท และแป้งมันสำปะหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis title	Kojic acid production from mutant strain of *Apergillus* sp. BR-1 using cassava starch as carbon source
Student	Mr. Thirdsak Kajornboon
ID	51068302
Degree	Master of Science
Major	Biotechnology
Year	2013
Advisor	Vorapat Sanguanchaipaiwong, Ph.D.

Abstract

To increase the production of kojic acid, this research was studied the mutation of *Aspergillus* sp. BR-1 and the optimization of medium compositions. The mutation was carried out with 2 mg/ml N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine. Consequently, 180 isolated mutants were obtained. Afterward, the screening of the high kojic acid produced mutants was performed using both of Czapex dox starch agar medium and starch medium containing 2% (w/v) cassava starch in 24-well plate. The results from two studies were found three maximum kojic acid produced mutants, *Aspergillus* sp. N-2062, N-2134 and N-2019. Then, these three mutants were cultivated in 250-ml flasks containing 6% (w/v) cassava starch medium. It was found that *Aspergillus* sp. N-2062 could produce the maximum concentration of kojic acid (21.81 g/l).

Subsequently, the mutant, N-2062, was continued to study for an optimized concentration of cassava starch (4, 6, 8 and 10%, w/v). The kojic acid concentration of 33.16 g/l could be produced when using 10% (w/v) cassava starch medium. Accordingly, six nitrogen organic sources, included meat extract, casein hydrolysate, corn steeped, peptone, tryptone and *y*east extract, were selected to study for the optimized organic nitrogen source. Using tryptone and yeast extract containing media resulted in the maximum kojic acid concentration of 31.08 and 29.26 g/l, respectively, which were not statistically significantly different at 95% confidence level. Nonetheless, the productivity calculated from yeast extract utilization (5.53 g/L.day) as

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

higher than this analyzed from tryptone utilization (5.18 g/L.day) and these productivities were significantly different. Thus, yeast extract was selected to with nitrogen inorganic sources, included sodium nitrate, ammonium nitrate and ammonium sulfate at the ratios of 3:2 2.5:2.5 and 2:3 (g/g). The maximum kojic acid concentration (31.32 g/l) was found when using yeast extract mixed with sodium nitrate at a ratio of 2:3. The mutant, N-2062, was then cultured in a 5-l fermenter at agitation rate of 400 rpm and aeration rate of 1.5 vvm. The maximum kojic acid concentration of 19.01 g/l was observed.

Keyword: kojic acid, N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine, *Aspergillus* sp. N-2062, yeast extract, sodium nitrate, cassava starch

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีจากความกรุณาของ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษา และ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง ซึ่งให้คำแนะนำ อำนวยความสะดวก ทั้งแก้เล่มวิทยานิพนธ์ และแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างศึกษา ผู้วิจัยจึงขอขอบคุณจากใจในความเมตตาของอาจารย์ทั้งสองท่าน

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล ผศ.ดร. เหมือนหมาย อภินทนาพงศ์ และ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล ที่กรุณาให้เกียรติและสละเวลาในการตรวจแก้ พิจารณา ปรับปรุงแก้ไข ตรวจสอบ อีกทั้งเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ ดร.วิมลมาศ บุญมี ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ รศ.ดร.มาริสา จาตุพร พิพัฒน์ รศ.อรไท เจริญสุข และรศ.อารี ฤทธิบูรณ์ ที่คอยให้กำลังใจ

ขอบคุณพี่ประสิทธิ์ แผ้วบาง พี่วิทยา เขียวเขิน พี่เอกภพ จันทร์เรือง พี่พยอม พี่สมศักดิ์ พี่แดง คุณสมัคร แสงจันทร์ และพี่อ้อม ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการเบิกอุปกรณ์ สารเคมี และจัดเตรียมเอกสารต่างๆ

ขอบคุณพี่ศักรินทร์ บุญล้ำ น้องสุภาพร พัฒนะวิริยะศิริกุล น้องจิรนันท์ โพธิสาร น้องฟาริดา พรหมมา ในการช่วยแก้ไขตรวจทานวิทยานิพนธ์เล่มนี้ รวมทั้งคุณภาณุพงศ์ โกมลปัญญากุล และภานุพงษ์ สนใจ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณแม่ พ่อ น้อง รุ่นน้องและลูกศิษย์ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจและแรงผลักดันจนวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เทอดศักดิ์ ขจรบุญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....V

สารบัญ.....VI

สารบัญรูป.....X

สารบัญตาราง.....XIX

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....1

1.2 ความมุ่งหมายและจุดประสงค์ของการทดลอง.....2

1.3 ขอบเขตของการทดลอง.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง.....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....4

2.1 การกลายพันธุ์.....4

2.1.1 ลักษณะของการกลายพันธุ์.....4

2.1.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์.....6

2.2 กรดโคจิก.....11

2.2.1 คุณสมบัติเชิงเคมีและฟิสิกส์.....11

2.2.2 ชีวสังเคราะห์ของกรดโคจิก.....12

2.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก.....14

2.3.1 แหล่งคาร์บอน.....14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.2 แหล่งไนโตรเจน....18

2.3.3 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง....22

2.3.4 ปริมาณสปอร์เริ่มต้น....24

2.4 แป้งมันสำปะหลัง....25

2.4.1 คุณสมบัติและข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับแป้งมันสำปะหลัง....25

2.4.2 การดูดซับน้ำ การพองตัวและการละลายของแป้ง....26

2.5 ประโยชน์ของกรดโคจิก....28

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง....30

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี....30

3.1.1 อุปกรณ์....30

3.1.2 สารเคมี....31

3.2 วิธีการทดลอง....34

3.2.1 การเก็บรักษาเชื้อ....34

3.2.2 การทำสารละลายสปอร์สำหรับทำกลายพันธุ์....34

3.2.3 การทำกลายพันธุ์ด้วยสารละลาย NTG (*N*-nitro-*N'*-methyl-*N*-itrosoguanidine) เพื่อหาเวลาที่สปอร์รอดชีวิตประมาณ 0.1 เปอร์เซ็นต์....34

3.2.4 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายและการทดสอบการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง Starch medium สูตรดัดแปลง....35

3.2.5 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม....35

3.2.6 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายในระดับฟลาสก์....36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.7 การศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิก.....36

3.2.8 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดโคจิก.....37

3.2.9 การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญและผลิตกรดโคจิกในสูตรอาหารที่เหมาะสมระหว่างเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่และสายพันธุ์กลาย.....37

3.2.10 การศึกษาอัตราการให้อากาศและการกวนในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร.....38

3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลอง.....38

3.4 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....39

บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง.....39

4.1 การทำกลายพันธุ์และคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดโคจิกได้สูง.....39

4.1.1 เวลาที่เหมาะสมต่อการทำกลายพันธุ์เชื้อรา *Aspergillus* sp. BR-1 39

4.1.2 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงบนอาหารแข็ง Starch.....39

4.1.3 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถผลิตกรดโคจิกสูงในจานเพาะเลี้ยง 24 หลุม.....40

4.1.4 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถผลิตกรดโคจิกสูงระดับฟลาสก์.....45

4.2 การหาความเข้มข้นของแป้งและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของสายพันธุ์กลาย.....50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.1 ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตกรด.....50

4.2.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดต่างๆ ต่อการผลิตกรดโคจิก.....59

4.2.3 ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และไนโตรเจนอนินทรีย์ร่วมกันเพื่อการผลิตกรดโคจิก.....72

4.2.4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพเชื้อสายพันธุ์กลาย N-2062 และสายพันธุ์เดิม BR-1 ด้วยสูตรอาหารที่เหมาะสม.....85

4.3 การศึกษาความเร็วรอบใบพัดและอัตราการให้อากาศในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 5.0 ลิตร.....89

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....98

บรรณานุกรม.....101

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และวิธีการเตรียม.....108

ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน.....110

ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์.....114

ภาคผนวก ง การนับจำนวนสปอร์.....118

ภาคผนวก จ ข้อผลการทดลอง.....121

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 กระบวนการกลายที่เกิดจากการแทนที่เบส.....5

2.2 ปฏิกิริยาการเกิดไพริมิดีนไดเมอร์ในเบสชนิดไทมีน.....6

2.3 ลักษณะโครงสร้างที่คล้ายกันของ 5-Bromo uracil และ เบสไทมีน.....7

2.4 การเกิดปฏิกิริยาดึงหมู่อะมิโนจากเบสไซโตซีนด้วยกรดไนตรัส.....8

2.5 โครงสร้างทางเคมีของสารก่อการกลายในกลุ่ม alkylating agent.....8

2.6 โครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก.....11

2.7 วิถีที่เป็นไปได้ในการสังเคราะห์กรดโคจิก.....12

2.8 วิถีการสังเคราะห์กรดโคจิกจาก *Aspergillus flavus* ที่อาจเป็นไปได้.....13

2.9 วิถีการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์.....18

4.1 ร้อยละการรอดชีวิตหลังจากสัมผัสสารก่อกลายพันธุ์ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ที่เวลาต่างๆ.....40

4.2 ช่วงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp.สายพันธุ์กลายต่างๆ.....44

4.3 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีน ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2019 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ความเข้มข้นแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....46

4.4 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีน ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ความเข้มข้นแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.5 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีน ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2134 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ความเข้มข้นแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....48

4.6 ความเข้มข้นของกรดโคจิก กลูโคซามีน และของ เชื้อ*Aspergillus* sp. สายพันธุ์กลาย N-2019 N-2062 และ N-2134 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ความเข้มข้นแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....49

4.7 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีน ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch แป้งความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....50

4.8 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช.น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีน ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch แป้งความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....52

4.9 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีน ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch แป้งความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....56

4.10 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10ปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.11 ความเข้มข้นกรดโคจิก กลูโคซามีน และสสูงสุด ของเชื้อ *Apergillus* sp. สายพันธุ์กลาย N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้ความเข้มข้นแป้ง 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....58

4.12 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้เนื้อสกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....59

4.13 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้เคซีนไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....61

4.14 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....62

4.15 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้เปบโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.16 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้ทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 64

4.17 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7.วัน.....66

4.18 ความเข้มข้นกรดโคจิก กลูโคซามีน และสูงสุด ของเชื้อ*Aspergillus* sp. สายพันธุ์กลาย N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้ความเข้มข้นแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....70

4.19 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนยีสต์สกัดต่อโซเดียมไนเตรท 3 กรัม ต่อ 2 กรัมเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....74

4.20 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนยีสต์สกัดต่อโซเดียมไนเตรท 2.5 กรัม ต่อ 2.5 กรัม เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7.....75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.21 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซา มีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนยีสต์สกัดต่อโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัมเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลาวัน.....76

4.22 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนยีสต์สกัดต่อแอมโมเยมไนเตรท 3 กรัม ต่อ 2 กรัมเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....77

4.23 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซา มีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนยีสต์สกัดต่อแอมโมเนียมไนเตรท 2.5 กรัม ต่อ 2.5 กรัมเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....78

4.24 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนยีสต์สกัดแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัม ต่อ 2 กรัมเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....79

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.25 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนยีสต์สกัดแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัม ต่อ 2.5 กรัมเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....80

4.26 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนยีสต์สกัดแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัม ต่อ 3 กรัมเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....81

4.27 ความเข้มข้นกรดโคจิก กลูโคซามีน ของเชื้อ *Apergillus* sp. สายพันธุ์กลาย N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้ความเข้มข้นแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนผสมระหว่างยีสต์สกัดและอนินทรีย์ในโตรเจน เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....82

4.28 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ BR-1 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนยีสต์สกัดโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัม เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....83

4.29 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนยีสต์สกัดโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัมเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.30 ความเข้มข้นกรดโคจิก กลูโคซามีน และ ของเชื้อ *Apergillus* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม BR-1 และสายพันธุ์กลาย N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้ความเข้มข้นแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนผสมระหว่างยีสต์สกัดและอนินทรีย์ไนโตรเจน 2 กรัม ต่อ 3 กรัม เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....86

4.31 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัดโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัมที่อัตราการกวนและการให้อากาศ 200 รอบต่อนาที และ 1.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาทีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....87

4.32 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัดโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัม ที่อัตราการกวนและการให้อากาศ 200 รอบต่อนาที และ 2.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....90

4.33 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัดโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัม ที่อัตราการกวนและการให้อากาศ 400 รอบต่อนาที และ 1.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาทีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....91

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.34 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัดโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัม ที่อัตราการกวนและการให้อากาศ 400 รอบต่อนาที และ 2.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....92

4.35 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัดโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัม ที่อัตราการกวนและการให้อากาศ 600 รอบต่อนาที และ 1.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....93

4.36 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัดโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัมที่อัตราการกวนและการให้อากาศ 600 รอบต่อนาที และ 2.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....94

4.37 ความเข้มข้นกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีน ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์กลาย N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้ความเข้มข้นแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัดและอนินทรีย์ไนโตรเจน 2 กรัม ต่อ 3 กรัม ณ อัตราการกวนและให้อากาศต่างๆ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.38 ความเข้มข้นกรดโคจิก และกลูโคซามีนสูงสุด ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์กลาย N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ความเข้มข้นแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัด 2 กรัม โซเดียมไนเตรท 3 กรัม ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีความเร็วรอบใบพัด 200 ถึง 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ถึง 2.0 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน.....96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ผลิตกรดโคจิกจากเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ.....22

2.2 เนื้อที่การเก็บเกี่ยว ผลผลิตเฉลี่ย และผลผลิตรวม ของแป้งมันสำปะหลัง.....26

2.3 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลัง.....27

2.4 คุณสมบัติของแป้งมันสำปะหลังเทียบกับแป้งชนิดอื่น.....27

4.1 เชื้อราสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม.....41

4.2 ประสิทธิภาพการหมักกรดโคจิกเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์กลาย N-2019 N-2062 และ N-2134.....49

4.3 ประสิทธิภาพการหมักกรดโคจิกที่เปอร์เซ็นต์แป้งมันสำปะหลังต่างๆ.....58

4.4 ประสิทธิภาพการหมักกรดโคจิกในแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ.....71

4.5 เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมดของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ.....71

4.6 ประสิทธิภาพการหมักกรดโคจิกด้วยยีสต์สกัดร่วมกับแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ 3 ต่อ 2 2.5 ต่อ2.5 และ 2 ต่อ 3 กรัมต่อกรัม 84

4.7 ประสิทธิภาพการหมักกรดโคจิกเปรียบเทียบระหว่างเชื้อสายพันธุ์ BR-1 และ N-2062.....87

4.8 ประสิทธิภาพการหมักกรดโคจิกเปรียบเทียบระหว่างอัตราการกวนและให้อากาศที่ 200/1.5 200/2.0 400/1.5 400/2.0 600/1.5 และ 600/2.0 รอบต่อนาทีและปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที..97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดโคจิก (Kojic acid; 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4-pyrone) เป็นสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) (Yabuta, 1924) ส่วนใหญ่สร้างจากเชื้อราในสกุล *Aspergillus* มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมเครื่องสำอางที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ช่วยให้ผิวขาว (whitening agent) เนื่องจากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ที่ส่งผลต่อกระบวนการสร้างเมลานิน (melanogenesis) (Kahn, 1995) กรดโคจิกยังถูกนำไปใช้ในด้านอื่นๆ เช่น การแพทย์ใช้เป็นยาบรรเทาอาการปวด (analgesic drug) (Beelik, 1956) สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) ซึ่งต้านไม่ให้ผักเกิดลักษณะคล้ำ (Chen และคณะ, 1991) ด้านเกษตรกรรม (agriculture) สารอนุพันธ์ของกรดโคจิกมีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลง (pesticide) (Rosfarizan และคณะ, 2010) นอกจากนี้ยังใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ (biodegradable plastic) (Futamura และคณะ, 2001b) เป็นต้น

งานวิจัยนี้จึงได้สนใจที่จะพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตกรดโคจิกโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus* ซึ่งมีศักยภาพในการผลิตทั้งสารเมทาบอไลท์ปฐมภูมิ (primary metabolite) และสารทุติยภูมิให้สามารถผลิตกรดโคจิกปริมาณสูงโดยมีการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกจากแป้งมันสำปะหลัง ใช้กระบวนการกลายพันธุ์ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับยีนเพื่อคัดเลือกเชื้อราที่เหมาะสมต่อกระบวนการย่อยแป้งและการผลิตกรดโคจิก รวมทั้งมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง การใช้แหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนของแหล่งไนโตรเจน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการทดลอง

1.2.1 ศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการทำกลายพันธุ์ด้วยสารก่อการกลาย เพื่อคัดเลือกเชื้อกลายที่ให้การผลิตกรดโคจิกสูง

1.2.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ และอัตราส่วนระหว่างแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

1.2.3 ศึกษาสภาวะการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.3 ขอบเขตของการทดลอง

1.3.1 ศึกษาระยะเวลาของการทำกลายพันธุ์ด้วยสารก่อการกลาย N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้สปอร์เชื้อรามีการรอดชีวิต 1.0 เปอร์เซ็นต์ และคัดเลือกเชื้อกลายที่ให้ผลการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด

1.3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อกลายที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูง เช่น ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ และอัตราส่วนระหว่างแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่อแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ในระดับฟลาสก์ทดลอง

1.3.3 ศึกษาสภาวะการให้อากาศประกอบด้วย อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศในถังหมักแบบใบพัดกวน 5 ลิตร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบเวลาที่ใช้ในการทำกลายพันธุ์ด้วยสารก่อการกลาย NTG เพื่อให้มีสปอร์เชื้อราอดชีวิต 1.0 เปอร์เซ็นต์ และคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถผลิตกรดโคจิกในปริมาณสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.2 ทราบความเข้มเข้มของแป้งมันสำปะหลัง ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ และลดการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ด้วยสารอนินทรีย์ไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 การกลายพันธุ์

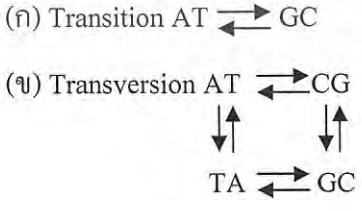
การดำรงพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตสิ่งหนึ่งที่ทำให้ประสบความสำเร็จในการอยู่รอดตามสภาวะของโลก คือ การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม ซึ่งตามธรรมชาติการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมสามารถเกิดขึ้นจากการผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) เช่น การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) เกิดยีนรีคอมบิเนชัน (gene recombination) ส่งผลต่อข้อมูลทางพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปได้สิ่งมีชีวิตบางชนิดที่มีลักษณะเหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมในขณะนั้น และแพร่พันธุ์ได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งกระบวนการที่กล่าวมาเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอย่างช้าๆ ตามวิถีของธรรมชาติ แต่ในระบบของสิ่งมีชีวิตยังมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับหน่วยที่ควบคุมลักษณะทางพันธุกรรม (gene) อย่างฉับพลันและสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ เรียกว่า การกลายพันธุ์ (mutation) (มาลินี, 2540) โดยการกลายสามารถเกิดได้ตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) ซึ่งเกิดในความถี่ที่ต่ำ คือ ประมาณ 10^{-5}-10^{-10} (พรรณี, 2543) หรือการใช้สารชักนำให้เกิดการกลาย (induced mutation) จะเรียกตัวชักนำว่า mutagen จุดประสงค์ของการชักนำก็เพื่อเพิ่มระดับความถี่ของการกลาย ดังนั้นจึงมีนักวิจัยจำนวนมากใช้แนวความคิดนี้ในการปรับปรุงสายพันธุ์พืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ ให้มีลักษณะตามที่ต้องการ โดยใช้ รังสี สารเคมี หรือการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เป็นต้น

2.1.1 ลักษณะของการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์สามารถเกิดได้ทั้งในระดับโครโมโซม (chromosomal mutation) เช่น การเพิ่มลดจำนวนชุดโครโมโซม ลักษณะของโครโมโซมที่ผิดเพี้ยนไปจากปกติ และในระดับดีเอ็นเอหรือยีน (DNA or gene mutation) (จุรีรัตน์, 2550) กรณีหลังส่วนใหญ่จะเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งจำเพาะบนยีนที่เรียกว่า point mutation (หัทยา, 2548) อาจมีการแทนที่ของเบสในดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(base substitution) ด้วยเบสในกลุ่มเดียวกัน คือ กลุ่มพิวรีน (purine) หรือไพริมิดีน (pyrimidine) เหมือนกัน เรียกการกลายลักษณะนี้ว่า transition แต่ถ้าแทนที่เบสคนละกลุ่ม คือ แทนที่เบสกลุ่มพิวรีนด้วยเบสไพริมิดีนหรือไพริมิดีนด้วยพิวรีน เรียกการแทนที่ลักษณะนี้ว่า transversion (รูปที่ 2.1) นอกจากนี้ยังมีการกลายที่เกิดการเพิ่ม (insertion) หรือขาดหายไปของเบส (deletion) (Turner, 1997) ในสายดีเอ็นเอ ทำให้รหัสโคดอนบนสาย mRNA (messenger RNA) ผิดเพี้ยนไปส่งผลต่อสายพอลิเพปไทด์ (polypeptide) ที่สร้างขึ้นในกระบวนการแปลรหัส (translation) ต่างไปจากปกติ โดยผลการเปลี่ยนแปลงเกิดในหลายลักษณะ เช่น การเปลี่ยนแปลงรหัสโคดอนแล้วทำให้รหัสมีความหมายผิดไป (missense mutation) การเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นรหัสหยุดหรือสิ้นสุดการสังเคราะห์สายพอลิเพปไทด์ (nonsense mutation) ทำให้สายพอลิเพปไทด์สั้นลง การเปลี่ยนแปลงทำให้กรอบการอ่านรหัสโคดอนเลื่อน (frameshift mutation) ส่งผลต่อบริเวณตั้งแต่กรอบการอ่านที่เลื่อนมีรหัสโคดอนที่กำหนดชนิดของกรดอะมิโนผิดเพี้ยนไปจากเดิม บางครั้งการเปลี่ยนแปลงไม่ส่งผลต่อคุณสมบัติเดิมของสายพอลิเพปไทด์ (neutral mutation) เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของเบสแปลรหัสได้กรดอะมิโนชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติไม่ต่างจากกรดอะมิโนชนิดเดิมหรือเป็นชนิดเดิม (วรวุฒิ, 2551) (การเปลี่ยนแปลงลำดับเบสตัวที่ 3 ของโคดอน ส่วนใหญ่จะแปลรหัสได้กรดอะมิโนชนิดเดิม เรียกคุณสมบัติในเบสตำแหน่งนี้ว่า wobble base) หรือเป็นกรดอะมิโนที่ไม่ได้อยู่ในบริเวณที่สำคัญ เช่น บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ จึงไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงที่เราสามารถสังเกตเห็นได้ (phenotype) ดังนั้นถ้ากระบวนการกลายพันธุ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเบสที่ส่งผลต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนทำให้โปรตีนที่เกิดขึ้นซึ่งมีส่วนในการสร้างสารผลิตภัณฑ์มีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปจนสามารถช่วยเสริมประสิทธิภาพการผลิตสารที่เราต้องการได้



รูปที่ 2.1 กระบวนการกลายที่เกิดจากการแทนที่เบส (ก) การแทนที่เบสด้วยเบสกลุ่มเดียวกัน (transition) (ข) การแทนที่เบสด้วยเบสคนละกลุ่มกัน (transversion)

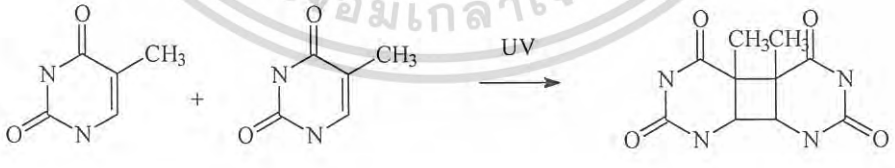
ที่มา: มาลินี (2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

2.1.2.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสี

การชักนำด้วยรังสี แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ ตามระดับของพลังงาน คือ การกลายจากรังสีกลุ่มที่ทำให้สารแตกตัวเป็นไอออน (ionizing radiation) ซึ่งจัดเป็นกลุ่มของรังสีพลังงานสูงมีอำนาจทะลุทะลวงมาก เช่น รังสีเอ็กซ์ (X-ray) และ รังสีแกมม่า (gamma ray) เป็นต้น อีกกลุ่ม คือ รังสีพลังงานต่ำไม่มีการแตกตัวเป็นไอออน (non-ionizing radiation) เช่น รังสียูวี (UV-ray) หรือความร้อน เนื่องจากความสามารถในการแทรกซึมต่ำกว่าทำให้ทั้ง 2 ลักษณะให้ผลการเปลี่ยนแปลงต่างกัน โดยกระบวนการกลายจากรังสีกลุ่มแรกทำให้อิเล็คตรอนของสารหลุดออกจึงส่งผลต่อโครงสร้างดีเอ็นเอทำให้เกิดการแตกหัก หรือโครงสร้างน้ำตาลและเบสถูกทำลาย (Turner, 1997) ทำให้โครโมโซมผิดปกติ คือ เกิดการเปลี่ยนทั้งแบบ deletion duplication (insertion) inversion และ translocation เป็นต้น (หัทยา, 2548) ส่วนการกลายจากรังสีที่ไม่ทำให้แตกตัวเป็นไอออน ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะรังสียูวีซึ่งใช้ในกระบวนการทำกลายพันธุ์ส่วนใหญ่ พบว่าทำให้อิเล็คตรอนมีการเปลี่ยนระดับชั้นพลังงานอยู่ในชั้นของพลังงานที่สูงขึ้น (exited state) ส่งผลต่อคุณสมบัติการจับกันของเบส ส่วนใหญ่เกิดลักษณะเรียกว่า ไพริมิดีนไดเมอร์ (pyrimidine dimers) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งเกิดการจับกันของเบสกลุ่มไพริมิดีนที่อยู่ติดกัน (Turner, 1997) พบเป็นไทมีนไทมีนไดเมอร์ อาจพบเป็นไซโตซีนไซโตซีนไดเมอร์ได้แต่พบในระดับความถี่ที่ต่ำกว่า (ไพศาล, 2542)



Thymine Thymine dimer

รูปที่ 2.2 ปฏิกิริยาการเกิดไพริมิดีนไดเมอร์ในเบสชนิดไทมีน

ที่มา: หัทยา (2548)

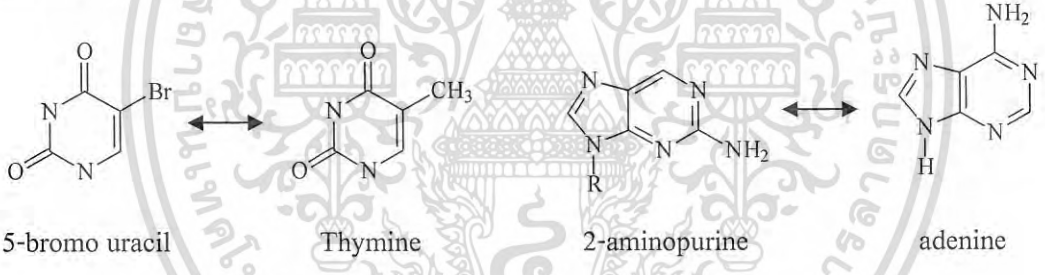
จุดนี้ให้การเปลี่ยนแปลง 2 ลักษณะ คือ ไดเมอร์ทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอเปลี่ยนไปส่งผลต่อการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ อีกลักษณะ คือ การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลายที่เป็นผลจากการซ่อมแซมตัวเองของดีเอ็นเอแล้วผิดพลาดจึงทำให้เกิดการกลายเช่นเดียวกัน (หัทยา, 2548)

2.1.2.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี

สารก่อการกลายแบ่งออกได้หลายกลุ่มตามกลไกการเข้าทำปฏิกิริยากับสารพันธุกรรม ประกอบด้วย สารลักษณะคล้ายเบส (base analog agent) คือ สารก่อการกลายพันธุ์ช่วงกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) ทำให้รหัสโคดอน (codon) บนสาย mRNA ถอดรหัสจากดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เปลี่ยนไปจากเดิมส่งให้การแปลรหัสเป็นสายพอลิเพปไทด์ผิดพลาดไปด้วย สารที่มีลักษณะคล้ายเบส เช่น 5-bromouracil (5-Bu) ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับเบสไทมีนต่างกันที่มีหมู่โบรมีน (-Br) ในตำแหน่งที่ 5 แทนที่หมู่ methyl ($-CH_3$) (จุรีรัตน์, 2550) (รูปที่ 2.3) นอกจากนี้ยังมีสาร 2-aminopurine ที่มีโครงสร้างคล้ายกับเบสในกลุ่มพิวรีน (กวานีนและอะดีนีน) (พรรณี, 2543)



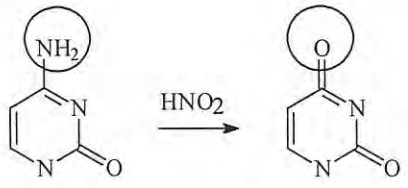
รูปที่ 2.3 (ก) ลักษณะโครงสร้างที่คล้ายกันของ 5-bromo uracil และ เบสไทมีน (ข) ลักษณะโครงสร้างที่คล้ายกันของ 2-aminopurine และ เบสอะดีนีน

ที่มา: มาลินี (2540)

สารกลุ่มที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างเบส (base modifying agent) คือ สารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเบสทั้งในขณะที่มีและไม่มีการจำลองตัวของดีเอ็นเอ ประกอบด้วยกลไก เช่น กระบวนการเปลี่ยนหมู่อะมิโน (deamination) เป็นหมู่คีโตน (ketone) ด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน เรียกว่า ปฏิกิริยาดึงหมู่อะมิโน (deamination) (รูปที่ 2.4) ตัวอย่าง คือ กรดไนตรัส (nitrous acid, HNO_2) หรือไฮดรอกซามีน (hydroxamine) ทำปฏิกิริยากับเบสไซโตซีนจนมีโครงสร้างทางเคมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช

เปลี่ยนเป็นไฮดรอกซีไซโตซีน (N_4-hydroxycytosine) แทนที่จะจับกับเบสกวานีนแต่กลับจับกับเบสอะดีนีนแทน



Cytosine Uracil

รูปที่ 2.4 การเกิดปฏิกิริยาดึงหมู่อะมิโนจากเบสไซโตซีนด้วยกรดไนตรัส

ที่มา: มาลินี (2540)

สารเติมหมู่แอลคิล (alkyl group) ให้โมเลกุลของสารอื่น (alkylating agent) เช่น เอทิล-มีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate, EMS) (รูปที่ 2.5 (ก)) จะเติมกลุ่มเอธิลให้กับเบสในดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 7- N และ 6-O เช่น กัวนีนถูกเติมเอธิลที่ตำแหน่ง 7-N (7-ethylguanine) ซึ่งจะจับกับไทมีนทำให้เกิดทรานซิชันมิวเทชัน G:C-->A:T หรือไนโตรโซกัวนิดีน (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG หรือ NTG) (รูปที่ 2.5 (ข)) สารนี้มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน ละลายได้ในน้ำ และในตัวทำละลายที่มีขั้ว เป็นสารก่อกลายที่มีประสิทธิภาพสูงตัวหนึ่ง สามารถชักนำให้เกิดการกลายหลายจุดในตำแหน่งที่ใกล้กัน มีการศึกษาผลจากการกลาย เมื่อใช้ไนโตรโซกัวนิดีนพบลักษณะการกลายคล้ายคลึงกัน คือ พบลักษณะกลายแบบแทนที่เบสชนิด transition

(ก) Ethyl methane sulfonate (ข) N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของสารก่อการกลายในกลุ่ม alkylating agent

ที่มา: (ก) Maloy และคณะ (1995)

(ข) Rice และคณะ (1984)

เช่น การศึกษากับ *Corynebacterium glutamicum* พบการกลายด้วยการแทนที่ของเบส หรือ point mutation โดยไม่พบการกลายแบบ deletion framshift และ insertion (Ohnishi และคณะ, 2007) ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คล้ายคลึงกับ Lucchesi และคณะ (1986) ใช้สารตัวเดียวกันทำกลายพันธุ์แบคเทอริโอเฟจ พบลักษณะการกลายเป็นแบบแทนที่เบสชนิด transition ชนิด GC -- > AT 29 ตัวอย่าง และ AT -- > GC 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ

Futamura และคณะ (2001a) ทำกลายพันธุ์เชื้อ *Aspergillus oryzae* ATCC 22788 ด้วยสารก่อการกลายไนโตรโซกัวนิดีนความเข้มข้นสุดท้ายเมื่อผสมกับสปอร์ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในสภาวะเขย่า หลังจากทำกลายพันธุ์ได้สปอร์รอดชีวิตประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ สปอร์ที่ได้มาล้างด้วยสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 7.0 ซึ่งผสมกับสารละลายทวีน 20 ความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเลี้ยงบนอาหารพีดีเอ (potato dextrose agar) 5-6 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลการคัดเลือกพบเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus oryzae* MK107-39 ที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้ถึง 28 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ถึง 7.7 เท่า

Wan และคณะ (2004) ได้เพิ่มโอกาสการกลายเพื่อพัฒนาสายพันธุ์พ่อแม่อย่าง *Aspergillus oryzae* ATCC 22788 เช่นเดียวกับ Futamura และคณะ (2001a) เพื่อให้กรดโคจิกมีปริมาณสูงขึ้น แต่ทำการกลายโดยผสมวิธีการ 3 วิธี ประกอบด้วย การใช้สารเคมีไนโตรโซกัวนิดีน การใช้รังสียูวี และการผสมรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) เริ่มแรกนำสปอร์เชื้อรามาทำให้กลายด้วยสารไนโตรโซกัวนิดีน ซึ่งใช้สารแขวนลอยสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ ผสมกับสารละลายไนโตรโซกัวนิดีนที่มีสารก่อการกลาย 1 กรัม ละลายอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris/HCl ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 6.0 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างสปอร์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง นำสปอร์ที่ได้เลี้ยงบนอาหารพีดีเอ เป็นเวลา 3 ถึง 4 วัน นำเชื้อที่คาดว่ามีการกลายจนผลิตกรดโคจิกสูงขึ้นมาทำการรวมโปรโตพลาสต์ นำเซลล์โปรโตพลาสต์ที่รวมแล้วฉายด้วยรังสียูวี และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกสูงขึ้น พบเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus oryzae* M3B9 ที่ผลิตกรดโคจิกสูงผลิตได้ถึง 41 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ถึง 100 เท่า ในแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส และแหล่งไนโตรเจน คือ รำข้าว ตามลำดับ

Pal และ Das (2005) ทำการคัดเลือกสปอร์ที่ต้านต่อโลหะแคดเมียม โดยนำสปอร์ของ *Aspergillus niger* ที่เลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน มาทำสารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของสารก่อการกลายที่ 200 400 และ 600 มิลลิกรัมต่อลิตร เวลาสัมผัสสารก่อการกลาย 35 นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากทำการกลายแล้วพบการรอดชีวิต 29 ถึง 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช

เปอร์เซ็นต์ และพบว่าปริมาณที่ 400 มิลลิลิกรัมต่อลิตร จะให้เชื้อสายพันธุ์กลายที่ต้านต่อโลหะแคดเมียมสูงที่สุด

Suryadi และคณะ (2006) ทำการกลาย *Aspergillus flavus* ด้วยสารไนโตรโซกัวนิดีน โดยใช้สารแขวนลอยสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายไนโตรโซกัวนิดีนในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าตลอดเวลาที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที จากนั้นล้างสารก่อการกลายออกด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นำมาเลี้ยงบนอาหารพีดีเอบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน คัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงขึ้น ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus oryzae* N40C10 ที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้ 8.15 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ประมาณ 20 เท่า

Lotfy และคณะ (2006) ได้คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายจาก *Aspergillus niger* UMIP 2564.04 ซึ่งผลิตกรดซิตริกสูงขึ้น ทำโดยนำสปอร์ของเชื้อราที่เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาฉายด้วยรังสียูวี กำลัง 30 วัตต์ มีระยะห่างจากหลอดยูวี 20 เซนติเมตร 18 นาที จากนั้นทำกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส (ethyl methane sulfonate, EMS) และ อะคริดีนออเรนจ์ (acridine orange, AO) โดยสารทั้งสองชนิดจะละลายอยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง 7.0 ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย คือ *Aspergillus niger* W5 ซึ่งผลิตกรดได้มากกว่าเดิม 3.2 เท่า ทั้งๆที่มวลเซลล์ที่ได้จากการหมักมีปริมาณต่ำที่สุด

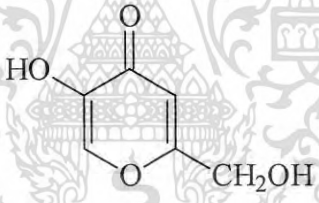
ฐิติมา (2543) ได้ปรับปรุงพันธุ์เชื้อราให้สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงขึ้นโดยใช้เทคนิคการหลอมรวมโพรโตพลาสต์ของเชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ได้เชื้อลูกผสม 3 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตกรดโคจิกจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งได้ เชื้อลูกผสมนี้สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 4.72 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ด้วยอาหารที่มี แป้งข้าวโพด 80 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 6.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กรดโคจิก (kojic acid)

2.2.1 คุณสมบัติเชิงเคมีและฟิสิกส์ (chemical and physical properties)

กรดโคจิก (kojic acid) หรือ 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-gamma-pyrone เป็นเมทาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) สร้างจากสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่หมักแบบใช้ออกซิเจนจากเชื้อหลายกลุ่ม แบคทีเรีย เช่น *Bacterium xylinoides*, *Glucono-acetobacter opacus* var. *mobilis*, *G. roseum* และ แบคทีเรียในกลุ่มผลิตกรดอะซิติก รา เช่น สกุล *Aspergillus* หรือ *Penicillium* โดยเฉพาะ *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus flavus* เป็นกลุ่มสำคัญที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิก (Bently, 2006) กรดโคจิกมีรายงานครั้งแรกในปี 1907 โดยนักวิทยาชาวญี่ปุ่น Saito (Brtko และคณะ, 2004) ซึ่งแยกผลึกของสารชนิดนี้ได้จากเส้นใยของ *Aspergillus oryzae* ที่เจริญบนข้าวนึ่ง (koji) แต่ยังไม่ได้ถูกตั้งชื่อ จนปี 1924 Yabuta ได้ศึกษาและให้ชื่อสารดังกล่าวว่ากรดโคจิกเป็นต้นมา กรดโคจิกเป็นสารประกอบกลุ่ม gamma-pyrone (รูปที่ 2.6)



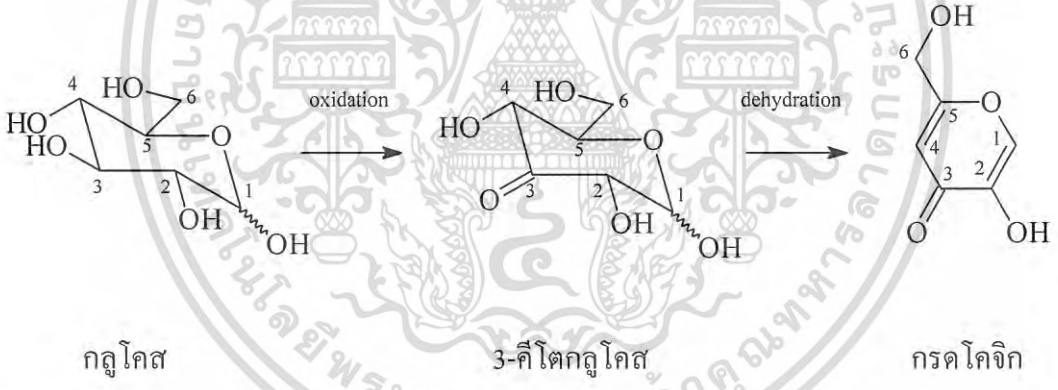
รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก
ที่มา : Bajpai และคณะ (1982)

มีสูตรโมเลกุล คือ $C_6H_6O_4$ มวลโมเลกุลเท่ากับ 142.11 กรัมต่อโมล เป็นผลึกไม่มีสีรูปทรงปริซึมแบบเข็ม ละลายได้ดีในตัวทำละลาย เช่น น้ำ เอทานอล และอะซีโตน มีจุดหลอมเหลว (meltingpoint) อยู่ที่ 152.5 องศาเซลเซียส ในสารละลายเจือจางสามารถให้สารประกอบสีม่วงแดงกับสารละลายเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ได้ (Bajpai และคณะ, 1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ชีวสังเคราะห์ของกรดโคจิก (kojic biosynthesis)

การสังเคราะห์กรดโคจิกแบ่งออกเป็น การสังเคราะห์กรดโคจิกจากกลูโคสซึ่งมีจำนวนคาร์บอน 6 อะตอม มีโครงสร้างเป็นวงแหวนไพราโนส (pyranose ring) เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยตรงจากกลูโคสเกิดเป็นกรดโคจิกที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนไพโรน (pyrone ring) ซึ่งไม่มีกระบวนการสลายสายคาร์บอนออกจากกัน ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงจะเกิดกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation) และกระบวนการดึงน้ำออก (dehydration) โดยกระบวนการหลังอาจเกิดขึ้น 2 ครั้ง ในอีกทฤษฎีหนึ่ง คือ การสร้างกรดโคจิกจากสารที่มีจำนวนคาร์บอนน้อยกว่า 6 อะตอม เช่น น้ำตาลเพนโตส (pentose) กลีเซอรอล (glycerol) และไดไฮดรอกซีอะซีโตน (dihydroxyacetone) ซึ่งเปลี่ยนแปลงจากสารที่มีจำนวนคาร์บอนน้อยกว่า 6 อะตอมกลายเป็นสารที่มีจำนวนคาร์บอน 6 อะตอมก่อน และโครงสร้างที่มีคาร์บอน 6 อะตอมนี้จะเป็นสารตั้งต้นที่เปลี่ยนเป็นกรดโคจิกต่อไป (Bently, 2006)



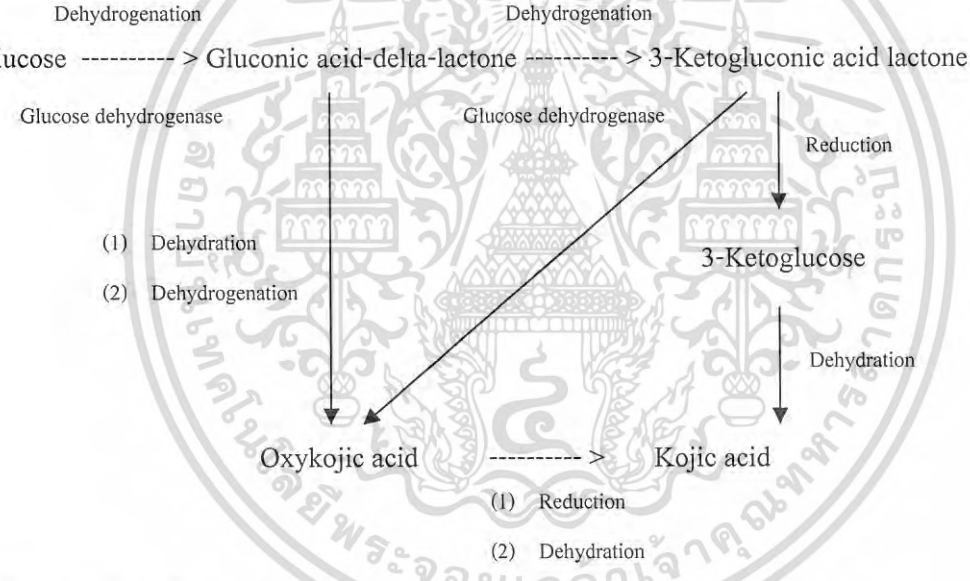
รูปที่ 2.7 วิถีที่เป็นไปได้ในการสังเคราะห์กรดโคจิก
ที่มา: Bently (2006)

ชีวสังเคราะห์ที่เป็นไปได้แสดงในรูปที่ 2.7 แสดงกระบวนการออกซิเดชันของหมู่ CHOH ของคาร์โบไฮเดรต (คาร์บอนตำแหน่งที่สามของน้ำตาล) กลายเป็นหมู่ CO ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 เช่นเดียวกัน จากกลูโคสได้เป็น 3-คีโตกลูโคส (3-ketoglucose) อันเป็นสารเริ่มต้นในกระบวนการสังเคราะห์กรดโคจิกต่อไป (Bently, 2006)

นอกจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีที่เกิดขึ้น จากรูปที่ 2.7 Bajpai และคณะ (1981) ได้ตรวจสอบเอนไซม์ที่มีความสำคัญในชีวสังเคราะห์ของกรดโคจิกจาก *Aspergillus flavus* โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิจารณาการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ พบว่าเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์กรดโคจิก คือ เอนไซม์เฮกโซไคเนส (hexokinase) กลูโคสดีไฮโดรจีเนส (glucose dehydrogenase) และกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส (gluconate dehydrogenase) ซึ่งพบกิจกรรมจำเพาะ(specific activity) ที่สูงในขณะที่เชื้อมีการผลิตกรดโคจิก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Megalla และคณะ (1986) พบว่าเมื่อเติมสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดนิโคตินิก (copper(I)-nicotinic acid complex) ที่เป็นสารกลุ่มวิตามินบี 3 และเป็นองค์ประกอบในโคเอนไซม์ NAD และ NADP สำหรับปฏิกิริยาดีไฮโดรจีเนชัน (dehydrogenation) พบว่าสามารถทำให้ *Aspergillus flavus* ผลิตกรดโคจิกสูงขึ้นจากเดิม 47 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารตัวกลางที่อาจพบในวิถีการสังเคราะห์กรดโคจิก คือ กรดกลูโคนิกเดลตาแลคโตน (gluconic acid - delta - lactone)



รูปที่ 2.8 วิถีการสังเคราะห์กรดโคจิกจาก *Aspergillus flavus* ที่เป็นไปได้

ที่มา : Bajpai และคณะ (1981)

1 ใน 3 ชนิด คือ 3-คีโตกลูโคนิกแลคโตน (3-ketogluconic acid lactone) 3-คีโตกลูโคส (3-ketoglucose) และกรดออกซาลิก (oxalic acid) (Bajpai และคณะ, 1981) เห็นได้ว่า สาร 3-คีโตกลูโคส ที่ตั้งสมมติฐานไว้ของ Bajpai และคณะ (1981) สอดคล้องกับข้อสรุปของ Bentley (2006) ในภายหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

เชื้อราส่วนใหญ่ได้รับพลังงานจากการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ (organotroph) และแหล่งคาร์บอนจากสารอินทรีย์เช่นเดียวกัน (heterotroph) ราจึงจัดอยู่ในกลุ่ม chemooraganotroph (Blanch และ Clark, 1996) ที่มีศักยภาพต่อการใช้สับสเทรตหลายชนิด ดังนั้นการรู้ถึงสภาวะที่สอดคล้องต่อกระบวนการสร้างสารผลิตภัณฑ์และการเจริญจะสามารถดึงศักยภาพของเชื้อราออกมาใช้ได้อย่างเต็มที่ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องและมีบทบาทสำคัญ เช่น ปัจจัยที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส แร่ธาตุต่างๆ และปัจจัยเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต เช่น ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณออกซิเจนละลาย หรือตัวยับยั้ง เป็นต้น (Michael และคณะ, 2001)

2.3.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source)

แหล่งคาร์บอนมีส่วนสำคัญในการสร้างพลังงาน (energy source) ผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) วัฏจักรเครป (Kreb's cycle) หรือกระบวนการถ่ายทอดอิเล็คตรอน (electron transport) อีกทั้งเป็นโครงร่างของเซลล์ (cell skeletal) โดยกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ใช้ก๊าซออกซิเจนสำหรับเจริญเติบโตต้องใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 55 (สมใจ, 2544) แหล่งคาร์บอนที่เชื้อราใช้ได้ดี คือ สารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตจำพวกน้ำตาล ทั้งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) เช่น น้ำตาลกลูโคสซึ่งเชื้อราส่วนใหญ่ใช้ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์มีโปรตีนสำหรับนำเข้าน้ำตาลกลูโคสตลอดเวลา (constitutive transport protein) ส่งผลให้เซลล์นำเข้าได้ดีกว่าน้ำตาลชนิดอื่นๆ นอกจากนี้เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) เช่น มอลโตส ซูโครส และกลุ่มโพลีแซคคาร์ไรด์ (polysaccharide) เช่น แป้ง (starch) เซลลูโลส (cellulose) เป็นต้น (Deacon, 2006)

มีการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดโคจิกด้วยกันหลายชนิด ตั้งแต่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น ไซโลส (xylose) (Barham และ Smith,1936; Rofarizan และคณะ, 2000a) กลูโคส และฟรุคโตส (Rofarizan และคณะ, 2000a) น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น มอลโตส (Rofarizan และคณะ, 2000a) และซูโครส (อุษา. 2543; Rofarizan และคณะ, 2006) คาร์โบไฮเดรตกลุ่มแป้ง เช่น แป้งสาคู (Rofarizan และคณะ, 2002) แป้งมันสำปะหลัง (อภิชญา, 2548; สุวทัย, 2545) และแป้งข้าวโพด (Futamura และคณะ, 2001b) เป็นต้น เห็นได้ว่าเชื้อราสามารถใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตกรดโคจิกที่หลากหลายตั้งแต่สารที่มีโมเลกุลไม่ซับซ้อนถึงสารที่มีความซับซ้อนสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี 1996 Takamizawa และคณะได้ทดลองใช้วิธีทางสถิติอย่าง Box-Wilson method เพื่อช่วยหาสภาวะที่เหมาะต่ออัตราการผลิตกรดโคจิกด้วย *Aspergillus oryzae* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสความเข้มข้น 148 กรัมต่อลิตร ส่วนสารอาหารชนิดอื่น ประกอบด้วย พอลิเปบโตน 4.44 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 สปอร์เริ่มต้นให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น $2x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที สามารถทำให้เชื้อราสามารถผลิตกรดโคจิกได้ 4.44 กรัมต่อลิตร

Rofarizan และคณะ (2000a) ศึกษาเกี่ยวกับจลนพลศาสตร์การหมักกรดโคจิกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เช่น กลูโคส ฟรุคโตส ไซโลส ซูโครส แป้ง มอลโทส และแลคโทส ด้วย *Aspergillus flavus* Link 44-1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียม-ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเท่ากับ 3.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ $3.5x10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่า *Aspergillus flavus* Link 44-1 สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดโคจิกได้มากที่สุดเท่ากับ 39.9 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมา คือ น้ำตาลไซโลสได้ 35.1 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อจะเปลี่ยนแป้งเป็นเซลล์ซึ่งสูงถึง 15.02 กรัมต่อลิตร แต่ผลิตกรดโคจิกได้เพียง 23.14 กรัมต่อลิตร

El-aasar (2006) ศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิกด้วย *Aspergillus parasiticus* ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และกากน้ำตาล โดยผันแปรความเข้มข้น พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุดมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เลือกใช้ น้ำตาลกลูโคสสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุดที่ระดับความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ส่วนน้ำตาลซูโครสและกากน้ำตาลมีระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สุวทัย (2545) ได้ทดลองใช้แป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นพอลิแซคคาร์ไรด์ในการผลิตกรดโคจิกด้วย *Aspergillus oryzae* K-13 ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 150 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.48 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้มีอัตราส่วนระหว่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนกับไนโตรเจนเท่ากับ 385 ต่อ 2 และใช้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 6.0 ได้ปริมาณกรดโคจิกเท่ากับ 21.70 กรัมต่อลิตร วันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยง

อภิชญา (2548) สามารถผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังด้วย *Aspergillus* sp BR-1 ที่ระดับความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ได้สูงที่สุด เมื่อเทียบกับระดับความเข้มข้นที่ 20 และ 40 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่ประกอบด้วยสารสกัดจากยีสต์ 2.5 กรัม โซเดียมไนเตรต 2.5 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัม ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 3.5 เขย่าในฟลาสก์ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังได้ 11.62 กรัมต่อลิตร เพียงในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ผลได้กรดโคจิกต่อมวลเซลล์เท่ากับ 0.850 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์ ผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล 0.252 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ผลได้กรดโคจิกจากการใช้น้ำตาล 0.214 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ

Kamaroddin (2007) ได้ผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง (fed-batch) ด้วย *Aspergillus flavus* ในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 1.5 ลิตร โดยสูตรอาหารประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัม ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 3.0 สามารถผลิตกรดโคจิกได้ 0.96 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสเท่ากับ 1.77 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในช่วงของการเพาะเลี้ยงแบบครั้งเดียวเสร็จ จากนั้นจะมีการเติมแป้งมันสำปะหลังพบว่าความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ได้ปริมาณกรดโคจิกสูงที่สุดเท่ากับ 2.77 กรัมต่อลิตร

จะเห็นได้ว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยง เช่น การเติมสับสเทรตหลังจากมีการเพาะเลี้ยงสามารถส่งผลต่อค่าพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก เห็นได้จากผลการวิจัยของ Rofarizan และคณะ (2002) ซึ่งแสดงผลการเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยแป้งสาคู โดยศึกษาระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่างๆ เปรียบเทียบกัน เทคนิคแรก คือ การเติมสับสเทรตเพิ่มภายหลังการเพาะเลี้ยงซึ่งทำใน 2 ลักษณะ ประกอบด้วยการเติมแป้งความเข้มข้น 140 กรัมต่อลิตร ครั้งเดียวหลังจากวันที่ 2 และการเติมแป้งเป็นช่วงๆ หลังจากวันที่ 2 จนได้ปริมาณ 140 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกัน ในสภาวะที่ใช้แป้งความเข้มข้นเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงช่วงแรก ส่วนเทคนิคหลัง คือ การเพาะเลี้ยงแบบครั้งเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เสร็จ (batch) ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร การเพาะเลี้ยงทั้ง 3 แบบ ให้ผลการผลิตกับข้อมูลทางจลนพลศาสตร์ภายในถังหมัก หรือแม้กระทั่งข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับเชื้อราแตกต่างกัน พบว่ากระบวนการเติมแป้งครั้งเดียวหลังจากวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงให้ปริมาณกรดโคจิกมากกว่ากระบวนการหมักแบบครั้งเดียวเสร็จถึง 4 เท่า แต่เมื่อมีการเติมแป้งเป็นช่วงๆ กลับให้ปริมาณกรดโคจิกที่สูงกว่าทั้ง 2 กระบวนการก่อนหน้านี้

นอกจากปริมาณของแป้ง หรือแม้กระทั่งเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนจะส่งผลต่อการผลิตกรดโคจิกโดยตรงแล้ว พบว่ายังก่อให้เกิดผลทางอ้อมซึ่งเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมในกระบวนการหมัก เช่น เกิดภาวะออกซิเจนละลายลดลง เนื่องจากอาหารที่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนมีความหนืดของอาหารมากกว่าแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาล ทำให้การถ่ายเทมวลของก๊าซออกซิเจน (oxygen transfer) จากอากาศลงสู่น้ำหมักเกิดได้น้อย ส่งผลให้ความสามารถการใช้ออกซิเจนของเชื้อราลดลง (Stanbury และคณะ, 1995) เพราะจากรายงานการวิจัยของ Futamura และคณะ (2001b) พบว่า *Aspergillus oryzae* MK-107 ที่เลี้ยงในแป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยบางส่วนจะไม่มีการผลิตกรดโคจิกเมื่อออกซิเจนละลายต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Rofarizan และคณะ (2002) พบว่าหากกระบวนการให้อากาศในถังหมักไม่เหมาะสมจะทำให้กรดโคจิกถูกสร้างน้อยลง เพราะจากผลการทดลองใช้แป้งสาคูเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้อาหารมีความหนืดสูง พบว่าถ้ากระบวนการกวนและการให้อากาศไม่เพียงพอจะทำให้ออกซิเจนละลายในน้ำหมักลดลงจนเหลือศูนย์เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งลักษณะของเส้นใยเมื่อเจริญจะแตกต่างกัน ถ้าเชื้อราเจริญในอาหารซึ่งมีองค์ประกอบที่ไม่ละลายน้ำหรือมีความหนืด จะทำให้เส้นใยของเชื้อราไม่ก่อตัวเป็นก้อนกลม (pellet) แต่จะมีลักษณะของเส้นใยเกาะกันอย่างหลวมๆ รูปร่างไม่แน่นอน ลักษณะเส้นใยแบบนี้จะส่งผลให้อาหารมีความหนืดสูงขึ้น (Wan และคณะ, 2005) ซึ่งจะลดประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลสาร ทำให้มีค่าการถ่ายเทมวลสารต่ำกว่าเชื้อราที่เจริญแล้วมีรูปร่างเป็นก้อนกลมซึ่งส่งผลต่อความหนืดของอาหารต่ำกว่า

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นถึงผลของแหล่งคาร์บอนทั้งทางตรงและอ้อม ซึ่งสามารถส่งผลต่อกระบวนการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา ดังนั้นการเลือกใช้แหล่งของคาร์บอนและหาสภาวะที่เหมาะต่อการผลิตกรดโคจิกของแหล่งคาร์บอนชนิดนั้นๆ จึงมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพสูงสุดที่ได้จากกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารอีกชนิดหนึ่งที่เชื้อราต้องการในปริมาณมาก โดยเชื้อราทั้งหมดสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จากกรดอะมิโนได้ดี โดยกรดอะมิโนอาจอยู่ในรูปของยีสต์สกัด (yeast extract) เปบโตน (peptone) ทริปโตน (tryptone) สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) เคซีน (casein hydrolysate) น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) เป็นต้น (Michael และคณะ, 2001) แหล่งไนโตรเจนกลุ่มกรดอะมิโนสามารถนำไปสังเคราะห์เป็นโปรตีนได้ทันที ส่วนแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียม (NH_4^+) ไม่สามารถนำไปสังเคราะห์เป็นโปรตีนได้ทันทีต้องผ่านกระบวนการรวมตัวกับกรดอินทรีย์จนเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ คือ กรดอะมิโนกลูตามิก (สังเคราะห์จากแอลฟ่าคีโตกลูตาเรต) หรือกรดอะมิโนแอสพาติก ซึ่งกรดอะมิโนทั้งสองสามารถถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ โดยอาศัยกระบวนการโยกย้ายหมู่อะมิโน(transamination reaction) แต่แอมโมเนียมไม่ใช่แหล่งไนโตรเจนที่ดีนัก เนื่องจากทุกครั้งที่มีการนำสารชนิดนี้สู่เซลล์จะแลกเปลี่ยนหรือปลดปล่อยโปรตอน (H^+) ออกมานอกเซลล์ (Griffin, 1994) ทำให้สภาวะในน้ำหมักมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างลดลงอย่างรวดเร็ว (Berry, 1988) ซึ่งอาจยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้

เชื้อราหลายชนิดสามารถใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนอีกชนิดหนึ่ง คือ สารประกอบไนเตรต (NO_3^-) ไนเตรทเมื่อเข้าในเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์และแอมโมเนียมจากการทำงานของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (nitrate reductase) และไนไตรท์รีดักเทส (nitrite reductase) ตามลำดับ

	nitrate reductase		*nitrite reductase*		*glutamate dehydrogenase*		*glutamine syntase*	
NO_3^-	--->	NO_2^-	--->	NH_4^+	--->	glutamate	--->	glutamine
nitrate		nitrite		ammonium				

รูปที่ 2.9 วิถีการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์

ที่มา: Daecon. (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นแอมโมเนียมที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ต่อไป (รูปที่ 2.8) ซึ่งผลจากการใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนจากไนเตรตจะทำให้อาหารเลี้ยงมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างสูงขึ้น (Daecon, 2006)

พบว่าการเลือกใช้ของเชื้อราส่วนใหญ่เมื่อมีแหล่งไนโตรเจนหลายชนิดผสมอยู่ แอมโมเนียมหรือกรดอะมิโนกลูตามีนจะถูกนำเข้ามาใช้ก่อนแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ เนื่องจากสารทั้งสองชนิดเป็นสารเริ่มต้นที่สำคัญต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนชนิดอื่นๆ (Daecon, 1997)

Futamura และคณะ (2001b) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกจาก *Aspergillus oryzae* MK-109 โดยใช้แป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยบางส่วน เพื่อผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบอากาศยกตัว (airlift fermentor) ขนาด 3 ลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 2 ลิตร โดยแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม คือ แหล่งไนโตรเจนจากน้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ El-aasar (2006) ที่รายงานผลของยีสต์สกัดที่ใช้เพียง 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผสมในอาหารที่มี กลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วย ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ด้วย *Aspergillus parasiticus* ให้ผลการผลิตกรดโคจิกถึง 34.38 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเหตุผลที่ว่ายีสต์สกัดมีสิ่งที่จำเป็นต่อการเจริญหรือวิตามินที่จำเป็นต่อกระบวนการหมักกรดโคจิก ส่วนเปบโตนให้ผลรองลงมา และที่ให้ผลน้อย คือ แหล่งไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรต ซึ่งประสิทธิภาพของยีสต์สกัดต่อการผลิตกรดโคจิกยังเห็นจากการทดลองโดยให้ยีสต์สกัดในช่วงหลังจากที่แหล่งไนโตรเจนหมดหรือช่วงที่มีการผลิตกรดโคจิกซึ่ง Ariff และคณะ (1996) ได้ศึกษาการใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร ในอัตรา 3.2 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง พบว่ายีสต์สกัดมีผลต่อการเจริญเติบโตเล็กน้อยซึ่งมีอัตราที่ต่ำกว่าการเจริญของเชื้อในช่วงต้นของการเพาะเลี้ยงแบบครั้งเดียวเสร็จ เมื่อเปรียบเทียบทั้งสองระบบ

พบว่าการเติมยีสต์สกัดในช่วงระยะการผลิตให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 16.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้ปริมาณเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบครั้งเดียวเสร็จถึง 23 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้เท่ากับ 19 กรัมต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงแบบที่ไม่มีการเติมยีสต์สกัด สาเหตุเกิดจากแหล่งไนโตรเจนที่เติมจะส่งผลให้เชื้อใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตของเซลล์แทน ส่งผลให้มีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำแหล่งคาร์บอนไปสังเคราะห์กรดโคจิกลดลง และยังพบอีกว่าเชื้อมีการใช้กลูโคสอย่างรวดเร็ว แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่กำลังเจริญและสภาวะที่มีแหล่งไนโตรเจนอย่างไม่จำกัดไม่ได้ส่งผลต่อวิถีการสังเคราะห์กรดโคจิก แต่แหล่งไนโตรเจนก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ซึ่งจะลดความสามารถของเส้นใยในการผลิตกรดโคจิกลง

ส่วนแหล่งไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ส่วนใหญ่มักให้ผลไปในเชิงลบเพราะทั้ง Coupland และ Walter (1987); El-aasar (2006) ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันในการทดลองกับ *Aspergillus parasiticus* โดย Coupland และ Walter (1987) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เติมเช่นกัน พบว่าที่ความเข้มข้นของเปบโตนที่ระดับ 2 กรัมต่อลิตร ให้ผลการผลิตกรดโคจิกสูงสุด แต่เมื่อเติมที่ 10 กรัมต่อลิตร จะให้ผลยับยั้งการผลิตกรดโคจิกอย่างสมบูรณ์ ส่วนแอมโมเนียมจะมีผลยับยั้งการผลิตกรดโคจิกที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และเส้นใยที่เจริญไม่เกิดลักษณะก้อนกลม แต่เป็นลักษณะเส้นใยมองเห็นเป็นรูปแบบเดียวกัน ซึ่งผลที่ได้ศึกษาในสูตรอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 0.2 โมลาร์ โพแทสเซียมฟอสเฟต 10 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นที่ 6.2 ใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

Wan และคณะ (2005) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัด โปรตีนจากถั่วเหลือง ทริปโตน น้ำแช่ข้าวโพด และรำข้าว ต่อสัณฐานวิทยาของเซลล์ และการผลิตกรดโคจิกของ *Aspergillus oryzae* M3B9 โดยใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร สปอร์เริ่มต้น $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที พบว่าแอมโมเนียมให้การผลิตกรดโคจิกที่ต่ำ และยังพบอีกว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้น (5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร) ยิ่งทำให้มวลเซลล์ที่ได้ลดลง ส่วนแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหลือจะให้ผลการผลิตกรดโคจิกที่สูงกว่า โดยปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่ 2.5 กรัมต่อลิตร ให้ผลการผลิตกรดโคจิกสูงและใช้ปริมาณน้อยกว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นที่ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงแต่ปริมาณการใช้ค่อนข้างมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

El-aasar (2006) พบว่าปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้สูงที่สุดจากการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อย่างยีสต์สกัดความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคสความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ปริมาณกรดโคจิกเท่ากับ 28.41 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง แต่กลับให้ผลการผลิตกรดโคจิกจากแหล่งของไนโตรเจนอนินทรีย์อย่างแอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรทต่ำกว่าไม่ว่าจะใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดอื่นก็ตาม

Rofarizan และ Ariff (2000) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์ ไนโตรเจนอินทรีย์ คือ ยีสต์สกัด และเปบโตน ส่วนไนโตรเจนอนินทรีย์ คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต ให้ผลในทำนองเดียวกันกับทั้ง Coupland และ Walter (1987) และ El-aasar (2006) คือ แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จะให้ผลการผลิตกรดโคจิกดีกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ โดยให้ผลการผลิตสูงสุดจากยีสต์สกัด ส่วนอนินทรีย์ไนโตรเจนให้ผลการผลิตที่น้อยกว่า ซึ่งกลุ่มของไนโตรเจนอนินทรีย์ที่ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด คือ แอมโมเนียมไนเตรต

อภิชญา (2548) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ คือ ยีสต์สกัด แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และโซเดียมไนเตรต ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 พบว่า โซเดียมไนเตรตให้การผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด รองลงมาคือ แอมโมเนียมไนเตรต ส่วนแอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมคลอไรด์ให้ผลการผลิตกรดโคจิกที่ต่ำกว่า

ดังนั้นชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนสามารถส่งผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคจิก ซึ่งให้ผลที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.1 ฉะนั้นการเลือกใช้ควรเลือกให้เหมาะสมและสอดคล้องกับ ชนิดของแหล่งคาร์บอน ชนิดของเชื้อ หรือปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ผลิตกรดโคจิกจากเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ

สายพันธุ์รา	แหล่งไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)		อ้างอิง
Aspergillus oryzae	$(NH_4)_2SO_4$	0.5	Katagiri และ Kitahara (1933)
	ยีสต์สกัด	10.0	Arnstein และ Bentley (1953c)
		5.0	Ogawa และคณะ, (1995)
		5.0	Kitada (1967)
A. flavus	NH_4NO_3	1.1	May และคณะ (1931)
	ยีสต์สกัด	1.0	Ariff และคณะ (1996)
		5.0	Megalla และคณะ (1987)
		6.0	Wan และคณะ (2005)
A. tamarii	$NaNO_3$	2.0	Gould (1938)
A. albus	พอลิเปปโตน	7.0	Saruno และคณะ (1978)
A. candidus	ยีสต์สกัด	1.0	Wei *et al.* (1991)
A. parasiticus	เปปโตน	2.0	Coupland และ Niehaus (1987)
	ยีสต์สกัด	10.0	El-Aasar (2006)

ที่มา: Rosfarizan และคณะ (2010)

2.3.3 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราควรมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ในระดับหนึ่ง เนื่องจากการเพาะเลี้ยงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่างอย่างรวดเร็วจากกระบวนการนำเข้าสาร กรดที่เชื้อราสร้างขึ้น หรือกระบวนการแลกเปลี่ยนไอออน ราส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างประมาณ 5.5-6.0 (Daecon, 2006) หรือปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นประมาณ 4-7 (Griffin, 1994) ดังนั้นถ้ามีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดเป็นด่างจนอยู่ในระดับที่ไม่เหมาะสมจะทำให้ประจุสุทธิของโปรตีนบนเยื่อหุ้มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งส่งผลต่อกระบวนการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์ อีกทั้งยังส่งผลต่อความสามารถในการละลายของเกลือต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สารอาหารอยู่ในรูปที่ไม่สามารถนำไปใช้ได้ (Daecon, 2006) ดังนั้นการควบคุมหรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือกใช้ระดับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมจะทำให้เชื้อมีการใช้สารอาหาร ปลดปล่อยสารผลิตภัณฑ์ หรือแม้กระทั่งการทำงานของเอนไซม์ซึ่งเชื้อสร้างขึ้นมีประสิทธิภาพสูงสุด

Rosfarizan และคณะ (2000) ศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อกระบวนการผลิตกรดโคจิกด้วย *Aspergillus flavus* Link 44-1 โดยศึกษาทั้งหมด 6 ระดับ ของค่าพีเอช ประกอบด้วย 2 3 4 5 6 และ 7 พบว่าการเจริญจะสูงขึ้นตามระดับของพีเอชเริ่มต้นที่เพิ่มขึ้น โดยไม่พบระยะปรับตัว (lag phase) ในทุกๆ ค่าพีเอชที่ใช้ทำการทดลอง แต่ที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 2 เชื้อจะมีระยะปรับตัวที่นาน อีกทั้งยับยั้งเจริญ และการผลิตกรดโคจิก แต่ปริมาณกรดโคจิกสามารถผลิตได้สูงที่สุดเมื่อปรับระดับพีเอชอยู่ที่ 3 มีค่าความเข้มข้นกรดโคจิกอยู่ที่ 30.20 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วย กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัมต่อลิตร และเมทานอล 10 มิลลิลิตรต่อลิตร สปอร์เริ่มต้น $3.5x10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหารปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

ต่อมา Rosfarizan และคณะ (2002) ได้ศึกษาการควบคุมระดับค่าความเป็นกรดเป็นด่างในการผลิตกรดโคจิกจากแป้งสาคู ในช่วงของกระบวนการเติมแหล่งคาร์บอนระหว่างการผลิตในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 8 ลิตร แบ่งออกเป็น 4 ลักษณะ ประกอบด้วย แบบแรก คือ ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดเป็นด่างโดยใช้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเท่ากับ 3.0 แบบที่สองควบคุมค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากันตลอดการเพาะเลี้ยง แบบที่สาม ควบคุมระดับของค่าความเป็นกรดเป็นด่างในช่วงเจริญที่ 4 ส่วนช่วงผลิตอยู่ที่ 3 และสุดท้ายไม่ควบคุมค่าความเป็นกรดเป็นด่างในช่วงเจริญแต่ควบคุมช่วงผลิตที่ 3 พบว่าแบบที่สองให้ค่าปริมาณกรดโคจิกต่ำที่สุด เนื่องจากเกิดกระบวนการย่อยแป้งน้อยทำให้เกิดน้ำตาลกลูโคสน้อยตามไปด้วยส่งผลให้ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตขึ้นน้อยตามไปด้วย ส่วนแบบที่สาม สามารถทำให้เชื้อเจริญและย่อยแป้งได้ดีกว่า แต่ที่ระดับของค่าความเป็นกรดเป็นด่างช่วงการเจริญไม่เหมาะต่อการสร้างเส้นใยที่สามารถสังเคราะห์กรดโคจิกได้ดังนั้นในการควบคุมแบบสุดท้าย คือ ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดเป็นด่างในช่วงเจริญแต่ควบคุมในช่วงผลิตจึงสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดถึง 31.23 กรัมต่อลิตร

Gruszka และ Podgorski (2003) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างในอาหารสังเคราะห์และกึ่งสังเคราะห์ พบว่าค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นน้อยกว่า 6.0 จะให้ผลการผลิตกรดโคจิกที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลดลง ในอาหารสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย แซคคาโรส 100 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียม-ไนเตรต 2.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต- เฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัมต่อลิตร ยูเรีย 0.082 กรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำประปาเป็นตัวทำละลาย ส่วนอาหารสูตรกึ่งสังเคราะห์ประกอบด้วย แซคคาโรส 80 กรัมต่อลิตร หางนมชนิดผง 23 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมเฮปตะไฮเดรต 0.25 กรัมต่อลิตร ยูเรีย 0.082 กรัมต่อลิตร ในน้ำประปาเช่นเดียวกัน

Rosfarizan และ Ariff (2006) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส พบว่าที่ระดับของค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ 2.75 ทำให้เชื้อมีปริมาณเซลล์สูงสุดถึง 16 กรัมต่อลิตร โดยพบว่าที่ระดับค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่ำกว่านี้เพียงเล็กน้อยจะยับยั้งการเจริญของ *Aspergillus flavus* s44-1 เป็นอย่างมาก เช่น ที่ระดับ 2.5 สามารถทำให้เชื้อเจริญเพียง 6.0 กรัมต่อลิตร สำหรับการผลิตกรดโคจิกพบว่าการหมักที่ไม่ควบคุมระดับของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (เริ่มต้นเท่ากับ 3) ให้ผลการผลิตสูงที่สุด คือ 40.2 กรัมต่อลิตร จากการใช้น้ำตาลซูโครส 150 กรัมต่อลิตร (วันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง) เมื่อเทียบกับระบบที่ควบคุมระดับค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ 2.5 2.8 และ 3.0 ตามลำดับ

El-aasar (2006) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่อความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของ *Aspergillus parasiticus* พบว่าที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.0 สามารถส่งเสริมให้เชื้อผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด ความเป็นกรดเป็นด่างสูงกว่า 5.5 ให้ผลการผลิตกรดโคจิกลดลง เนื่องจากเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการผลิตกรดโคจิกจะถูกยับยั้งที่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่สูง

2.3.4 ปริมาณสปอร์เริ่มต้น

ในกระบวนการหมักจะมีการเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งการเตรียมหัวเชื้อราส่วนใหญ่นิยมใช้การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นจากสปอร์เนื่องจากสะดวกและมีความสม่ำเสมอของหัวเชื้อที่เตรียมขึ้น ซึ่งปริมาณสปอร์นี้จะสอดคล้องกับปริมาณของเซลล์ที่เกิดขึ้น โดยปริมาณของสปอร์ที่เหมาะสมจะส่งเสริมให้ได้ปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมเพื่อสอดคล้องกับสับสเทรตหรือผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ดังนั้นการเลือกใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สามารถควบคุมสภาวะต่างๆ ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักได้

Mojsov (2010) ได้ศึกษาผลของปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่ 2 เปอร์เซ็นต์ ($4x10^6$ สปอร์) ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ ($1x10^7$ สปอร์) อายุของสปอร์ที่ 2 3 4 และ 5 วันต่อกิจกรรมเอนไซม์ที่ย่อยเพคติน (endo-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pectinolytic activity) และน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Aspergillus niger* MK-15 พบว่าที่ปริมาณสปอร์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ หรือมีจำนวนสปอร์ $6x10^6$ สปอร์ อายุสปอร์ 3 วัน ทำให้เชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดถึง 345 ยูนิตต่อลิตร และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 18.2 กรัมต่อลิตร

Sikander และคณะ (2002) ศึกษาผลของปริมาณหัวเชื้อที่ได้จากเส้นใยเริ่มต้นต่อการผลิตกรดซิตริกโดยใช้กากน้ำตาลของ *Aspergillus niger* GCBT7 ในถังหมักแบบใบพัดกวน โดยศึกษาขนาดหัวเชื้อตั้งแต่ 0.5 ถึง 3.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ปริมาณหัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตกรดซิตริกได้มากที่สุดเท่ากับ 96.9 กรัมต่อลิตร

Irfan และคณะ (2011) ศึกษาปริมาณของหัวเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิล-เซลลูเลส (carboxymethyl cellulase) ในการย่อยของเสียทางการเกษตร เช่น ฟางข้าวจากเชื้อ *Aspergillus niger* ซึ่งทดสอบกับหัวเชื้อปริมาณตั้งแต่ 1 ถึง 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่าหัวเชื้อปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ให้การผลิตเอนไซม์สูงที่สุด 0.442 ยูนิต แต่การผลิตจะลดลงเมื่อปริมาณหัวเชื้อเพิ่มสูงขึ้น 4 เปอร์เซ็นต์

Acharya และคณะ (2008) ศึกษาจำนวนของเชื้อ *Aspergillus niger* ที่เจาะเป็นแผ่นกลมจำนวน 5 10 15 และ 20 แผ่น ในการผลิต จากการทดสอบ พบว่าได้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส 0.06414 0.09867 0.03577 และ 0.05427 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นการใช้จำนวนเชื้อ 10 แผ่นจะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อในปริมาณมากกว่าจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในช่วงต้นจะลดลง

ดั้งนั้นปริมาณของหัวเชื้อจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ ซึ่งควรจะใช้ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมกับสภาวะการผลิตสารที่ต้องการ

2.4 แป้งมันสำปะหลัง

2.4.1 คุณสมบัติและข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับแป้งมันสำปะหลัง

ไทยเป็นแหล่งส่งออกมันสำปะหลังสำคัญที่สุดในเอเชีย มีส่วนแบ่งผลผลิตในปี 2551 ถึง 25.2 เปอร์เซ็นต์ ติด 1 ใน 5 และเป็นลำดับที่ 3 ของโลก อันประกอบด้วย ไนจีเรีย บราซิล ไทย อินโดนิเซีย และคองโก ตามลำดับ มีพื้นที่การเก็บเกี่ยว ผลผลิตรวมดังตารางที่ 2.2 แป้งมันสำปะหลังเป็นแป้งที่ได้จากส่วนรากของต้นมันสำปะหลัง (cassava plant) ส่วนใหญ่พบมากในแถบเขตร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีองค์ประกอบของอะไมโลสต่ำ ประมาณ 17-20 เปอร์เซ็นต์ แต่น้ำหนักมวลโมเลกุลของอะไมโลส และอะไมโลเพคตินสูง มีค่าอุณภูมิที่ทำให้แป้งเปียก (starch paste) หนืดสูงสุดที่ 71 องศาเซลเซียส ค่าความหนืดสูงสุด 108 g-cm อุณหภูมิ และค่าความหนืดหลังจาก 20 นาที ของค่าความหนืดสูงสุด อยู่ที่ 94 องศาเซลเซียส และความหนืด 59 g-cm มีรูปร่างเม็ดแป้งเรียบ ทรงกลม ซึ่งเปรียบเทียบคุณสมบัติกับแหล่งแป้งชนิดอื่น ส่วนองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ประกอบด้วย ไขมัน โปรตีน และเถ้า มีปริมาณคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 0.1 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงค่าในตารางที่ 2.3และตารางที่ 2.4 ตามลำดับ

ตารางที่ 2.2 เนื้อที่การเก็บเกี่ยว ผลผลิตเฉลี่ย และผลผลิตรวม ของแป้งมันสำปะหลัง

ปี	เนื้อที่การเก็บเกี่ยว (ไร่)	ผลผลิตเฉลี่ย (ตัน)	ผลผลิตรวม (ตัน)
2551/52	8,292,146	3.628	30,088,024
2552/53	7,302,839	3.013	22,005,740
2553/54	6,901,132	3.025	21,060,903

ที่มา: คณะสำรวจภาวะการผลิตและการค้ามันสำปะหลัง (2553)

2.4.2 การดูดซับน้ำ การพองตัวและการละลายของแป้ง

แป้งดิบจะไม่ละลายน้ำที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณภูมิเจาลาติไนซ์ เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนจากหมู่ไฮดรอกซิลของแป้งที่อยู่ใกล้กันยังเชื่อมอยู่ แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นพันธะไฮโดรเจนจะถูกทำลาย ทำให้โมเลกุลของน้ำจับหมู่ไฮดรอกซิลที่อิสระนั้น ทำให้เม็ดแป้งเกิดการพองตัวเนื่องจากดูดซึมน้ำ ส่งผลให้น้ำบริเวณรอบๆ ลดลงเป็นเหตุให้แป้งเคลื่อนไหวยากผลคือความหนืด และความใสเพิ่มขึ้น เมื่อความหนืดเพิ่มขึ้นถึงจุดสูงสุด (peak viscosity) จะเป็นจุดที่เม็ดแป้งพองตัวเต็มที่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาต่อไปอีก อีกทั้งมีการกวนอย่างต่อเนื่อง จะทำให้โครงสร้างภายในแตกออก ความหนืดลดลง แต่เมื่ออุณหภูมิลดลง ความหนืดจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากการเรียงตัวใหม่ของอะไมโลสที่หลุดจากเม็ดแป้งเรียกว่า รีโทรเกรเดชัน พบว่าแป้งจากส่วนรากหรือส่วนกลางลำต้น (pith) เช่น แป้งมันสำปะหลัง มีกำลังการพองตัวเพียงขั้นเดียว ที่ 95 องศาเซลเซียส มีค่าประมาณ 71 ค่าการละลายประมาณ 48 เปอร์เซ็นต์ (กล้าณรงค์ และเกื้อกูล. 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	ปริมาณร้อยละ
ความชื้น	13.0
แป้ง	27.0
ไขมัน	0.1
โปรตีน	0.1
เถ้า	0.2
ฟอสฟอรัส	0.01
สารที่ให้กลิ่นรส	ต่ำมาก

ที่มา: Lyon (1974)

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติของแป้งมันสำปะหลังเทียบกับแป้งชนิดอื่น

แหล่งแป้ง	ขนาดเม็ดแป้ง (ไมโครเมตร)	การกระจายขนาดเม็ดแป้ง	อุณหภูมิเจลาติไนซ์ (องศาเซลเซียส)	ความหนืดสูงสุด (BU)	อุณหภูมิของความหนืดสูงสุด (องศาเซลเซียส)	ไขมัน (เปอร์เซ็นต์)	โปรตีน (เปอร์เซ็นต์)	เถ้า (เปอร์เซ็นต์)
มันสำปะหลัง	4-35	15	17	3000	65-70	0.01	0.2	0.10	0.1
มันฝรั่ง	5-100	27	21	3000	60-65	0.08	0.4	0.06	0.05
ข้าวโพด	2-30	10	28	800	75-80	0.02	0.1	0.35	0.7
ข้าวโพดข้าวเหนียว	2-30	10	0	-	65-70	0.01	0.1	0.25	0.15
ข้าวสาลี	2-30	bimodal	28	800	80-85	0.06	0.2	0.40	0.8

[a] ค่าประมาณ

[b] อุณหภูมิเจลาติไนซ์

ที่มา: BeMiller and Whistler (2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ประโยชน์ของกรดโคจิก

2.5.1 เครื่องสำอาง (cosmetic)

กรดโคจิกเป็นส่วนประกอบพื้นฐานในการผลิตครีมเพื่อช่วยให้ผิวขาว (skin whitening creams) ครีมปกป้องผิวหนัง (skin protective lotions) สบู่ช่วยทำให้ผิวขาว (whitening soaps) และผลิตภัณฑ์ดูแลรักษาฟัน (tooth care products) เนื่องจากกรดโคจิกมีความสามารถป้องกันปฏิกิริยาจากรังสียูวี (UV-protection effect) ที่ส่งผลต่อผิวหนังทำให้เกิดกระและจุดด่างดำได้ อีกทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสที่มีผลให้เกิดการสร้างเม็ดสีเมลานิน (Choi และคณะ, 2012)

2.5.2 สารปฏิชีวนะ (antibiotic)

กรดโคจิกหรือสารอนุพันธ์ เช่น เมทิลโคจิก(methyl kojic acid) ไดเมทิลโคจิก (dimethyl kojic acid) มีคุณสมบัติต้านต่อแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive bacteria) เช่น *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ทั่วไป สายพันธุ์ต้านต่อยาเมทิซิลิน(methicillin-resistance) และสายพันธุ์ที่ต้านยาหลายขนาน (multidrug-resistance) (Yang และคณะ, 2011) นอกจากนี้ยังสามารถต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดวัณโรคในมนุษย์ (human tubercle bacilli) มีฤทธิ์ต้านต่อเชื้อราก่อโรคในมนุษย์ เช่น *Candida albicans, Cryptococcus neoformans* และ *Trichophyton rubrum* (Chee และ Lee, 2003)

2.5.3 การแพทย์และเภสัชกรรม (medical and pharmaceutical)

อนุพันธ์ของกรดโคจิกมีคุณสมบัติต้านต่ออาการอักเสบ (anti-inflammatory) อาการปวด (pain killer) หรือผลที่เกิดจากกระบวนการปลูกถ่ายอวัยวะ (neoplastic effect) อีกทั้งยังใช้ในกระบวนการสังเคราะห์สารในกลุ่มไพริโดนซึ่งเป็นโครงสร้างที่อยู่ในตัวยาหลายๆ ชนิด เพื่อลดความเป็นพิษของตัวยาลง นอกจากนี้รายงานการวิจัยพบว่ากรดโคจิกปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารกระตุ้นลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาที่เพิ่มประสิทธิภาพกระบวน phagocytosis ได้ (Paula และคณะ, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4 อาหารและเกษตรกรรม (food and agiculture)

กรดโคจิกสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีผลทำให้เกิดลักษณะดำคล้ำในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร (Chang, 2009) นอกจากนี้ยังเป็นสารตั้งต้นเพื่อใช้สังเคราะห์สารเพิ่มกลิ่นรส (flavor enhancer):ซึ่งใช้เพิ่มกลิ่นในอาหารได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) บริษัท Hiclave จำกัด
2. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) บริษัท Oscon จำกัด
3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) บริษัท Thermo Scientific จำกัด
4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (analytical balance) บริษัท Adventure จำกัด
5. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (analytical balance) บริษัท Sartorius จำกัด
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) บริษัท Hermle จำกัด
7. เครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge) บริษัท Eppendorf จำกัด
8. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) บริษัท Denver Instrument จำกัด
9. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) บริษัท Shel Lab จำกัด
10. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)บริษัท Memmert จำกัด
11. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) บริษัท Olympus จำกัด
12. โถดูดความชื้น (desicator) บริษัท Duran จำกัด
13. ไมโครปิเปต ขนาด 1,000 ไมโครลิตร 5 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร บริษัท Labnet จำกัด
14. แผ่นนับเม็ดเลือด (hemacytometer) บริษัท Brand จำกัด
15. เครื่องผสม (vortex mixture) บริษัท Scientific Industries จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar airflow cabinet) บริษัท Holten จำกัด

17. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Memmert จำกัด

18. ถังหมัก (fermenter) รุ่น Biostat B บริษัท B. Braun Biotech International

19. ตู้เย็น (refrigerator) บริษัท Sunyo จำกัด

20 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงในถาดหลุม (microplate reader)

21. จานหลุมขนาด 24 หลุม (ชนิดปลอดเชื้อ) และขนาด 96 หลุม บริษัท Nunc จำกัด

22. ขวดรูปชมพู่ (erlenmayer flask) บริษัท Pyrex จำกัด

23. จานเพาะเชื้อ (petri dish) บริษัท Pyrex จำกัด

24. บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 100, 500 และ 1,000 บริษัท Vitlab จำกัด

25. หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร บริษัท Pyrex จำกัด

26. เครื่องไมโครเวฟ บริษัท Samsung จำกัด

27. คิวเวต บริษัท Starna จำกัด

28. กระดาษกรองเบอร์ 1 บริษัท Whatman จำกัด

29. คอร์กบอเรอร์ (cork borer) บริษัท Canadawide Scientific จำกัด

3.1.2 สารเคมี

1. กรดโคจิก (kojic acid ; $C_6H_6O_4$) บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด

2. กลูโคส (glucose anhydrous ; $C_6H_{12}O_6$) บริษัท Carlo Erba จำกัด

3. กลูโคซามีนไฮโดรคลอไรด์ (D-glucosamine hydrochloride; $C_6H_{12}O_6$.HCl) บริษัท Sisco Research Laboratories จำกัด

4. โซลูเบิล สตาร์ช (soluble starch) บริษัท Ajax Finechem จำกัด

5. แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) บริษัท ต้นสน จำกัด

6. เคซีนไฮโดรไลเซต (casein hydrolysate) บริษัท Himedia จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ยีสต์สกัด (yeast extract powder) บริษัท Himedia จำกัด

8. เปปโตน (peptone) Himedia จำกัด

9. สารสกัดจากเนื้อวัว (beef extract) บริษัท Biomark laboratories จำกัด

10. ทริปโตน (tryptone) บริษัท Difco จำกัด

11. น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor)บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด

12. แอมโมเนียมไนเตรต (ammonium nitrate ; NH_4NO_3)บริษัท Fluka จำกัด

13. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate ; $(NH_4)_2SO_4$)บริษัท Ajax Finechem จำกัด

14. โซเดียมไนเตรต (sodium nitrate ; $NaNO_3$) บริษัท Ajax Finechem จำกัด

15. ทวีน 80 (polysorbate 80 ; $C_{64}H_{124}O_{26}$) บริษัท Ajax Finechem จำกัด

16. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต (ferric chloride hexahydrate ; $FeCl_3.6H_2O$) บริษัท Carlo Erba จำกัด

17. โซเดียมโพแทสเซียมทาเทรต (sodium potassium tartrate ; $KNaC_4H_4O_6.4H_2O$) บริษัท Ajax Finechem จำกัด

18. 3,5 -ไดไนโตรซาลิไซลิก แอซิด (3,5-dinitrosalicylic acid ; $C_7H_4N_2O_7$) บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด

19. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate ; KH_2PO_4) บริษัท Ajax Finechem จำกัด

20. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (magnesium sulfate heptahydrate ; $MgSO_4.7H_2O$) บริษัท Ajax Finechem จำกัด

21. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น(sulfuric acid ; H_2SO_4) บริษัท Ajax Finechem จำกัด

22. ฟีนอล (phenol ; C_6H_6O) บริษัท Panreac Quimica SAU จำกัด

23. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (hydrochloric acid ; HCl) บริษัท Ajax Finechem จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

24. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride ; NaCl) บริษัท Ajax Finechem จำกัด

25. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (dipotassium hydrogen phosphate ; K_2HPO_4) บริษัท Carlo Erba จำกัด

26. เฟอร์รัสซัลไฟด์เฮปตะไฮเดรต (ferrous sulfide heptahydrate ; $FeSO_4.7H_2O$) บริษัท Carlo Erba จำกัด

27. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide ; NaOH) บริษัท Carlo Erba จำกัด

28. 2,4-เพนตะไดโอน (2,4-pentadione ; $C_5H_8O_2$) บริษัท Carlo Erba จำกัด

29. เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (ethyl alcohol ; C_2H_6O) บริษัท องค์การสุรา จำกัด

30. โมโนเบสิคโซเดียมฟอสเฟต (monobasic sodium phosphate ; $NaH_2PO_4.H_2O$) บริษัท Ajax Finechem จำกัด

31. ไดเบสิคโซเดียมฟอสเฟต (dibasic sodium phosphate ; $Na_2HPO_4.7H_2O$ หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$) บริษัท Panreac Quimica SAU จำกัด

33. ไนโตรโซกัวนิดีน (N-nitro-N'-methyl-N-nitrosoguanidine ; $C_2H_5O_5N_3$) บริษัท Sigma-Aldrich จำกัด

34. ไดเมทิลพาราอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (N,N-dimethyl-*p*-aminobenzaldehyde ; $C_9H_{16}NO$) บริษัท Fluka จำกัด

35. โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate; Na_2CO_3)บริษัท Ajax Finechem จำกัด

36. อาหาเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (potatoes dextrose agar) บริษัท Himedia จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 วิธีการทดลอง

ส่วน 1 การทำกลายพันธุ์และคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดโคจิกสูง

3.2.1 การเก็บรักษาเชื้อ

เชื้อ *Aspergillus* sp. BR-1 เลี้ยงบนอาหาร PDA (ภาคผนวก ก) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีการถ่ายเชื้อทุกๆ 5 เดือน ส่วนเชื้อที่ได้จากการทำกลายพันธุ์จะเก็บบนอาหาร Czapek dox สูตรดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อลิตร) (ภาคผนวก ก.)

3.2.2 การทำสารแขวนลอยสปอร์สำหรับทำกลายพันธุ์

เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. BR-1 บนอาหาร PDA เป็นเวลา 5-7 วัน จากนั้นนำสารละลายทวีน 80 ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีเชื้อราเจริญอยู่ นำไปปั่นผสมด้วยเครื่องผสมเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายทวีนอีก 5 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพื่อแยกส่วนของเส้นใยราออกเหลือเฉพาะสปอร์ จากนั้นนับปริมาณสปอร์โดยแผ่นนับเม็ดเลือด (ภาคผนวก ง.)

3.2.3 การทำกลายพันธุ์ด้วย NTG (N-nitro-N´-methyl-N-nitrosoguanidine) เพื่อหาเวลาที่สปอร์รอดชีวิตประมาณ 1.0 เปอร์เซ็นต์

นำสารแขวนลอยสปอร์ผสมกับสารละลาย NTG ซึ่งละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดเป็นด่างประมาณ 7.0 (Futamura และคณะ, 2001) ให้มีปริมาณสปอร์และความเข้มข้นของสารก่อกลายพันธุ์ประมาณ 1x 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่สภาวะปราศจากแสง เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกๆ 0 15 30 45 และ 60 นาที จากนั้นล้างสปอร์เพื่อชะสาร NTG ออก โดยนำสารแขวนลอยสปอร์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากฟลาสก์ทำกลายพันธุ์ใส่ในหลอดไมโครทิวปราศจากเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลาเทส่วนใส (supernatant) ทิ้ง ล้างสปอร์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ชะสาร NTG ออกจากสปอร์โดยนำไปปั่นบนเครื่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสม จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเดิม ทำกระบวนการล้างสปอร์ข้างต้นทั้งหมด 3 ครั้ง เมื่อล้างสปอร์เรียบร้อยแล้วนำมาเจือจางที่ระดับความเจืองจาง 10^{-1} 10^{-2} และ10^{-3} ปิเปตมา 0.1 มิลลิลิตร จากแต่ละระดับความเจือจางใส่ลงบนอาหาร Czapek dox สูตรดัดแปลง เกลี่ยให้กระจาย ทำทั้งสิ้น 5 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน นับจำนวนเซลล์รอดชีวิตจากจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 15-150 โคโลนี (Lynne, 2005) นำข้อมูลที่ได้หาเวลาที่ทำให้สปอร์รอดชีวิต 0.1 เปอร์เซ็นต์

3.2.4 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายและทดสอบการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง Starch medium สูตรดัดแปลง

เมื่อได้เวลาที่สปอร์รอดชีวิตประมาณ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาดังกล่าวทำกลายพันธุ์โดยใช้ปริมาณสปอร์และความเข้มข้นของ NTG ตามวิธีในข้อที่ 3.2.3 เมื่อทำครบกระบวนการ นำเชื้อที่ผ่านการทำกลายพันธุ์เกลี่ยลงบนอาหาร Czapek dox สูตรดัดแปลง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน คัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตกรดโคจิกสูงขึ้นซึ่งพิจารณาจากขนาดของโคโลนีก่อนในขั้นแรก จากนั้นทำให้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหารชนิดเดียวกัน นำเชื้อที่บริสุทธิ์แล้วมาทดสอบการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง Starch สูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก.) ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ ทำโดยใช้คอร์กบอเรอร์เบอร์ 1 เจาะเส้นใยราที่เจริญบนอาหาร Starch เป็นเวลา 2-3 วัน วางบนอาหารใหม่ เลี้ยงให้เส้นใยราเจริญบนอาหารเป็นเวลา 4 วัน โดยทำเชื้อ 1 สายพันธุ์ต่อจาน เพาะเชื้อ 1 จาน นำสารละลายเฟอริกคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อลิตร) (ภาคผนวก ค.) ราดบนอาหารเพาะเลี้ยงตามเวลาที่กำหนดตรวจสอบสีที่เกิดขึ้น บันทึกผลเชื้อราสายพันธุ์กลายที่ให้สีกับสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์เข้มกว่าสายพันธุ์เดิม

3.2.5 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม

นำเชื้อราที่ได้จากการคัดเลือกบนอาหาร Czapek dox แล้วตรวจสอบเบื้องต้นบนอาหารแข็ง Starch medium มาตรวจสอบซ้ำโดยเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Starch เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นนำคอร์กบอเรอร์ขนาดเบอร์ 1 วางทาบกับอาหาร จากนั้นเจาะบริเวณปลายโคโลนีเพื่อนำเส้นใยมาเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 24 หลุม ซึ่งบรรจุอาหารเหลวสูตร Starch ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลุม ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเก็บน้ำหมักจำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที นำส่วนใสที่ได้ตรวจสอบปริมาณกรดโคจิกตามวิธีของ Bentley (1957) (ภาคผนวก ค.) วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงบนถาดหลุมตัวกรอง (filter) ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณปริมาณกรดโคจิก เพื่อเป็นข้อมูลคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโคจิกต่อไป

3.2.6 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายในระดับฟลาสก์

จากข้อที่ 3.2.5 เมื่อคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดโคจิกในปริมาณสูง ลำดับต่อมาเป็นการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดโคจิกในระดับฟลาสก์ เพื่อคัดเลือกเชื้อ 1 สายพันธุ์ ที่ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงที่สุด ทำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร Starch ดัดแปลง ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 6 เปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อลิตร) บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร สปอร์เริ่มต้นที่ใช้มีความเข้มข้นเมื่ออยู่ในอาหารเท่ากับ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง โดยทำการเก็บทั้งฟลาสก์ ทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ตัวอย่างจะนำมาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน กรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

ส่วนที่ 2 การหาความเข้มข้นของแป้ง และแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของสายพันธุ์กลาย

3.2.7 การศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิก

นำเชื้อสายพันธุ์กลายที่คัดเลือกได้มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Starch ดัดแปลง โดยผันแปรระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อลิตร) บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร สปอร์เริ่มต้นมีความเข้มข้นสุดท้ายในอาหารเท่ากับ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ทำการเก็บทั้งฟลาสก์ทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ตัวอย่างจะนำมาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน กรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.8 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดโคจิก

3.3.8.1 ผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์

เมื่อได้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสม ความเข้มข้นนี้จะใช้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์สกัด สารสกัดจากเนื้อ เปปโตน น้ำแช่ข้าวโพด ทริปโตน และเคซีนไฮโดรไลเซต ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร เท่ากับปริมาณการใช้ในอาหารสูตร Starch บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหาร 50 มิลลิลิตร สปอร์เริ่มต้นเมื่ออยู่ในอาหารเท่ากับ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 5.0 เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง โดยเก็บทั้งฟลาสก์ทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ตัวอย่างนำมาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน กรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

3.2.8.2 ผลการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์

เมื่อได้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด จากนั้นนำมาผสมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ 3 ชนิด ประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต และโซเดียมไนเตรท โดยผสมกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่ออนินทรีย์แต่ละชนิดอัตราส่วน 3ต่อ2 2.5 ต่อ 2.5 และ 2 ต่อ 3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักรวม 5 กรัมต่อลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร สปอร์เริ่มต้นเมื่ออยู่ในอาหารเท่ากับ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ทำการเก็บทั้งฟลาสก์ทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ตัวอย่างจะวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน กรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

3.2.9 ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญและผลิตกรดโคจิกในสูตรอาหารที่เหมาะสมระหว่างเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่และสายพันธุ์กลาย

เมื่อได้สูตรที่เหมาะสมแล้วนำสูตรที่ได้มาเพาะเลี้ยงเปรียบเทียบการเจริญและผลิตกรดโคจิกระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ *Aspergillus* sp. BR-1 และสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp N-2062 ซึ่งอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร สปอร์เริ่มต้นเมื่ออยู่ในอาหารเท่ากับ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ทำการเก็บทั้งฟลาสก์ ทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ตัวอย่างจะวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน กรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

ส่วนที่ 3 การศึกษาอัตราการกวน และการให้อากาศในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 5 ลิตร

3.2.10 การศึกษาอัตราการให้อากาศและการกวนในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมประกอบด้วย ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง อัตราส่วนของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ที่เหมาะสมในระดับฟลาสก์ จากนั้นทำการศึกษาผลของอัตราการกวนที่ 200 400 และ 600 รอบต่อนาที ณ ระดับอัตราการให้อากาศที่ 1.5 และ 2.0 ปริมาตรต่อรวมทั้งสิ้น 6 ชุด การทดลอง ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งเติมอาหารสูตรที่เหมาะสมที่สุดมีปริมาตร 3 ลิตร เก็บผลทุกวันตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ตัวอย่างนำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน กรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด และค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน (ภาคผนวก ค.1)

3.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ภาคผนวก ค.2)

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิก (ภาคผนวก ค.3)

3.4 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

นำข้อมูลจากผลการทดลองมาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS statistics version 14.0 และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีวิเคราะห์ของ Duncan's multiple range test analysis ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การทำกลายพันธุ์และคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดโคจิกได้สูง

4.1.1 เวลาที่เหมาะสมต่อการทำกลายพันธุ์เชื้อรา *Aspergillus* sp. BR-1

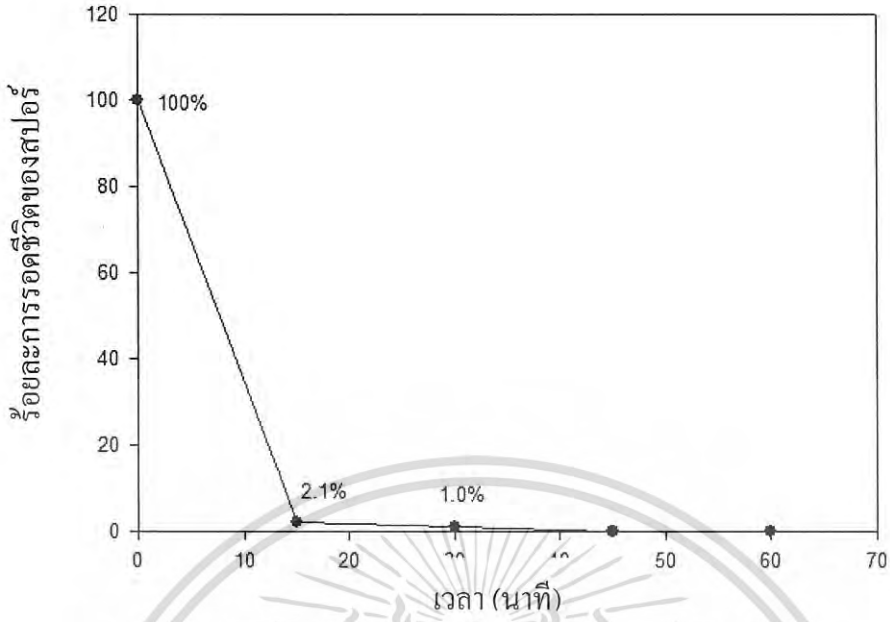
ทำกลายพันธุ์โดยผสมสารแขวนลอยสปอร์ของ *Aspergillus* sp. BR-1 และสารก่อกลายพันธุ์ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ปริมาตรสุดท้าย 10 มิลลิลิตร สปอร์สัมผัสสารก่อกลายพันธุ์เป็นเวลา 0 15 30 45 และ60 นาที จากนั้นเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Czapek dox สูตรดัดแปลง พบว่าที่เวลา 15 นาที มีสปอร์รอดชีวิต 3.78×10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.1) คิดเป็นร้อยละ 2.1 ของจำนวนสปอร์เริ่มต้น เมื่อใช้เวลา 30 นาที พบสปอร์รอดชีวิต 8.84×10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร คำนวณได้เป็นร้อยละ 0.9 จากปริมาณสปอร์เริ่มต้น ส่วนที่เวลา 45 และ 60 นาที ไม่สามารถทำการนับสปอร์ที่รอดชีวิตได้เนื่องจากมีจำนวนโคโลนีไม่ถึง 15 โคโลนี

ดังนั้นจึงนำเวลา 30 นาที ที่เป็นเวลาที่ทำให้สปอร์ของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR-1 เหลือร้อยละของการรอดชีวิตใกล้เคียงกับร้อยละ 1 มากที่สุด ซึ่งเป็นระดับของการรอดชีวิตที่ทำให้เชื้อยังสามารถแสดงลักษณะทางฟีโนไทป์ออกมาได้และไม่เป็นอันตรายต่อเชื้อมากจนเกินไป (ไพศาล, 2542) ฉะนั้นจึงใช้ร้อยละการรอดชีวิตระดับนี้ทำการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง Starch ต่อไปในหัวข้อ 4.1.2

4.1.2 การคัดเลือกเชื้อราสายพันธุ์กลายที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงบนอาหารแข็ง Starch

หลังจากทำกลายพันธุ์ *Aspergillus* sp. BR-1 ด้วยความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้น 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้น N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายจากอาหาร Czapek dox สูตรดัดแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ร้อยละการรอดชีวิตหลังจากสัมผัสสารก่อกลายพันธุ์ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ที่เวลาต่างๆ (● ค่าร้อยละการรอดชีวิต)

ได้ทั้งหมด 180 ไอโซเลต เพื่อนำมาตรวจสอบการผลิตกรดโคจิกเบื้องต้นโดยการใช้อาหาร Starch สูตรดัดแปลง ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ได้เชื้อสายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดโคจิกมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมจำนวน 94 ไอโซเลต ซึ่งคิดเป็น 52.2 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

4.1.3 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถผลิตกรดโคจิกสูงในจานเพาะเลี้ยง 24 หลุม

นำเชื้อกลายพันธุ์ที่ผ่านการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยอาหาร Czapek dox จำนวน 180 ไอโซเลต เช่นเดียวกับหัวข้อที่ 4.1.2 มาตรวจสอบซ้ำเพื่อคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายด้วยอาหารเหลว Starch สูตรดัดแปลง ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในจาน 24 หลุม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ผลการทดลอง พบว่าเชื้อกลายพันธุ์มีการผลิตกรดโคจิกใกล้เคียงหรือลดลง ในช่วง 0.01 กรัมต่อลิตร ถึง 0.09 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราสายพันธุ์กลาย

รหัส	ผล	รหัส	ผล	รหัส	ผล	รหัส	ผล
N-1001	-	N-1002	+	N-1003	-	N-1004	-
N-1005	+	N-1006	-	N-1007	-	N-1008	+
N-1009	-	N-1010	+	N-1011	-	N-1012	-
N-1013	+	N-1014	+	N-1015	-	N-1016	-
N-1017	+	N-1018	+	N-1019	-	N-1020	+
N-1021	+	N-1022	+	N-1023	+	N-1024	-
N-1025	+	N-1026	-	N-1027	+	N-1028	-
N-1029	-	N-1030	+	N-1031	-	N-1032	-
N-1033	-	N-1034	-	N-1035	+	N-1036	-
N-1037	-	N-1038	-	N-1039	+	N-1040	-
N-2001	-	N-2002	-	N-2003	-	N-2004	+
N-2005	+	N-2006	+	N-2007	-	N-2008	-
N-2009	+	N-2010	+	N-2011	-	N-2012	-
N-2013	-	N-2014	-	N-2015	+	N-2016	+
N-2017	-	N-2018	-	N-2019	-	N-2020	+
N-2021	+	N-2022	+	N-2023	+	N-2024	+
N-2025	+	N-2026	-	N-2027	+	N-2028	+
N-2029	-	N-2030	-	N-2031	+	N-2032	+
N-2033	+	N-2034	+	N-2035	+	N-2036	+
N-2037	-	N-2038	-	N-2039	+	N-2040	+
N-2041	+	N-2042	+	N-2043	+	N-2044	+
N-2045	-	N-2046	+	N-2047	+	N-2048	-

หมายเหตุ (+) = ผลิตกรดโคจิกสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ; (-) = ผลิตกรดโคจิกต่ำกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราสายพันธุ์กลาย

รหัส	ผล	รหัส	ผล	รหัส	ผล	รหัส	ผล
N-2049	+	N-2050	+	N-2051	-	N-2052	+
N-2053	+	N-2054	-	N-2055	-	N-2056	+
N-2057	-	N-2058	-	N-2059	+	N-2060	-
N-2061	+	N-2062	+	N-2063	+	N-2064	+
N-2065	+	N-2066	-	N-2067	+	N-2068	+
N-2069	+	N-2070	+	N-2071	+	N-2072	+
N-2073	+	N-2074	+	N-2075	-	N-2076	+
N-2077	+	N-2078	+	N-2079	-	N-2080	-
N-2081	-	N-2082	+	N-2083	-	N-2084	-
N-2085	+	N-2086	-	N-2087	+	N-2088	-
N-2089	-	N-2090	-	N-2091	+	N-2092	-
N-2093	-	N-2094	-	N-2095	-	N-2096	+
N-2097	-	N-2098	-	N-2099	+	N-2100	+
N-2101	+	N-2102	+	N-2103	+	N-2104	+
N-2105	+	N-2106	+	N-2107	+	N-2108	+
N-2109	-	N-2110	-	N-2111	-	N-2112	-
N-2113	-	N-2114	+	N-2115	-	N-2116	-
N-2117	-	N-2118	-	N-2119	-	N-2120	-
N-2121	+	N-2122	-	N-2123	+	N-2124	+
N-2125	+	N-2126	-	N-2127	+	N-2128	+
N-2129	-	N-2130	+	N-2131	-	N-2132	+
N-2133	-	N-2134	+	N-2135	+	N-2136	-
N-2137	+	N-2138	+	N-2139	+	N-2140	+

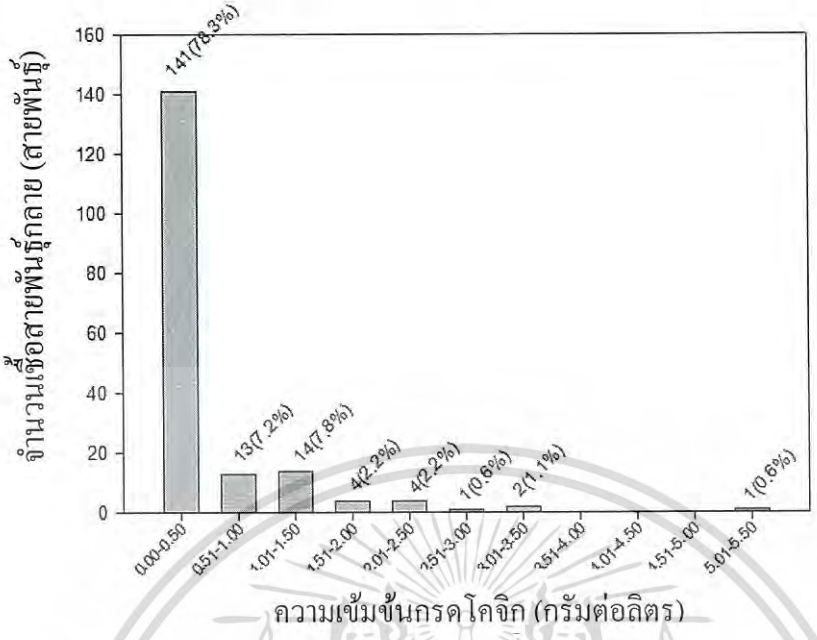
หมายเหตุ (+) = ผลิตกรดโคจิกสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ; (-) = ผลิตกรดโคจิกต่ำกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คิดเป็น 30.5 เปอร์เซ็นต์ หรือจำนวน 61 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 180 ไอโซเลต (เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ *Aspergillus* sp. BR-1 ที่ผลิตได้ 0.09 กรัมต่อลิตร) เมื่อพิจารณาความเข้มข้นกรดโคจิกที่เชื้อสายพันธุ์กลายผลิตได้ในสภาวะที่ทดลองเป็นช่วงของความเข้มข้น ไอโซเลตส่วนใหญ่สร้างกรดโคจิกความเข้มข้นอยู่ระหว่างกรัมต่อลิตร ถึง 0.00-0.50 กรัมต่อลิตร จำนวน 141 ไอโซเลต คำนวณได้เป็นร้อยละ 78.3 ของไอโซเลตทั้งหมด (รูปที่ 4.2) รองลงมา คือ พบช่วงปริมาณกรดโคจิก 1.01 กรัมต่อลิตร ถึง 1.50 กรัมต่อลิตร จากการผลิตของเชื้อกลายพันธุ์ 14 ไอโซเลต (ร้อยละ 7.8) และมีเชื้อ 13 ไอโซเลตที่สร้างกรดโคจิกอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.51 กรัมต่อลิตร ถึง 1.00 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 7.2 (รูปที่ 4.2) และเมื่อนำความเข้มข้นกรดโคจิกที่เชื้อสายพันธุ์กลายผลิตได้ในแต่ละสายพันธุ์ รวมเป็น 180 สายพันธุ์ มาหาค่าเฉลี่ยได้ค่าความเข้มข้นเฉลี่ยเท่ากับ 0.43 กรัมต่อลิตร มีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเป็น 0.71 เมื่อนำค่าทั้ง 2 คือ ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน มาหาค่า Z หรือ ค่ามาตรฐานโดยถ้าค่ามาตรฐานมากกว่า 0 แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์กลายชนิดนั้นสร้างกรดโคจิกสูงกว่าเชื้อสายพันธุ์กลายส่วนใหญ่ แต่ถ้าค่าน้อยกว่า 0 แสดงว่าผลิตได้ต่ำกว่าเชื้อสายพันธุ์กลายส่วนใหญ่ พบว่ามีเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีค่ามาตรฐานมากกว่า 0 เพียง 44 สายพันธุ์ จาก 180 สายพันธุ์ คิดเป็น 24.4 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ได้จากการทำกลายพันธุ์ ส่วนใหญ่มีการผลิตกรดโคจิกน้อยกว่าค่าเฉลี่ยส่วนใหญ่ที่เชื้อสายพันธุ์ที่ผ่านการทำกลายพันธุ์ด้วย N-methyl-N'-nitro-N-nitrosogunidine สร้างได้ ส่วนน้อยเท่านั้นที่ให้ผลการผลิตเพิ่มขึ้น โดยเชื้อสายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดโคจิกสูงเป็น 3 อันดับแรกเรียงจากมากไปน้อย คือ N-2062 N-2134 และ N-2019 ผลิตได้ 5.47 กรัมต่อลิตร 3.43 กรัมต่อลิตร และ 3.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการคัดเลือก ณ สภาวะความเข้มข้น N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบการรอดชีวิตของสปอร์ประมาณ 1.0 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนสปอร์เริ่มต้น สามารถคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดโคจิกสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของงานหลายชิ้นที่ใช้การคัดเลือกโดยพิจารณาจากการรอดชีวิตของสปอร์ไม่เกิน 1.0 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนสปอร์เริ่มต้น ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ช่วงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp.สายพันธุ์กลายต่างๆ จำนวนทั้งสิ้น 180 ไอโซเลต

Futamura และคณะ (2001) ทำการพัฒนาความสามารถในการสังเคราะห์กรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* ด้วยสารก่อการกลาย N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 M. พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที คัดเลือกที่อัตราการรอดชีวิตสปอร์ 1.0 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนสปอร์เริ่มต้น ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus oryzae* MK107-39 ที่ผลิตกรดโคจิกได้ 28 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 7.7 เท่า

Amany (2013) ได้ทำการปรับปรุงพันธุ์เชื้อ *Aspergillus flavus* เพื่อผลิตกรดโคจิกโดยใช้การทำกลายพันธุ์ด้วยวิธีทางกายภาพจากรังสียูวีและรังสีแกมม่า ซึ่งใช้สารแขวนลอยสปอร์เข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 หลังจากทำกลายพันธุ์ให้เลือกจานเพาะเลี้ยงที่มีจำนวนสปอร์รอดชีวิตน้อยกว่า 1.0 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนสปอร์เริ่มต้น ทำให้เชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เป็นสารที่ได้หลังจากการย่อยแป้งมันฝรั่งและรำข้าวได้

นอกจากการผลิตกรดโคจิก การเลือกใช้การรอดชีวิตของสปอร์ที่ 1.0 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนสปอร์ทั้งหมด ยังถูกนำไปใช้ในการคัดเลือกราสายพันธุ์กลายที่ผลิตสารเมทาบอไลท์อื่นๆ เช่น เอนไซม์ไลเปส ซึ่ง Karanam และ Medicherla (2008) ใช้ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นเวลา 120 และ 150 นาที ปรับปรุงพันธุ์โดยทำกลายพันธุ์หลังจากเชื้อถูกทำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีและไนตรัสออกไซด์ เช่นเดียวกับ Rakariyatham และคณะ (2006) ได้เลือกสารก่อกลายพันธุ์สองชนิด คือ Ethylmethane sulfonate และ N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพกิจกรรมของเอนไซม์ไมโรซิเนส (myrosinase) จาก *Aspergillus* sp. NR 4617 ที่แยกจากดิน ผลการใช้อีเอ็มเอสเป็นสารชักนำทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นถึง 1.90 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงจากเดิมถึง 171 เปอร์เซ็นต์

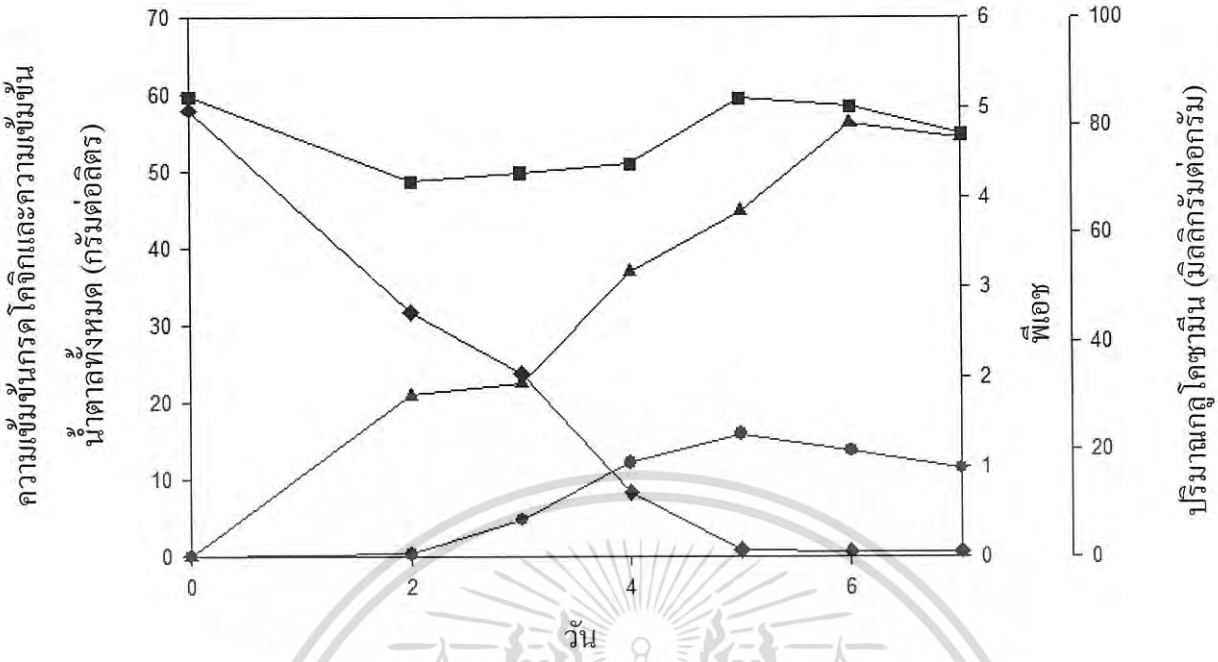
4.1.4 การคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่มีความสามารถผลิตกรดโคจิกสูงระดับฟลาสก์

เชื้อสายพันธุ์กลาย 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย N-2019 N-2062 และ N-2134 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Starch ซึ่งประกอบไปด้วยแป้งมันสำปะหลัง 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อเลือกเชื้อกลายที่สามารถผลิตกรดโคจิกความเข้มข้นสูงสุด และนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกต่อไป

จากรูปที่ 4.3 ถึง 4.6 พบว่าเชื้อกลายทั้ง 3 สายพันธุ์มีรูปแบบการผลิตกรด การเปลี่ยนแปลงระดับค่าความเป็นกรดเป็นด่างคล้ายคลึงกัน คือ กรดโคจิกมีแนวโน้มเพิ่มอย่างช้าๆ จนสูงสุดในวันที่ 5 ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงจนถึงความเข้มต่ำสุดในวันเดียวกัน หลังจากนั้นปริมาณกรดโคจิกลดลงเรื่อยๆ ในวันที่ 6 และ 7 ของการเพาะเลี้ยง ขณะที่ความเป็นกรดเป็นด่างมีการเปลี่ยนแปลงไม่มาก เชื้อ N-2019 และ N-2134 มีช่วงการเปลี่ยนแปลงของระดับกรดและด่างประมาณ 4.2 ถึง 5.1 และ 4.0 ถึง 5.0 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าของเชื้อ N-2062 เล็กน้อยที่มีค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 4.0 ถึง 4.7

ส่วนการใช้น้ำตาลทั้งหมดมีความแตกต่างกัน ในช่วงต้นของการเพาะเลี้ยงจากวันที่ 2 ถึง 3 พบว่าเชื้อ N-2019 และ N-2134 ใช้แป้งได้เร็วกว่าเชื้อ N-2062 แต่เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดไม่แตกต่างกัน สำหรับค่าพารามิเตอร์ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์

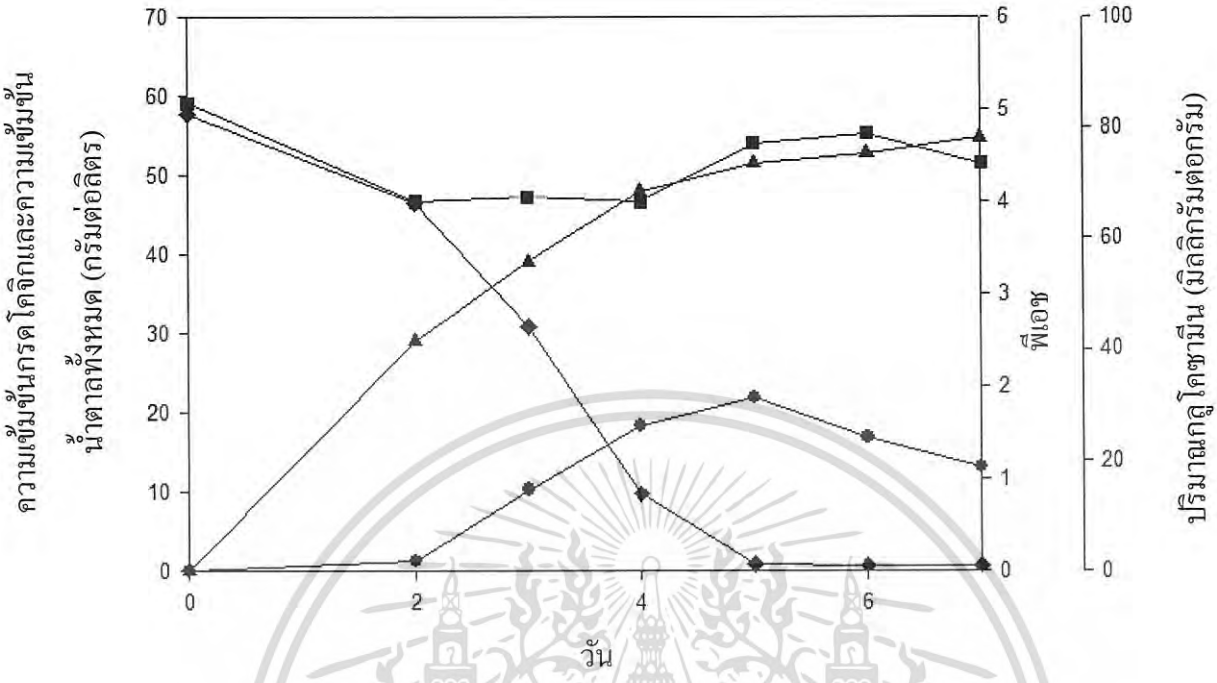
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2019 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งมีความเข้มข้นแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

พบว่า เชื้อ N-2062 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 21.81 กรัมต่อลิตร กำลังการผลิต 4.36 กรัมต่อลิตรต่อวัน และผลได้ของกรดโคจิกต่อน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปมีค่าเท่ากับ 0.38 กรัมต่อกรัม ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์กลาย N-2019 และ N-2134 อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ที่ให้ค่าความเข้มข้นกรดโคจิกสูงสุด 15.93 และ 16.20 กรัมต่อลิตร กำลังการผลิต 3.19 และ 3.29 กรัมต่อลิตรต่อวัน ผลได้ของกรดโคจิกต่อแป้งมันสำปะหลังที่ใช้ไป 0.28 และ 0.28 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ

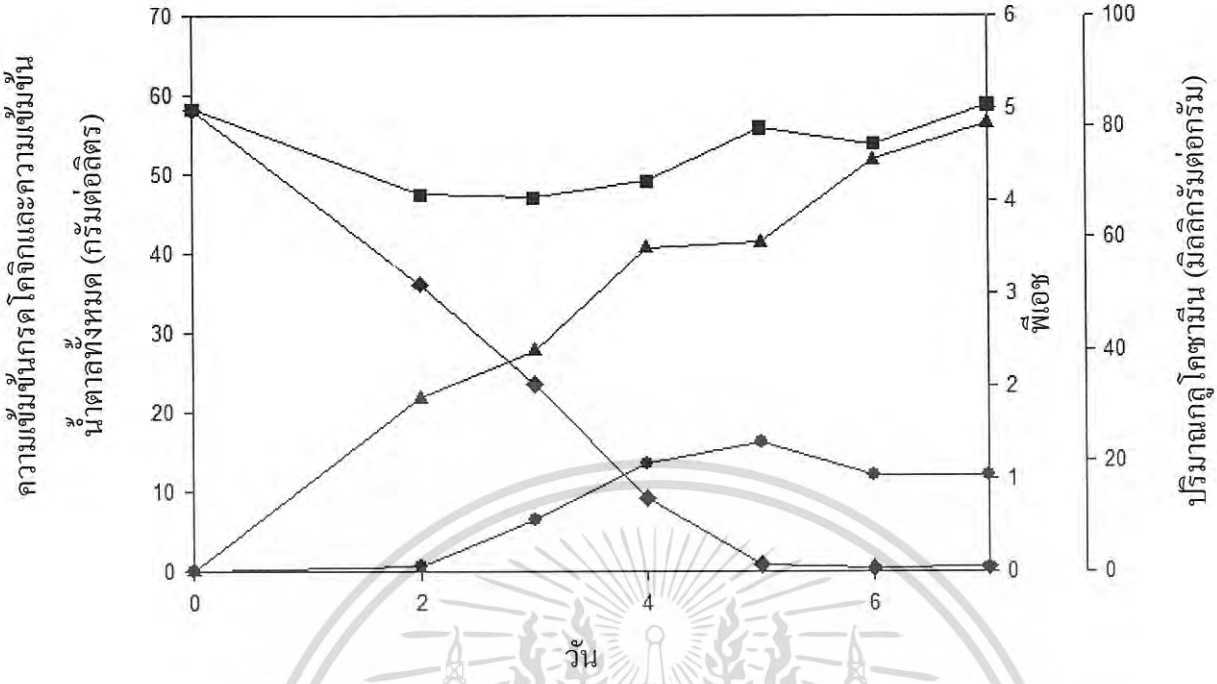
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีน ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งมีความเข้มข้นแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

ทั้ง 3 สายพันธุ์ให้ค่าความเข้มข้นของกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 4.2) ณ วันที่กรดโคจิกถูกผลิตสูงสุด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อสายพันธุ์ N-2062 ให้ปริมาณกลูโคซามีนในวันที่กรดโคจิกสูงสุดว่ามีความแตกต่างกับเชื้อสายพันธุ์ N-2134 อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่เมื่อนำค่าปริมาณกลูโคซามีนของสายพันธุ์ N-2062 เทียบกับสายพันธุ์ N-2019 พบว่าไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4.2

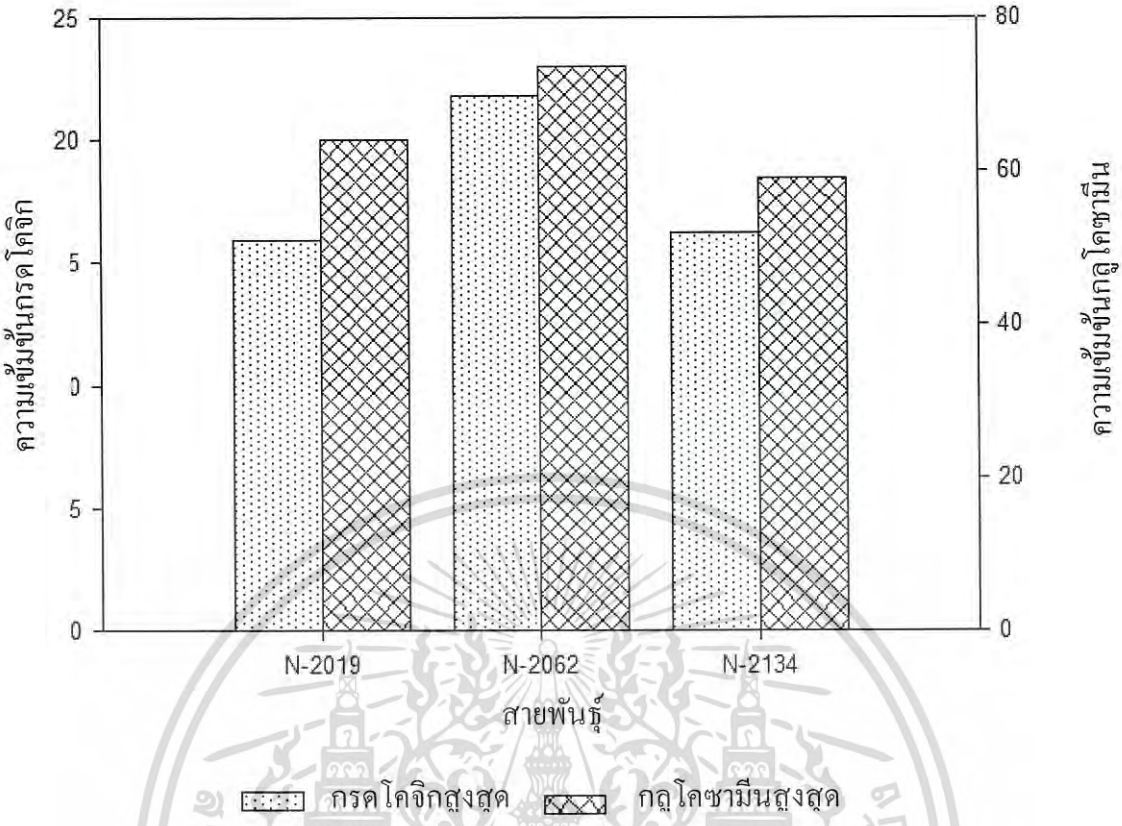
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีน ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2134 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งมีความเข้มข้นแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

ดังนั้นจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย N-2062 มีค่า ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด คือ 21.81 กรัมต่อลิตร ค่ากำลังการผลิต 4.36 กรัมต่อลิตรต่อวัน ค่าผลได้ของกรดโคจิกต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไปเท่ากับ 0.38 กรัมต่อกรัม สูงกว่าสายพันธุ์กลาย N-2019 และ N-2134 ส่วนปริมาณกลูโคซามีนเมื่อเปรียบทางสถิติก็พบว่าสูงที่สุดเช่นกัน คือ วัดได้ 73.6 มิลลิกรัมต่อกรัมจากข้อมูลทั้งหมดจึงเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย N-2062 ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ความเข้มข้นของกรดโคจิก และกลูโคซามีนสูงสุด ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์กลาย N-2019 N-2062 และ N-2134 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งมีความเข้มข้นแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4.2 ประสิทธิภาพการหมักกรดโคจิกเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์กลาย N-2019 N-2062 และ N-2134

สายพันธุ์	วันที่กรดโคจิกสูงสุด	P_{max} (กรัมต่อลิตร)	Productivity (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	$Y_{p/s}$ (กรัมต่อกรัม)	กลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัม)
N-2019	5	15.93^{b} ±1.83	3.19^{b} ±0.37	0.28^{b} ±0.02	64.0^{ab} ±4.7
N-2062	5	21.81^{a} ±2.21	4.36^{a} ±0.44	0.38^{a} ±0.05	73.6^{a} ±4.0
N-2134	5	16.20^{b} ±0.88	3.29^{b} ±0.18	0.28^{b} ±0.00	59.1^{b} ±7.7

หมายเหตุ ตัวอักษร a และ b ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

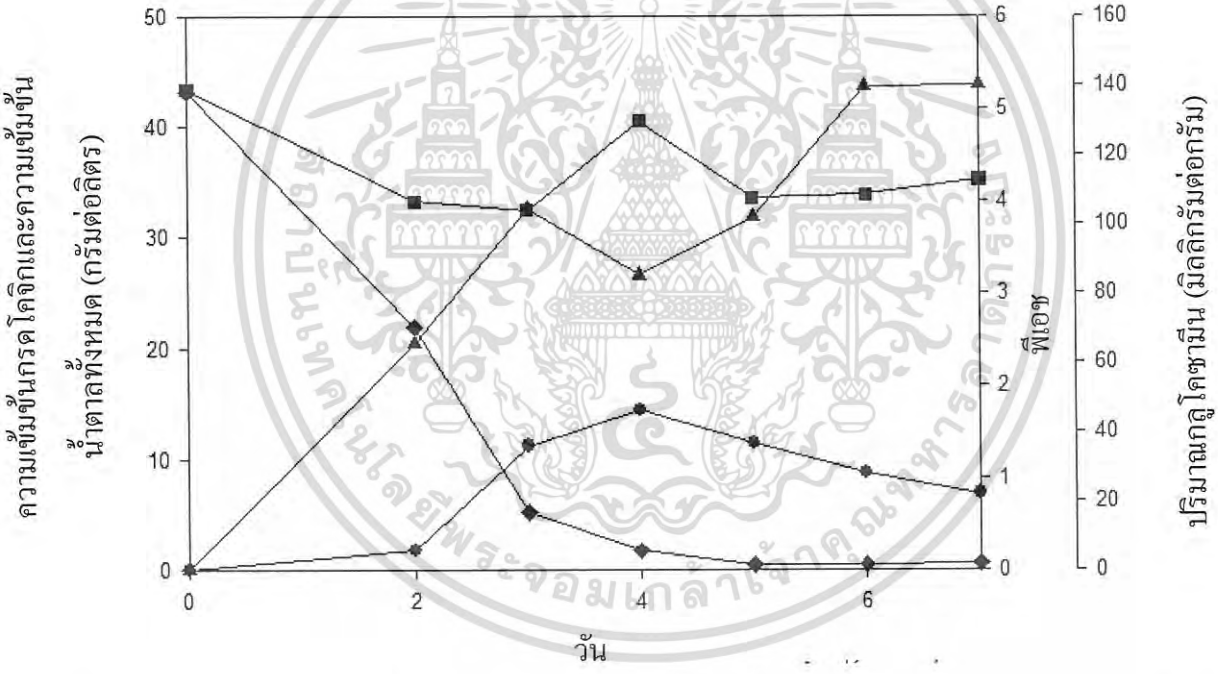
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ทางสถิติจากการทดลอง 3 ซ้ำ

4.2 การหาความเข้มข้นของแป้งและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของสายพันธุ์กลาย

4.2.1 ผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตกรดโคจิก

เมื่อใช้อาหาร Starch สูตรดัดแปลง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีสภาวะของการเพาะเลี้ยงเป็นค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที ความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งผันแปรความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังที่ระดับต่างๆ ประกอบด้วย 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



รูปที่ 4.7 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และ กลูโคซามีน ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งมีแป้งความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

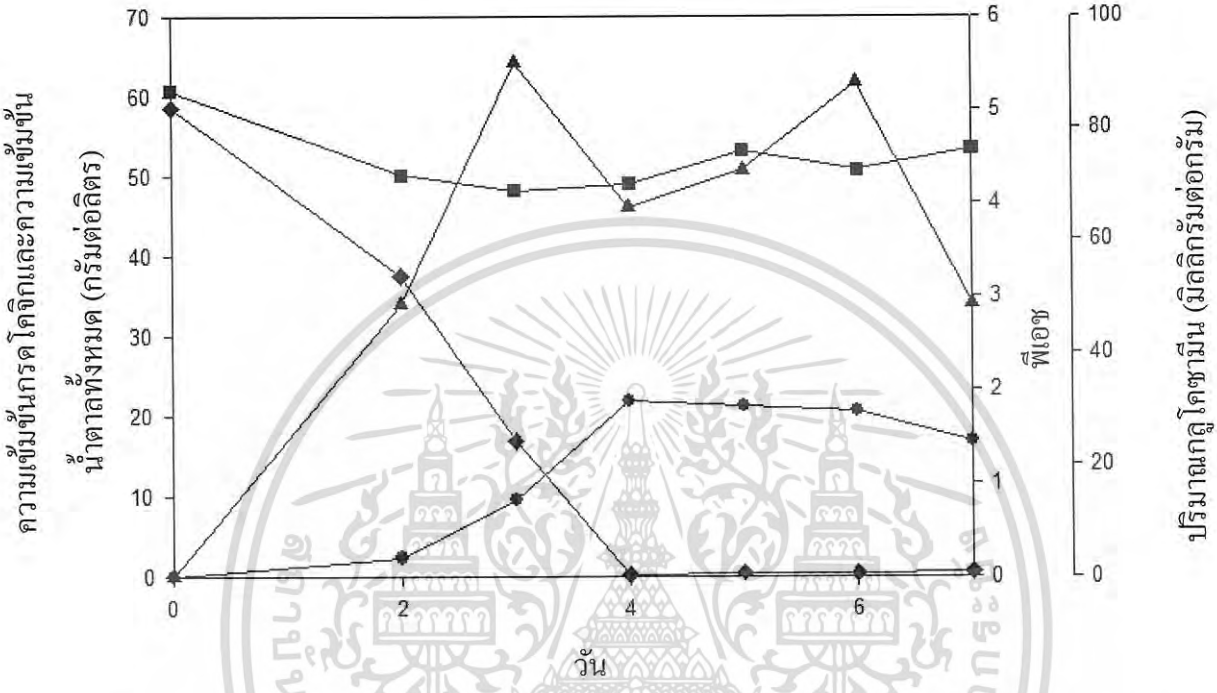
พบว่าการใช้ความเข้มข้นแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำให้กรดโคจิกถูกผลิตตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.7) โดยมีค่าความเข้มข้น 1.86 กรัมต่อลิตร และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 4 ของกระบวนการหมัก วัดปริมาณกรดโคจิกได้ 14.45 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทั้งหมดมีค่าความเข้มข้น 1.7 กรัมต่อลิตรในวันเดียวกัน จากนั้นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีแนวโน้มลดลงเหลือเพียง 0.5 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดระดับนี้ส่งผลให้กรดโคจิกลดปริมาณลง เป็น 11.45 กรัมต่อลิตร ส่วนการเปลี่ยนแปลงพีเอชอยู่ในช่วง 3.9 ถึง 4.9 ปริมาณกลูโคซามีนพบว่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของแป้งระดับนี้ (ร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ค่ากลูโคซามีนสูงกว่าระดับความเข้มข้นแป้งที่ 6 8 หรือ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงจนถึงวันสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง และให้ปริมาณกลูโคซามีน 85.2 มิลลิกรัมต่อกรัมของเซลล์ที่นำมาสกัด ณ วันที่เชื้อผลิตกรดได้สูงสุด (วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง) ดังแสดงในตารางที่ 4.3

เมื่อเติมแป้งความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณกรดโคจิกมีความเข้มข้นสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 2 ของการเก็บตัวอย่าง ซึ่งมีกรดโคจิก 2.38 กรัมต่อลิตร และมีความเข้มข้นสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.8) ซึ่งเป็นวันเดียวกับการใช้ความเข้มข้นแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แต่การเพาะเลี้ยงเชื้อพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062 ด้วยแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงกว่าการใช้ความเข้มข้นแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร คือ ให้กรดโคจิกอยู่ที่ความเข้มข้น 21.96 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.3) เพิ่มจากกรดโคจิกที่ได้จากการเติมแป้งความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งวัดค่าปริมาณกรดโคจิกได้ 14.45 กรัมต่อลิตร ถึง 1.5 เท่า สอดคล้องกับปริมาณแป้งที่เติมเพิ่มเข้าไปในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงจาก 40 กรัมต่อลิตร เป็น 60 กรัมต่อลิตร

ผลของการนำแป้งที่ระดับความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่ามีแป้งเหลือประมาณ 0.2 กรัมของน้ำตาลทั้งหมดต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก ซึ่งเป็นวันที่ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดความเข้มข้น 21.96 กรัมต่อลิตร โดยการลดลงของแป้งในวันเดียวกัน คือ วันที่ 4 นั้น พบว่าเร็วกว่าระดับแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเล็กน้อย ปริมาณแป้งคงเหลือซึ่งวัดจากค่าความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดได้ 1.7 กรัมต่อลิตร การใช้ความเข้มข้นแป้งที่ 6 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างเปลี่ยนแปลงในช่วงแคบระหว่าง 4.1 ถึง 4.6 ส่วนปริมาณกลูโคซามีนมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น แต่วันสุดท้ายปริมาณกลูโคซามีนมีค่าลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และให้ค่ากลูโคซามีนสูงสุดในวันที่ 6 อยู่ที่ 91.8 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ส่วนปริมาณกลูโคซามีนในช่วงที่เชื้อสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุดอยู่ที่ 65.8 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัดในวันที่ 4 ของการหมัก



รูปที่ 4.8 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีน ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งมีแป้งความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันวัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเชื้อกลายพันธุ์ *Aspergillus* sp N-2062 ด้วยแป้งความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ผลการวัดค่ากรดโคจิก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราการเพิ่มระดับความเข้มข้นของกรดช้ากว่าเมื่อเทียบกับระดับแป้งที่ 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สังเกตได้จากปริมาณกรดโคจิกเริ่มมีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และมีค่าสูงสุดในวันที่ 5 ของการหมักมีปริมาณเท่ากับ 25.80 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.9) ขณะที่ระดับความเข้มข้นแป้ง 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรให้กรดสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก ซึ่งระดับแป้งที่ 8 เปอร์เซ็นต์มีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับปริมาณกรดโคจิกสูงสุดที่ผลิตด้วยระดับแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (14.45 กรัมต่อลิตร) คิดเป็น 1.8 เท่า และ เมื่อเปรียบเทียบกับระดับแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (21.96 กรัมต่อลิตร) ให้ค่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดโคจิกคิดเป็น 1.2 เท่า ตามลำดับ

เมื่อใช้ปริมาณแป้งที่ความเข้มข้นระดับ 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งเพิ่มจากแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์ คิดเป็น 2 เท่า และเมื่อเทียบกับระดับความเข้มข้นที่ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพิ่มขึ้น 1.3 เท่า เช่นเดียวกันกับปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้ซึ่งสูงขึ้นตามปริมาณของแป้งที่เพิ่มขึ้น ค่าของน้ำตาลทั้งหมดในการทดลองเมื่อใช้แป้ง 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรจะลดลงช้ากว่าเมื่อเทียบกับระดับแป้งที่ 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยจะลดจนมีค่าคงที่ที่ค่าความเข้มข้นประมาณ 0.6 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ความเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชอยู่ในช่วงระหว่าง 3.9-4.9 ซึ่งระยะที่กรดโคจิกมีการผลิตเพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลให้ระดับของพีเอชลดลง และเมื่อการผลิตกรดโคจิกลดลงระดับพีเอชจะปรับสูงขึ้นอีกครั้งหนึ่ง (รูปที่ 4.9)

ส่วนค่าความเข้มข้นกลูโคซามีนซึ่งใช้เป็นค่าประมาณน้ำหนักของเซลล์ (Van der Loo, 1976) ก็พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงวันสุดท้ายของการเก็บตัวอย่างมีค่ามากที่สุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณของกลูโคซามีนอยู่ที่ 70.4 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์ที่นำมาสกัด แต่เมื่อพิจารณาค่าความเข้มข้นของกลูโคซามีนในวันที่เชื้อสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุด พบว่ามีความเข้มข้นของกลูโคซามีนอยู่ที่ 43.1 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ณ วันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. N-2062 เพื่อผลิตกรดโคจิก

ปริมาณแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำให้มีการเพิ่มของปริมาณกรดโคจิกอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันแรกของการเก็บตัวอย่าง ซึ่งมีค่าความเข้มข้นเท่ากับ 1.91 กรัมต่อลิตร จนมีปริมาณมากที่สุดในวันที่ 6 มีความเข้มข้นของกรดโคจิก 33.16 กรัมต่อลิตร สูงกว่าการใช้ระดับความเข้มข้นแป้ง 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 14.45 21.96 และ 25.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกที่ความเข้มข้นแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรกับความเข้มข้น 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าได้กรดโคจิกความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 2.3 1.5 และ 1.3 เท่า ซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนเท่าของกรดโคจิกที่เพิ่มขึ้นนั้นใกล้เคียงกับจำนวนเท่าของความเข้มข้นแป้งที่เพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มปริมาณแป้งที่ระดับความเข้มข้น 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร เป็น 100 กรัมต่อลิตร คิดเป็นจำนวนเท่าของการเพิ่ม คือ 2.5 1.7 และ 1.25 เท่า ตามลำดับ

ส่วนค่าความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดซึ่งบ่งชี้ปริมาณการใช้แป้งมันสำปะหลังได้มีค่าลดลงจนคงที่ในวันที่ 7 ของกระบวนการหมัก โดยค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับระดับน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือจนวัดได้ค่าความเข้มข้นคงที่ของการใช้แป้งความเข้มข้น 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร มีค่าเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร 0.2 กรัมต่อลิตร และ 2.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งพบได้ในวันที่ 5 4 และ 5 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งเกิดขึ้นได้ไวกว่าที่ระดับความเข้มข้นแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (รูปที่ 4.7 ถึง 4.10) ฉะนั้นการวัดค่าซึ่งค่าน้ำตาลทั้งหมดลดลงจนคงที่ของการทดลองจากอาหารที่ใช้แป้ง 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร จะช้ากว่าเมื่อเทียบกับอาหารที่มีแป้ง 4 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักโดยปริมาตร เนื่องจากระดับความเข้มข้นของแป้งที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สูงกว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งทั้ง 3 ระดับ ตามที่ได้กล่าวถึงมาแล้ว ส่วนอัตราการใช้น้ำตาลทั้งหมดของตัวอย่างอาหารที่มีความเข้มข้นแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งคิดเทียบจากความเข้มข้นแป้งที่ใช้เริ่มต้น (100 กรัมต่อลิตร) ต่อเวลาที่ใช้จนกระทั่งค่าน้ำตาลทั้งหมดเหลือคงที่ซึ่ง คือ วันที่ 7 มีค่าเท่ากับ 14.29 กรัมต่อลิตรต่อวัน แตกต่างเพียงเล็กน้อยกับอาหารที่มีความเข้มข้นแป้งเริ่มต้น 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (แป้งเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร เวลา 5 วัน) และอาหารที่มีความเข้มข้นแป้งเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (แป้งเริ่มต้น60 กรัมต่อลิตร เวลา 4 วัน) ที่มีค่าการใช้น้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 16.00 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 15.00 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ ส่วนอาหารที่มีแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบค่าอัตราการใช้น้ำตาลทั้งหมดเพียง 8.00 กรัมต่อลิตรต่อวัน ค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 4.1 ถึง 4.4

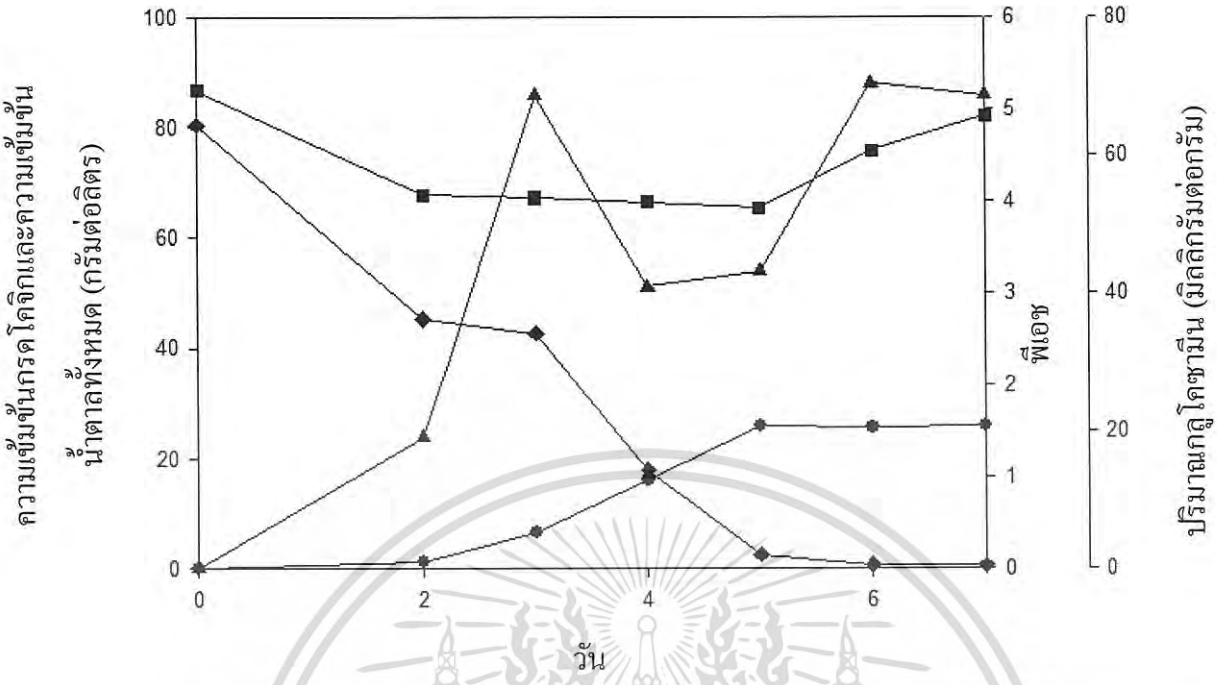
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนปริมาณกลูโคซามีนที่เพิ่มขึ้นตั้งแต่วันแรกถึงวันสุดท้ายที่ทำการทดลองการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์กลาย N-2062 พบปริมาณกลูโคซามีนมีค่าสูงสุดอยู่ที่ 78.5 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ในวันที่ 3 ของเวลาที่ทำการทดลอง (รูปที่ 4.10) แต่ปริมาณกลูโคซามีน ณ วันที่วัดเมื่อเชื้อราสายพันธุ์กลาย N-2062 สร้างกรดโคจิกได้สูงสุดในวันที่ 6 ของกระบวนการเพาะเลี้ยง สามารถวัดค่าได้ 68.3 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด

จากผลการวิจัยที่ใช้แป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ถึง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สังเกตว่าเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง การผลิตกรดโคจิกของเชื้อจะเพิ่มขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ผลการผลิตกรดโคจิกสูงสุด 33.16 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ การเติมแป้งในอาหารความเข้มข้น 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ผลผลิตกรดโคจิก 21.96 และ 25.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้แป้ง 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ปริมาณกรดโคจิกต่ำที่สุด คือ 14.45 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรดโคจิกที่เพิ่มขึ้นจะแสดงความแปรผันตามปริมาณสับสเตรทที่มากเห็นได้จากรูปที่ 4.11 เนื่องจากกรดโคจิกมีวิถีการสังเคราะห์ด้วยการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันซึ่งเกิดการสูญเสียอิเล็คตรอนในโครงสร้างของกลูโคสและดีไฮเดรชันหรือปฏิกิริยาดึงน้ำออก ตามลำดับ (Bently, 2006)

ดังนั้นเมื่อเชื้อกลายพันธุ์ไป เชื้อมีการปลี่ยนแปลงในระดับยีนในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการใช้แป้งและผลิตกรดโคจิก ซึ่งส่งผลให้เชื้อสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ประกอบจากโมโนเมอร์อย่างน้ำตาลกลูโคสได้ ปริมาณกรดโคจิกจึงเพิ่มขึ้นตามปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่สูงขึ้น เนื่องจากเมื่อพิจารณาค่าพารามิเตอร์ซึ่งบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการหมักกรดโคจิก พบว่าอาหารที่มีระดับความเข้มข้นแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ให้ค่า Productivity และ$Y_{p/s}$ เท่ากับ 5.53 กรัมต่อลิตรต่อวัน และ 0.34 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากการใช้แป้งที่ความเข้มข้น 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งคำนวณค่า Productivity ได้เท่ากับ 5.49 และ 5.16 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3)และค่า $Y_{p/s}$ เท่ากับ 0.38 และ0.34 กรัมต่อกรัม อีกทั้งปริมาณกลูโคซามีน

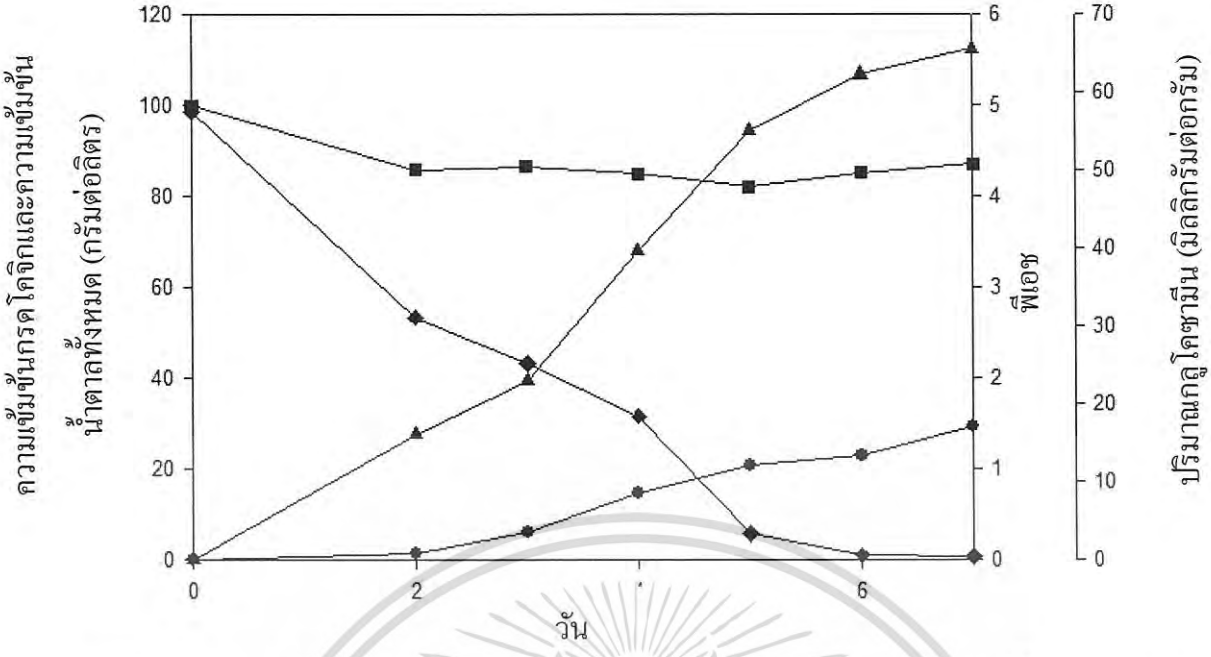
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีน ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งมีแป้งความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน(● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

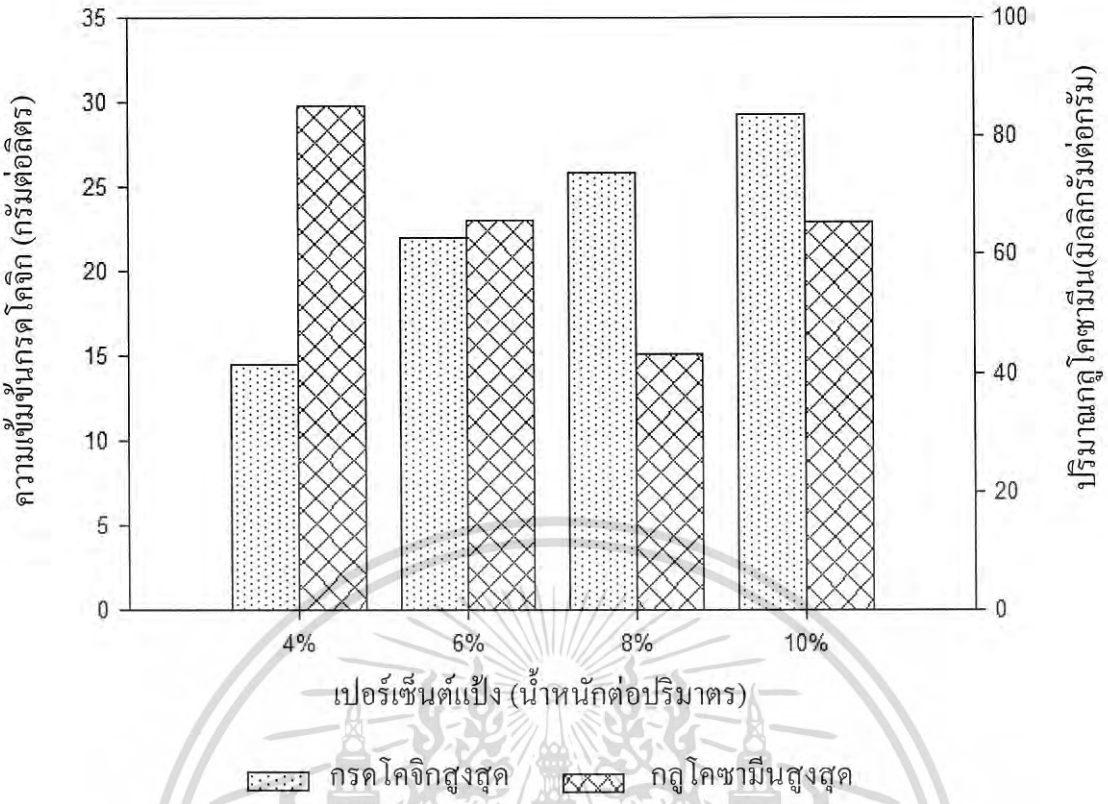
ยังอยู่ในค่าที่เหมาะสม ซึ่งเป็นระดับที่สามารถให้ผลผลิตของกรดได้สูงสังเกตได้จากการใช้อาหารที่มีระดับแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ให้ปริมาณกลูโคซามีนสูงที่สุดที่ 140.2 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัดในช่วงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง แต่เมื่อพิจารณาพารามิเตอร์ $Y_{p/s}$ กลับมีค่าเพียง 0.35 กรัมต่อกรัม ดังที่ถูกแสดงไว้ในตารางที่ 4.3 ซึ่งไม่แตกต่างจากความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นในอาหารที่ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งให้ปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดน้อยกว่า เพียง 78.4 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัดที่เป็นเช่นนี้เพราะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิกซึ่งอยู่บริเวณเส้นใยสามารถทำงานซ้ำได้ (Rosfarizan และคณะ, 2010) ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องได้เซลล์ หรือค่ากลูโคซามีนมาก แต่ให้มีปริมาณมากเพียงพอต่อสภาวะที่เหมาะสมของการสร้างกรดโคจิกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งมีแป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันวัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 ความเข้มข้นกรดโคจิก และกลูโคซามีนสูงสุด ของเชื้อ *Apergillus* sp. สายพันธุ์กลาย N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งมีความเข้มข้นแป้ง 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพการหมักกรดโคจิกที่เปอร์เซ็นต์แป้งมันสำปะหลังต่างๆ

% (w/v)	วันที่กรดโคจิกสูงสุด	P_{max} (กรัมต่อลิตร)	Productivity (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	$Y_{p/s}$ (กรัมต่อกรัม)	กลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัม)
4	4	14.45^{c} ±1.73	3.61^{b} ±0.43	0.35^{a} ±0.03	85.2^{a} ±3.4
6	4	21.96^{b} ±1.05	5.49^{a} ±0.26	0.38^{a} ±0.01	65.8^{b} ±6.0
8	5	25.80^{b} ±0.58	5.16^{a} ±0.12	0.33^{a} ±0.02	43.1^{c} ±0.7
10	6	33.16^{a} ±1.44	5.53^{a} ±0.24	0.34^{a} ±0.00	68.3^{ab} ±18.0

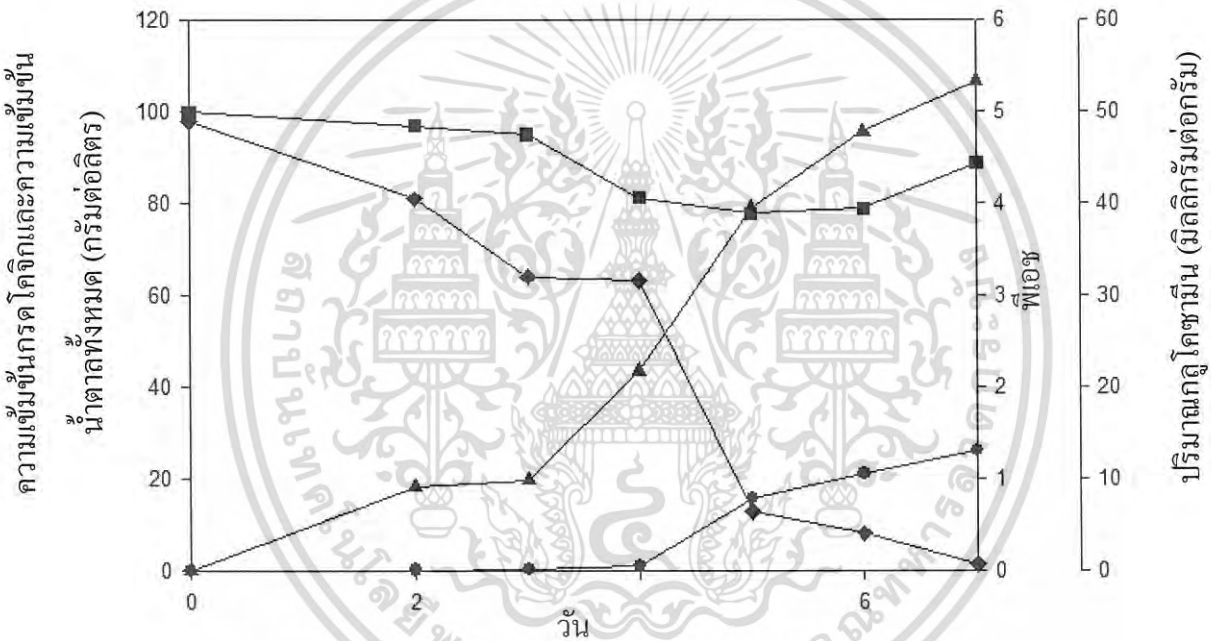
หมายเหตุ ตัวอักษร a bและ c ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ทางสถิติจากการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดต่างๆ ต่อการผลิตกรดโคจิก

การศึกษาชนิดแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ทั้งหมด 6 ชนิด ประกอบด้วย เนื้อสกัด เคซีน-ไฮโดรไลเซต น้ำแช่ข้าวโพด เปบโตน ทริปโตน และยีสต์สกัด โดยเติมลงในอาหาร Starch ซึ่งใช้ปริมาณแป้งความเข้มข้นเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเชื้อกลายพันธุ์ *Aspergillus* sp. N-2062 นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที ปริมาณสปอร์ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.12 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้เนื้อสกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน(● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

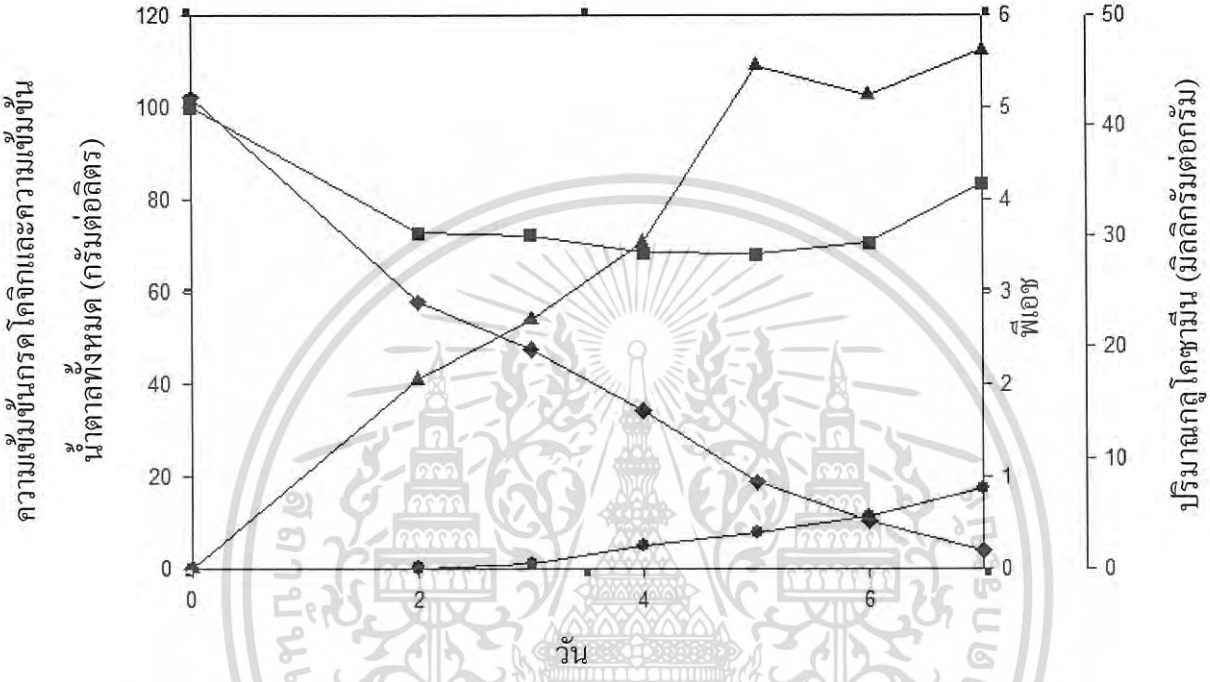
จากผลการทดลองแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด พบว่าเนื้อสกัดให้ผลการผลิตกรดโคจิกค่อนข้างช้าในช่วงวันที่ 2 ถึงวันที่ 4 วัดปริมาณกรดโคจิกได้ 0.19 กรัมต่อลิตร ณ วันที่ 2 และ 1.22 กรัมต่อลิตร ณ วันที่ 4 ของการเก็บตัวอย่าง แต่ช่วงวันที่ 4 ถึง วันที่ 5 ปริมาณกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 1.22 กรัมต่อลิตร เป็น 15.75 กรัมต่อลิตร และให้ค่าความเข้มข้นกรดโคจิกสูงสุดที่ 26.07 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ขณะที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงในอัตราที่ต่ำในช่วงเริ่มเก็บตัวอย่าง มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ณ วันที่ 0 เท่ากับ 97.9 กรัมต่อลิตร แต่ในวันที่ 2 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดยังคงเหลือถึง 81.0 กรัมต่อลิตร จากนั้นจะลดอย่างรวดเร็วช่วงวันที่ 4 ถึงวันที่ 5 มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดในวันที่ 4 เท่ากับ 63.2 กรัมต่อลิตร ขณะที่วันที่ 5 เหลือน้ำตาลทั้งหมดในน้ำหมักเพียง 12.8 กรัมต่อลิตร ซึ่ง ณ วันสุดท้าย คือ วันที่ 7 วัดค่าความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดได้ประมาณ 1.6 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.12)

ในช่วงเวลาเดียวกันกับกรดโคจิกที่ค่าความเข้มข้นเพิ่มขึ้นและค่าน้ำตาลทั้งหมดที่ปริมาณลดลง ระดับค่าของพีเอชกลับคงที่ในช่วงวันที่ 2 ถึง วันที่ 3 มีค่าพีเอชเท่ากับ 4.8 และลดลงในช่วงที่กรดโคจิกผลิตสูงขึ้น หลังจากผ่านการเพาะเลี้ยงไป 5 วัน วัดค่าพีเอชได้ 3.9 จากนั้นพีเอชจะเพิ่มขึ้นค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 3.9 ถึง 4.8 ส่วนปริมาณกลูโคซามีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง จนกระทั่งถึงวันสุดท้ายที่เก็บตัวอย่าง โดยช่วงต้น คือ วันที่ 2 มีปริมาณกลูโคซามีน เท่ากับ 9.2 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ และในวันที่ 3 พบกลูโคซามีนความเข้มข้น 9.9 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด และเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 4 วิเคราะห์ได้ปริมาณกลูโค-ซามีนความเข้มข้น 21.8 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด อีกทั้งวัดปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดได้ ณ วันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงมีความเข้มข้น 53.2 มิลลิลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ซึ่งเป็นวันเดียวที่ปริมาณกรดโคจิกเพิ่มขึ้นสูงสุดเช่นกัน

การเติมเคซีนไฮโดรไลเซตลงในอาหาร ให้แนวโน้มการผลิตกรดโคจิก ค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ซึ่งใช้เป็นข้อมูลประกอบเพื่อการพิจารณาเลือกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนี้ ความเข้มข้นกรดโคจิกมีการเพิ่มอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 2 ถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยให้ค่าปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 17.57 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการทดลอง ส่วนค่าความเป็นกรดเป็นด่างลดลงต่ำกว่า 4.0 ตั้งแต่วัน 2 ถึง 6 มีช่วงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชตลอดการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่างค่า 3.4 ถึง 4.2 ส่วนความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดค่อยๆลดลงต่อเนื่องและมีแนวโน้มตรงกันข้ามกับการสร้างกรดโคจิกเช่นเดียวกับเนื้อสกัด ทั้งนี้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือเพียง 4 กรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

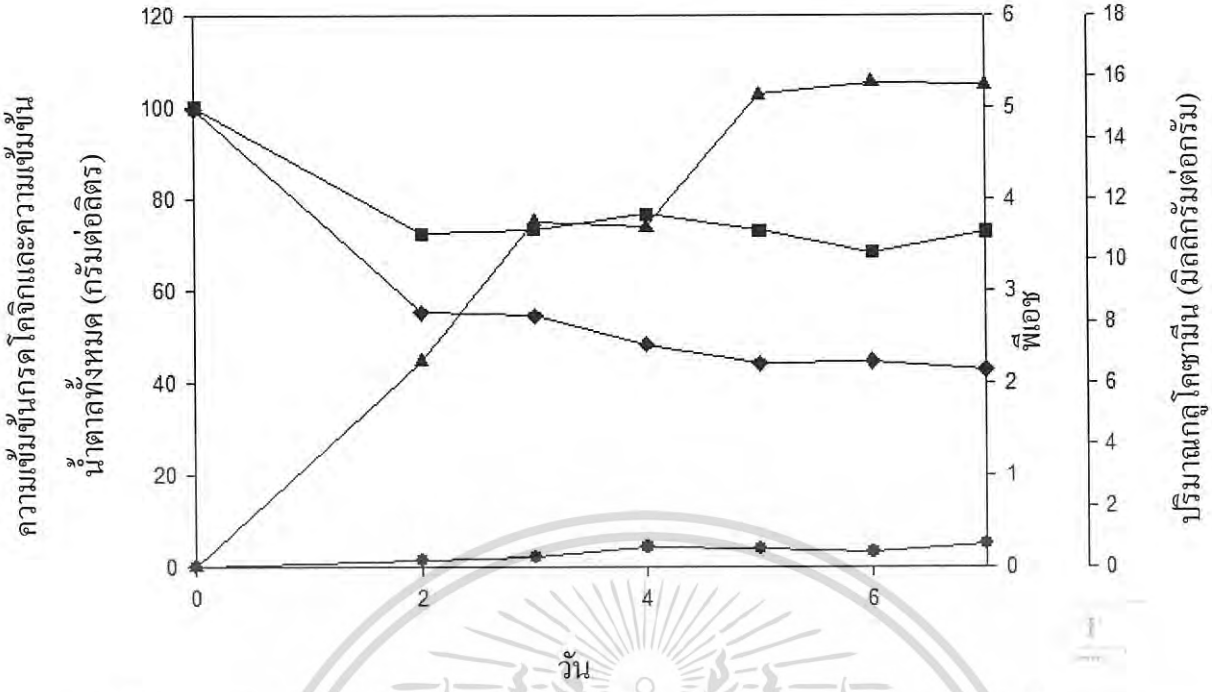
ลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นตลอดตั้งแต่วันแรกที่เก็บตัวอย่าง จนถึงวันที่ 7 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการทดลอง มีค่าความเข้มข้นของกลูโคซามีนสูงสุด ในวันที่ 7 ทั้งนี้เป็นวันเดียวที่กรดโคจิกเพิ่มปริมาณจนถึงจุดสูงสุดตลอดของช่วงเวลาเพาะเลี้ยงโดยมีค่าเท่ากับ 46.8 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ซึ่งแสดงผลดังในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้เคซีนไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เข่ยาที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน(● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนตัวที่ 3 ที่นำมาศึกษา คือ น้ำแช่ข้าวโพด ผลปรากฏว่ามีการเพิ่มของกรดโคจิกอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยงเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 จนถึงวันสุดท้ายแต่อยู่ในปริมาณที่ไม่สูง โดยตรวจพบค่าความเข้มข้นกรดโคจิกสูงสุดได้ในวันที่ 7 เพียง 4.90 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเป็นด่างลดลงต่ำกว่า 4.0 ตั้งแต่วันที่ 2 ของการเก็บตัวอย่าง มีช่วงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชตลอดการทดลองกับน้ำแช่ข้าวโพดอยู่ระหว่าง 3.4 ถึง 3.8 การลดลงของน้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

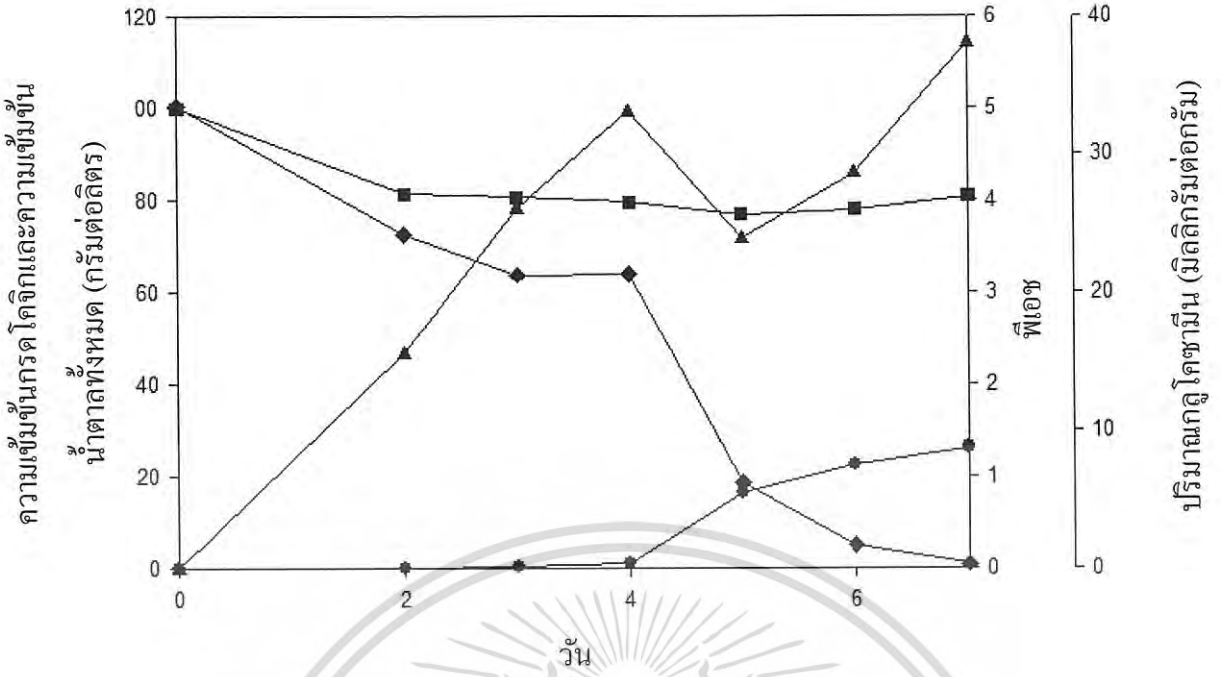


รูปที่ 4.14 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

ค่อนข้างช้าและมีปริมาณคงที่ตั้งแต่วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง พบปริมาณของน้ำตาลเหลือในอาหารถึง 42.9 กรัมต่อลิตร ถึงแม้เป็นวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง (วันที่ 7) ส่วนปริมาณกลูโคซามีนซึ่งบ่งชี้ค่ามวลเซลล์ของเชื้อพบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องคล้ายคลึงกับแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่กล่าวมาแล้วก่อนหน้านี้ทั้งเนื้อสกัดและเคซีนไฮโดรไลเซต แต่ให้ความเข้มข้นกลูโคซามีนสูงสุดในวันที่ 7 มีค่าความเข้มข้นเพียง 15.8 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด

ส่วนอาหารที่ประกอบไปด้วยเปบโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน พบค่าปริมาณกรดโคจิกที่ถูกผลิต มีลักษณะแนวโน้มคล้ายกับค่าความเข้มข้นของกรดโคจิกจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อย่างเนื้อสกัด (รูปที่ 4.18) ซึ่งคล้ายคลึงทั้งรูปแบบและปริมาณกรดโคจิกที่เพิ่มขึ้นในแต่ละวัน โดยพบค่ากรดโคจิกมากที่สุด ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 26.27 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลทั้งหมดช่วงวันที่ 2 ถึง 3 มีการลดต่ำลงอย่างช้าๆ จาก 72.6 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 2 เป็น 63.8 กรัมต่อลิตร เมื่อถึงวันที่ 3 และลดลงอย่างรวดเร็วระหว่างวันที่ 4 ถึงวันที่ 5 จากความเข้มข้น 63.9 กรัมต่อ

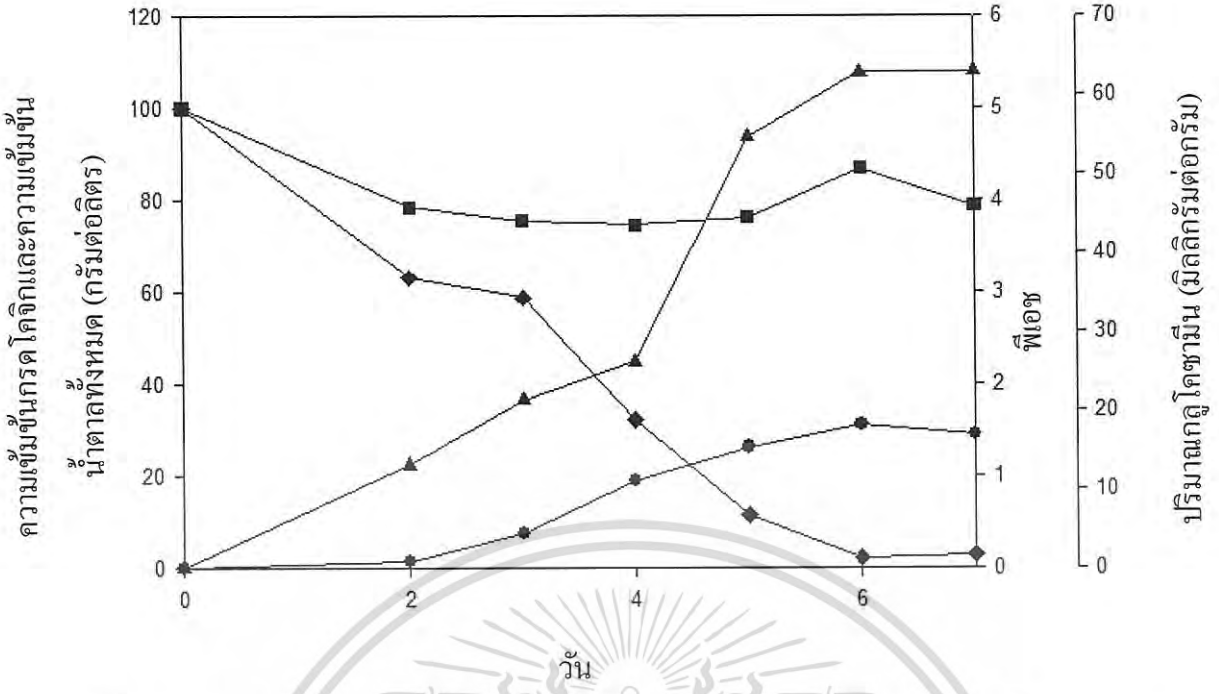
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้เปบโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

ลิตร เป็น 18.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันสิ้นสุดของการเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเหลือเพียง 1 กรัมต่อลิตร โดยการลดลงของค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดโคจิกอย่างรวดเร็วจาก 1.15 เป็น 16.42 กรัมต่อลิตร ปริมาณกลูโคซามีนให้ค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบระหว่างวันวันแรกและวันสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง จากวันที่ 2 ถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณกลูโคซามีนสูงที่สุด ณ ช่วงที่กรดโคจิกสูงสุดอยู่ที่ 38.1 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ในวันที่ 7 ของการทดลอง (ตารางที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.16 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้ทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน(● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

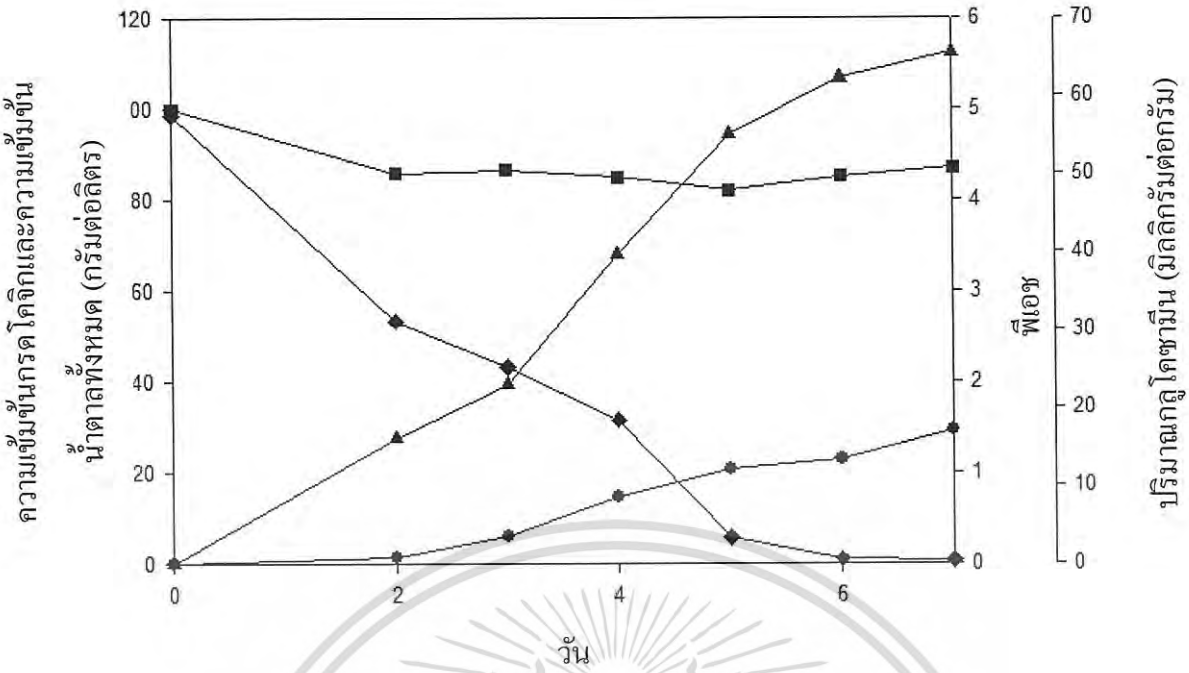
ทริปโตนเป็นไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดที่ 5 ที่นำมาทดลองและศึกษา โดยพบว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลค่อนข้างดีต่อการผลิตกรดโคจิก แต่การผลิตมีแนวโน้มเพิ่มช้าในช่วงต้น คือ วันที่ 2 และ 3 มีความเข้มข้นกรดโคจิกเพียง 1.57 และ 7.45 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อถึงวันที่ 4 ของการหมัก ปริมาณกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างมากเป็น 18.85 กรัมต่อลิตร จนมามีค่าสูงสุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงให้ค่าความเข้มข้นกรดโคจิกสูงถึง 31.08 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เชื้อกลายพันธุ์ใช้ มีความสอดคล้องกับค่าปริมาณกรดโคจิกที่เชื้อสร้างขึ้น คือ ลดอย่างช้าๆ ในวันที่ 2 ถึง 3 63.1 กรัมต่อลิตร ถึง 58.7 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกัน และลดลงอย่างรวดเร็วขึ้นหลังจากวันที่ 3 ของการเก็บตัวอย่าง ซึ่งปริมาณน้ำตาลลดลงจนเหลือ 3 กรัมต่อลิตร ในวันสุดท้ายหรือวันที่ 7 ของกระบวนการหมัก ค่าความเป็นกรดและด่างเปลี่ยนแปลงในช่วงระหว่าง 3.9 ถึง 4.3 ขณะที่ปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันที่สอง จากปริมาณความเข้มข้นที่ 13.1 มิลลิกรัมต่อกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ที่นำมาสกัด แล้วคงที่หลังจากวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง มีค่าความเข้มข้นเป็น 62.8 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด

จากแหล่งไนโตรเจนทั้ง 5 ชนิด ที่กล่าวมาข้างต้น เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อย่างยีสต์สกัดซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้เพื่อผลิตกรดโคจิก ผลการพิจารณาข้อมูลจากการทดลองโดยเปรียบเทียบการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์กับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดอื่น พบว่าการใช้ยีสต์สกัดร่วมกับแหล่งคาร์บอนอย่างแป้งมันสำปะหลังที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ยีสต์สกัดให้การผลิตกรดโคจิกในอัตราที่สูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดอื่น จากผลการทดลอง ณ วันที่ 2 ถึง วันที่ 3 มีการเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นกรดโคจิกจาก 1.91 กรัมต่อลิตร เป็น ความเข้มข้นกรดโคจิกที่ 8.71 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ เนื้อสกัด มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นกรดโคจิกจาก 0.12 กรัมต่อลิตร เป็น 0.26 กรัมต่อลิตร เคซีนไฮโดรไลเซตเปลี่ยนจากระดับความเข้มข้น 0.15 กรัมต่อลิตร เพิ่มเป็น 0.94 กรัมต่อลิตร น้ำแช่ข้าวโพดเพิ่มจาก 1.41 กรัมต่อลิตร เพิ่มปริมาณอยู่ที่ความเข้มข้น 2.12 กรัมต่อลิตร เปบโตน ณ ระดับความเข้มข้นกรดโคจิกที่ 0.11 กรัมต่อลิตร ขึ้นไปที่ระดับปริมาณกรดโคจิก 0.32 กรัมต่อลิตร และทริปโตนซึ่งให้ค่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดโคจิกใกล้เคียงกับยีสต์สกัดแต่ให้ช่วงการเปลี่ยนแปลงที่ต่ำกว่าเล็กน้อย มีค่าปริมาณกรดโคจิกเท่ากับ 1.51 กรัมต่อลิตร และ 7.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งในของการเพาะเลี้ยงโดยใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จากยีสต์สกัด ข้อมูลแสดงให้เห็นว่า ช่วงวันที่ 4 ถึง วันที่ 6 ของการเก็บตัวอย่าง ความเข้มข้นกรดโคจิกเปลี่ยนแปลงจากระดับความเข้มข้นกรดโคจิกที่ 17.32 กรัมต่อลิตร ณ วันที่ 4 จนสูงสุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงให้ค่าความเข้มข้นกรดโคจิกเป็น 33.17 กรัมต่อลิตร ใกล้เคียงกับค่าความเข้มข้นกรดโคจิกเมื่อใช้ทริปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ดังแสดงในรูปที่ 4.18 โดยทริปโตนให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดอยู่ที่ 31.08 กรัมต่อลิตร ณ วันที่ 6 เช่นกัน โดยปริมาณทั้ง 2 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าพีเอชเปลี่ยนแปลงพีเอช คือ มีการผันแปรในช่วง 4.1 ถึง 4.3 ตลอดการเพาะเลี้ยง ส่วนปริมาณกลูโคซามีน จากข้อมูลแสดงให้เห็นในรูปที่ 4.17 สามารถอธิบายได้ว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

ปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มอย่างต่อเนื่องตั้งแต่วันแรกของการเก็บตัวอย่างจนกระทั่งวันสุดท้ายให้ปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดที่ 70.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ณ วัดสุดท้ายของการทดลอง และให้ค่าความเข้มข้นกลูโคซามีน ณ วัดที่มีการสะสมกรดโคจิกอยู่ที่ 68.3 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด (ตารางที่ 4.4)

จากการทดลองซึ่งแสดงผลในตารางที่ 4.4 ให้ข้อมูลว่า แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ทั้ง 6 ชนิด ประกอบด้วย เนื้อสกัด เคซีนไฮโดรไลเซต น้ำแช่ข้าวโพด เปบโตน ทริปโตน และยีสต์สกัด พบว่าในแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่นำมาศึกษาบางชนิดให้ผลคล้ายคลึงกัน เช่น ทริปโตนและยีสต์สกัดให้ผลความเข้มข้นกรดโคจิกสูงสุดที่ 31.08 และ 33.16 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อีกทั้งทริปโตนให้ค่า $Y_{p/s}$ และปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดในวันเดียวกันกับปริมาณกรดโคจิกสูงสุด คือ 0.32 กรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรัม และ 62.8 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ส่วนยีสต์สกัดให้ค่า $Y_{p/s}$ และปริมาณกลูโคซามีนสูงสุด ณ วันเพาะเลี้ยงที่กรดโคจิกสูงสุด คือ 0.34 กรัมต่อกรัม และ 68.3 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งทั้งค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่เมื่อพิจารณาค่ากำลังการผลิตพบว่ายีสต์สกัดให้ค่ากำลังการผลิตอยู่ที่ 5.53 กรัมต่อลิตรต่อวัน ในขณะที่ทริปโตนให้ค่ากำลังการผลิตอยู่ที่ 5.18 กรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งค่าที่ได้จากยีสต์สกัดสูงกว่าทริปโตนอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95ส่วนการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดและด่างอยู่ในช่วงประมาณ 4.0

แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อีกคู่ที่ให้รูปแบบการหมักกรดโคจิกคล้ายกัน คือ เปปโตนและเนื้อสกัดให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 7 ของการหมัก มีค่าความเข้มข้นกรดโคจิกอยู่ที่ 26.27 และ 26.07 กรัมต่อลิตร ค่าพารามิเตอร์ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของการหมักกรดโคจิกยังให้ค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 คือ Productivity อยู่ที่ 3.75 และ 3.72 กรัมต่อลิตรต่อวัน ส่วนค่า $Y_{p/s}$ 0.26 และ 0.27 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ ค่าพีเอชที่ช่วงต้นเมื่อทำการเพาะเลี้ยงมีค่าแตกต่างกัน กล่าวคือ เนื้อสกัดส่งผลให้ระดับของพีเอชลดลงช้ากว่าเปบโตนช่วงวันที่ 2 ถึงวันที่ 3 ที่ทำการทดลองหลังจาก วันที่ 3 ค่าพีเอชจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มีค่าไม่แตกต่างกัน ในทำนองเดียวกันกับความเข้มข้นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้เนื้อสกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์พบการลดลงของความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดช้ากว่าเปบโตนในช่วงแรก คือ วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากวันที่ 2 แล้ว ผลการเปลี่ยนแปลี่ยนค่าความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเหมือนกัน ส่วนค่าปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดในวันเดียวกับที่กรดโคจิกสูงสุด พบว่าเนื้อสกัดให้ปริมาณกลูโคซามีนสูงกว่าเปบโตนที่ระดับ 46.8 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ซึ่งมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเปบโตนที่ให้ปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดเพียง 38.1 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด (ตารางที่ 4.4)

ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ 2 ชนิดสุดท้าย คือ เคซีนไฮโดรไลเซตและน้ำแช่ข้าวโพด ไนโตรเจนอินทรีย์ทั้ง 2 แหล่ง ให้ปริมาณกรดโคจิกน้อยกว่าแหล่งไนโตรเจนที่กล่าวมาข้างต้น โดยเคซีนไฮโดรไลเซตให้ผลการผลิตสูงกว่าน้ำแช่ข้าวโพดที่ความเข้มข้นของกรดโคจิก 17.57 กรัมต่อลิตร ขณะที่น้ำแช่ข้าวโพดให้ผลน้อยที่สุดเพียง 4.90 กรัมต่อลิตร ยังผลให้ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ขึ้นกับปริมาณกรดโคจิกแตกต่างกันดังนี้ ค่ากำลังการผลิต 2.51 และ 0.73 กรัมต่อลิตรต่อวัน ในขณะที่ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์จากการใช้สับสเตรท 0.18 และ 0.09 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้แป้งของเชื้อเมื่อเลือกเคซีนเป็นแหล่งไนโตรเจนไม่แตกต่างจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น อย่างไรก็ตาม หากใช้น้ำแช่ข้าวโพดมีการใช้แป้งแตกต่างซึ่งตรงข้ามกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ใช้ศึกษา โดยการใช้น้ำแช่ข้าวโพดไม่สามารถส่งเสริมให้เชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062 ใช้แหล่งคาร์บอนจากแป้งมันสำปะหลังได้ เนื่องจากเมื่อวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากตัวอย่างที่เก็บ ณ วันสุดท้ายของการทดลอง วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้ 42.9 กรัมต่อลิตร ส่วนการลดลงหรือเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชช่วงวันที่ 2 ถึง 5 มีลักษณะคล้ายกัน แต่ลดลงต่ำกว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่น ซึ่งค่าการต่ำลงของพีเอชไม่ได้เกิดเนื่องจากกรดโคจิกเพียงอย่างเดียวแต่เกิดเนื่องจากกรดที่ถูกผลิตขึ้นจากเมทาบอลิซึมอื่นร่วมด้วย จึงทำให้ระดับพีเอชต่ำลงด้วย

จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมด ด้วยวิธี Kjeldahl พบว่าน้ำแช่ข้าวโพดซึ่งให้ผลการเจริญค่อนข้างต่ำ มีระดับไนโตรเจนทั้งหมดน้อยที่สุดเพียง 4.39 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นให้ผลไนโตรเจนทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 13.33 ถึง 13.80 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เปบโตนให้ปริมาณไนโตรเจนมากสุดที่ 14.82 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.5) ทั้งนี้ ปริมาณไนโตรเจนจากการทดลองชุดน้ำแช่ข้าวโพดน้อยเกินไปจนไม่เหมาะสมต่อการเจริญซึ่งพิจารณาจากค่าองค์ประกอบกลูโคซามีน ซึ่งให้ค่าต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารที่เติมแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ ทำนองเดียวกันองค์ประกอบที่เป็นกรดอะมิโนซึ่งสามารถแสดงได้จากค่าของไนโตรเจนทั้งหมด จึงมีจำนวนต่ำส่งผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนที่สำคัญ คือ เอนไซม์ โดยเฉพาะเอนไซม์อะไมเลสที่เกี่ยวข้องกับการสลายแป้งเป็นน้ำตาล

การใช้เคซีนไฮโดรไลเซตเป็นแหล่งไนโตรเจนแสดงแนวโน้มค่าพีเอชที่ต่ำคล้ายคลึงกับผลการทดลองของน้ำแช่ข้าวโพด แต่ให้ผลของกลูโคซามีนสูงกว่า เนื่องจากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงกว่าจึงส่งเสริมให้เชื้อเจริญได้สูงกว่า ดังนั้น เชื้อกลายพันธุ์มีการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ 2 ชนิดนี้ น้อยกว่าเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดอื่น

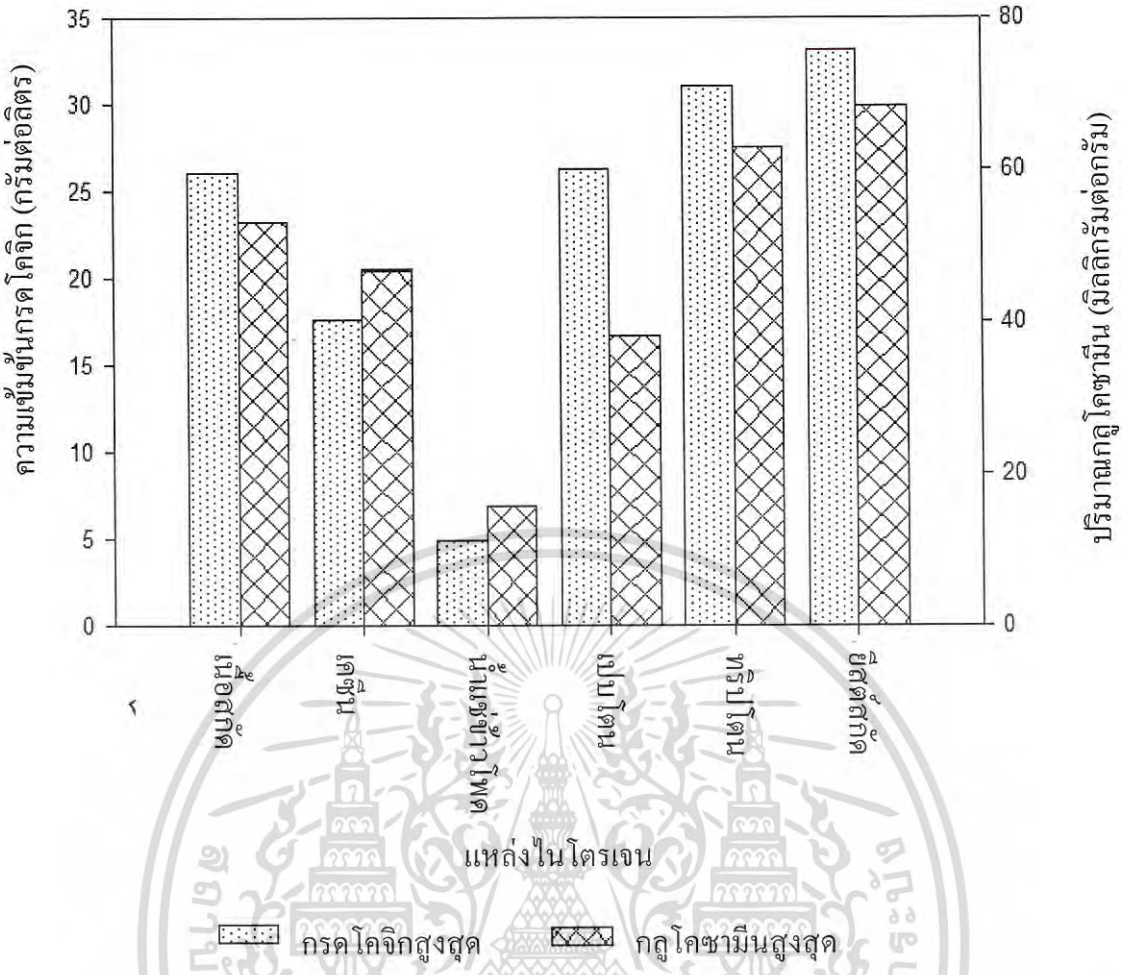
ส่วนแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ให้กรดโคจิกสูงสุด มี 2 ชนิด คือ ยีสต์สกัดและทริปโตน จากงานวิจัยของ Wan และคณะ (2005) พบว่ายีสต์สกัดและทริปโตนให้การผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus oryzae* M3B9 และน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ได้ค่าความเข้มข้นสูงและไม่แตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้น 5 10 หรือ 15 กรัมต่อลิตร แต่ค่ากรดที่ได้ต่ำกว่าน้ำแช่ข้าวโพดเล็กน้อยซึ่งให้ผลขัดแย้งกับการทดลองนี้ แต่งานวิจัยส่วนใหญ่ในรายงานรวบรวมงานวิจัยพบว่ายีสต์สกัดเหมาะต่อการผลิตโคจิก (Rosfarizan และคณะ, 2010) เช่น รายงานของ Rosfarizan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ Ariff (2000) ที่ใช้ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์กับแหล่งคาร์บอนจากกลูโคสให้ผลผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 39.90 กรัมต่อลิตร มากกว่าเปบโตนซึ่งได้ปริมาณกรดโคจิกรองลงมาที่ 36.40 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ คือ ยีสต์สกัดให้ผลการผลิตกรดโคจิกมากกว่าเปบโตนที่ 29.26 และ 26.27 ตามลำดับ เหตุส่งเสริมของยีสต์สกัดต่อการให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงเนื่องจากยีสต์สกัดเป็นแหล่งรวมของวิตามินบี (Zimbro และคณะ, 2009)

เนื่องด้วยวิตามินบีโดยเฉพาะบี 2 ที่เป็นองค์ประกอบของโคเอนไซม์ในชนิดเอนไซม์กลุ่มดีไฮโดรจีเนสมีความสำคัญในปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ซึ่งในงานของ Megella และคณะ (1987) ได้ศึกษาการใช้วิตามินบี 2 ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะทองแดง (II) สามารถกระตุ้นให้เชื้อสังเคราะห์กรดโคจิกเพิ่มขึ้นประมาณ 47 เปอร์เซ็นต์ ที่เป็นเช่นนี้เพราะกลไกลการสังเคราะห์กรดโคจิกต้องอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันจากเอนไซม์กลุ่มดีไฮโดรจีเนสซึ่งมีวิตามินบีเป็นโคแฟคเตอร์ในโมเลกุลของโปรตีน (Bajpai และคณะ, 1982b) จากผลการทดลองยีสต์สกัดและทริปโตนให้ผลการผลิตกรดไม่ต่างกันแต่เมื่อพิจารณาค่ากำลังการผลิตซึ่งยีสต์ให้ค่าที่สูงกว่า ราคาต่อหน่วยยีสต์สกัดมีราคาต่อหน่วยต่ำกว่าเหมาะที่จะพัฒนาในเชิงการค้า จึงเลือกยีสต์สกัดไปศึกษาผลร่วมของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 ความเข้มข้นของกรดโคจิก และ กลูโคซามีนสูงสุด จากการใช้แหล่งไนโตรเจนดังต่อไปนี้ เนื้อสกัด เคซีนไฮโดรไลเซต น้ำแช่ข้าวโพด เปบโตน ทริปโตน และยีสต์สกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ประสิทธิภาพการหมักกรดโคจิกในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดต่างๆ

แหล่งไนโตรเจน	**วันที่กรดโคจิกสูงสุด**	P_{max} (กรัมต่อลิตร)	Productivity (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	$Y_{p/s}$ (กรัมต่อกรัม)	กลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัม)
เนื้อสกัด	7	26.07^{b} ±0.85	3.72^{c} ±0.12	0.27^{b} ±0.01	53.2^{ab} ±7.0
เคซีนไฮโดรไลเซต	7	17.57^{c} ±0.53	2.51^{d} ±0.08	0.18^{c} ±0.01	46.8^{ab} ±9.0
น้ำแช่ข้าวโพด	7	4.90^{d} ±0.55	0.73^{e} ±0.08	0.09^{d} ±0.01	15.7^{c} ±10.5
เปปโตน	7	26.27^{b} ±2.17	3.75^{c} ±0.31	0.26^{b} ±0.02	38.1^{b} ±5.8
ทริปโตน	6	31.08^{a} ±1.22	5.18^{b} ±0.20	0.32^{a} ±0.02	62.8^{a} ±16.9
ยีสต์สกัด	6	33.16^{a} ±1.44	5.53^{a} ±0.24	0.34^{a} ±0.00	68.3^{a} ±18.0

หมายเหตุ ตัวอักษร a b c d และ e ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ทางสถิติจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4.5 เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดต่างๆ

แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์	เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมด
เนื้อสกัด	13.80^{b} ±0.24
เคซีนไฮโดรไลเซต	13.70^{b} ±0.01
น้ำแช่ข้าวโพด	4.39^{c} ±0.10
เปบโตน	14.82^{a} ±0.20
ทริปโตน	13.33^{b} ±0.23
ยีสต์สกัด	13.53^{b} ±0.48

หมายเหตุ ตัวอักษร a b และ c ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ทางสถิติจากการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และไนโตรเจนอนินทรีย์ร่วมกันเพื่อการผลิตกรดโคจิก

จากผลการทดลองแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนในหัวข้อ 4.2.2 พบว่ายีสต์สกัดมีความเหมาะสมที่นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อกลายพันธุ์เพื่อสร้างกรดโคจิก อย่างไรก็ตาม ราคาต่อหน่วยของยีสต์สกัดค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ อีกทั้งมีความแปรปรวนขององค์ประกอบในสารอาหารแต่ละครั้งที่ผลิต จึงมีความสนใจศึกษาการใช้ยีสต์สกัดผสมร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ 3 ชนิด ประกอบด้วย โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต ในอัตราส่วน 3 กรัม ต่อ 2 กรัม 2.5 กรัม ต่อ 2.5 กรัม และ 2 กรัม ต่อ 3 กรัม ทั้งสิ้น 9 ชุดการทดลอง โดยใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

เมื่อพิจารณาผลการทดลองซึ่งแสดงในรูปที่ 4.19 ถึง 4.21 พบว่า ผลการผสมยีสต์สกัดด้วยสารโซเดียมไนเตรททุกอัตราส่วน ให้รูปแบบการผลิตกรดโคจิกคล้ายคลึงกัน เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยยีสต์สกัดอย่างเดียว พบว่าการสร้างกรดโคจิกเริ่มเกิดขึ้นช้ากว่า สังเกตได้จากการทดลองเมื่อใช้ยีสต์สกัดเพียงอย่างเดียวเพาะเลี้ยงไปเวลา 2 วัน สามารถวัดปริมาณกรดโคจิกได้ 1.91 กรัมต่อลิตร ขณะที่เมื่อเติมโซเดียมไนเตรทในทุกๆ อัตราส่วนที่ทำการทดลอง คือ 3:2 2.5:2.5 และ 2:3 ตรวจสอบปริมาณกรดโคจิกได้ เท่ากับ 0.24 0.18 และ 0.20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณกรดสูงสุดให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 3 อัตราส่วนประกอบด้วย 3:2 2.5:2.5 หรือ 2:3 ซึ่งได้ความเข้มข้น 32.50 33.46 และ 31.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6) ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ อีกทั้งยังใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอย่างเดียว ระดับช่วงพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงคล้ายคลึงกัน โดยอัตราส่วน 3:2 อยู่ในช่วง 4.9 ถึง 6.2 (รูปที่ 4.19) ส่วนอัตราส่วน 2.5:2.5 มีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 5.2 ถึง 6.1 (รูปที่ 4.20) ในขณะที่อัตราส่วน 2:3 ค่าพีเอชตั้งแต่ 5.2 ถึง 6.0 (รูปที่ 4.21) ค่าความเป็นกรดด่างของการใช้ยีสต์สกัดกับโซเดียมไนเตรทในอัตราส่วนที่กล่าวไว้ช่วงต้น ทำให้ค่าพีเอชสูงกว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนการใช้แป้ง เมื่อพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด พบว่าไม่แตกต่างกันในทุกอัตราส่วนของยีสต์และโซเดียมไนเตรท อีกทั้งการลดลงของปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

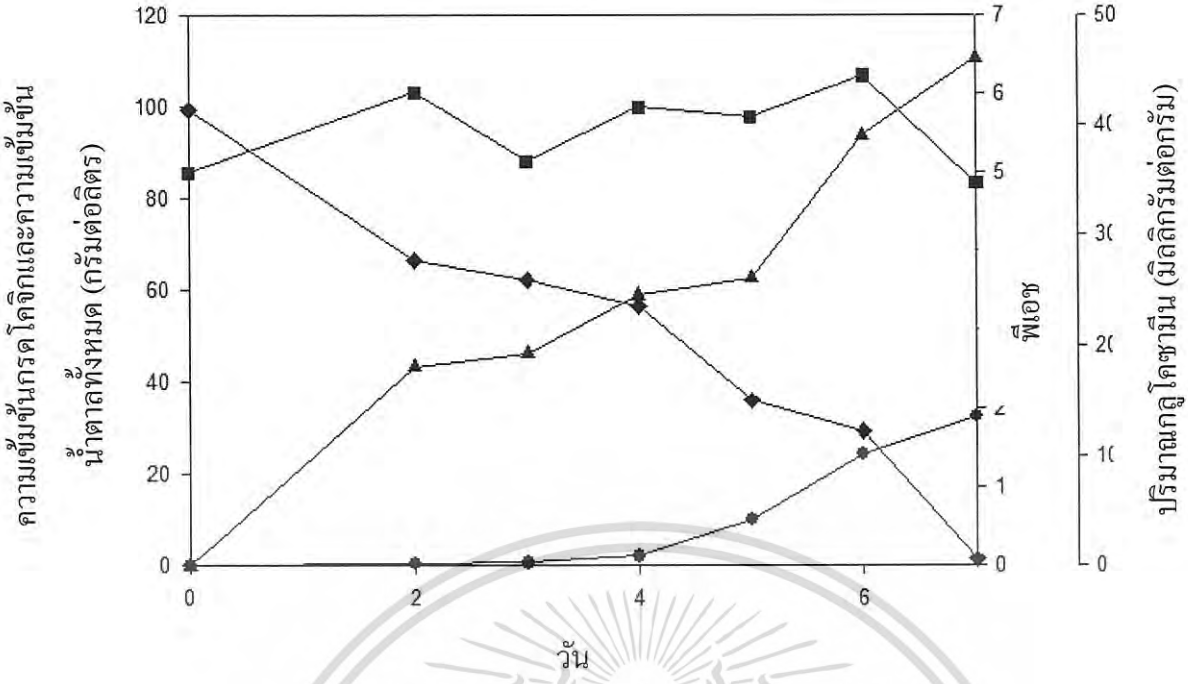
น้ำตาลทั้งหมดยังไม่ถูกกระทบจากแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เติมเข้าไป ส่วนค่าความเข้มข้นกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นตามเวลาการเพาะเลี้ยงที่เพิ่ม โดยมีอัตราส่วน 2 กรัม ต่อ 3 กรัม ให้ปริมาณกลูโคซามีนสูงสุดขณะที่กรดโคจิกสร้างมากที่สุด เท่ากับ 50.6 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่นๆ ได้แก่ 3:2 และ 2.5:2.5 มีความเข้มข้นอยู่ที่ 46.1 และ 42.2 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ตามลำดับ โดยแสดงค่าในตารางที่ 4.6

แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดที่ 2 ซึ่งเลือกใช้ทำการศึกษา พบว่าเมื่อสัดส่วนการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเพิ่มขึ้น ค่าปริมาณกรดโคจิกสูงสุดมีแนวโน้มลดลง โดยที่อัตราส่วน 3 กรัม ต่อ 2 กรัม ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 20.49 กรัมต่อลิตร อีก 2 อัตราส่วน คือ 2.5:2.5 และ 2:3 ให้ผลค่าความเข้มข้นกรดโคจิกที่ 17.62 และ 15.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ตารางที่ 4.6) ส่วนค่าพีเอชมีขอบเขตการเปลี่ยนแปลงลดลงตามอัตราส่วนการใช้แอมโมเนียมไนเตรทที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน มีช่วงพีเอชที่วัดได้จากอาหารซึ่งมีอัตราส่วนยีสต์สกัดต่อแอมโมเนียมไนเตรทเป็น 3:2 2.5:2.5 และ 2:3 เป็น 3.5 ถึง 4.5 3.5 ถึง 4.2 และ 3.3 ถึง 4.0 ตามลำดับ สังเกตว่าช่วงของค่าพีเอชเข้าไปอยู่ในช่วงที่เป็นกรดมาก เมื่อเทียบกับการเติมโซเดียมไนเตรท (รูปที่ 4.22 ถึง รูปที่ 4.24)

ในขณะที่ผลปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง แต่อัตราการใช้แป้งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมโซเดียมไนเตรททุกอัตราส่วน ซึ่งเชื้อสามารถใช้แป้งเกือบหมดจากอาหารที่ประกอบไปด้วยยีสต์สกัดกับแอมโมเนียมไนเตรท ในอัตราส่วน 3:2 2.5:2.5 และ 2:3 เหลือค่าความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเพียง 0.8 0.9 และ 1.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่ปริมาณกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันแรกจนวันสุดท้ายของการเลี้ยง เมื่อระดับการใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นยีสต์สกัด 3 กรัม ต่อแอมโมเนียมไนเตรท 2 กรัม ให้ค่ากลูโคซามีนสูงสุดวัดได้ 46.1 ในวันที่กรดโคจิกเพิ่มมากที่สุด และไม่ต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากอัตราส่วนยีสต์สกัด 2.5 กรัม ต่อแอมโมเนียมไนเตรท 2.5 กรัม และอัตราส่วน 2 กรัม ต่อ 3 กรัม ให้ผลการทดลองที่ 42.2 และ 50.6 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ตามลำดับ

สุดท้าย คือ การผสมยีสต์สกัดด้วยไนโตรเจนอนินทรีย์แอมโมเนียมซัลเฟตที่อัตราส่วนสามชุดเดียวกัน (3:2 2.5:2.5 และ 2:3) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปในอาหาร มีผลทำให้การผลิตกรดโคจิกของเชื้อน้อยมาก โดยมีค่าสูงสุดเพียง

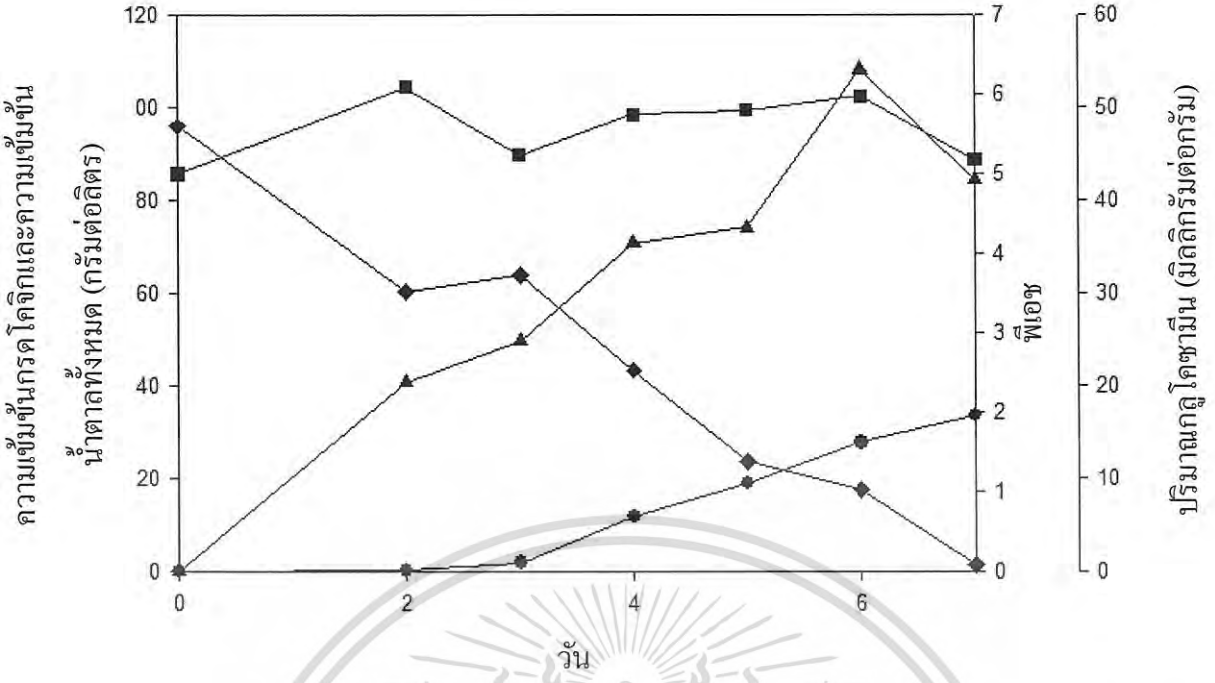
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.19 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดต่อโซเดียมไนเตรท 3 กรัม ต่อ 2 กรัม เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

0.37 0.23 และ 0.16 กรัมต่อลิตร จากอัตราส่วน 3:2 2.5:2.5 และ 2:3 ตามลำดับ ซึ่งไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในทุกสัดส่วนที่ใช้ ส่วนระดับของพีเอชที่วัดได้ในอาหารซึ่งเติมยีสต์สกัดร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นอัตราส่วน 3:2 2.5:2.5 และ 2:3 เป็นแหล่งไนโตรเจน มีค่าลดลงต่ำมากอยู่ในช่วง 1.8 ถึง 2.2 1.8 ถึง 2.0 และ 2.0 ถึง 2.3 ภายใน 7 วันของการเพาะเลี้ยง ส่วนการใช้แป้งพบว่าเชื้อสามารถใช้แป้งได้เพียงเล็กน้อย จากผลแสดงให้เห็นว่ายังพบปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่างน้ำหมักความเข้มข้นมากในทุกอัตราส่วน โดยวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำหมักมีปริมาณเท่ากับ 63.1 65.6 และ81.6 จากอัตราส่วน 3:2 2.5:2.5 และ2:3 ตามลำดับ

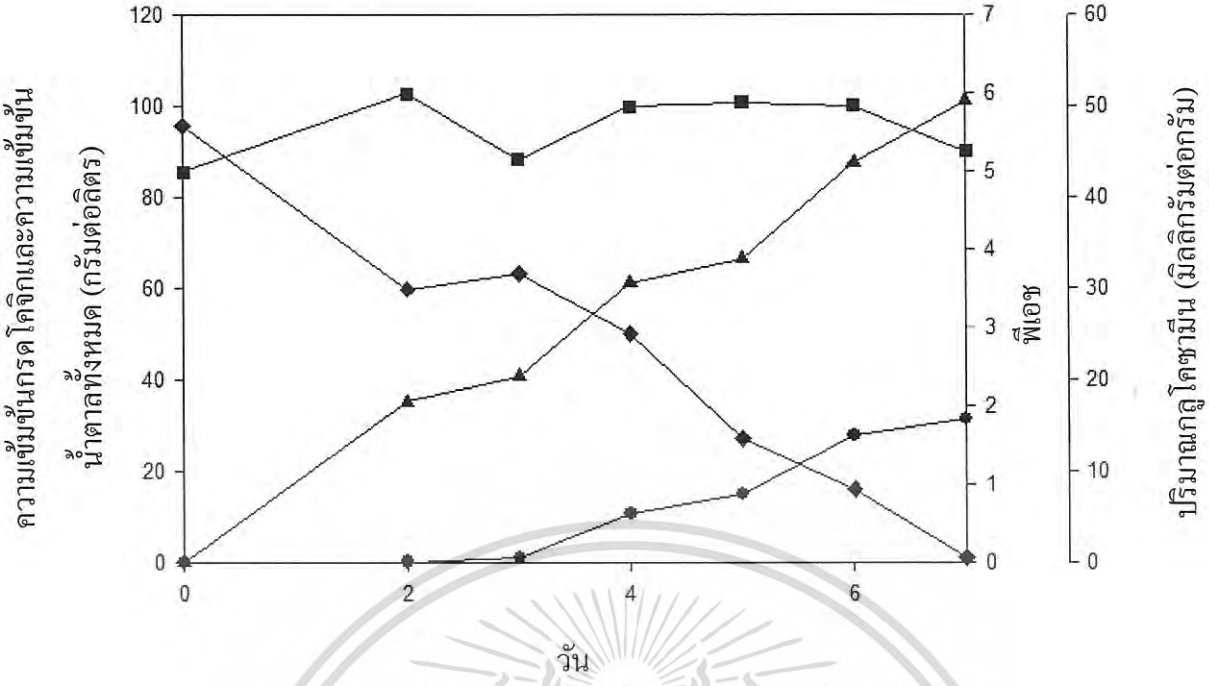
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.20 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดต่อโซเดียมไนเตรท 2.5 กรัม ต่อ 2.5 กรัม เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

ในแต่ละอัตราส่วนระหว่างยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นกลูโคซามีนมีค่าน้อยเมื่อใช้แอมโมโมเนียมซัลเฟตที่อัตราส่วนยีสต์สกัด 2.5 กรัม ต่อแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัม เท่ากับ 17.1 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ในขณะที่อัตราส่วนที่เหลือให้ผลสูงกว่าอัตราส่วน 2.5:2.5 อย่างมีนัยสำคัญ ที่อัตราส่วน 3:2 มีค่ากลูโคซามีนเท่ากับ 28.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ส่วนอัตราส่วน 2:3 ให้ความเข้มข้นที่ 35.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด

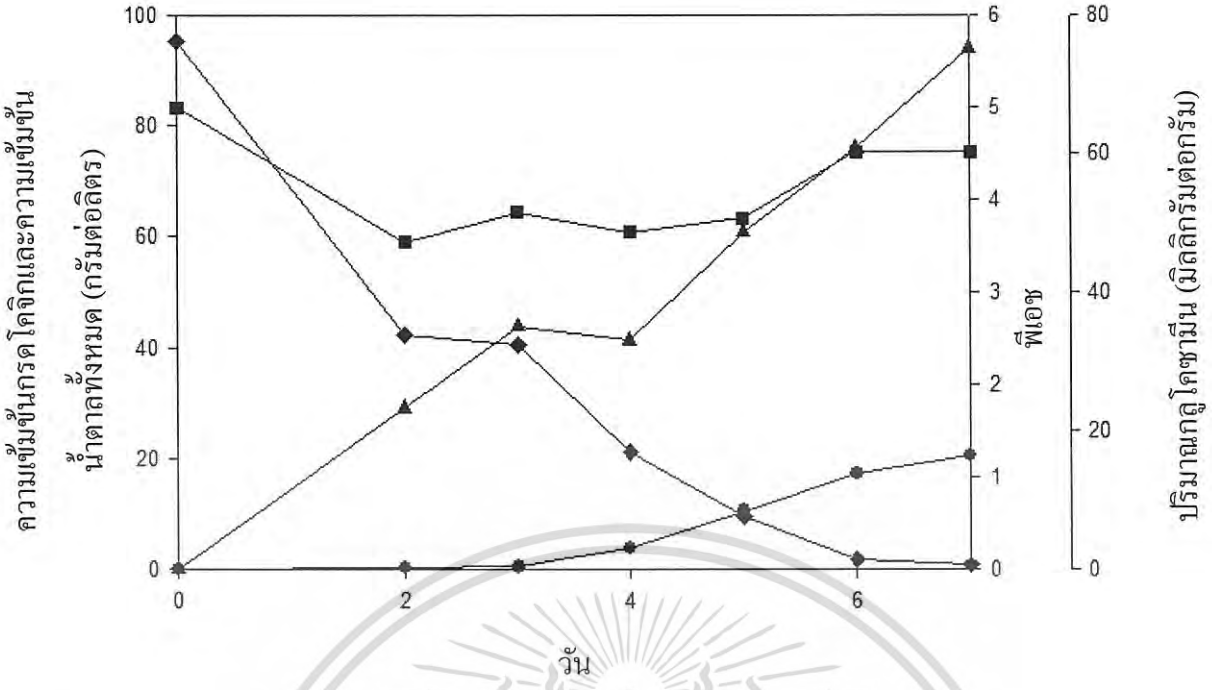
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.21 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดต่อโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัม เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

แต่เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตมีผลทำให้การเพิ่มขึ้นของกลูโคซามีนเร็วกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น ในช่วงต้นของการเพาะเลี้ยง มีค่าปริมาณกลูโคมีนในวันที่ 2 ของอัตราส่วนที่ 3:2 2.5:2.5 และ 2:3 วัดได้ 31.6 29.4 และ 30.6 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ตามลำดับ แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ส่วนใหญ่ให้ผลเชิงลบหรือผลผลิตกรดโคจิกต่ำ ถ้าเติมลงไปในอาหารเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว

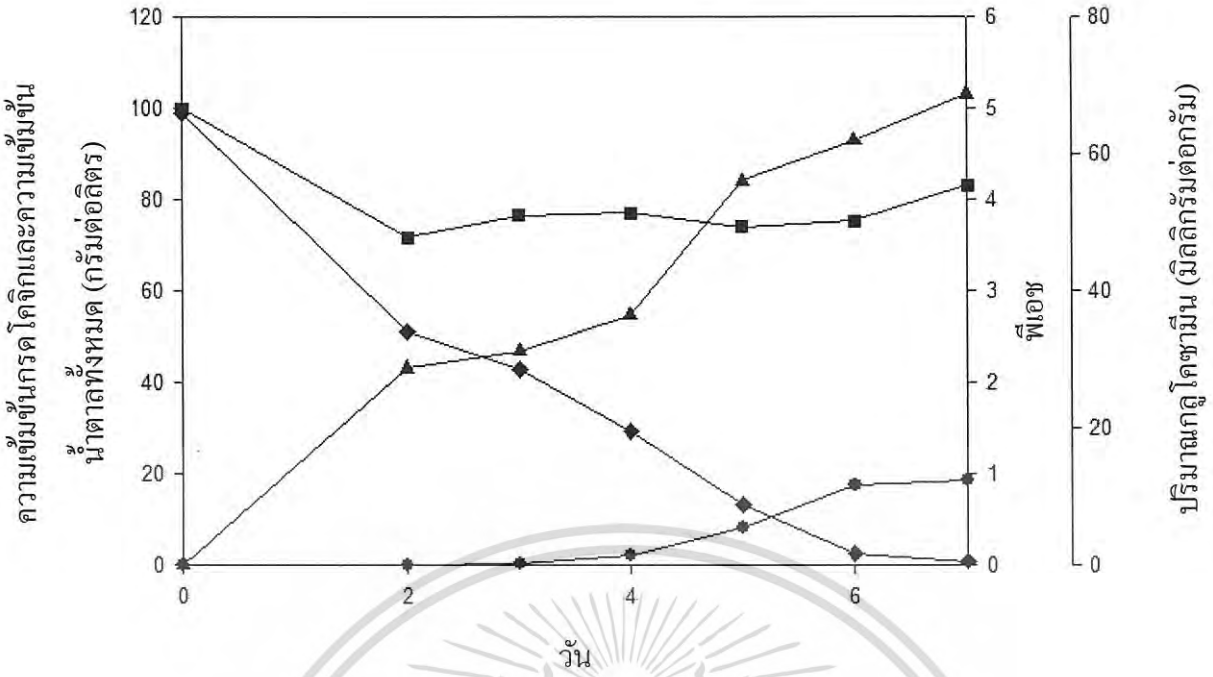
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.22 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดต่อแอมโมเนียมไนเตรท 3 กรัม ต่อ 2 กรัมเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

เห็นได้จากการศึกษาของ Rosfarzan และ Ariff (2000) ทดลองเติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ซึ่งประกอบด้วย แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรท ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร และใช้กลูโคสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ได้กรดโคจิกความเข้มข้นสูงสุด เมื่อใช้แอมโมเนียมคลอไรด์วัดได้ 0.012 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์สูงสุด 2.90 กรัมต่อลิตร ค่ากำลังการผลิต 0.000024 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แอมโมเนียมซัลเฟตวัดปริมาณกรดโคจิกได้ 0.05 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์มีค่าสูงสุดอยู่ที่ 4.20 กรัมต่อลิตร และค่ากำลังการผลิตที่ 0.000099 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนแอมโมเนียมไนเตรทให้ค่ากรดโคจิกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

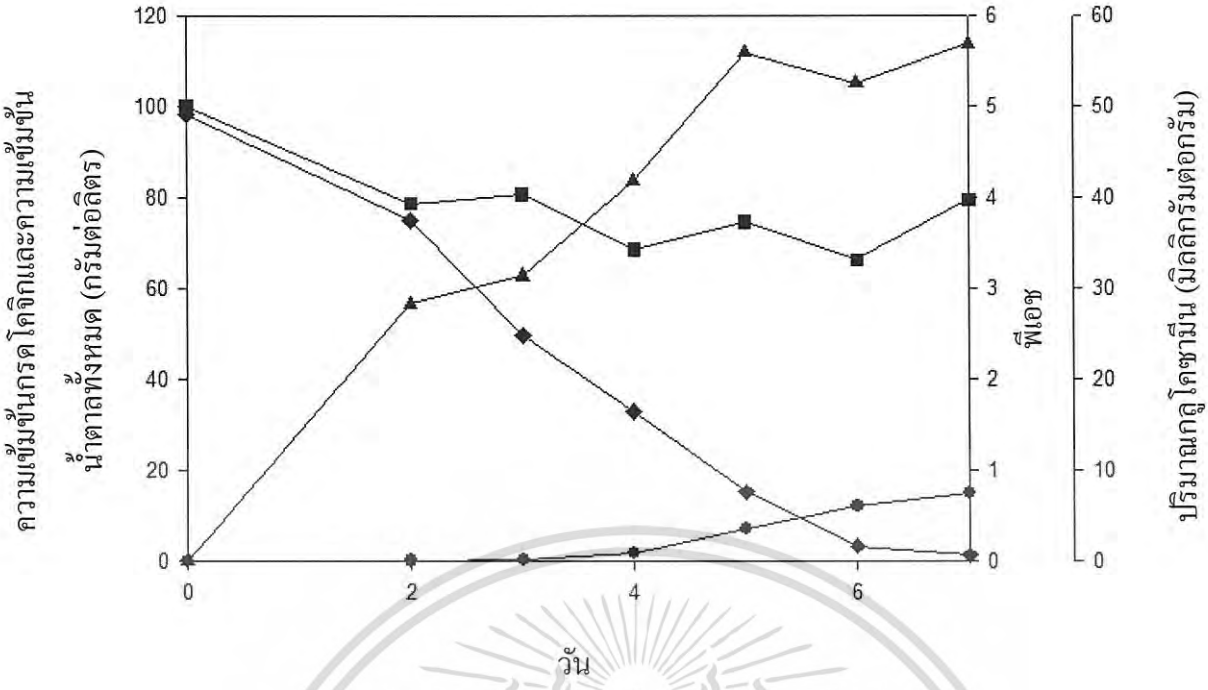


รูปที่ 4.23 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือส่วนยีสต์สกัดต่อแอมโมเนียมไนเตรท 2.5 กรัม ต่อ 2.5 กรัมเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่กล่าวไปแล้ว มีความเข้มข้นเท่ากับ 12.00 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์สูงสุด 8.00 กรัมต่อลิตร ในขณะที่กำลังการผลิตมีค่าเท่ากับ 0.024 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ส่วน El-Aziz (2013) ได้ทดลองเติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่น เมื่อใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์วัดความเข้มข้นของกรดโคจิกได้ 16.37 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์สูงสุด 12.75 กรัมต่อลิตร ค่ากำลังการผลิต 0.076 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แอมโมเนียมคลอไรด์ปริมาณกรดโคจิกได้ 15.43 กรัมต่อลิตร น้ำหนักของเซลล์มีค่าสูงสุดอยู่ที่ 3.95 กรัมต่อลิตร และค่ากำลังการผลิตที่ 0.007 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนแอมโมเนียมซัลเฟตให้ค่ากรดโคจิกต่ำที่สุดเมื่อ

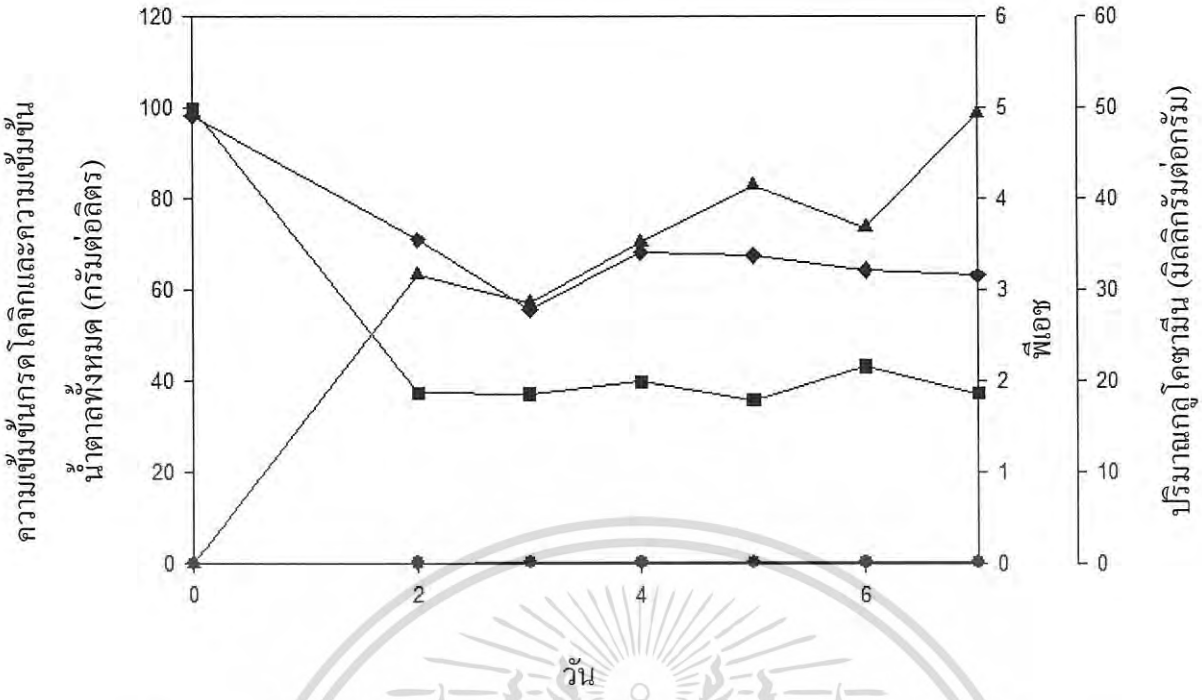
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.24 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดแอมโมเนียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัมเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

เทียบกับแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่กล่าวไปแล้ว มีความเข้มข้นจากการวัดปริมาณกรดโคจิกได้ 2.63 กรัมต่อลิตร ส่วนค่าน้ำหนักเซลล์สูงสุดมีค่า 6.85 กรัมต่อลิตร ในขณะที่กำลังการผลิตมีค่าเท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

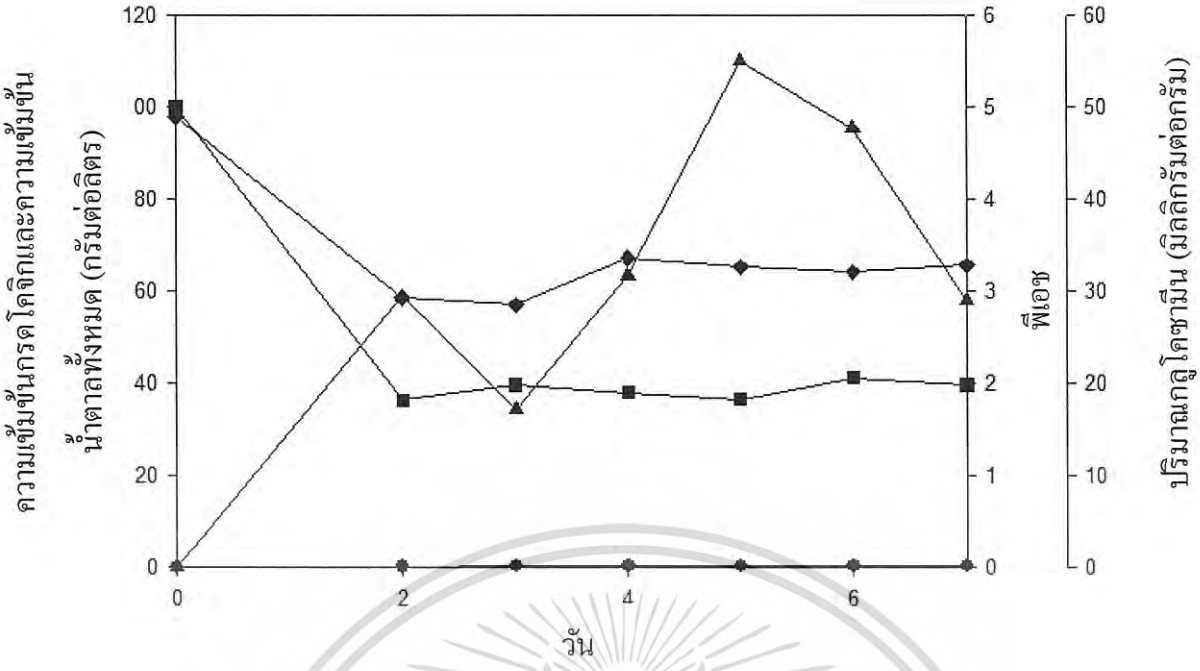
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.25 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัม ต่อ 2 กรัมเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

ขณะที่ อภิชญา (2548) ใช้ไนโตรเจนอนินทรีย์ 4 ชนิด ได้แก่ โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยมีแหล่งคาร์บอน คือ แป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ได้ความเข้มข้นของโคจิกสูงสุด 4.75 0.10 3.90 และ 0.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยสังเกตจากผลการวัดค่าระดับพีเอชเมื่อใช้ไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีแอมโมเนียมโมเนียมไอออนเป็นองค์ประกอบจะให้ระดับพีเอชที่ต่ำกว่า

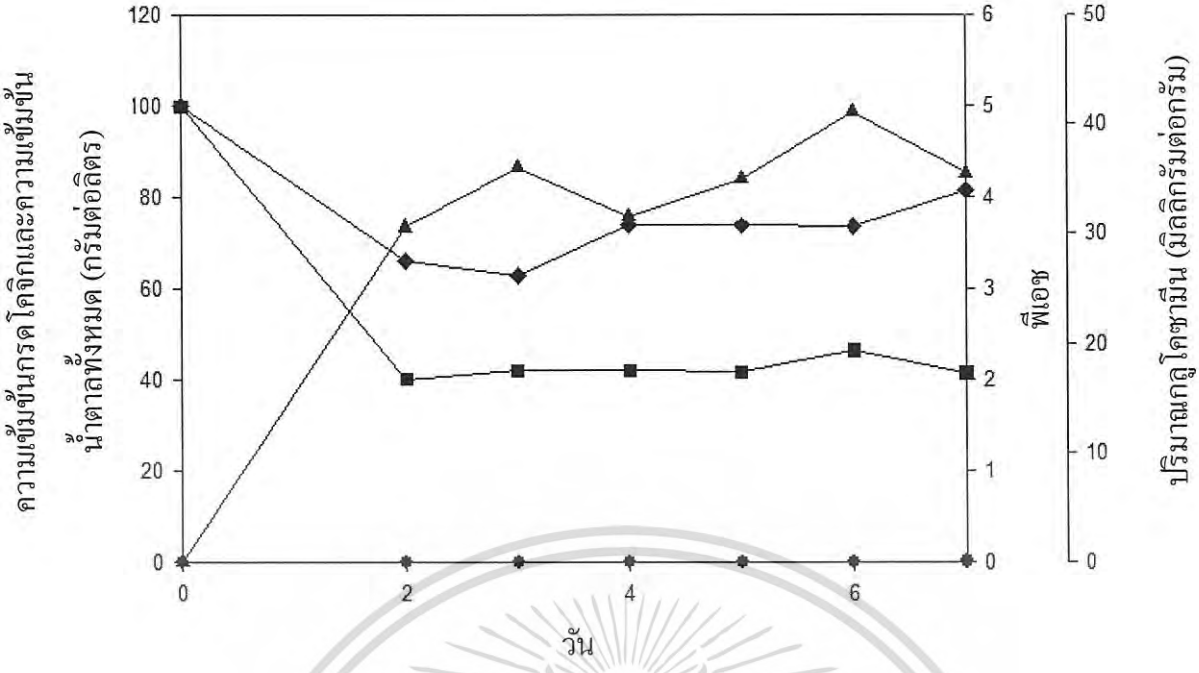
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.26 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดแอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัม ต่อ 2.5 กรัมเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วันวัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

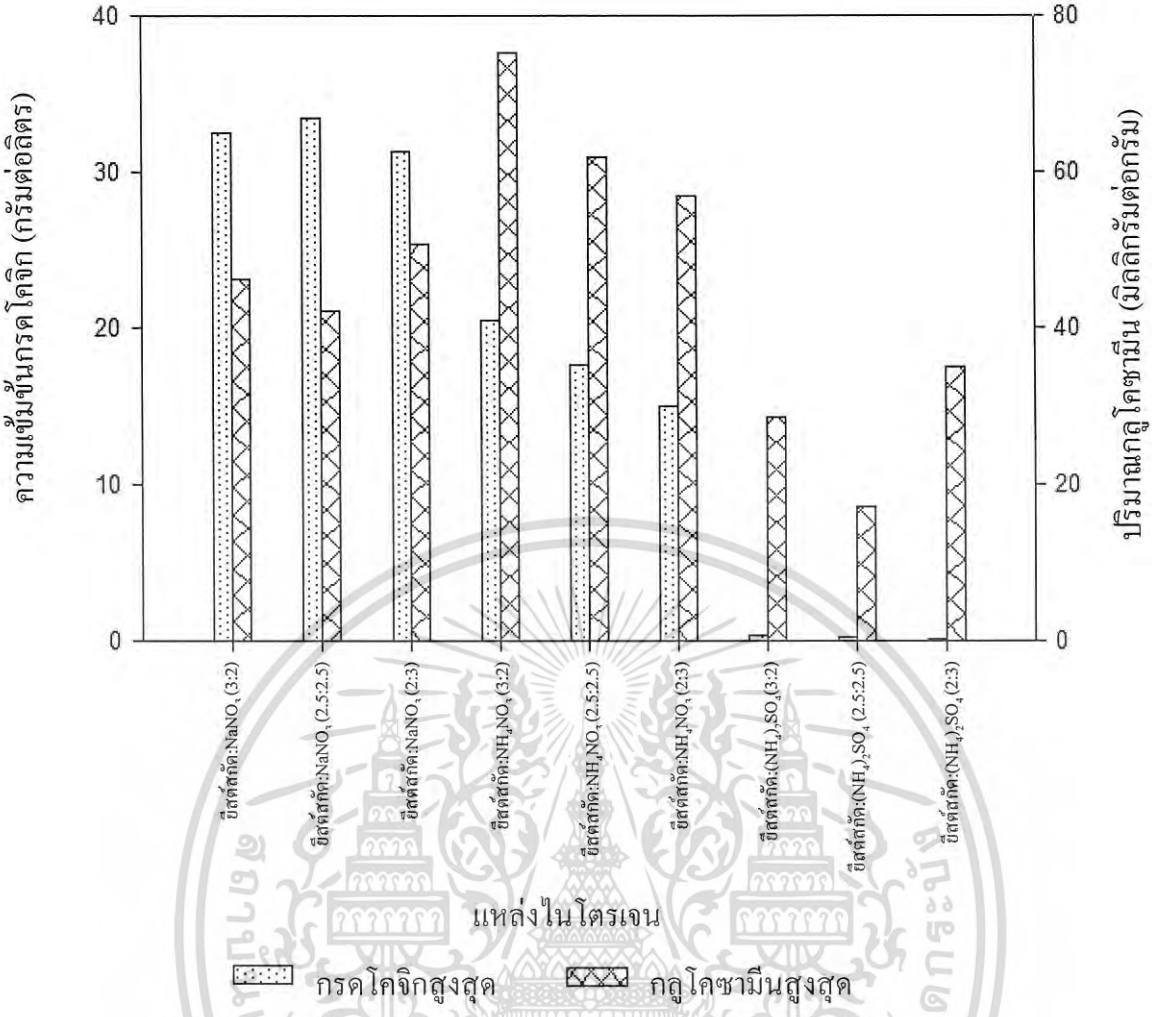
จากการศึกษาของ อภิชญา (2548) และ El-Aziz (2013) จะเห็นว่าแหล่ง ไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีไนเตรทไอออนอยู่ในโมเลกุลมักทำให้เชื้อผลิตกรดโคจิกความเข้มข้นสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีแอมโมเนียมไอออน อีกทั้งระดับพีเอชยังสูงกว่าไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีแอมโมเนียมเป็นองค์ประกอบ เพราะแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่มีแอมโมเนียมเป็นองค์ประกอบวัดค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากราเมื่อใช้แอมโมเนียมไอออนจะมีการปลดปล่อยโปรตอนออกมา ทำให้ระดับพีเอชลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้สภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคจิก ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เป็นพวกไนเตรทไอออนจึงเหมาะสมนำมาใช้ผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. N-2062 (Daecon, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.27 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัม ต่อ 3 กรัมเขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน(● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.28 ความเข้มข้นของกรดโคจิก และ กลูโคซามีน จากการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกับ โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นอัตราส่วน 3:2 2.5:2.5 และ 2:3 โดยน้ำหนัก (กรัมต่อกรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ประสิทธิภาพการหมักกรดโคจิกในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นยีสต์สกัดร่วมกับโซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต ในอัตราส่วน 3:2 2.5:2.5 และ 2:3 โดยน้ำหนัก (กรัมต่อกรัม)

แหล่งไนโตรเจน (กรัมต่อกรัม)	วันที่ผลิตกรดโคจิกสูงสุด	P_{max} (กรัมต่อลิตร)	Productivity (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	$Y_{p/s}$ (กรัมต่อกรัม)	กลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัม)
โซเดียมไนเตรท					
3:2	7	32.50^{a} ±1.50	4.64^{a} ±0.21	0.33^{a} ±0.02	46.1^{cd} ±1.5
2.5:2.5	7	33.46^{a} ±0.79	4.78^{a} ±0.11	0.35^{a} ±0.00	42.2^{d} ±4.0
2:3	7	31.32^{a} ±0.93	4.47^{a} ±0.12	0.33^{a} ±0.02	50.6^{c} ± 4.3
แอมโมเนียมไนเตรท					
3:2	7	20.49^{b} ±4.48	2.93^{b} ±0.64	0.23^{b} ±0.06	75.2^{ab} ± 0.0
2.5:2.5.	6	17.62^{c} ±0.37	2.94^{b} ±0.06	0.18^{c} ±0.01	61.9^{b} ± 7.1
2:3.	7	15.03^{c} ±0.68	2.15^{c} ±0.10	0.16^{c} ±0.01	56.9^{b} ± 1.3
แอมโมเนียมซัลเฟต					
3:2	3	0.37^{d} ±0.15	0.12^{d} ±0.05	0.009^{d} ±0.002	28.6^{f} ±3.5
2.5:2.5	3	0.23^{d} ±0.03	0.08^{d} ±0.01	0.005^{d} ±0.001	17.1^{g} ±3.8
2:3	5	0.16^{d} ±0.00	0.03^{d} ±0.00	0.006^{d} ±0.001	35.0^{e} ±1.1

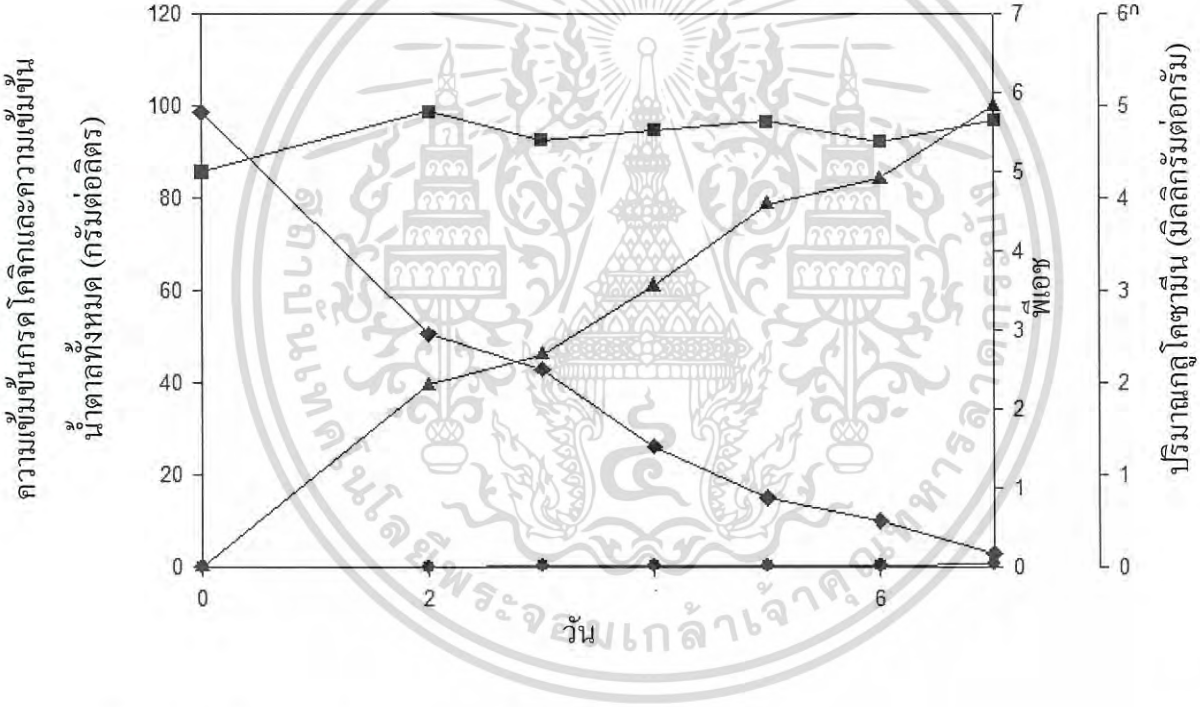
หมายเหตุ ตัวอักษร a b c d e f และ g ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ทางสถิติจากการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

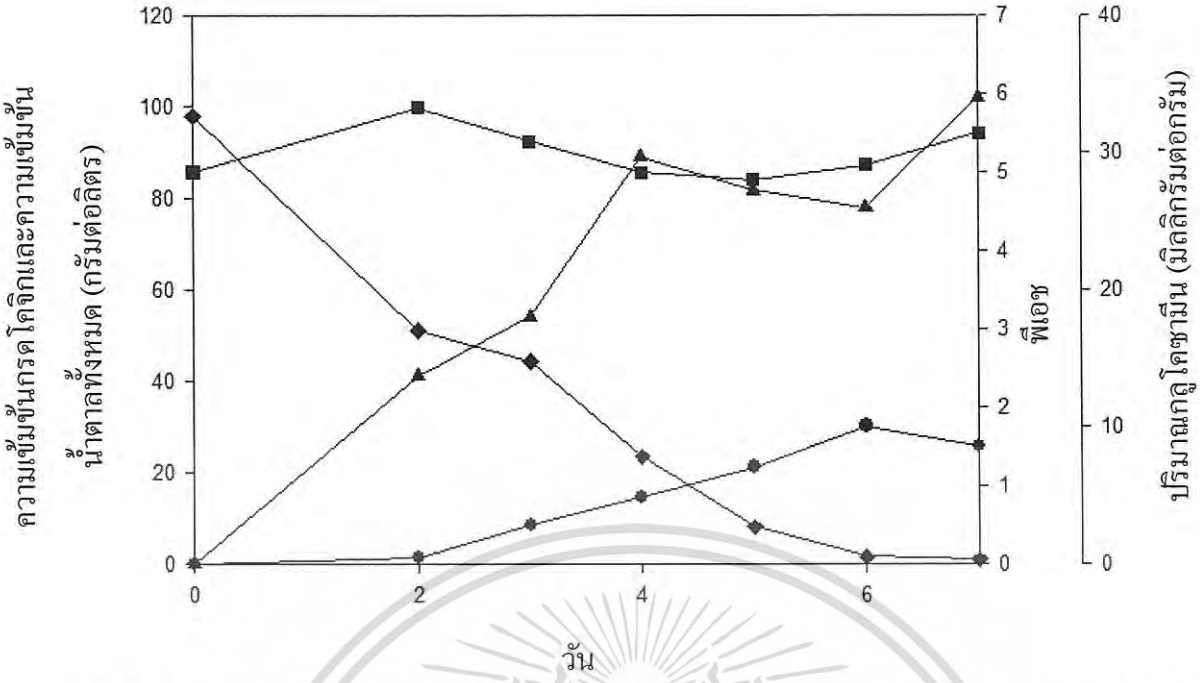
4.2.4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพเชื้อสายพันธุ์กลาย N-2062 และสายพันธุ์เดิม BR-1 ด้วยสูตรอาหารที่เหมาะสม

เมื่อได้สูตรอาหารที่เหมาะสมซึ่งประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตร (หัวข้อ 4.2.1) ยีสต์สกัด (หัวข้อ 4.2.2) 2 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 3 กรัมต่อลิตร (หัวข้อ 4.2.3) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นที่ 5.0 เลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงเชื้อ 2 สายพันธุ์ประกอบด้วย สายพันธุ์ BR-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ N-2062 ซึ่งได้จากการวิจัยในหัวข้อ 4.1.1-หัวข้อ 4.1.4



รูปที่ 4.29 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ BR-1 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัดต่อโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัม เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

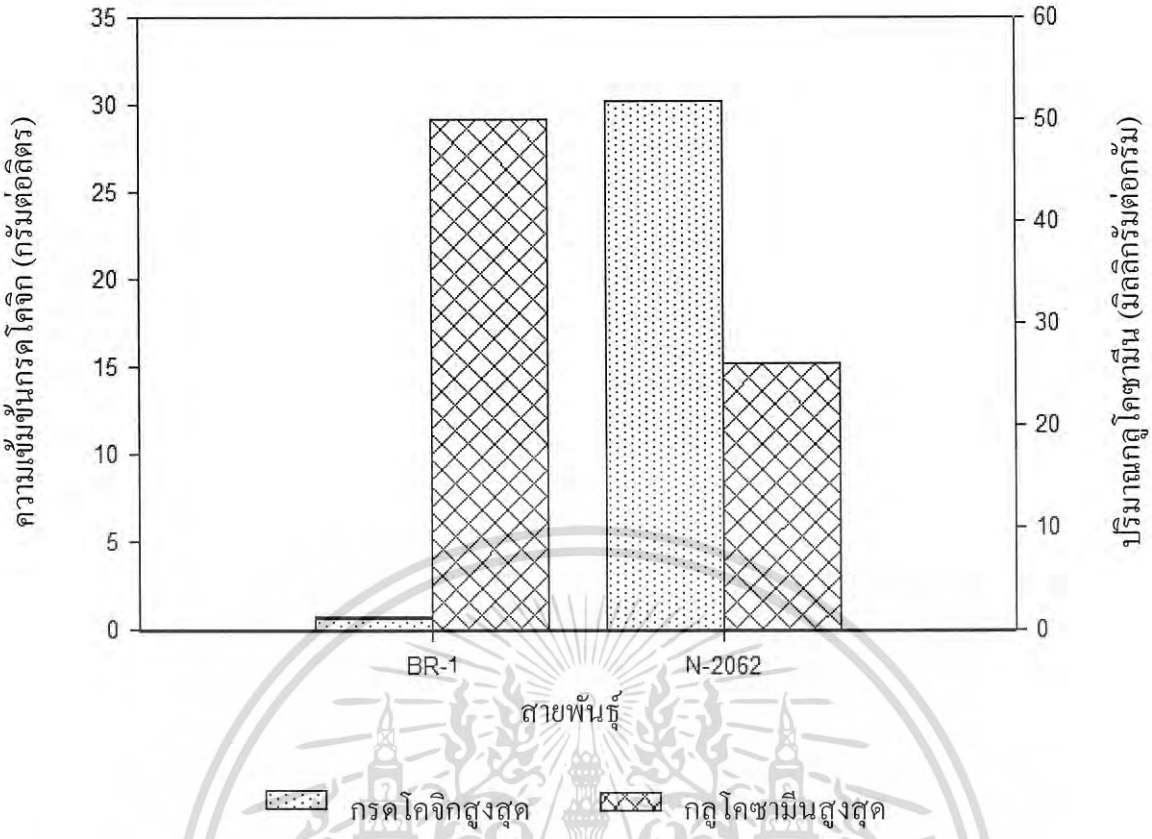
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.30 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ซึ่งใช้แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัดโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัม เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (● ความเข้มข้นกรดโคจิก ■ ค่าความเป็นกรดด่าง ◆ ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมด ▲ ความเข้มข้นกลูโคซามีน)

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช และลักษณะการใช้แป้งของเชื้อกลายพันธุ์และสายพันธุ์ BR-1 (รูปที่ 4.29 และรูปที่ 4.30) พบว่ามีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงคล้ายคลึงกัน เพียงแต่สายพันธุ์กลาย N-2062 มีการใช้แป้งได้เร็วกว่าเล็กน้อย สังเกตได้จากความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดของเชื้อสายพันธุ์ N-2062 ที่ลดลงต่ำกว่า 10.0 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 5 วัน ขณะที่เชื้อสายพันธุ์ BR-1 ใช้เวลาถึง 7 วัน ส่วนการเปลี่ยนแปลงพีเอชมีค่าประมาณ 5.5 ตลอดการเพาะเลี้ยง แต่เมื่อพิจารณาปริมาณกลูโคซามีนของสายพันธุ์ N-2062 และ BR-1 จะวัดได้ตั้งแต่วันแรกที่ทำการเก็บตัวอย่างมีค่าเท่า 19.8 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด และ 13.8 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด จนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงได้ค่ากลูโคซามีน 50.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด และ 34.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์นำมาสกัด ตามลำดับ จากค่าที่วัดได้ ณ วันที่ 7 บ่งชี้ว่าสายพันธุ์ BR-1 มีการเจริญที่สูงกว่าสาย พันธุ์ N-2062

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.31 ความเข้มข้นกรดโคจิก และกลูโคซามีนสูงสุด จากการผลิตของเชื้อ *Apergillus* sp. สายพันธุ์ดั้งเดิม BR-1 และ สายพันธุ์กลาย N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ความเข้มข้นแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือส่วนผสมระหว่างยีสต์สกัดและโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัม เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 4.7 ประสิทธิภาพการหมักกรดโคจิกเปรียบเทียบระหว่างเชื้อสายพันธุ์ BR-1 และ N-2062

สายพันธุ์	วันที่โคจิกสูงสุด	P_{max} (กรัมต่อลิตร)	Productivity (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	$Y_{p/s}$ (กรัมต่อกรัม)	กลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัม)
BR-1	7	0.68^{b} ±0.20	0.10^{b} ±0.03	0.01^{b} ±0.00	50.0^{a} ±3.9
N-2062	6	30.18^{a} ±3.32	5.03^{a} ±0.55	0.32^{a} ±0.06	26.0^{b} ±1.3

หมายเหตุ ตัวอักษร a และ b ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ทางสถิติจากการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากข้อมูลข้างต้นชี้ให้เห็นความสอดคล้องในอัตราการใช้แป้งซึ่งวิเคราะห์จากค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดและอัตราการเจริญซึ่งวัดได้จากค่าปริมาณกลูโคซามีน

จากข้อมูลในตารางที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่าการที่เชื้อสายพันธุ์กลายผลิตกรดโคจิกสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมพบว่าไม่ได้ขึ้นกับปริมาณเซลล์ เนื่องจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเซลล์ของสายพันธุ์ดั้งเดิมมีปริมาณกลูโคซามีนสูงกว่า คือ 50.0 มิลลิกรัมต่อกรัมของเซลล์ที่นำมาสกัด ขณะที่เชื้อสายพันธุ์กลายวัดได้ 34.0 มิลลิกรัมต่อกรัมของเซลล์ที่นำมาสกัด ดังนั้นเมื่อเชื้อใช้แหล่งคาร์บอนไปสร้างองค์ประกอบของเซลล์ลดลง เชื้อจึงมีแหล่งคาร์บอนที่มากขึ้นจึงสามารถใช้แหล่งคาร์บอนดังกล่าวเปลี่ยนเป็นกรดโคจิกได้

อีกทั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดโคจิกซึ่งอยู่บริเวณเส้นใยสามารถทำงานซ้ำได้ จึงไม่จำเป็นต้องสร้างเซลล์ในปริมาณมาก เพียงแต่มีปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม (Rosfarizan และคณะ, 2010) เพราะกระบวนการกลายพันธุ์อาจส่งผลต่อภาพรวมของการหมักกรดโคจิกไม่ว่าจะทางตรงหรืออ้อม ทางตรง คือ ยีนที่มีส่วนในวิถีการสังเคราะห์สามารถแสดงออกได้มากขึ้น ส่วนทางอ้อม คือ ยีนที่เปลี่ยนอาจเปลี่ยนยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแป้ง เมื่อแป้งถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่มีประสิทธิภาพที่สูงขึ้นจึงเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลได้มากขึ้น เชื้อจึงใช้น้ำตาลกลูโคสผลิตเป็นกรดโคจิกได้สูง แสดงให้เห็นว่ากระบวนการทำกลายพันธุ์สามารถพัฒนาและปรับปรุงศักยภาพของเชื้อให้สูงขึ้นสอดคล้องกับงานของ Lotfy และคณะ (2006) ได้คัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายจาก *Aspergillus niger* UMIP 2564.04 ซึ่งผลิตกรดซิตริกสูงขึ้น จากการนำสปอร์มาฉายด้วยรังสียูวีเวลา 18 นาที จากนั้นทำกลายพันธุ์ด้วยสารอีเอ็มเอส (ethyl methane sulfonate, EMS) และ อะคริดีนออเรนจ์ (acridine orange, AO) ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้เชื้อพันธุ์กลาย *Aspergillus niger* W5 ซึ่งผลิตกรดมากกว่าเดิม 3.2 เท่า โดยที่มวลเซลล์ที่ได้จากการหมักมีปริมาณต่ำที่สุด

ในการศึกษาของฐิติมา (2543) ได้ปรับปรุงพันธุ์เชื้อราให้สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงขึ้นโดยใช้เทคนิคการหลอมรวมโพรโตพลาสต์ของเชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ได้เชื้อลูกผสม 3 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตกรดโคจิกจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งได้ เชื้อลูกผสมนี้สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 4.72 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ด้วยอาหารที่มี แป้งข้าวโพด 80 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

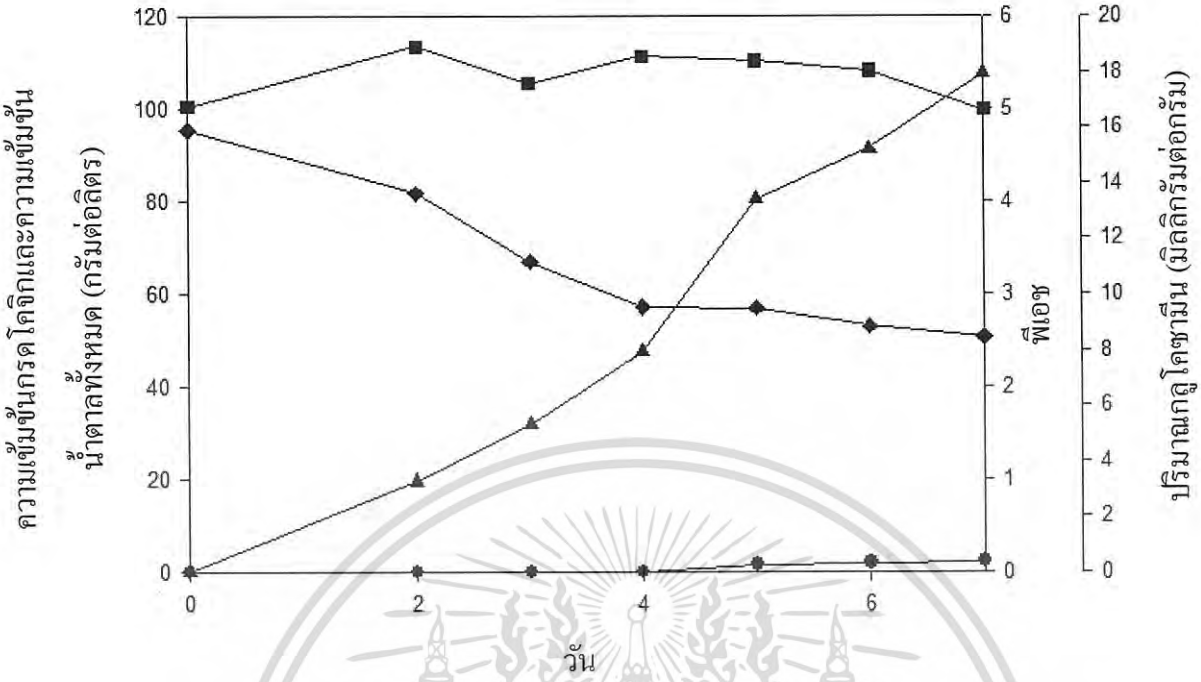
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 6.0

และเมื่อสังเกตผลการทำลองซึ่งแสดงในรูปที่ 4.31 พบว่า แม้ว่าปริมาณกลูโคซามีนของเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมจะสูงกว่าสายพันธุ์กลายอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีปริมาณกลูโคซามีนในสายพันธุ์ดั้งเดิม เท่ากับ 50.0 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด ในขณะที่สายพันธุ์ N-2062 มีค่าความเข้มข้นกลูโคซามีนเพียง 26 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ที่นำมาสกัด แต่เชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมสามารถสร้างกรดโคจิกมีปริมาณสูงสุดเพียง 0.68 กรัมต่อลิตร ตรงกันข้ามกับเชื้อสายพันธุ์กลาย N-2062 ที่สร้างกรดโคจิกได้สูงถึง 30.18 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.7) จากผลการทดลองนี้อธิบายได้ว่าการที่เชื้อให้ผลผลิตของกรดโคจิกที่สูงขึ้นไม่ขึ้นกับปริมาณเซลล์

4.3 การศึกษาความเร็วรอบใบพัดและอัตราการให้อากาศในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เมื่อนำเชื้อกลายสายพันธุ์ N-2062 มาศึกษาความเป็นได้ต่อการขยายกำลังการผลิตกรดโคจิกในอาหารสูตรที่ดีที่สุดในระดับฟลาสก์ ซึ่งประกอบไปด้วย แป้งมันสำปะหลังร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ยีสต์สกัด 2 กรัม โซเดียมไนเตรท 3 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัม ตามลำดับ โดยศึกษาสภาวะความเร็วรอบของใบพัด 200 400 และ 600 รอบต่อนาที ซึ่งทุกการทดลองการเพาะเลี้ยงในถังหมักด้วยความเร็วรอบของใบพัด 3 อัตราเร็ว มีการศึกษาอัตราการให้อากาศที่ 1.5 และ 2.0 vvm รวมทั้งสิ้น 6 ชุดการทดลอง พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062 สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดที่ความเร็วรอบของใบพัด 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm รองลงมาคือ 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2.0 vvm ส่วนสภาวะอื่นๆ ให้ค่ากรดโคจิกค่อนข้างต่ำ จากผลการทดลอง ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดที่ได้ในแต่ละสภาวะ คือ ณ สภาวะที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที เท่ากับ 2.29 กรัมต่อลิตร และอัตราการให้อากาศที่ระดับการกวนเดียวกันมีค่าความเข้มข้นเป็น 2.39 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรต่อปริมาตร มีค่ากรดโคจิกวัดได้ 19.01 กรัมต่อลิตร และที่อัตราการให้อากาศที่รอบการกวนเดียวกัน มีค่าปริมาณกรดโคจิกเป็น 2.45 กรัมต่อลิตร สุดท้ายคือที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที มีค่าเท่ากับ 9.11 กรัมต่อลิตร และสุดท้ายที่อัตราการให้อากาศ 2.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที

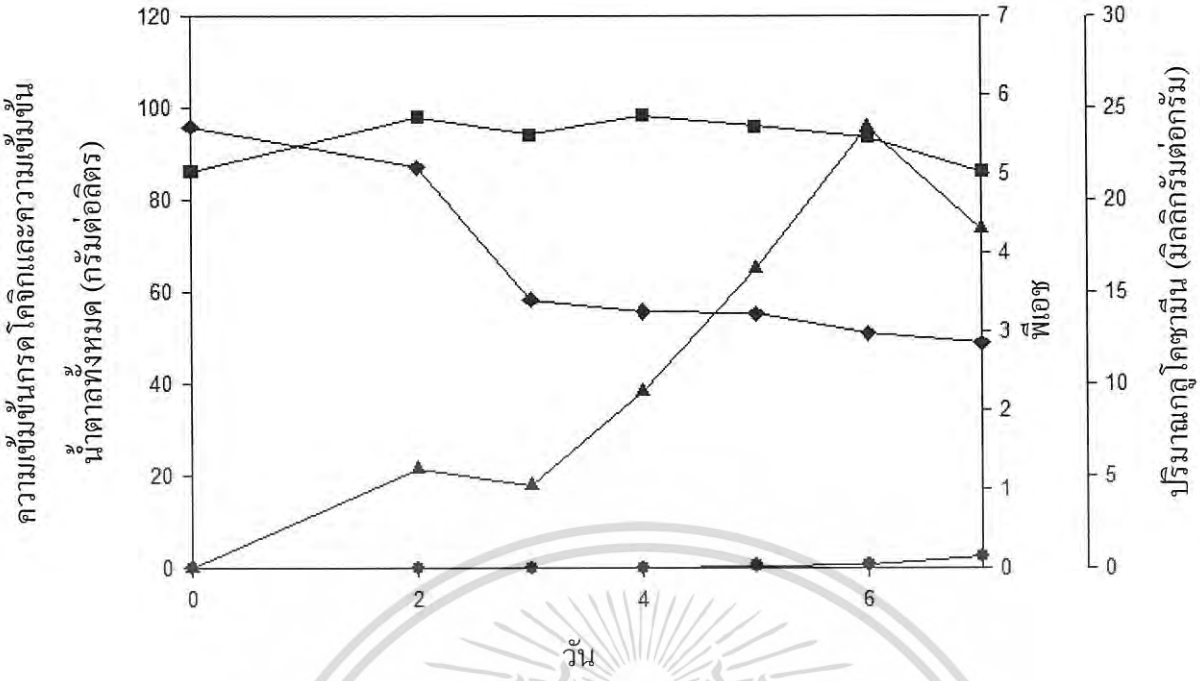
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.32 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดต่อโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัมต่อลิตรของอาหาร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีความเร็วรอบใบพัด 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

ที่อัตราการกวนสุดท้ายนี้ ณ อัตราการให้อากาศ 2.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ให้ค่าความเข้มข้นกรดโคจิกอยู่ที่ 15.39 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.8) จากผลการทดลองที่กล่าวไปข้างต้นไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดโคจิกและสภาวะที่ทดลอง คือ อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ เพราะถ้ามีปริมาณอากาศเพิ่มสูงขึ้นความเข้มข้นกรดโคจิกน่าจะมีการผลิตเพิ่มสูงขึ้น (Ariff และคณะ, 1996) แต่ที่ไม่พบแนวโน้มที่ชัดเจนเนื่องจากถังหมักที่ใช้มีใบพัดแบบกังหัน หรือ turbine ซึ่งไม่สามารถกวนผสมน้ำหมักได้มีประสิทธิภาพพอ อีกทั้งเชื้อราเมื่อเจริญไม่แสดงลักษณะของเพลเลตแต่ให้ลักษณะเป็นเส้นใยส่งผลให้น้ำหมักมีลักษณะหนืดซึ่งลักษณะหนืดที่เกิดขึ้นยังส่งผล

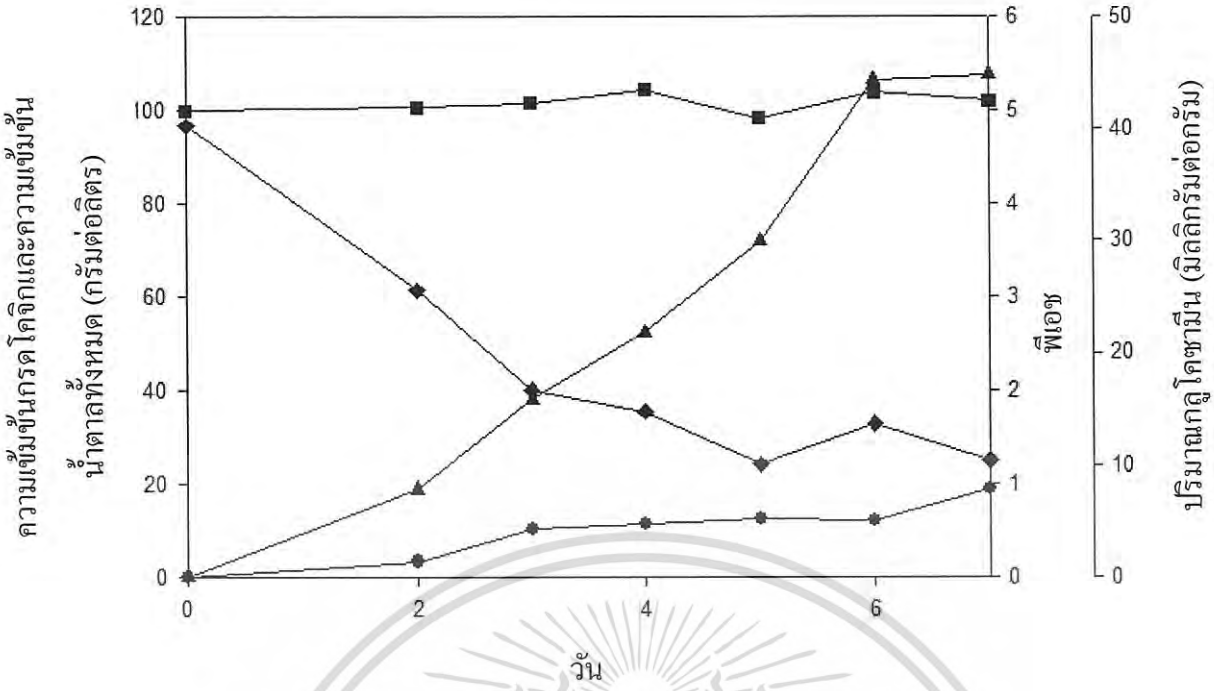
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.33 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch แป้งความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดต่อโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัมต่อลิตรของอาหาร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีความเร็วรอบใบพัด 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2.0 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

มาจากปริมาณแป้งที่ใช้ซึ่งมีระดับที่สูง นอกจากนี้ขณะที่ใบพัดกำลังกวนและเชื้อมีการเจริญเติบโต ปริมาตรของน้ำหมักพบว่าลดลง ทำให้ใบพัดส่วนบนอยู่เหนือผิวอาหารเล็กน้อย ส่งผลให้ใบพัดตีผิวส่วนบนของอาหารทำให้เชื้อส่วนใหญ่ติดอยู่ที่ผนังของถังหมัก ส่งผลให้สภาวะในถังหมักไม่สม่ำเสมอ เมื่อสุ่มเก็บตัวอย่างจึงให้ค่ากรดโคจิกที่วัดได้ไม่พบแนวโน้มจากสภาวะที่ทำการทดลอง

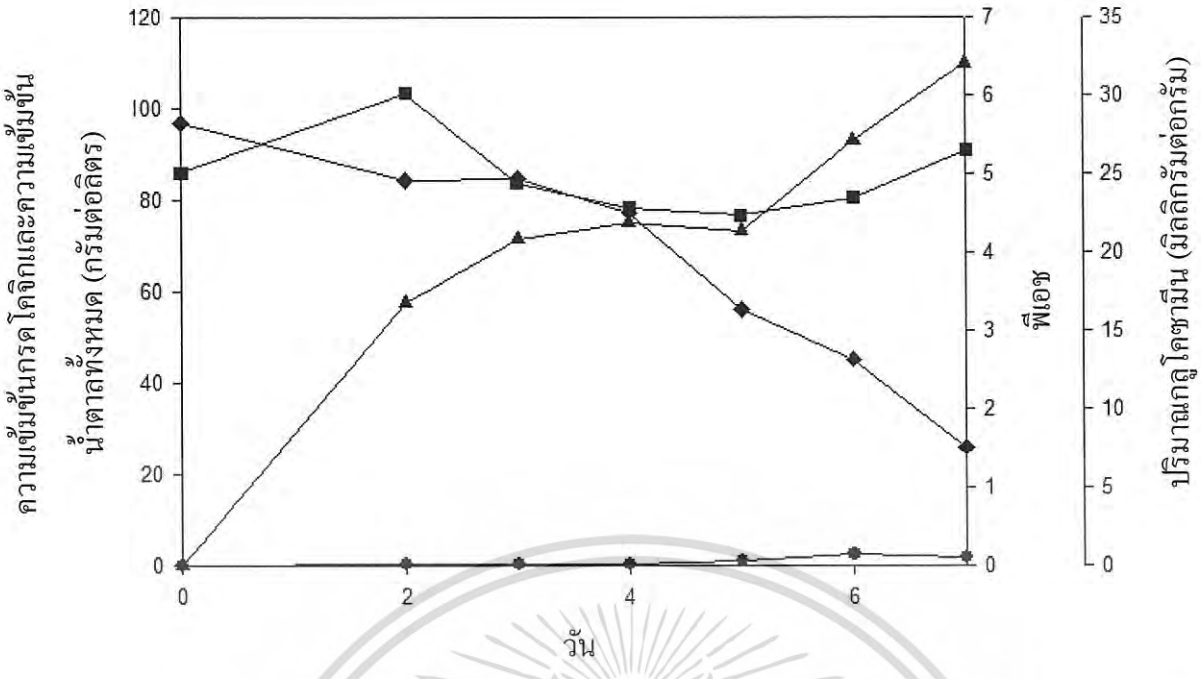
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.34 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ*Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch แป้งความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัมต่อลิตรของอาหาร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีความเร็วรอบใบพัด 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

เมื่อพิจารณางานวิจัยของ Kamaroddin (2007) ซึ่งใช้แป้งเช่นเดียวกันกับงานวิจัยนี้แต่สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อให้ผลิตกรดโคจิกได้ เนื่องจากใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* แบบมีการเติมอาหารระหว่างการเพาะเลี้ยง (fed-batch) ในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 1.5 ลิตร โดยสูตรอาหารประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 30 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัม ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 3.0 สามารถผลิตกรดโคจิกได้ 0.96 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง มีค่ากิจกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

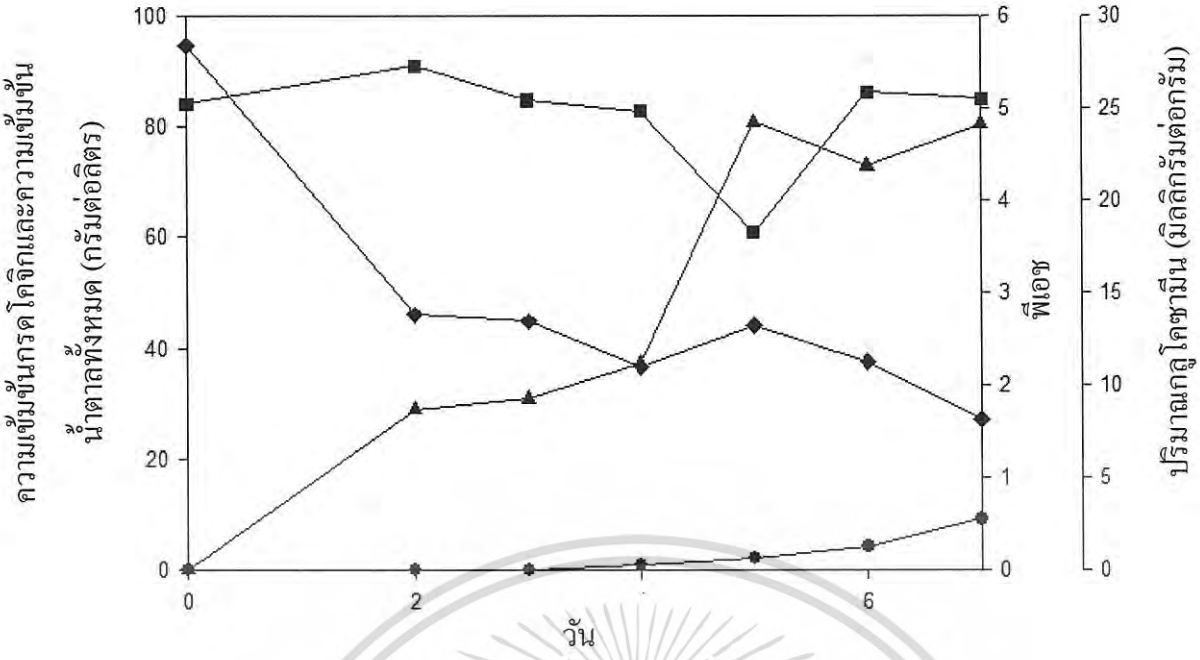


รูปที่ 4.35 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัมต่อลิตรของอาหาร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีความเร็วรอบใบพัด 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2.0 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

ของเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสเท่ากับ 1.77 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในช่วงของการเพาะเลี้ยงแบบครั้งเดี้ยวเสร็จ จากนั้นจะมีการเติมแป้งมันสำปะหลังพบว่าความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ได้ปริมาณกรดโคจิกสูงที่สุดเท่ากับ 2.77 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักควรแก้ปัญหาเรื่องความหนืด และเลือกชนิดของใบพัด ส่วนของความหนืดแนวทางการแก้ปัญหาอาจใช้เทคนิดการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีการเติมสับสเตรทเป็นช่วงๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงจึงเป็นการลดความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น ส่งผลให้ความหนืดของอาหารลดลง ผลคืออากาศสามารถละลายลงในน้ำหมักได้มากขึ้นจึง

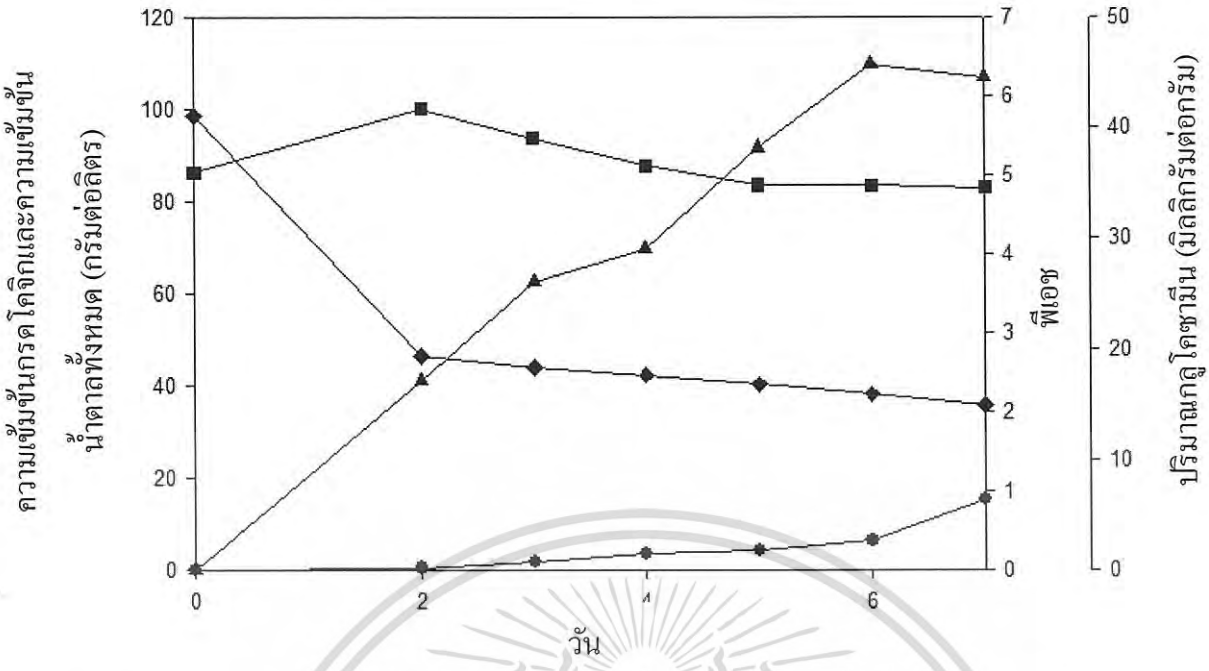
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.36 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch แป้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัมต่อลิตรของอาหาร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีความเร็วรอบใบพัด 600รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

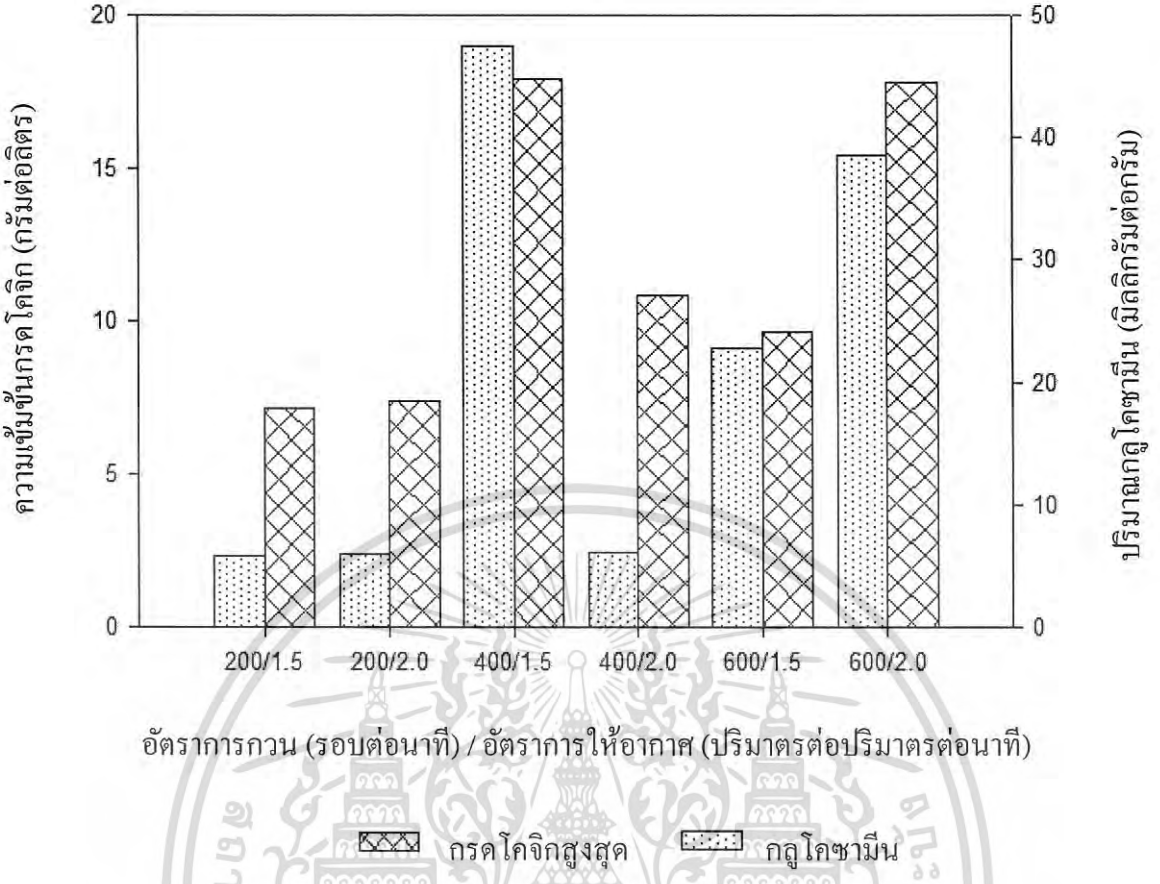
ทำให้ค่าปริมาณการละลายของออกซิเจนที่ละลายได้มีปริมาณสูงขึ้นตาม ในกรณีของแป้งการเตรียมแป้งก่อนการหมักอาจใช้เอนไซม์ย่อยแป้งบางส่วนก่อน เพื่อทำให้ความหนืดของ แป้งลดลง อีกทั้งยังได้น้ำตาลส่วนหนึ่งหลังจากการย่อยสำหรับให้เชื้อใช้เจริญในช่วงต้นของการเจริญ ส่วนแนวทางอื่นๆ อาจทดลองใช้ใบพัดที่มีความสามารถในการกวนผสมสูง มีรูปแบบของใบกวนที่ให้ลักษณะการไหลของน้ำหมักที่ส่งเสริมให้อากาศสามารถละลายในสภาวะที่อาหารมีความหนืดค่อนข้างสูงได้ หรือ อาจประยุกต์ใช้เทคนิคหลายๆ เทคนิคร่วมกัน เพื่อส่งเสริมและลดข้อบกพร่องจากลักษณะของการหมักด้วยอาหารที่มีส่วนผสมของแป้งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.37 ความเข้มข้นของกรดโคจิก พีเอช น้ำตาลทั้งหมด และกลูโคซามีนของเชื้อ*Aspergillus* sp. สายพันธุ์ N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch แป้งความเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดโซเดียมไนเตรท 2 กรัม ต่อ 3 กรัมต่อลิตรของอาหาร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีความเร็วรอบใบพัด 600รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2.0 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.38 ความเข้มข้นกรดโคจิก และกลูโคซามีนสูงสุด และ ของเชื้อ *Aspergillus* sp. สายพันธุ์กลาย N-2062 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Starch ความเข้มข้นแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แหล่งไนโตรเจน คือ ยีสต์สกัด 2 กรัม โซเดียมไนเตรท 3 กรัม ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีความเร็วรอบใบพัด 200 ถึง 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 ถึง 2.0 vvm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ประสิทธิภาพการหมักกรดโคจิกเปรียบเทียบระหว่างอัตราการกวนและให้อากาศที่ 200/1.5 200/2.0 400/1.5 400/2.0 600/1.5 และ 600/2.0 รอบต่อนาทีและปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)/อัตราการให้อากาศ(ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที)	วันที่กรดโคจิกสูงสุด	P_{max} (กรัมต่อลิตร)	Productivity (กรัมต่อลิตรต่อวัน)	$Y_{p/s}$ (กรัมต่อกรัม)	กลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัม)
200 / 1.5	7	2.29^{d} ±0.02	0.33^{e} ±0.00	0.05^{d} ±0.00	17.9^{d} ±0.5
200 / 2.0	7	2.39^{d} ±0.06	0.34^{e} ±0.01	0.05^{d} ±0.00	18.4^{d} ±0.2
400 / 1.5	7	19.01^{a} ±0.28	2.72^{a} ±0.04	0.26^{a} ±0.00	44.8^{a} ±0.4
400 / 2.0	6	2.45^{d} ±0.04	0.41^{d} ±0.01	0.05^{d} ±0.00	27.1^{b} ±0.1
600 / 1.5	7	9.11^{c} ±0.22	1.30^{c} ±0.03	0.14^{c} ±0.01	24.2^{c} ±0.2
600 / 2.0	7	15.39^{b} ±0.09	2.20^{b} ±0.01	0.24^{b} ±0.00	44.5^{a} ±0.1

หมายเหตุ ตัวอักษร a b c d และ e ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ทางสถิติจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 1.77 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในช่วงของการเพาะเลี้ยงแบบครั้งเดี้ยวเสร็จ จากนั้นจะมีการเติมแป้งมันสำปะหลังพบว่าความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ได้ปริมาณกรดโคจิกสูงที่สุดเท่ากับ 2.77 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักควรแก้ปัญหาเรื่องความหนืดและเลือกชนิดของใบพัดให้เหมาะสมน่าจะเป็นทางออกให้ประสิทธิภาพการหมักกรดสูงขึ้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ทำการศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อ *Aspergillus* sp. BR-1 ด้วยสารก่อการกลาย N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine เข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต้องการหาเวลาที่ทำให้สปอร์ของเชื้อรามีการรอดชีวิต 1 เปอร์เซ็นต์จากจำนวนสปอร์เริ่มต้น บนอาหาร Czapek dox ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่เวลา 30 นาทีพบจำนวนสปอร์ของเชื้อราซึ่งมีการรอดชีวิต 1 เปอร์เซ็นต์จากจำนวนสปอร์เริ่มต้น และสามารถคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ทั้งหมด 180 ไอโซเลต จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดโคจิกความเข้มข้นสูง โดยใช้อาหารแข็ง Starch ที่ผสมแป้งความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เช่นกัน ได้ผลว่าเชื้อสายพันธุ์กลายจำนวน 52.2 เปอร์เซ็นต์จากเชื้อกลายที่นำมาทดสอบทั้งหมด (180 ไอโซเลต) มีผลการทดสอบว่าผลิตกรดได้สูงกว่าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม และเมื่อนำเชื้อทั้ง 180 ไอโซเลต มาทดสอบซ้ำในจานขนาด 24 หลุม ที่บรรจุอาหารเหลวสูตร Starch ที่ระดับเปอร์เซ็นต์แป้งเดียวกับที่ทำการทดสอบในอาหารแข็ง พบว่า เชื้อพันธุ์กลายส่วนใหญ่มีผลการผลิตอยู่ในช่วง 0.00 กรัมต่อลิตร ถึง 0.50 กรัมต่อลิตร ทั้งสิ้น 141 ไอโซ-เลต คิดเป็น 78.3 เปอร์เซ็นต์จากเชื้อสายพันธุ์กลาย 180 ไอโซเลต พบเชื้อสายพันธุ์กลายที่ผลิตกรดโคจิกสูงสุด 3 ลำดับแรก คือ *Aspergillus* sp. N-2062 N-2134 และ N-2019 ผลิตได้ระดับของความเข้มข้นกรดโคจิกที่ 5.47 3.43 และ3.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อกลายพันธุ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารสูตร Starch ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อคัดเลือกเชื้อที่ผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุดในระดับฟลาสก์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062 ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดมีความเข้มข้นของกรด 21.81 กรัมต่อลิตร จึงเชื้อกลายพันธุ์นี้มาปรับปรุงสูตรอาหารที่ประกอบไปด้วยแป้งต่อไป

เมื่อทำการหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของแป้งมันสำปะหลังในอาหาร โดยใช้ความเข้มข้นที่ 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเชื้อ *Aspergillus* sp. N-2062 สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 33.16 กรัมต่อลิตร จากอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร รองลงมา คือ อาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 8 6 และ 4 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีความเข้มข้นของกรดโคจิกอยู่ที่ 25.80 21.96 และ 14.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากนั้น เติมเนื้อสกัด เคซีนไฮโดรไลเซต น้ำแช่ข้าวโพด เปปโตน ทริปโตน หรือยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารสูตร Starch ที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสม ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่ายีสต์สกัดและทริปโตนมีผลต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ ได้ความเข้มข้นกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 33.16 และ 31.08 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างในทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากนั้น เพื่อลดการใช้ยีสต์สกัดซึ่งมีส่วนประกอบไม่แน่นอน จึงทำการศึกษาผลของการใช้ยีสต์สกัดร่วมกับไนโตรเจนอนินทรีย์ ประกอบด้วย โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต ในอัตราส่วน 3:2 2.5:2.5 และ 2:3 (โดยน้ำหนัก กรัมต่อกรัม) พบว่าการใช้ยีสต์สกัดร่วมกับโซเดียมไนเตรทให้ความเข้มข้นกรดโคจิกสูงสุด ณ ในทุกอัตราส่วน ประกอบด้วย 3:2 2.5:2.5 และ 2:3 มีค่าปริมาณกรดโคจิกอยู่ที่ 32.50 33.46 และ 31.32 กรัมต่อลิตร แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อเทียบกับแอมโมเนียมไนเตรท ที่อัตราส่วนเดียวกัน มีค่ากรดโคจิก เท่ากับ 20.49 17.62 และ 15.03 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.37 0.23 และ 0.16 กรัมต่อลิตร ดังนั้น เมื่อการเติมยีสต์สกัดและโซเดียมไนเตรทที่ 2 กรัม และ 3 กรัม ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดความเข้มข้น 31.32 กรัมต่อลิตร ไม่แตกต่างจากยีสต์สกัดกับโซเดียมไนเตรทที่ 3 กรัม และ 2 กรัม ที่ได้ค่าความเข้มข้น เท่ากับ 32.50 กรัมต่อลิตร กับปริมาณการใช้ที่ 2.5 กรัม และ 2.5 กรัม ซึ่งวัดค่ากรดโคจิกได้ที่ 33.46 กรัมต่อลิตร จึงใช้อัตราส่วนนี้ในการนำสูตรอาหารที่ได้ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ยีสต์สกัด 2 กรัม โซเดียมไนเตรท 3 กรัม มาเพาะเลี้ยงเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ความเร็วรอบใบพัด 200 400 และ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2 ระดับ คือ 1.5 และ 2.0 ปริมาตรต่อปริมาตร รวมเป็น 6 ชุดการทดลอง พบว่าที่ความเร็วรอบใบพัด 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ทำให้เชื้อผลิตกรดโคจิกความเข้มข้นสูงสุด 19.01 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดโคจิกลำดับรองลงมาคือ 15.39 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเร็วรอบใบพัด 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ในการทดลองระดับถังหมักเมื่อทดลองด้วยแหล่งคาร์บอนที่ส่งเสริมให้เกิดความหนืดสูงขึ้น ควรเลือกใช้เทคนิคหรือการเตรียมสับสเตรทที่ลดความหนืดของอาหารก่อนนำไปใช้เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราอีกทั้งในการทดลองนี้ยังไม่ได้ศึกษาอิทธิพลที่เกิดจากชนิดของใบพัด ซึ่งส่งผลต่อลักษณะการกวนผสม ดังนั้น ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาโอกาสเพิ่มศักยภาพของการหมักด้วยแป้งให้สูงขึ้น

2. ควรปรับปรุงเชื้อราให้สามารถใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เพื่อลดความแปรปรวนในองค์ประกอบของสารอาหารจากสารอาหารกลุ่มอินทรีย์ หรือ ถ้าเป็นการศึกษาอิทธิพลร่วมระหว่างแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์หรืออนินทรีย์ควรผันแปรระดับอัตราส่วนเพิ่มขึ้น เนื่องจากเป็นไปได้ที่ว่าสารบางชนิดอาจให้ผลดีเมื่อใช้ในปริมาณที่ไม่มากจนเกิน

3. ควรระมัดระวังการใช้ Antifoam เพื่อควบคุมปริมาณฟองที่เกิดขึ้นเนื่องจากอาจส่งผลต่อการเจริญของเชื้อราและเมทาบอลิซึมของการผลิตสารได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

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

คณะสำรวจภาวะการผลิตและการค้ามันสำปะหลัง. 2553. **การเสวนาโต๊ะกลม เรื่อง สถานการณ์การขาดแคลนหัวมันสำปะหลังกับผลกระทบต่อการค้ามันเส้น/มันอัดเม็ด.** [สไลด์]. กรุงเทพฯ: สมาคมค้ามันสำปะหลังไทย

จุรีย์รัตน์ ลีสมิทธิ์. 2550. **ระบบพันธุกรรมของจุลินทรีย์.** กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฐิติมา ศรีสกุณี. 2543. "การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *Aspergillus oryzae* NRRL 484 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 เพื่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารแป้ง." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พรรณี ฐิตาภิชิต. 2543. **หลักพันธุศาสตร์.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ไพศาล เหล่าสุวรรณ. 2542. **พันธุศาสตร์.** พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช.

มาลินี ตันติยาภรณ์. 2540. **พันธุศาสตร์จุลินทรีย์.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2551. **พันธุศาสตร์.** กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมใจ ศิริโภค. 2544. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.** กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

หัทยา กาวีวงศ์. 2548. **อณูพันธุศาสตร์.** กรุงเทพฯ : บุญไชยการพิมพ์.

สุวทัย รชตอาชา. 2545. "การใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13." วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิตสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อภิชญา ทองทับ. 2548. "การผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR- 1." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อุษา สรรค์วัฒนา. 2543. "การผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลทรายโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในถังหมัก." วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิตสาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Acharya, P.B., D.K. Acharya and H.A. Modi. 2008. "Optimization for cellulose production by *Aspergillus niger* using saw dust as substrate." **Afr. J. Biotechnol**. 7: 4147-4152.

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

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

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

Barham, H.N. and B.L. Smits. 1936. "Production of kojic acid from xylose by *Aspergillus flavus*." **Ind. Eng. Chem. Res.** 28: 567-570.

Beelik, A. 1956. "Kojic acid." **Adv. Carbohydr. Chem**. 11: 145-183.

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

Bentley, R. 2006. "From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid." **Nat. Prod. Rep**. 23: 1046-1062.

Bernfeld, P. 1955. **Amylase *alpha* and *beta* method in enzymology**. New York: Academic Press, Inc.

Berry, D.R. 1988. **Physiology of industrial fungi**. Oxford: Blackwell Scientific.

Blanch, H.W. and D.S. Clark. 1996. **Biochemical engineering**. New York: Marcel Dekker.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Brtko, J., L. Rondahl, M. Ficková, D. Hudecová, V. Eybl, and M. Uher. 2004. "Kojic acid and its derivatives: History and present state of art." **Cent. Eur. J. Publ. Health**. 12: S16-S18.

Chang, T. S. 2009. "An update review of tyrosinase inhibitor." **Int. J. Mol. Sci.** 10: 2440-2475.

Chee, H. Y. and E. H. Lee. 2003. "Fungistatic activity of kojic acid against human pathogenic fungi and inhibition of melanin-production in *Cryptococcus neoformans*." **Mycobiology.** 31(4): 248-250.

Chen, J.S., C.L. Wei, R.S. Rolle, M.O. Balaban, S.W. Otwell and M.R. Marshall. 1991. "Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustratacean polyphenol oxidasees. " **J. Agric. Food Chem**. 39: 1396-1401.

Choi, H., K. Kim, J. Han, H. Choi, S. H. Jin, E. K. Lee, D. W. Shin, T. R. Lee, A. Y. Lee and M. Noh. 2012. "Kojic acid-induced IL-6 production in human keratinocytes plays a role in its anti-melanogenic activity in skin." **J. Dermatol. Sci.** 66(3): 207-215.

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

Deacon, J. W. 1997. **Modern mycology**. Oxford: Blackwell Science.

Deacon, J. 2006. **Fungal biology**. Malden, MA: Blackwell.

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

El-aasar, S.A. 2006. "Cultural conditions studies on kojic acid production by *Aspergillus parasiticus*." **Int. J. Agr. Biol**. 8(4): 468-473.

Elson, L.A. and W.T. Morgan. 1933. "A colorimetric method for the determination of Glucosamine and chrondrosamine." **Biochem. J**. 27:1824-1828.

Futamura, T., M. Okabe, T. Tamura, K. Toda, T. Matsunobu and Y. S. Park. 2001a. "Improvement of production of kojic acid by a mutant strain *Aspergillus oryzae*, MK107-39." **J. Biosci. Bioeng**. 91(3): 272-276.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Futamura, T., H. Ishihara, T. Tamura, T. Yasutake, G. Huang, M. Kojima and M. Okabe. 2001b. "Kojic acid production in an airlift bioreactor using partially hydrolyzed raw corn starch." **J. Biosci. Bioeng**. 92(4): 360-365.

Griffin, D.H. 1994. **Fungal physiology**. New York: Wiley-Liss.

Gruszka, R. and W. Podgorski. 2003. "Kojic acid production by *Aspergillus oryzae* in defined media." **Proceedings of the 30th International Conference of SSCHE**. 30: 145.

Irfan, M., U. Irfan, Z. Razzaq, Q. Syed and M. Nadeem. 2011. "Utilization of agricultural waste as a substrate for carboxymethyl cellulose production from Aspergillus niger in submerged fermentation." **IJAVMS**. 5:464-471.

Kahn, V., P. Lindner and V. Zakin. 1995. "Effect of kojic acid on the oxidation of *o*-dihydroxyphenols by mushroom tyrosinase." **J. Agric. Food Chem**. 18: 253-271.

Kamaroddin, M.F.B.A. 2007. "Direct utilization of tapioca starch by *Aspergillus flavus* for production of kojic acid in batch and fed-batch culture." The award of bachelor of science Industrial biology Faculty of science: University Technology Malaysia.

Lotfy, W. A., K. M. Ghanem and E. R. El-Helow. 2006. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. mutagenesis and cost reduction studies." **Bioresource technol**. 98: 3464-3469.

Lucchesi, P.M., Carraway and M.G. Marinus. 1986. "Analysis of forward mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the bacteriophage P22 mnt repressor gene." J Bacteriol. 166: 34-36

Lyne M. 2005. Food microbiology laboratory. Boca Raton : CRC Press

Maloy, S. R., J. E. Cronan and D. Freifelder. 1995. **Microbial genetics.** New Delhi: Narosa Publishing House.

Megalla, S. E., A. Y. Nassar and M. A. S. Gohar. 1986. "The role of copper(I)-nicotinic acid complex on kojic acid biosynthesis by *Aspergillus flavus*." **J. Basic Microbiol.** 27(1): 29-33.

Michael, J.W., L.M. Neil, J.S. Rockey and G. Higton. 2001. **Industrial Microbiology : an introduction.** Oxford: Blackwell Science.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Miller, G.L. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." **Anal. Chem.** 31(3): 426-428.

Mojsov, K. 2010. "Experimental investigations of submerged fermentation and synthesis of pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger*: Effect of inoculum size and age of spores." **Applied Technology and Innovation**. 2: 40-46.

Ohnishi. J., H. Mizoguchi, S. Takeno and M. Ikeda. 2008. "Characterization of mutations induced by *N*-methyl-*N*_-nitro-*N*-nitrosoguanidine in an industrial *Corynebacterium glutamicum* strain." **Mutat. Res.** 649: 239-244.

Pal, S. K. and T. K. Das. 2005. "Biochemical characterization of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced cadmium resistant mutants of *Aspergillus niger*." **J. Biosci.** 30(5): 639-646.

Ramachandran, R. K. Roopesh, K.M. Nampoothiri, G. Szakacs and A. Pandey. 2005. "Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as subsrate." **Process Biochem.**, 40(5): 1749-1754.

Rice, S., M. Y. Cheng, R. E. Cramer, M. Mandel, H. F. Mower and K. Seff. 1984. "Structure of *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine." **J. Am. Chem. Soc. 106: 239-243.**

Rodrigues, A. P. D., A. N. S. C. Carvalho, A. S. Santos, C. N. Alves, J. L. M. Nascimento and E. O. Silva. 2011. "Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp. Acts as an inducer of macrophage activation." **Cell Biol. Int.** 35: 335-343.

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

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

Rosfarizan, M., A. B. Ariff, M. A. Hassan and M. I. A. Karim. 2000b. "Influence of pH on kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus*." **Pakistan. J. Biol. Sci.** 3(6): 977-982.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Rofarizan, M. and A.B. Ariff. 2006. "Kinetics of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* Link S44-1 using sucrose as a carbon source under different pH conditions. **Biotechnol. Bioprocess Eng**. 11: 72-79.

Rofarizan, M., M. S. Mohamed, N. Suhaili, M. M. Salleh and A. B. Ariff. 2010. "Kojic: Applications and development of fermentation process for production." **Biotechnol. Mol. Biol. Rev**. 5(2): 24-37.

Sikander, A., H. Ikram, M.A. Qadeer and I. Javed. 2002. "Production of citric acid by *Aspergillus niger* using cane molasses in a stirred fermentor." **Electron. J. Biotechnol**. 5:258-271.

Stanbury, P.F., A. Whitaker and S.J. Hall. 1995. **Principles of fermentation technology**. Oxford:Butterworth-Heinemann.

Suryadi, H., M. Radji, J. Dianingtyas, and A.H. Ap. 2006. "Improvement of kojic acid production by a mutant strain of *Aspergillus flavus* N40C10." **International Conference on Mathematics and Natural Sciences**.

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

Turner, P.C. 1997. **The instant notes in molecular biology**. Singapore : BIOS Scientific.

Wan, H. M., C. C. Chen, T. S. Chang, R. N. Giridhar and W. T. Wu. 2004. "Combination induced mutation and protoplasting for strain improvement of *Aspergillus oryzae* for kojic acid production." **Biotechnol. Lett.** 26: 1163-1166.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Yabuta, T., 1924. "The constitution of kojic acid, a delta-pyrone derivative formed by *Aspergillus flavus* from carbohydrates." **J. Chem. Soc. Trans**. 125: 575-587.

Yang, G., L. Sandjo, K. Yan, A. S. Leutou, G. D. Kim, H. D. Choi, J. S. Kang, J. Hong, B. W. Son. 2011. "Flavusides A and B,antibacterial cerebrosides from the marine-derived fungus Aspergillus flavus." **Chem. Pharm. Bull.** 59(9): 1174-1177.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และวิธีการเตรียม

ก.1 อาหารสูตร Starch medium ดัดแปลง (Mohamad และคณะ, 2002)

ยีสต์สกัด	5.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
แป้งมันสำปะหลัง (6 % w/v)	60.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ในกรณีเตรียมเป็นอาหารแข็งเติมวุ้นปริมาณ 1.5 % (w/v)

ละลายส่วนประกอบต่างๆ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ 5.0 นำไปต้มเพื่อให้แป้งละลายโดยใช้ไฟปานกลาง เมื่อแป้งละลายดีซึ่งจะเห็นเป็นลักษณะเจลใส ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.2 อาหารสูตร Czapek dox ดัดแปลง (Atlas M. R., 1995)

$NaNO_3$	3.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
แป้งมันสำปะหลัง	20.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ละลายสารทั้งหมดแล้ว จากนั้นทำการปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่ 7.3 ± 0.2 นำไปต้มเพื่อให้แป้งละลายโดยใช้ไฟปานกลาง เมื่อแป้งละลายดีซึ่งจะเห็นเป็นลักษณะเจลใส ปรับปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.3 อาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) (Himedia)

เดกซ์โทส	20.0 กรัม
Potatoes infusion from	200.0 กรัม
วุ้น	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1000.0 กรัม

ละลายอาหารสูตรพีดีเอสำเร็จรูปจำนวน 39 กรัม เติมน้ำจนมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปต้มจนวุ้นละลาย ผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

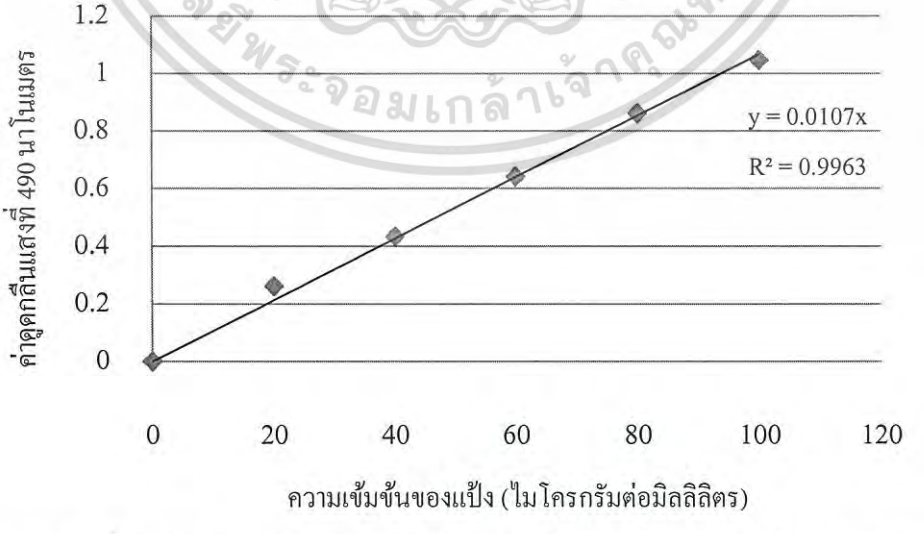
ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐาน

ข.1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร กับความเข้มข้นแป้ง

ตารางภาคผนวกที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และระดับความเข้มข้นของแป้ง

ความเข้มข้นแป้ง (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย ± S.D.
0	0	0	0	0.000 ± 0.00
20	0.258	0.285	0.241	0.261 ± 0.022
40	0.444	0.420	0.436	0.433 ± 0.012
60	0.646	0.637	0.641	0.641 ± 0.005
80	0.869	0.846	0.870	0.862 ± 0.014
100	1.081	1.034	1.027	1.047 ± 0.029



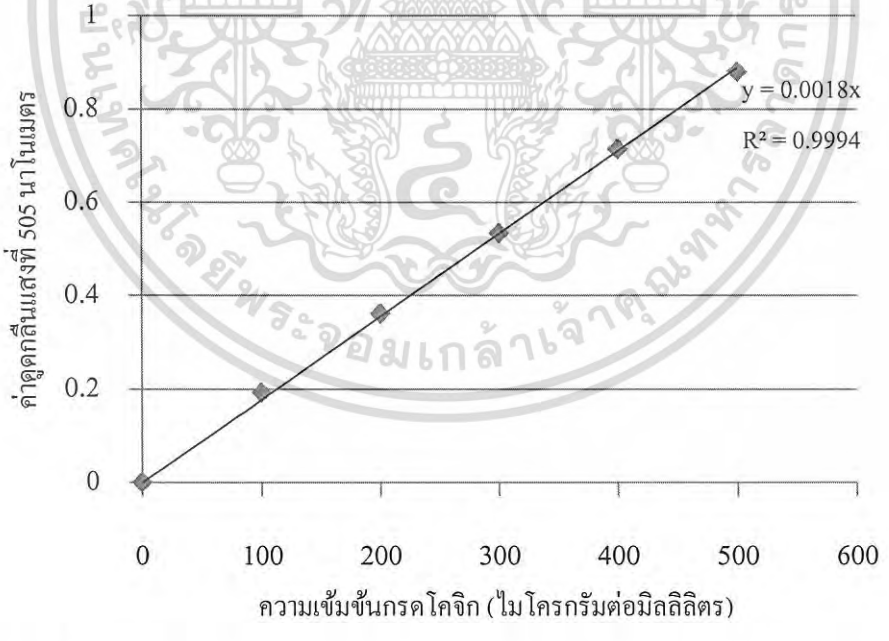
รูปภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และความเข้มข้นกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร กับความเข้มข้นกรดโคจิก

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร และความเข้มข้นของกรดโคจิก

ความเข้มข้นกรดโคจิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย ± S.D.
0	0	0	0	0.000 ± 0.000
100	0.190	0.192	0.195	0.192 ± 0.003
200	0.368	0.370	0.345	0.361 ± 0.014
300	0.527	0.534	0.540	0.534 ± 0.007
400	0.727	0.712	0.704	0.714 ± 0.012
500	0.862	0.881	0.895	0.879 ± 0.017



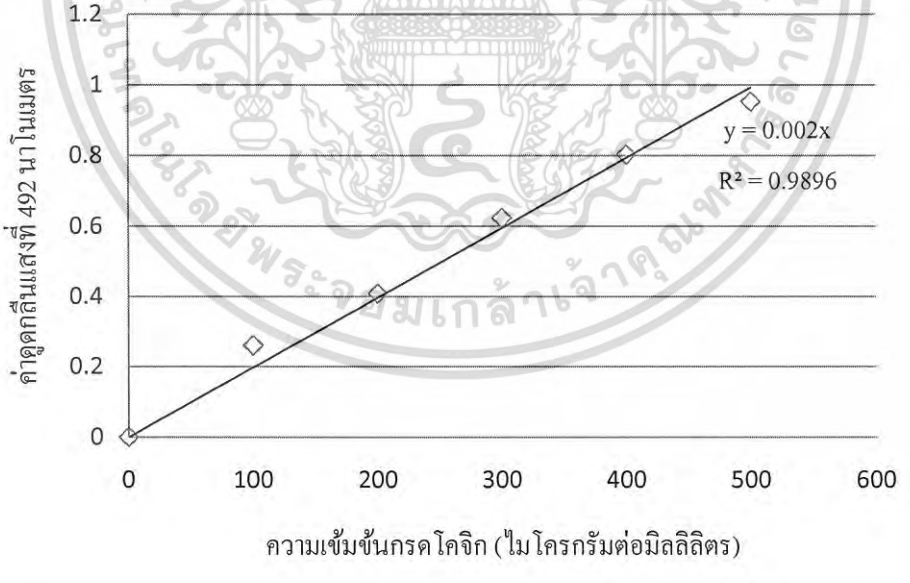
ภาพภาคผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร และความเข้มข้มกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.3 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ตัวกรองความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร กับความเข้มข้นกรดโคจิกที่วัดด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงในถาดหลุม

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร และความเข้มข้นกรดโคจิก

ความเข้มข้นกรดโคจิก (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย ± S.D.
0	0	0	0	0.000 ± 0.000
100	0.260	0.227	0.295	0.261 ± 0.034
200	0.411	0.415	0.402	0.409 ± 0.007
300	0.625	0.604	0.643	0.624 ± 0.020
400	0.800	0.801	0.804	0.802 ± 0.002
500	0.950	0.953	0.951	0.951 ± 0.002



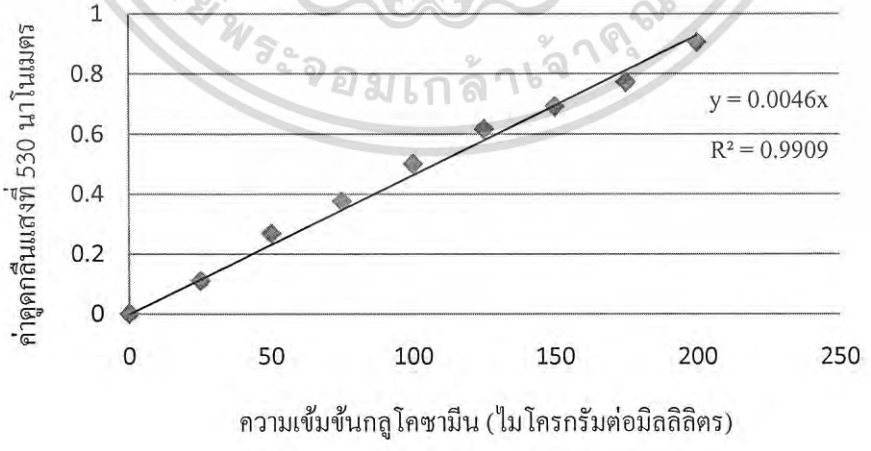
ภาพภาคผนวกที่ 4. กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และความเข้มข้นกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.4 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ตัวกรองความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร กับความเข้มข้นกลูโคซามีน

ตารางภาคผนวกที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร และความเข้มข้นกลูโคซามีน

ความเข้มข้นกลูโคซามีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย ± S.D.
	0.000	0.000	0.000	0.000 ± 0.000
25	0.105	0.118	0.107	0.110 ± 0.007
50	0.268	0.271	0.265	0.268 ± 0.003
75	0.375	0.37	0.38	0.375 ± 0.005
100	0.5	0.505	0.495	0.500 ± 0.005
125	0.619	0.619	0.612	0.616 ± 0.004
150	0.699	0.69	0.686	0.692 ± 0.006
175	0.769	0.778	0.77	0.772 ± 0.005
200	0.905	0.908	0.901	0.905 ± 0.004



ภาพภาคผนวกที่ 5. กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร และความเข้มข้นกลูโคซามีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์

ค.1 การวัดการเจริญด้วยการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (sulfuric acid 98% (w/w) ; H_2SO_4)
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide ; NaOH)

การเตรียมสารละลาย

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 7.5 นอร์มัล

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 300 กรัม ในน้ำกลั่น (ควรใช้ภาชนะที่เป็นพลาสติก) เมื่อละลายดีแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

ขั้นตอนการสกัดกลูโคซามีนออกจากเซลล์ (ดัดแปลงจาก Ramachandran *et al.*, 2005)

ชั่งตัวอย่างอบแห้งที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ประมาณ 0.10-0.25 กรัม จากนั้นเติมกรดซัลฟิริกเข้มข้น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีความเข้มเข้น 1 นอร์มัล (ปรับปริมาตรเป็น 73.6 มิลลิลิตร) จากนั้นให้อุณหภูมิที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อกำจัดตะกอนออก ทำให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.0 และ7.5 นอร์มัล กับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการวิเคราะห์กลูโคซามีนตามวิธีของ (Van der Loo, 1976)

สารเคมี

1. อะซิติลอะซีโตน (acetyl acetone ; $C_5H_8O_2$)

2. โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate ; Na_2CO_3)

3. ไดเมทิลพาราอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (N,N-dimethyl-*p*-aminobenzaldehyde ; $C_9H_{16}NO$)

4. แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (ethyl alcohol ; C_2H_6O)

5. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (hydrochloric 36% ; HCl)

การเตรียมสารละลาย

สารละลายอะซิติลอะซีโตน (acetyl acetone reagent) 4 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

ผสมสารละลายอะซีติลอะซีโตนในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 1.25 M. จนอะซีติลอะซีโตนมีความเข้มข้นสุดท้าย 4 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

สารละลาย Ehrlich's reagent

ชั่งไดเมทิลพาราอะมิโนเบนซัลดีไฮด์หนัก 1.6 กรัม ในสารละลายผสมระหว่างกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 30 มิลลิลิตร และแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร

วิธีการ

- นำสารละลายที่ผ่านการสกัดกลูโคซามีนปริมาตร 1 มิลลิลิตร (แบลงค์ใช้น้ำกลั่น) กับสารละลายอะซิติลอะซีโตนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที

- ทิ้งสารละลายจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง

- เติมแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย ehrlich's reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที จะเกิดสารละลายสีชมพูบานเย็น

- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณ

กลูโคซามีนต่อเซลล์ที่นำมาสกัด (มิลลิกรัมต่อกรัม)

$$= \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร} \times \text{ปริมาตรสารละลายก่อนนำมาวัด}}{\text{ความชันจากกราฟมาตรฐาน} \times \text{น้ำหนักตัวอย่างที่นำมาวัด} \times 10}$$

ค.2 การวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟิวริก (Dubois, 1956)

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (sulfuric acid 98% (w/w) ; H_2SO_4)
2. ฟีนอล (phenol ; C_6H_6O)

การเตรียมสารละลาย

สารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

- ชั่งผลึกฟีนอลหนัก 5 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในภาชนะทึบแสง

วิธีการ

- นำส่วนใสของน้ำหมักที่มีระดับความเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (แบลงค์ใช้น้ำกลั่น) ผสมกับสารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เช่นกัน
- เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร
- ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ผสมให้เข้ากัน แล้วทำให้เย็นลงโดยแช่ในน้ำเป็นเวลา 20 นาที
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ค.3 การวัดปริมาตรกรดโคจิกตามวิธีของ (Bentley, 1957)

สารเคมี

1. เฟอริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรท (ferric chloride hexahydrate ; $FeCl_3.6H_2O$)
2. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น(hydrochloric 36% (w/w) ; HCl)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลาย

สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

ตวงสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 36 เปอร์เซ็นต์ (w/w) (ความหนาแน่น 1.18 กรัมต่อมิลลิลิตร) ประมาณ 8.6 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนสารละลายมีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

ชั่งเฟอร์ริกคลอไรด์เฮกซะไฮเดรทหนัก 1 กรัม ละลายในสารละลายกรดไฮโดร-คลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และปรับปริมาตรด้วยสารละลายชนิดเดิมเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

- นำส่วนใสของน้ำหมักที่มีระดับความเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (แบลงค์ใช้น้ำกลั่น) ผสมกับ สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

การคำนวณจำนวนสปอร์และโคโลนีต่อสารละลาย

ง.1 การนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

อุปกรณ์

1. ฮีมาไซโตมีเตอร์(haemacytometer)
2. พลาสเจอร์ปิเปต(pastuer pipette)
3. กล้องจุลทรรศน์แบบพื้นหลังสว่าง(bright field microscope)
4. เครื่องผสม(vortex mixer)

วิธีการ

- วางแผ่นปิดสไลด์บนตำแหน่งที่ใช้ในการวัดของฮีมาไซโตมิเตอร์
- เจือจางปริมาณสปอร์ให้อยู่ในช่วง 5-200 สปอร์ ต่อหนึ่งช่องสี่เหลี่ยมใหญ่ในฮีมาไซโตมิเตอร์ (เพื่อให้ได้ค่าจากการวัดที่แม่นยำ)
- ใส่ตัวอย่างในตำแหน่งใส่ตัวอย่าง

(ตัวอย่างที่ใส่จะต้องไม่ไหลออกมาบริเวณช่องข้างๆ ของบริเวณที่ใช้ในการวัด)

- จากนั้นนำฮีมาไซโตมิเตอร์ไปส่องเพื่อตรวจนับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายของเลนส์ใกล้วัตถุที่เหมาะสม

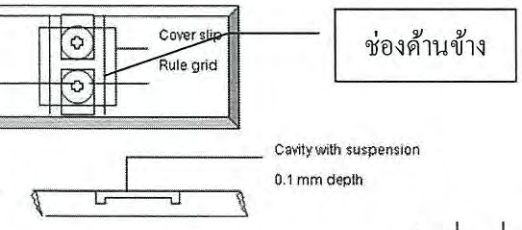
<u>หมายเหตุ</u> - ถ้าต้องการนับสปอร์อย่างรวดเร็วสามารถนับสี่เหลี่ยมบริเวณมุมทั้ง 4 และตรงกลางของบริเวณที่ใช้วัดรวมทั้งสิ้น 5 ช่อง (ตามหมายเลขที่กำหนดในภาพ) แต่ถ้าต้องการความแม่นยำให้ทำการนับทุกช่องสี่เหลี่ยม (ช่องสี่เหลี่ยมเล็กจะทำในทำนองเดียวกัน)

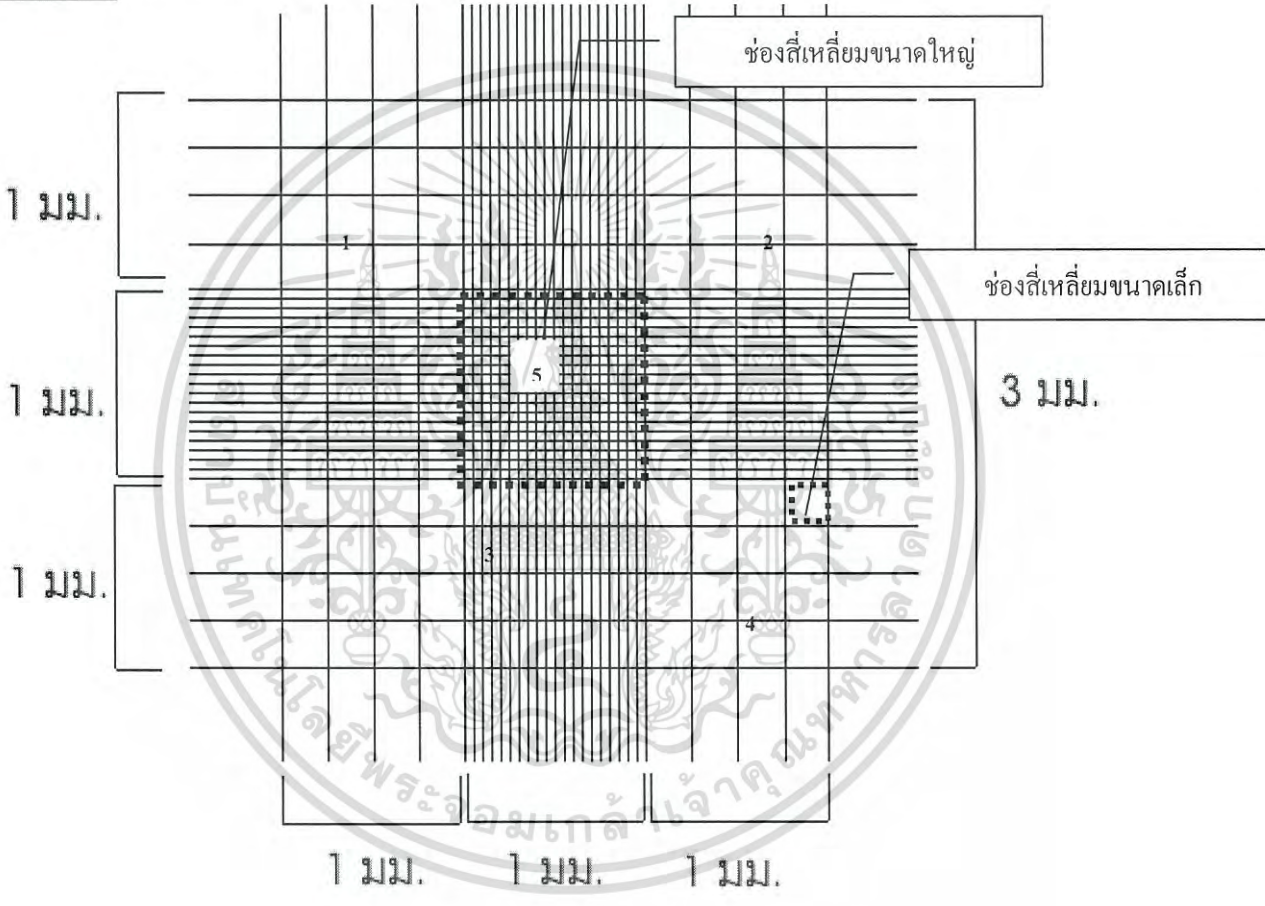
- หลักเกณฑ์ในการนับจะนับเชื้อที่อยู่ติดขอบเส้นด้านบนและด้านซ้ายและจะไม่นับเชื้อที่ติดขอบเส้นด้านขวาและด้านล่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณ จำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร

$$= \frac{\text{จำนวนสปอร์ที่นับได้ต่อหนึ่งช่องสี่เหลี่ยมที่ทำการนับ (สปอร์)}}{\text{ปริมาตรต่อหนึ่งช่องสี่เหลี่ยม (มิลลิลิตร)}}$$





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง.2 การคำนวณจำนวนโคโลนีเชื้อ

เมื่อนับจำนวนโคโลนีของราจากจานเพาะเลี้ยงที่มีจำนวนระหว่าง 15-150 โคโลนี จากนั้นคำนวณหาค่าในรูปของจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร

จากสูตร

$$\frac{\sum C}{[(V \times a) + (0.1 \times b)] \times d}$$

หมายเหตุ C = จำนวนโคโลนี

V = ปริมาตรที่ใช้เพาะเลี้ยง

a = จำนวนโคโลนีในระดับความเจือจางแรกที่นับได้ (ระดับความเจือจางต่ำกว่า)

b = จำนวนโคโลนีในระดับความเจือจางหลังที่นับได้ (ระดับความเจือจางสูงกว่า)

d = ค่าระดับความเจือจางแรกที่นับโคโลนีได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ข้อมูลผลการทดลอง

จ.1 ผลการผลิตกรดโคจิกในถาด 24 หลุม ด้วยอาหารเหลว Starch เพื่อคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย

รหัส	g/L	รหัส	g/L	รหัส	g/L	รหัส	g/L
N-1001	0.04	N-1002	0.12	N-1003	0.08	N-1004	0.17
N-1005	0.89	N-1006	0.05	N-1007	1.43	N-1008	0.89
N-1009	0.06	N-1010	0.94	N-1011	0.01	N-1012	0.07
N-1013	0.21	N-1014	2.10	N-1015	0.04	N-1016	0.04
N-1017	0.04	N-1018	0.06	N-1019	0.10	N-1020	0.08
N-1021	0.06	N-1022	1.60	N-1023	0.09	N-1024	0.03
N-1025	0.10	N-1026	0.03	N-1027	0.08	N-1028	0.03
N-1029	0.05	N-1030	0.59	N-1031	0.08	N-1032	0.04
N-1033	0.06	N-1034	0.05	N-1035	0.54	N-1036	0.05
N-1037	0.12	N-1038	0.08	N-1039	0.15	N-1040	0.09
N-2001	0.34	N-2002	0.70	N-2003	0.12	N-2004	0.75
N-2005	0.05	N-2006	0.07	N-2007	0.06	N-2008	0.06
N-2009	0.11	N-2010	1.29	N-2011	0.04	N-2012	0.20
N-2013	0.12	N-2014	0.10	N-2015	0.16	N-2016	1.63
N-2017	0.11	N-2018	1.84	N-2019	3.28	N-2020	0.73
N-2021	0.10	N-2022	1.13	N-2023	0.19	N-2024	1.26
N-2025	2.38	N-2026	0.02	N-2027	0.05	N-2028	0.05
N-2029	0.03	N-2030	0.08	N-2031	0.15	N-2032	0.11
N-2033	0.12	N-2034	0.07	N-2035	0.43	N-2036	0.10
N-2037	0.05	N-2038	0.06	N-2039	0.03	N-2040	0.06
N-2041	0.07	N-2042	1.34	N-2043	0.09	N-2044	0.29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.1(ต่อ) ผลการผลิตกรดโคจิกในถาด 24 หลุม ด้วยอาหารเหลว Starch เพื่อคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย

รหัส	g/L	รหัส	g/L	รหัส	g/L	รหัส	g/L
N-2045	0.08	N-2046	0.08	N-2047	0.07	N-2048	1.28
N-2049	0.48	N-2050	0.06	N-2051	0.02	N-2052	0.16
N-2053	0.29	N-2054	0.07	N-2055	1.40	N-2056	0.13
N-2057	0.09	N-2058	0.50	N-2059	0.13	N-2060	0.06
N-2061	0.49	N-2062	5.47	N-2063	0.10	N-2064	0.18
N-2065	1.46	N-2066	0.16	N-2067	1.13	N-2068	0.19
N-2069	0.24	N-2070	0.65	N-2071	0.16	N-2072	0.98
N-2073	2.02	N-2074	0.19	N-2075	0.22	N-2076	0.19
N-2077	0.11	N-2078	0.18	N-2079	0.25	N-2080	1.00
N-2081	0.14	N-2082	0.21	N-2083	0.21	N-2084	0.18
N-2085	0.30	N-2086	0.11	N-2087	0.37	N-2088	0.17
N-2089	0.14	N-2090	0.14	N-2091	0.23	N-2092	0.15
N-2093	0.20	N-2094	0.09	N-2095	0.10	N-2096	2.17
N-2097	0.23	N-2098	0.11	N-2099	0.38	N-2100	0.29
N-2101	1.46	N-2102	0.26	N-2103	0.04	N-2104	0.24
N-2105	0.99	N-2106	0.38	N-2107	0.21	N-2108	0.13
N-2109	0.14	N-2110	0.07	N-2111	0.09	N-2112	0.18
N-2113	0.22	N-2114	0.13	N-2115	0.12	N-2116	0.21
N-2117	0.08	N-2118	0.16	N-2119	0.09	N-2120	1.10
N-2121	0.02	N-2122	0.07	N-2123	0.15	N-2124	0.06
N-2125	1.53	N-2126	0.06	N-2127	0.21	N-2128	0.42
N-2129	0.10	N-2130	0.64	N-2131	1.03	N-2132	0.11
N-2133	0.09	N-2134	3.43	N-2135	0.60	N-2136	0.62
N-2137	1.10	N-2138	0.12	N-2139	0.12	N-2140	2.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.1(ต่อ) ผลการผลิตกรดโคจิกในถาด 24 หลุม ด้วยอาหารเหลว Starch เพื่อคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลาย

รหัส	g/L	รหัส	g/L	รหัส	g/L	รหัส	g/L
BR-1	0.09						

จ.2 ผลการทดลองเชื้อสายพันธุ์ N-2019 เพื่อคัดเลือกจาก 3 สายพันธุ์ในระดับฟลาสก์

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.1	0.00 ± 0.00	58.0 ± 4.1	0.0 ± 0.0
2	4.2	0.33 ± 0.04	31.7 ± 2.3	30.0 ± 3.2
3	4.3	4.74 ± 0.57	23.8 ± 2.6	32.3 ± 2.5
4	4.4	12.22 ± 1.35	8.3 ± 2.0	52.7 ± 3.4
5	5.1	15.93 ± 1.83	0.9 ± 0.1	64.0 ± 4.7
6	5.0	13.79 ± 1.66	0.7 ± 0.2	80.4 ± 3.1
7	4.7	11.45 ± 1.55	0.7 ± 0.2	77.8 ± 4.6

จ.3 ผลการทดลองเชื้อสายพันธุ์ N-2062 เพื่อคัดเลือกจาก 3 สายพันธุ์ในระดับฟลาสก์

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.1	0.00 ± 0.00	57.6 ± 1.2	0.0 ± 0.0
2	4.0	1.29 ± 0.17	46.5 ± 5.4	41.4 ± 3.8
3	4.0	10.30 ± 1.18	30.8 ± 3.1	55.8 ± 4.8
4	4.0	18.28 ± 1.93	9.7 ± 0.4	68.5 ± 4.9
5	4.6	21.81 ± 2.21	0.8 ± 0.1	73.6 ± 4.0
6	4.7	16.91 ± 0.76	0.7 ± 0.2	75.3 ± 5.2
7	4.4	13.19 ± 1.62	0.8 ± 0.2	78.2 ± 3.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.4 การทดลองเชื้อสายพันธุ์ N-2134 เพื่อคัดเลือกจาก 3 สายพันธุ์ในระดับฟลาสก์

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	58.1 ± 3.2	0.0 ± 0.0
2	4.1	0.64 ± 0.09	36.1 ± 5.7	31.1 ± 2.0
3	4.0	6.54 ± 1.17	23.5 ± 1.5	39.6 ± 2.5
4	4.2	13.47 ± 0.86	9.2 ± 0.4	58.1 ± 3.6
5	4.8	16.20 ± 0.88	0.9 ± 0.0	59.1 ± 7.7
6	4.6	12.01 ± 0.94	0.5 ± 0.0	74.0 ± 4.9
7	5.0	12.16 ± 1.56	0.5 ± 0.2	80.6 ± 8.5

จ.5 ผลของแป้งมันสำปะหลัง 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.2	0.00 ± 0.00	43.2 ± 2.3	0.0 ± 0.0
2	4.0	1.86 ± 0.26	21.9 ± 1.6	65.5 ± 8.6
3	3.9	11.23 ± 1.14	5.2 ± 0.3	104.3 ± 5.6
4	4.9	14.45 ± 1.73	1.7 ± 0.2	85.2 ± 3.4
5	4.0	11.45 ± 2.46	0.5 ± 0.0	102.2 ± 9.0
6	4.1	8.84 ± 0.37	0.5 ± 0.1	139.7 ± 4.7
7	4.2	6.92 ± 0.48	0.6 ± 0.0	140.2 ± 7.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.6 ผลของแป้งมันสำปะหลัง 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.2	0.00 ± 0.00	58.6 ± 2.1	0.0 ± 0.0
2	4.3	2.38 ± 0.13	37.5 ± 5.0	48.7 ± 5.5
3	4.1	9.66 ± 0.73	16.9 ± 0.9	91.8 ± 5.3
4	4.2	21.96 ± 1.05	0.2 ± 0.0	65.8 ± 6.0
5	4.6	21.34 ± 0.68	0.5 ± 0.0	72.6 ± 7.1
6	4.4	20.55 ± 1.53	0.5 ± 0.0	88.2 ± 11.1
7	4.6	16.95 ± 1.67	0.6 ± 0.1	48.7 ± 21.4

จ.7 ผลของแป้งมันสำปะหลัง 8 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.2	0.00 ± 0.00	80.5 ± 3.4	0.0 ± 0.0
2	4.1	1.09 ± 0.43	45.3 ± 3.3	19.2 ± 0.5
3	4.0	6.47 ± 0.20	42.7 ± 0.7	68.6 ± 4.7
4	4.0	15.95 ± 0.16	18.0 ± 1.3	40.8 ± 4.1
5	3.9	25.80 ± 0.58	2.5 ± 1.1	43.1 ± 0.7
6	4.6	25.62 ± 0.68	0.6 ± 0.0	70.4 ± 14.9
7	4.9	25.94 ± 5.41	0.5 ± 0.1	68.7 ± 10.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.8 ผลของแป้งมันสำปะหลัง 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เพื่อคัดเลือกความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	98.5 ± 3.7	0.0 ± 0.0
2	4.3	1.91 ± 0.08	53.4 ± 2.6	17.7 ± 2.1
3	4.3	8.71 ± 0.56	43.2 ± 3.2	78.5 ± 1.1
4	4.2	17.32 ± 1.69	31.6 ± 4.9	40.8 ± 6.3
5	4.1	29.22 ± 1.16	5.8 ± 0.2	43.9 ± 1.3
6	4.3	33.16 ± 1.44	1.0 ± 0.0	68.3 ± 18.0
7	4.4	31.40 ± 0.90	0.8 ± 0.0	70.0 ± 4.6

จ.9 ผลของเนื้อสกัดเพื่อคัดเลือกแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	97.9 ± 2.0	0.0 ± 0.0
2	4.8	0.19 ± 0.03	81.0 ± 21.8	9.2 ± 0.3
3	4.8	0.26 ± 0.10	64.1 ± 10.7	9.9 ± 0.4
4	4.1	1.22 ± 0.17	63.2 ± 4.6	21.8 ± 2.7
5	3.9	15.75 ± 0.73	12.8 ± 2.4	39.5 ± 1.1
6	3.9	21.23 ± 0.81	8.1 ± 0.5	47.8 ± 15.0
7	4.4	26.07 ± 0.85	1.6 ± 0.2	53.2 ± 7.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.10 ผลของเคซีนไฮโดรไลเซตเพื่อคัดเลือกแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	100.5 ± 3.8	0.0 ± 0.0
2	3.6	0.15 ± 0.01	57.5 ± 0.7	17.1 ± 0.6
3	3.6	0.94 ± 0.16	47.5 ± 1.4	22.5 ± 2.5
4	3.4	4.96 ± 0.14	34.2 ± 5.1	29.4 ± 1.8
5	3.4	7.93 ± 1.30	18.8 ± 1.5	45.4 ± 4.8
6	3.5	11.35 ± 0.21	10.3 ± 0.5	42.7 ± 11.3
7	4.2	17.57 ± 0.53	4.0 ± 0.7	46.8 ± 9.0

จ.11 ผลของน้ำแช่ข้าวโพดเพื่อคัดเลือกแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	99.5 ± 3.6	0.0 ± 0.0
2	3.6	1.41± 0.06	55.2 ± 1.9	6.7 ± 0.6
3	3.7	2.12 ± 0.36	54.5 ± 2.9	11.3 ± 2.0
4	3.8	4.32 ± 0.21	48.4 ± 1.5	11.1 ± 2.0
5	3.7	3.90 ± 0.10	44.2 ± 5.3	15.4 ± 3.4
6	3.4	3.35 ± 0.08	44.7 ± 2.2	15.8 ± 4.2
7	3.6	4.90 ± 0.55	42.9 ± 3.5	15.7 ± 10.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.12 ผลของเปบโตนเพื่อคัดเลือกแหล่งอินทรีย์ในโตรเจน

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	100.5 ±1.4	0.0 ± 0.0
2	4.1	0.11 ± 0.02	72.6 ± 9.7	15.6 ± 3.9
3	4.0	0.32 ± 0.04	63.8 ± 1.1	26.1 ± 3.9
4	4.0	1.15 ± 0.46	63.9 ± 0.7	33.1 ± 6.6
5	3.9	16.42 ± 0.30	18.8 ± 5.2	23.9 ± 5.2
6	3.9	22.62 ± 0.21	5.0 ± 0.4	28.6 ± 2.0
7	4.0	26.27 ± 2.17	1.0 ± 0.1	38.1 ± 5.8

จ.13 ผลของทริปโตนเพื่อคัดเลือกแหล่งอินทรีย์ในโตรเจน

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	100.1± 0.7	0.0 ± 0.0
2	3.9	1.51 ± 0.69	63.1 ± 5.7	13.1 ± 1.6
3	3.8	7.45 ± 1.21	58.7 ± 3.1	21.3 ± 1.6
4	3.7	18.85 ± 1.24	32.2 ± 0.9	26.2 ± 0.3
5	3.8	26.20 ± 3.03	11.4 ± 0.4	54.7 ± 2.1
6	4.3	31.08 ± 1.22	2.2 ± 0.3	62.8 ± 16.9
7	3.9	28.96 ± 2.46	3.0 ± 0.2	62.9 ± 9.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.14 ผลของยีสต์สกัดเพื่อคัดเลือกแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	99.0 ±1.1	0.0 ± 0.0
2	4.0	1.37 ± 0.12	70.0 ± 4.6	16.1 ± 1.8
3	4.0	5.95 ± 0.72	59.1 ± 3.3	22.9 ± 2.1
4	3.9	14.69 ± 0.96	41.8 ± 4.3	39.6 ± 6.8
5	4.0	20.64 ± 2.37	22.2 ± 5.7	55.0 ± 2.2
6	4.0	22.73 ± 2.75	23.9 ± 1.9	62.3 ± 12.0
7	3.9	29.26 ± 1.11	4.3 ± 0.4	65. 5 ± 5.7

จ.15 ผลร่วมของยีสต์สกัดและโซเดียมไนเตรทอัตราส่วน 3 กรัม ต่อ 2 กรัม

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	99.4 ± 2.7	0.0 ± 0.0
2	6.0	0.24 ± 0.01	66.5 ± 1.2	18.1 ± 2.5
3	5.1	0.61 ± 0.06	62.3 ± 1.0	19.3 ± 4.5
4	5.8	2.05 ± 0.33	56.4 ± 2.5	24.6 ± 2.5
5	5.7	10.02 ± 1.51	36.0 ± 0.9	26.1 ± 4.4
6	6.2	24.42 ± 1.16	29.3 ± 3.1	39.1 ± 4.7
7	4.9	32.50 ± 1.50	1.4 ± 0.1	46.1 ± 1.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.16 ผลร่วมของยีสต์สกัดและโซเดียมไนเตรทอัตราส่วน 2.5 กรัม ต่อ 2.5 กรัม

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	95.9 ± 3.0	0.0 ± 0.0
2	6.1	0.18 ± 0.02	60.4 ± 2.9	20.4 ± 0.3
3	5.2	1.94 ± 1.45	64.0 ± 2.5	24.8 ± 3.3
4	5.7	11.75 ± 0.27	43.3 ± 2.5	35.4 ± 1.2
5	5.8	18.80 ± 1.37	23.6 ± 1.5	37.1 ± 2.1
6	6.0	27.70 ± 1.96	17.6 ± 7.5	54.1 ± 7.4
7	5.2	33.46 ± 0.79	1.5 ± 0.0	42.2 ± 4.0

จ.17 ผลร่วมของยีสต์สกัดและโซเดียมไนเตรทอัตราส่วน 2 กรัม ต่อ 3 กรัม

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	95.7 ± 4.5	0.0 ± 0.0
2	6.0	0.20 ± 0.01	59.8 ± 3.3	17.6 ± 5.3
3	5.2	1.11 ± 0.40	63.2 ± 0.7	20.4 ± 0.8
4	5.8	10.89 ± 0.60	49.9 ± 2.5	30.6 ± 7.3
5	5.9	14.58 ± 0.95	27.1 ± 0.3	33.3 ± 3.2
6	5.8	27.76 ± 1.14	16.2 ± 2.3	43.8 ± 7.9
7	5.3	31.32 ± 0.93	1.2 ± 0.1	50.6 ± 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.18 ผลร่วมของยีสต์สกัดและแอมโมเนียมไนเตรทอัตราส่วน 3 กรัม ต่อ 2 กรัม

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	95.2 ± 9.6	0.0 ± 0.0
2	3.5	0.27 ± 0.03	42.2 ± 13.4	23.3 ± 3.9
3	3.9	0.47 ± 0.12	40.4 ± 1.2	35.0 ± 0.8
4	3.6	3.93 ± 0.06	21.2 ± 1.5	33.1 ± 1.9
5	3.8	10.57 ± 0.23	9.4 ± 1.4	48.6 ± 4.4
6	4.5	17.23 ± 1.66	1.9 ± 0.2	60.7 ± 12.1
7	4.5	20.49 ± 4.48	0.8 ± 0.0	75.2 ± 0.0

จ.19 ผลร่วมของยีสต์สกัดและแอมโมเนียมไนเตรทอัตราส่วน 2.5 กรัม ต่อ 2.5 กรัม

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	98.9 ± 5.2	0.0 ± 0.0
2	3.6	0.17 ± 0.01	51.1 ± 3.5	28.8 ± 2.1
3	3.8	0.38 ± 0.01	42.8 ± 3.9	31.3 ± 8.1
4	3.9	2.13 ± 0.01	29.3 ± 1.8	36.5 ± 4.2
5	3.7	9.03 ± 1.78	13.2 ± 2.6	56.1 ± 9.4
6	3.8	17.62 ± 0.37	2.6 ± 0.3	61.9 ± 4.7
7	4.2	18.73 ± 1.62	0.9 ± 0.2	68.8 ± 7.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.20 ผลร่วมของยีสต์สกัดและแอมโมเนียมไนเตรทอัตราส่วน 2 กรัม ต่อ 3 กรัม

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	98.2 ± 2.1	0.0 ± 0.0
2	3.9	0.15 ± 0.01	75.1 ± 2.6	28.3 ± 1.4
3	4.0	0.32 ± 0.03	49.7 ± 5.9	31.4 ± 2.4
4	3.4	1.71 ± 0.14	32.8 ± 3.6	41.8 ± 2.9
5	3.7	7.12 ± 0.12	15.2 ± 1.4	55.9 ± 6.3
6	3.3	12.37 ± 0.48	3.3 ± 0.6	52.5 ± 9.8
7	4.0	15.03 ± 0.68	1.3 ± 0.1	56.9 ± 1.3

จ.21 ผลร่วมของยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตอัตราส่วน 3 กรัม ต่อ 2 กรัม

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	98.3 ± 4.8	0.0 ± 0.0
2	1.9	0.19 ± 0.01	70.9 ± 1.2	31.6 ± 2.2
3	1.9	0.37 ± 0.15	55.6 ± 3.6	28.6 ± 3.5
4	2.0	0.29 ± 0.02	68.4 ± 3.1	35.2 ± 4.7
5	1.8	0.30 ± 0.05	67.6 ± 0.9	41.5 ± 5.0
6	2.2	0.26 ± 0.01	64.1 ± 6.2	36.8 ± 3.4
7	1.9	0.28 ± 0.00	63.1 ± 1.3	49.3 ± 1.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.22 ผลร่วมของยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตอัตราส่วน 2.5 กรัม ต่อ 2.5 กรัม

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	97.8 ± 6.2	0.0 ± 0.0
2	1.8	0.16 ± 0.02	58.6 ± 3.5	29.4 ± 2.7
3	2.0	0.23 ± 0.03	57.0 ± 4.0	17.1 ± 3.8
4	1.9	0.22 ± 0.01	67.2 ± 1.5	31.7 ± 2.8
5	1.8	0.22 ± 0.01	65.2 ± 0.9	55.1 ± 4.3
6	2.1	0.22 ± 0.00	64.1± 0.8	47.8 ± 5.5
7	2.0	0.22 ± 0.01	65.6 ± 3.0	29.0 ± 2.2

จ.23 ผลร่วมของยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟตอัตราส่วน 2 กรัม ต่อ 3 กรัม

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	100.0 ± 2.1	0.0 ± 0.0
2	2.0	0.12 ± 0.00	66.2 ± 1.5	30.6 ± 4.1
3	2.1	0.15 ± 0.00	63.0 ± 2.4	36.0 ± 2.0
4	2.1	0.15 ± 0.01	73.8 ± 1.8	31.6 ± 1.1
5	2.1	0.16 ± 0.00	73.9 ± 1.2	35.0 ± 1.1
6	2.3	0.17 ± 0.00	73.5 ± 2.0	41.1 ± 1.0
7	2.1	0.18 ± 0.00	81.6 ± 1.1	35.5 ± 0.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.24 การทดลองเชื้อ BR-1 เพื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลาย

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)	กิจกรรมอะไมเลส (U/ml ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	98.6 ± 6.5	0.0 ± 0.0	0.000 ± 0.000
2	5.8	0.28 ±0.03	50.6 ± 9.3	19.8 ± 1.0	0.677 ± 0.140
3	5.4	0.21± 0.03	43.0 ± 1.1	23.1 ± 1.4	0.502 ± 0.294
4	5.5	0.28± 0.02	26.3 ± 2.3	30.5 ± 2.2	0.327 ± 0.144
5	5.6	0.38± 0.04	15.0 ± 3.3	39.3 ± 2.3	0.303 ± 0.146
6	5.4	0.46± 0.06	10.1 ± 2.3	42.1 ± 8.6	0.222 ± 0.025
7	5.7	0.68± 0.20	2.9 ± 0.4	50.0 ± 3.9	0.299 ± 0.021

จ.25 การทดลองเชื้อ N-2062 เพื่อเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลาย

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	97.9 ± 8.6	0.0 ± 0.0
2	5.8	1.51 ± 0.20	51.2 ± 6.3	13.8 ± 0.8
3	5.4	8.62 ± 0.82	44.2 ± 2.8	18.1 ± 1.0
4	5.0	14.81 ± 0.74	23.5 ± 3.3	29.6 ± 7.7
5	4.9	21.23 ± 3.07	8.1 ± 1.9	27.2 ± 2.5
6	5.1	30.18 ± 3.32	1.6 ± 0.2	26.0 ± 6.8
7	5.5	25.58 ± 0.82	0.9 ± 0.1	34.0 ± 1.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.26 ผลของอัตราการกวนและให้อากาศที่ 200 rpm. และ 1.5 vvm. ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	95.3 ± 2.3	0.0 ± 0.0
2	5.7	0.07 ± 0.00	81.7 ± 1.6	3.3 ± 0.4
3	5.3	0.07 ± 0.00	67.0 ± 1.2	5.3 ± 0.2
4	5.6	0.09 ± 0.00	57.2 ± 5.5	7.9 ± 0.2
5	5.5	1.57 ± 0.02	57.0 ± 1.1	13.4 ± 0.4
6	5.4	1.97 ± 0.02	53.1 ± 0.7	15.2 ± 0.7
7	5.0	2.29 ± 0.02	50.6 ± 1.6	17.9 ± 0.5

จ.27 ผลของอัตราการกวนและให้อากาศที่ 200 rpm. และ 2.0 vvm. ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	95.5 ± 2.3	0.0 ± 0.0
2	5.7	0.06 ± 0.00	87.0 ± 0.8	5.4 ± 0.2
3	5.5	0.06 ± 0.01	58.4 ± 2.2	4.5 ± 0.2
4	5.7	0.09 ± 0.00	55.8 ± 0.5	9.6 ± 0.2
5	5.6	0.49 ± 0.00	55.2 ± 1.9	16.3 ± 0.3
6	5.5	0.70 ± 0.04	50.9 ± 0.8	23.9 ± 0.3
7	5.0	2.39 ± 0.06	48.8 ± 0.2	18.4 ± 0.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.28 ผลของอัตราการกวนและให้อากาศที่ 400 rpm. และ 1.5 vvm. ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	96.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0
2	5.0	3.39 ± 0.10	61.3 ± 0.3	7.9 ± 0.1
3	5.1	10.48 ± 0.21	40.1 ± 2.9	15.9 ± 0.1
4	5.2	11.47 ± 0.40	35.5 ± 0.6	21.8 ± 0.2
5	4.9	12.57 ± 0.59	24.2 ± 0.3	30.0 ± 0.1
6	5.2	12.22 ± 0.99	32.8 ± 0.8	44.4 ± 0.4
7	5.1	19.01 ± 0.28	24.9 ± 0.2	44.8 ± 0.4

จ.29 ผลของอัตราการกวนและให้อากาศที่ 400 rpm. และ 2.0 vvm. ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	96.9 ± 2.9	0.0 ± 0.0
2	6.0	0.23 ± 0.01	84.2 ± 3.2	16.8 ± 0.2
3	4.9	0.30 ± 0.01	84.6 ± 1.3	20.9 ± 0.2
4	4.6	0.38 ± 0.01	77.3 ± 1.4	21.9 ± 0.1
5	4.5	1.15 ± 0.04	56.1 ± 0.9	21.4 ± 0.3
6	4.7	2.45 ± 0.04	45.1 ± 0.3	27.1 ± 0.1
7	5.3	1.80 ± 0.04	25.9 ± 1.0	32.1 ± 0.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.30 ผลของอัตราการกวนและให้อากาศที่ 600 rpm. และ 1.5 vvm. ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.1	0.00 ± 0.00	94.7 ± 2.0	0.0 ± 0.0
2	5.5	0.09 ± 0.00	46.1 ± 0.6	8.7 ± 0.3
3	5.1	0.14 ± 0.00	44.9 ± 2.0	9.3 ± 0.5
4	5.0	0.83 ± 0.01	36.6 ± 4.7	11.2 ± 0.3
5	3.6	2.17 ± 0.02	44.1 ± 1.9	24.3 ± 0.5
6	5.2	4.19 ± 0.02	37.5 ± 2.6	21.9 ± 0.2
7	5.1	9.11 ± 0.22	27.2 ± 4.3	24.2 ± 0.2

จ.31 ผลของอัตราการกวนและให้อากาศที่ 600 rpm. และ 2.0 vvm. ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (g/L ± S.D.)	น้ำตาลทั้งหมด (g/L ± S.D.)	กลูโคซามีน (mg/g ± S.D.)
0	5.0	0.00 ± 0.00	98.6 ± 2.0	0.0 ± 0.0
2	5.8	0.49 ± 0.02	46.4 ± 7.0	17.2 ± 0.2
3	5.5	1.71 ± 0.03	43.9 ± 1.0	26.1 ± 0.2
4	5.1	3.64 ± 0.06	42.3 ± 7.2	29.0 ± 0.2
5	4.9	4.32 ± 0.07	40.2 ± 1.4	38.2 ± 0.2
6	4.9	6.29 ± 0.27	38.1 ± 1.6	45.8 ± 0.1
7	4.8	15.39 ± 0.09	35.7 ± 1.3	44.5 ± 0.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.32 เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมดของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนต่างๆ

แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน	เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมด
เนื้อสกัด	13.80 ± 0.24^{b}
เคซีนไฮโดรไลเซต	13.70 ± 0.01^{b}
น้ำแช่ข้าวโพด	4.39 ± 0.10^{c}
เปบโตน	14.82 ± 0.20^{a}
ทริปโตน	13.33 ± 0.23^{b}
ยีสต์สกัด	13.53 ± 0.48^{b}

หมายเหตุ ตัวอักษร a b และ c ที่อยู่ในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ทางสถิติจากการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นายเทอดศักดิ์ ขจรบุญ

วัน/เดือน/ปี เกิดเมื่อ 7 มกราคม 2527

ที่อยู่ 54/62 พระยาสุเรนทร์ซอย 2 แขวงพระยาสุเรนทร์
เขตคลองสามวา กทม. 10510

การศึกษา 2544 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนนวมินทรานุทิศ
สตรีวิทยา ๒ เกรดเฉลี่ย 3.15
2548 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
สถาบันเทคโนโลพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เกรดเฉลี่ย 3.14

ผลงานตีพิมพ์ ผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังและแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062 งานประชุมหาดใหญ่วิชาการครั้งที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้