การผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL484 จากน้ำอ้อย

PRODUCTION OF KOJIC ACID BY *Aspergillus oryzae* NRRL484 FROM SUGARCANE JUICE

วรรณี สุวรรณเวช

WANNEE SUWANVESH

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-052-4

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL484 จากน้ำอ้อย

PRODUCTION OF KOJIC ACID BY *Aspergillus oryzae* NRRL484 FROM SUGARCANE JUICE

วรรณี สุวรรณเวช
WANNEE SUWANVESH

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 49418
วัน, เดือน, ปี 20 ก.พ. 2547

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2546

ISBN 974-324-952-4

PRODUCTION OF KOJIC ACID BY *Aspergillus oryzae* NRRL484 FROM SUGARCANE JUICE

WANNEE SUWANVESH

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN APPLIED BIOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2003

ISBN 974-324-952-4

COPYRIGHT 2003
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 จากน้ำอ้อย

PRODUCTION OF KOJIC ACID BY *ASPERGILLUS ORYZAE* NRRL 484 FROM SUGARCANE JUICE

ชื่อนักศึกษา นางสาววรรณี สุวรรณเวช

รหัสประจำตัว 43065204

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.มาลินี	ตันติยาภรณ์	
รศ.ดร.นวลพรรณ	ณ ระนอง	
ผศ.ดวงใจ	โอชัยกุล	
ผศ.นวรัตน์	ปานแย้ม	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 31 ตุลาคม 2546 เวลา 10.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1 ชั้น 4 ห้อง 424

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.บุญวัฒน์ อัตชู)

รักษาราชการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 29 **เดือน** พฤศจิกายน **พ.ศ.** 2546

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 จากน้ำอ้อย
นักศึกษา	นางสาววรรณี สุวรรณเวช
รหัสประจำตัว	43065204
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2546
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 เมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกประกอบด้วย น้ำอ้อย 1 ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 การผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์เขย่าได้กรดโคจิก 24.32 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30° เซลเซียส อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.07 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตกรดโคจิก (Q_p) 1.87 กรัมต่อลิตร.วัน และผลได้ของกรดโคจิกจากน้ำตาล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.36 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตรพบว่าผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดเท่ากับ 45.15 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเร็วของการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม ที่อุณหภูมิ 30° เซลเซียส โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.11 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตกรดโคจิก (Q_p) 4.10 กรัมต่อลิตร.วัน และผลได้ของกรดโคจิกจากน้ำตาล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.57 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล

Thesis Title	PRODUCTION OF KOJIC ACID BY *Aspergillus oryzae* NRRL 484 FROM SUGARCANE JUICE
Student	Miss Wannee Suwanvesh
Student ID	43065204
Degree	Master of Science
Programme	Master of Science in Biotechnology
Year	2003
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr.Nuanphan Naranong

ABSTRACT

Production of kojic acid by *Aspergillus oryzae* NRRL 484 from sugarcane juice as a sole carbon source was studied. The optimum medium for kojic acid production contained 1 l sugarcane juice, 5 g/l $(NH_4)_2SO_4$, 0.25 g/l K_2HPO_4, 0.25 g/l $MgSO_4.7H_2O$ with an initial pH of 6.0. In shake flask culture, kojic acid production was 24.32 g/l on day 13 of the cultivation with the shaking speed of 200 rpm at 30°C. The specific growth rate (μ), productivity (Q_p) and production yield ($Y_{p/s}$) were 0.07 h^{-1}, 1.87 g/l.d and 0.36 g kojic acid/g sugar, respectively. In 10 litres fermentor, the maximum kojic acid production was 45.15 g/l on day 11 of the cultivation at the agitation speed of 400 rpm and the aeration rate of 1.0 vvm at 30°C. The specific growth rate (μ), productivity (Q_p) and production yield ($Y_{p/s}$) were 0.11 h^{-1}, 4.10 g/l.d and 0.57 g kojic acid/g sugar, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เพราะได้รับความอนุเคราะห์จากรศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ได้ให้คำแนะนำและคำปรึกษาตลอดมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ ซึ่งเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษา ความคิดเห็น และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์ ได้แก่ รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ ผศ.ดวงใจ โอชัยกุล และผศ.นวรัตน์ ปานแย้ม

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.เทียนชัย สุวรรณเวช ที่ช่วยให้คำปรึกษา แนะนำ อันเป็นประโยชน์และเป็นกำลังใจสนับสนุนด้านการศึกษาตลอดมา

ขอขอบคุณ นายกรกฎ สุวรรณเวช นายอลงกรณ์ สุวรรณเวช และนายนราธร สุวรรณเวช ที่ช่วยค้นคว้า เรียบเรียง และจัดพิมพ์วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์และสารเคมี ขอขอบคุณ คุณจินตนา บัวหลวง คุณคึกฤทธิ์ ศิลาลาย คุณธีระพันธ์ เจริญสาคร เพื่อนๆ น้องๆ และทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์นี้

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ คุณครู อาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

วรรณี สุวรรณเวช

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญรูป.....X

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....1

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 กรดโคจิก.....3

2.1.1 คุณสมบัติของกรดโคจิก.....3

2.2 การผลิตกรดโคจิก.....4

2.2.1 เชื้อจุลินทรีย์.....4

2.2.2 การสังเคราะห์กรดโคจิก.....8

2.2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก.....9

2.2.4 ประโยชน์ของกรดโคจิก.....14

2.3 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมัก.....16

2.4 น้ำอ้อย.....18

2.5 การใช้ประโยชน์จากน้ำอ้อย.....19

2.5.1 น้ำอ้อยใช้เป็นเครื่องดื่ม.....19

2.5.2 ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำตาล.....19

2.5.3 ใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์.....22

2.6 อ้อย.....24

2.7 พันธุ์อ้อย.....26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย.....28
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....28
3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์.....28
3.1.2 สารเคมี.....28
3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์.....28
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....29
3.3 วิธีการวิจัย.....30
3.3.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484.....30
3.3.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่า.....30
3.3.3 การศึกษาการผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบตช์.....31
3.4 วิธีวิเคราะห์.....31
3.4.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....31
3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิก.....32
3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด.....33
3.4.4 การหาค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดโคจิก.....34
3.4.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....35

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....36
4.1 ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่า.....36
4.1.1 ผลการศึกษาปริมาณของน้ำอ้อยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก.....36
4.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก.....46
4.2 ผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบตช์.....59

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....76

บรรณานุกรม.....77

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....82

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์.....85

ภาคผนวก ค ตารางค่าทางสถิติ.....87

ประวัติผู้เขียน.....89

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงแหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์กรดโคจิก.....10

2.2 แสดงปริมาณของเกลือแร่ในน้ำอ้อย น้ำเชื่อมและกากน้ำตาล.....21

2.3 แสดงปริมาณกรดคาร์บอกซิลิกในน้ำอ้อยสด.....21

2.4 แสดงปริมาณโลหะหนักในน้ำตาลทรายดิบ.....22

2.5 แสดงปริมาณสารเคมีชนิดต่างๆที่เป็นผลพลอยได้ และจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักเอทิลแอลกอฮอล์.....22

4.1 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 100 เปอร์เซ็นต์.....38

4.2 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 75 เปอร์เซ็นต์.....40

4.3 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 50 เปอร์เซ็นต์.....42

4.4 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 25 เปอร์เซ็นต์.....44

4.5 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารที่มีน้ำอ้อยปริมาตรต่างๆกัน.....45

4.6 แสดงค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำอ้อยปริมาตรต่างๆกัน.....45

4.7 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0 กรัมต่อลิตร.....48

4.8 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร.....50

4.9 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร.....52

4.10 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 15 กรัมต่อลิตร.....54

4.11 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 20 กรัมต่อลิตร.....56

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.12 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆกัน...57

4.13 แสดงค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆกัน.....57

4.14 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ผลิต โดย *A. oryzae* NRRL 484 ในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม 61

4.15 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ผลิต โดย *A. oryzae* NRRL 484 ในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม 63

4.16 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ผลิต โดย *A. oryzae* NRRL 484 ในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม 65

4.17 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้ในระดับถังหมัก ที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศในระดับต่างๆกัน.....66

4.18 แสดงค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 เมื่อเลี้ยงในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศระดับต่างๆกัน 66

4.19 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ผลิต โดย *A. oryzae* NRRL 484 ในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม 68

4.20 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ผลิต โดย *A. oryzae* NRRL 484 ในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม 70

4.21 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ผลิต โดย *A. oryzae* NRRL 484 ในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม 72

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.22แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้ในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศระดับต่างๆกัน.....73

4.23แสดงค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *A.oryzae* NRRL 484 เมื่อเลี้ยงในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศระดับต่างๆกัน.....73

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก....4

2.2 แสดงการสังเคราะห์กรดโคจิกจากกลูโคส....8

2.3 แสดงแผนภาพกระบวนการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแล็กโทน....9

2.4 แสดงแผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *A. flavus* สายพันธุ์บี....9

4.1 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 100 เปอร์เซ็นต์....37

4.2 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 75 เปอร์เซ็นต์....39

4.3 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 50 เปอร์เซ็นต์....41

4.4 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 25 เปอร์เซ็นต์....43

4.5 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0 กรัมต่อลิตร....47

4.6 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร....49

4.7 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร....51

4.8 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 15 กรัมต่อลิตร....53

4.9 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 20 กรัมต่อลิตร....55

4.10 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม....60

4.11 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม....62

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

4.12แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม.....64

4.13แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม.....67

4.14แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม.....69

4.15แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม.....71

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดโคจิก (Kojic acid) ตรวจพบครั้งแรกโดยพบว่าเป็นผลิตผลพลอยได้ของการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aspergillus oryzae* บนข้าวนึ่งในสภาพการหมักในอาหารแข็ง ปัจจุบันการผลิตกรดโคจิกมักนิยมระบบการหมักในสภาพอาหารเหลวเป็นส่วนใหญ่ นำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างกว้างขวาง ได้แก่ทางการแพทย์ ใช้เป็นส่วนผสมในยาสลบ ยาขยายหลอดลม ยาแก้อักเสบ และยาแก้ปวด (Anon.1992) ในอุตสาหกรรมอาหารใช้ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (Chen *et al.* 1991) และใช้เป็นสารเสริมกลิ่นรส (Blanc and Akers. 1989) ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ที่ทำให้ผิวขาว (Obara *et al.* 1985) นอกจากนี้ยังป้องกันแสงอัลตราไวโอเลตได้อีกด้วย (Ohyama and Mishima. 1990) และในอุตสาหกรรมเคมีใช้เป็นสารสำหรับวิเคราะห์ธาตุต่างๆ (Baipai *et al.* 1982)

การศึกษาการผลิตกรดโคจิกนี้ ได้เลือกเชื้อรา *Aspergillus oryzae* NRRL 484 เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดโคจิก และที่สำคัญเชื้อรานี้ได้ผ่านการตรวจสอบมาแล้วว่าไม่สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน (สุกัญญา สายธิ. 2541) นอกจากนี้ *A. oryzae* ยังเป็นเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมมาก โดยที่ U.S. Food and Drug Administration (FAD) ประกาศว่า *A. oryzae* เป็นหนึ่งในห้าจุลินทรีย์ที่จัดเป็น "generally reconized as safe" (GRAS) และ *A. oryzae* ยังจัดเป็นเชื้อราที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหารหมัก อาจนับได้ว่าเป็นเชื้อราที่มีความสำคัญเกี่ยวข้องกับอาหารมนุษย์มากที่สุดด้วย (Bennett. 1985) เชื้อ *A. oryzae* NRRL484 สามารถผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณมากในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Ogawa *et al.* 1995) แต่เนื่องจากกลูโคสเป็นวัตถุดิบที่มีราคาสูง จึงเลือกใช้น้ำอ้อยในการผลิตกรดโคจิก เพราะเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่ราคาต่ำกว่ากลูโคส นอกจากนี้ยังหาได้ง่ายและมีทุกฤดูกาล น้ำอ้อยประกอบด้วยธาตุอาหารที่มีประโยชน์หลายชนิดเหมาะแก่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จึงทำการศึกษาวิธีการผลิตโดยใช้วัตถุดิบจากการเกษตร เพื่อลดต้นทุนการผลิต และขยายกำลังการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากอาหารน้ำอ้อยสด

1.2.2 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

1.2.3 เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่ากับถังหมักแบบแบตช์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีน้ำอ้อยสดเป็นแหล่งคาร์บอน

1.3.2 ขยายกำลังการผลิตกรดโคจิกจากฟลาสก์แบบเขย่าเป็นการผลิตในถังหมักแบบแบตช์

บทที่ 2
หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

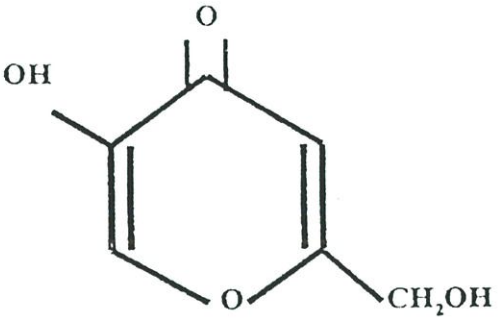
2.1 กรดโคจิก (Kojic acid)

กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นกรดอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการสร้างและสลายทุติยภูมิ (Secondary metabolism) มีชื่อทางเคมีว่า 5 – hydroxy – 2 – hydroxymethyl – γ – pyrone จุลินทรีย์หลายชนิดผลิตกรดโคจิกได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนและใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งอาหาร Saito (1907) รายงานการค้นพบกรดโคจิกเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1907 และสามารถแยกสารที่มีลักษณะเป็นผลึกได้จากการเจริญของเส้นใยของเชื้อ *Aspergillus oryzae* บนข้าวนึ่ง (Steamed rice) สารนี้คือกรดเบต้ารีซอร์ซิลคาร์บอกซิลิก (B – resorcylcarboxylic acid) หลังจากนั้นไม่นาน Yabuta (1913)ได้ตรวจสอบสารนี้อย่างจริงจังแล้ว ตั้งชื่อว่า " กรดโคจิก " และกำหนดองค์ประกอบที่แน่นอนของกรดโคจิกใน ค. ศ. 1924 การสังเคราะห์กรดโคจิกทางเคมีจากน้ำตาลกลูโคสทำสำเร็จในปี ค.ศ. 1930 (Maurer. 1930) ตั้งแต่นั้นมามีงานทดลองเกี่ยวกับการสังเคราะห์กรดโคจิกทางชีวภาพออกมามาก และมีการตีพิมพ์เผยแพร่คุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพของกรดโคจิกออกมามากมาย

2.1.1 คุณสมบัติของกรดโคจิก

กรดโคจิกเป็นสารประกอบของไพโรน (Pyrone) ที่ขาดกลุ่มคาร์บ็อกซิล กลุ่มไฮดรอกซิลฟีนอลิกทำให้กรดโคจิกมีคุณสมบติเป็นกรดอ่อน และสามารถรวมกับโลหะเช่น โซเดียม แบเรียม แคลเซียม โคบอลต์ ทองแดง นิเกิล เหล็ก แมงกานีส ตะกั่ว สังกะสี และ อะลูมิเนียม เกิดสารประกอบจำพวกเกลือ นอกจากนี้อนุพันธ์หลายชนิดของสารประกอบไฮดรอกซิลสามารถเตรียมได้จากกรดโคจิก เช่น อีเทอร์ และเอสเทอร์ต่างๆ โมเลกุลของกรดโคจิกประกอบขึ้นด้วยคาร์บอน 6 อะตอม ไฮโดรเจน 6 อะตอม และออกซิเจน 4 อะตอม ดังนั้นกรดโคจิกมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_6O_4$ (Bajpai *et al.* 1982) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

Bentley (1957) รายงานว่าผลจากการศึกษาทาง x – ray investigation พบว่ากรดโคจิกบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผลึกทรงปริซึมรูปเข็มไม่มีสี ผลึกละลายได้ง่ายในน้ำ (3.95 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรที่ 20 องศาเซลเซียล) กรดโคจิกมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 142.11 และมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 153 – 154 องศาเซลเซียส การทำให้กรดโคจิกบริสุทธิ์ทำได้โดยการตกผลึกซ้ำ (Recrystallization) ในอะซีโตน เอทานอล – อีเทอร์ เมทานอล และเอทิลอะซิเตท หรือการทำให้บริสุทธิ์ภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 150 – 200 องศาเซลเซียส



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก
ที่มา : Bajpai *et al.*(1982)

2.2 การผลิตกรดโคจิก

2.2.1 เชื้อจุลินทรีย์

Bajpai *et al.* (1982) รายงานว่ากรดโคจิกเริ่มผลิตครั้งแรกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* และต่อมาได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้เชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้คือ *A. oryzae A. gymnosardae. A. flavus A. awamori A. clavatus A. fumigatus A. giganteus A. albus, A. nidulans A. parasiticus A. effusus A. tamarii A. luteovirescens A. lutescens A. wentii* และ *A. alliaceus* เป็นต้น

กรดโคจิกส่วนมากผลิตจากเชื้อราโดยใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน และเชื้อต้องการอากาศในการเจริญ (Bentley. 1957) Parrish (1996) ทำการศึกษาการผลิตสารอะฟลาทอกซินและกรดโคจิกจากเชื้อราสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* โดยทำการศึกษาสายพันธุ์ของ *Aspergillus* ได้แก่ *A. clavatus A. effusus A. flavus A. fumigatus A. nidulans A. oryzae A. parasiticus A.tamarii* และ *A. ustus* พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดโคจิก และมีเชื้อรา 2 สายพันธุ์ที่ ผลิตอะฟลาทอกซิน คือ *A. flavus* และ *A. parasiticus* ส่วนสายพันธุ์ของ *Penicillium* ที่ทำการศึกษาได้แก่ *P. citrinum P. griseofulvum P. purpruogenum* และ *P. rubrum* พบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์ผลิตกรดโคจิกได้ และไม่มีสายพันธุ์ใดที่ผลิตสารอะฟลาทอกซินเลย จึงสรุปว่าทุกสายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกได้ไม่จำเป็นต้องผลิตสารอะฟลาทอกซินได้ทั้งหมด

Bassapa *et al.* (1970) พบว่าการสังเคราะห์กรดโคจิกและสารอะฟลาทอกซินมีวิถีการสังเคราะห์แยกออกจากกันและกรดโคจิกไม่เป็นสารตัวกลางที่เกิดขึ้นระหว่างการสังเคราะห์สารอะฟลาทอกซิน โดยการทดลองได้ใช้เซลล์ระยะพักตัว (Resting cells) ของเชื้อ *Aspergillus flavus* และทำการทดสอบโดยใช้ดี–ไซโลสและเอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกรดโคจิก

เกิดขึ้นแต่ไม่มีสารอะฟลาทอกซินเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตกรดโคจิกและอะฟลาทอกซินนั้นขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าพีเอช อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวหน้าต่อปริมาตร (Surface volume ratio) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และองค์ประกอบของสารอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น

Lin *et al.* (1976) ทำการเพาะเลี้ยง *Aspergilus parasiticus* UNBF A12 พบว่าผลิตกรดโคจิก และสารอะฟลาทอกซินจากอาหารเหลวได้ในปริมาณสูง ซึ่งเชื้อสายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกและสารอะฟลาทอกซินในปริมาณสูงเช่นนี้แยกมาได้จากอากาศที่ตำบล Federal ในประเทศบราซิล การศึกษาค่าพีเอช ที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิก และสารอะฟลาทอกซิน พบว่าพีเอชเท่ากับ 4.5 และ 6.2 ผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณสูง แต่ค่าพีเอช เท่ากับ 4.0 และ 4.5 ผลิตสารอะฟลาทอกซินได้ปริมาณสูง สำหรับค่าพีเอช เท่ากับ 5.1 ผลิตสารอะฟลาทอกซินได้น้อยลง และค่าพีเอช เท่ากับ 6.8 หรือสูงกว่า 6.8 ไม่ผลิตสารอะฟลาทอกซินเลย เมื่อทำการแยกสปอร์เดี่ยวเพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อ จากอาหารที่เรียกว่า YES ซึ่งประกอบด้วยยีสต์สกัด 2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปรับค่าพีเอช ให้มีค่าแตกต่างกัน แล้วพบว่าการผลิตกรดโคจิกและสารอะฟลาทอกซินได้ปริมาณกรดโคจิกอยู่ระหว่าง 11.17 - 20.93 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ปริมาณสารอะฟลาทอกซินมีปริมาณเฉลี่ยเท่ากับ 15.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Tadera *et al.* (1985) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อราสกุล *Aspergillus* สายพันธุ์ *A. oryzae* K *A. oryzae* IAM 2024 *A. oryzae* IFO 5239 *A. flavus* IAM 2001 และ *A. tamarii* IFO 4099 พบว่า *A. flavus* IAM 2001 สามารถผลิตกรดโคจิกได้มากที่สุดเท่ากับ 17.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เปปโตน 6 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.01 กรัมต่อลิตร เฟอริกคลอไรด์ 0.01 กรัมต่อลิตร และไซคาซิน 2 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 4.5

Kwak and Rhee (1992a) ได้ทำการปรับปรุงการผลิตกรดโคจิกโดยการตรึงเส้นใยของ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดโฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ที่ประกอบด้วยแมงกานีสซัลเฟต 2 เปอร์เซ็นต์ เฟอรัสซัลเฟต 2 เปอร์เซ็นต์ และซิงค์ซัลเฟต 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นปรับพีเอชของอาหารเป็น 6.0 ด้วย 2 N NaOH แล้วพบว่า ถึงแม้ว่าเส้นใยของเชื้อชนิดนี้จะถูกตรึงไว้ ก็ยังสามารถผลิตกรดโคจิกได้ นอกจากนี้พบว่าแหล่งไนโตรเจนและขนาดของเซลล์ที่ถูกตรึงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตกรดโคจิก ขนาดของเซลล์ที่ถูกตรึงมีผลต่อการผลิตกรดโคจิก โดยเซลล์ที่ถูกตรึงที่มีขนาดเล็กจะมีการผลิตกรดโคจิกสูงกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงที่มี

ขนาดใหญ่ และยังพบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน

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

Ogawa *et al.* (1995) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยเลี้ยงบนเมมเบรน (Membrane – Surface Liquid Culture : MSLC) ในอาหาร 1 ลิตร ที่มีองค์ประกอบคือกลูโคส 100 กรัม ยีสต์สกัด 0.5 – 1.0 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.5 กรัม และเฟอรัสฟอสเฟต 0.01 กรัม ที่พีเอช 6.0 จากการทดลองเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยการเลี้ยงบนเมมเบรนกับการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า พบว่าการเลี้ยงบนเมมเบรนผลิตกรดโคจิกได้มากกว่าการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า โดยการเลี้ยงบนเมมเบรนผลิตกรดโคจิกสูงสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าได้กรดโคจิกสูงสุดเพียง 20.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิก โดยเลี้ยงบนเมมเบรนที่มีกระบวนการหมักแตกต่างกัน 3 แบบ คือ การหมักแบบแบตช์ (Batch MSLC) การหมักแบบกึ่งแบตช์ซึ่งมีการเติมสารอาหารลงไปโดยไม่มีการถ่ายออก (Fed batch MSLC) และการหมักแบบกึ่งแบตช์ ที่มีการเติมอาหารซ้ำ (Repeated fed batch)เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า พบว่าการหมักแบบกึ่งแบตช์ที่มีการเติมอาหารซ้ำให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 14.2 กรัมต่อลิตรต่อวัน และการเลี้ยงแบบเขย่าให้ปริมาณกรดโคจิกน้อยที่สุดเท่ากับ 1.6 กรัมต่อลิตร

Ariff *et al.* (1996) ศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* Link 44-1 จากอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักที่มีการกวนขนาด 2 ลิตร โดยเปลี่ยนแปลงปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารระดับต่าง ๆ กัน (เปลี่ยนแปลงอัตราการให้อากาศ) จำกัดอัตราการกวนคงที่เท่ากับ 600 รอบต่อนาที ขั้นตอนที่หนึ่งทำการทดลองโดยควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร 3 ระดับ คือ30 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการผลิตกรดโคจิกไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร (13.5 กรัมต่อลิตร) เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกในการหมักที่ควบคุมออกซิเจนที่ละลายในอาหารเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์กับการผลิตกรดโคจิก

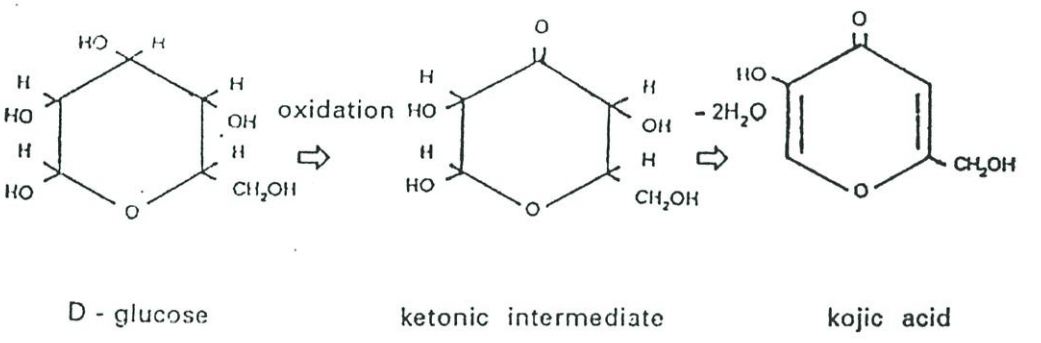
ในการหมักที่ไม่ควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร พบว่าเมื่อลดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ การผลิตกรดโคจิกลดลงอย่างมีนัยสำคัญถึงแม้ว่าจำนวนเซลล์จะเพิ่มขึ้น ขั้นตอนที่สองควบคุมระดับออกซิเจนที่ละลายในอาหารอยู่ระดับสูงมาก (80 เปอร์เซ็นต์) ระหว่างที่เซลล์เจริญอย่างรวดเร็วแล้วลดระดับออกซิเจนที่ละลายในอาหารลงมาอยู่ระดับต่ำ (30 เปอร์เซ็นต์) ระหว่างที่มีการผลิตกรดโคจิก พบว่าการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้น (28.9 กรัมต่อลิตร) ประมาณ 2 เท่าของการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร อย่างไรก็ตามเมื่อเติมยีสต์สกัดอย่างต่อเนื่องในการเพาะเลี้ยงขั้นตอนที่สอง เซลล์เจริญอย่างรวดเร็วระหว่างที่ผลิตกรดโคจิกและปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้สูงสุดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การผลิตกรดโคจิกทางชีวภาพให้ได้ปริมาณสูงต้องให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารระดับสูงในระยะที่เซลล์เจริญอย่างรวดเร็วและไม่เติมยีสต์สกัดในระยะผลิตกรดโคจิก ดังนั้นจะต้องควบคุมระดับออกซิเจนที่ละลายในอาหารให้อยู่ระดับสูงมากระหว่างที่เซลล์เจริญอย่างรวดเร็วและไม่เติมแหล่งไนโตรเจนในระยะผลิตกรดโคจิก ขณะเดียวกันก็ให้ออกซิเจนที่ละลายในอาหารระดับต่ำในระยะที่ผลิตกรดโคจิกด้วย

Wakisaka *et al.*(1998) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยเลี้ยงบนเมมเบรน SE 20 (Membrane – Surface Liquid Culture : MSLC) ที่ประกอบด้วยโพลีซัลโฟนขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.2 ไมโครเมตร ซึ่งเป็นเมมเบรนที่มีสปอร์ลอดผ่านเข้าไปได้ แต่เส้นใยลอดผ่านเข้าไปไม่ได้ ในอาหาร 1 ลิตรที่มีองค์ประกอบคือกลูโคส 100 กรัม ยีสต์สกัด 1 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 0.25 กรัม พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกจากการเลี้ยงบนเมมเบรนกับการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า พบว่าการเลี้ยงบนเมมเบรนผลิตกรดโคจิกได้มากกว่าจากการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า โดยการเลี้ยงบนเมมเบรนที่มีพื้นที่ผิว 220 ตารางเซนติเมตร แบบแบตช์ผลิตกรดโคจิกสูงสุด 14 45 และ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 5 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ทำการเพาะเลี้ยง 15 15 และ 27 วันตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าได้กรดโคจิกสูงสุดเพียง 24 และ 22 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ทำการเพาะเลี้ยง 15 และ 18 วันตามลำดับ หลังจากนั้นทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยการเลี้ยงบนเมมเบรนแบบต่อเนื่อง (Continuous MSLC) พบว่าเซลล์ติดอยู่บนผิวหน้าเมมเบรนทำให้สามารถเพาะเลี้ยงได้นานกว่า 70 วัน เมื่ออัตราการเติมอาหารที่มีกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ยเท่ากับ 30 มิลลิลิตรต่อวัน ความเข้มข้นของกรดโคจิกในระยะคงตัวอยู่ระหว่าง 45 – 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Futamura *et al.* (2001 a) ได้นำเชื้อ *Aspergillus oryzae* ATCC 22788 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้ N-Methyl-N′-nitoro-N-nitrosoguanidine พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ *A. oryzae* สายพันธุ์ MK 107-39 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 28 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์แบบเขย่าที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้กรดโคจิกสูงกว่าสายพันธุ์เดิม 7.7 เท่า

2.2.2 การสังเคราะห์กรดโคจิก

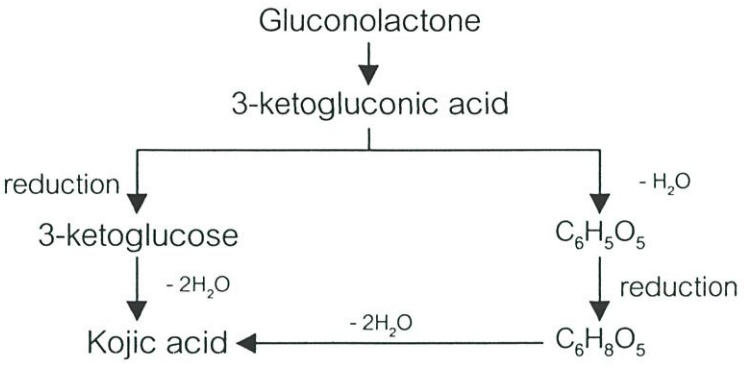
กรดโคจิกมีโครงสร้างคล้ายกับสารโมโนแซ็กคาไรด์เนื่องจากสังเคราะห์ได้จากน้ำตาลกลูโคส (D – glucose) การสังเคราะห์เริ่มจากกลูโคสถูกออกซิเดชันเป็นสารคีโตนิกอินเทอร์มิเดียด จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิกโดยการกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 2 โมเลกุล ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 แสดงการสังเคราะห์กรดโคจิกจากกลูโคส
ที่มา : Bajpai *et al.* (1982)

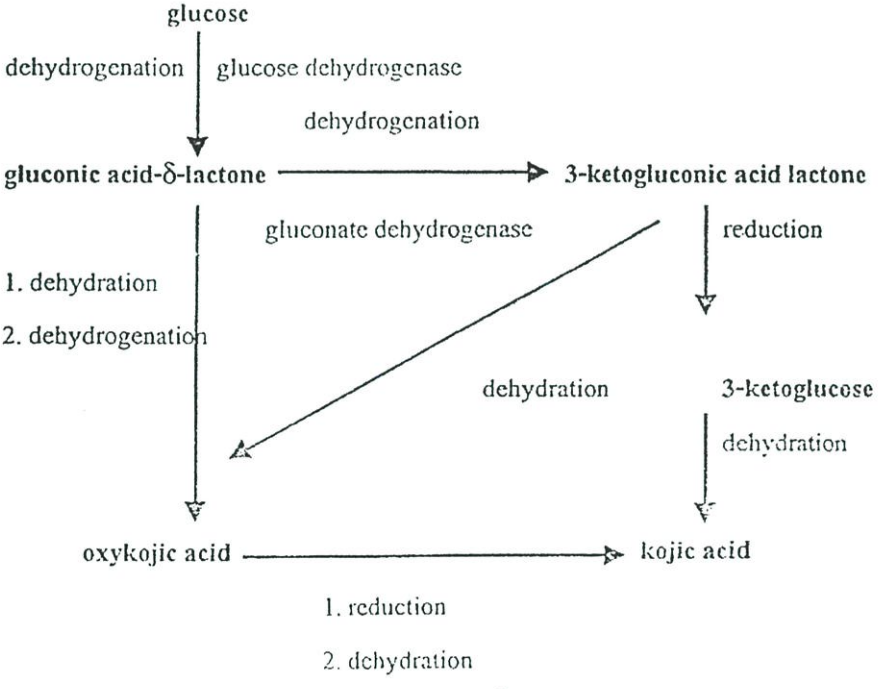
Arnteins and Bentley (1953) รายงานว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นสารเริ่มต้นในกระบวนการผลิตกรดโคจิกจากการเปลี่ยนกลูโคสเป็นสาร 3 - คีโทกลูโคส (3 – ketoglucose) โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็นกรดโคจิกโดยเกิดการกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 2 โมเลกุล นอกจากนั้นยังพบว่ากลูโคโนแล็กโทน (Gluconolactone) เป็นสารเริ่มต้นในกระบวนการผลิตกรดโคจิกได้ โดยการเปลี่ยนไปเป็น 3 – คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทน (3 – ketogluconicacidlactone) แล้วจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิกได้ 2 ทาง คือ วิถีที่ 1 เปลี่ยน 3 – คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทนเป็น 3 – คีโตกลูโคส ก่อนแล้วจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิก วิถีที่ 2 สาร 3 – คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทน จะถูกกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 1 โมเลกุล โดยการเกิดรีดักชันและเกิดการกำจัดโมเลกุลของน้ำอีก 1 โมเลกุล ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.3

Bajpai *et al.* (1981) ได้ทำการศึกษาวิถีการสังเคราะห์กรดโคจิกเมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นจากเชื้อ *Aspergillus flavus* สายพันธุ์บี พบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างกระบวนการผลิตกรดโคจิก ได้แก่ เฮกโซไคเนส (Hexokinase) กลูโคส – 6 – ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase) 6 – ฟอสเฟตกลูโคเนต ดีไฮโดรจีเนส (6 – phosphategluconate dehydrogenase) กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase) และกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส (Gluconate dehydrogenase) เอนไซม์ดังกล่าวสัมพันธ์กับกระบวนการผลิตกรดโคจิกดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.3 แสดงแผนภาพกระบวนการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแล็กโทน

ที่มา : Arnteins and Bentley (1953)



รูปที่ 2.4 แสดงแผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *A. flavus* สายพันธุ์บี

ที่มา : Bajpai *et al.* (1981)

2.2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก

2.2.3.1 แหล่งคาร์บอน

ธาตุที่มีมากที่สุดในเซลล์จุลินทรีย์ คือ ธาตุคาร์บอน ซึ่งมีมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง การเตรียมสูตรอาหารโดยอย่างน้อยที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จะต้องมีปริมาณธาตุต่างๆไม่น้อยกว่าปริมาณของธาตุที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์จุลินทรีย์ (บุษบา ยงสมิทธ์. 2540)

ธาตุคาร์บอนมีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50 – 55 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน และต้องเลือกใช้แหล่งคาร์บอนให้เหมาะสม (Stanbury *et al.* 1995)

ตารางที่ 2.1 แสดงแหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์กรดโคจิก

จำนวนอะตอมคาร์บอน	สารประกอบ
2	เอทานอล ไกลซีน โซเดียมอะซีเตต
3	1,3-ไดไฮดร็อกซี – 2 – โพรพาโนน กลีเซอรัลดีไฮด์ กลีเซอรอล โซเดียมอะซีเตต โซเดียมไพรูเวต
4	กรดทาร์ทาริก
5	ไรบิทอล อะราบิโนส ไซโลส
6	2– ดีอ็อกซีกลูโคส ฟรักโทส กาแลกโทส กรดกลูโคนิก กลูโคโนแล็ก-โทน กลูโคสอิโนซิทอล ซอร์บิทอล
7	กรดคิวนิก กรดซิกิมิค
12	กรดแลกโตบินิก แล็กโทส มอลโทส ซูโครส ทรีฮาโลส
18	แรฟฟีโนส
6n	เด็กซ์ตริน อินูลิน เปปติน แป้ง

ที่มา : Bajpai *et al.* (1982)

Challenger *et al.* (1929) ได้ทำการศึกษาการใช้น้ำตาล 3 ชนิด คือ อะราบิโนส ไซโลส และกลูโคส ในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* โดยใช้ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนประกอบในอาหาร K. (Kinoshita's basal salt medium : K medium) ประกอบด้วยโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมไนเตรท 0.4 กรัมต่อลิตร

May *et al.* (1931) ทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลเด็กซ์โทรสที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ดังนี้คือ 10 15 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร ไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียม

ไนเตรท 1.125 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลเด็กซ์โทรส 20 เปอร์เซ็นต์ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 48.2 เปอร์เซ็นต์ Bentley (1957) ได้นำสูตรอาหารดัดแปลงจาก Czapek - Dox liquid medium มาเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* เพื่อผลิตกรดโคจิกโดยมีน้ำตาลกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกรดโคจิกเกิดขึ้น 7 – 12 กรัมต่อลิตร

Davis (1962) ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา *Aspergillus flavus* NTCC 10124 จากน้ำมันถั่วลิสงเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ค่าพีเอช อุณหภูมิ เวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง แหล่งไนโตรเจน อัตราส่วนของพื้นที่ผิวหน้าต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และความเข้มข้นของโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตคือค่าพีเอช 5.0 ถึง 9.0 อุณหภูมิ 20 ถึง 40 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง 10 วัน ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วลิสง 3.4 เปอร์เซ็นต์ หรือสูงกว่านี้ และอัตราส่วนของพื้นที่ผิวหน้าต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.56 สภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดโคจิกคือค่าพีเอช 7.0 ถึง 8.0 อุณหภูมิ 30 ถึง 35 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง 19 วัน ความเข้มข้นของน้ำมันถั่วลิสง 3.5 เปอร์เซ็นต์ และอัตราส่วนของพื้นที่ผิวหน้าต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.56 การใช้เกลืออนินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวไม่สามารถผลิตกรดโคจิกได้ แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตกรดคือ ยีสต์สกัด เคซีน เปปโตน อะลานีน ทริปโตเฟน กรดกลูตามิก และโพรลีนปริมาณเล็กน้อย กรดอะมิโนและเอไมด์ชนิดอื่นไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก ถึงแม้ว่าบางชนิดจะทำให้การเจริญเติบโตดี การใส่โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อจะยับยั้งการผลิตกรดโคจิก โดยโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 เปอร์เซ็นต์ หรือสูงกว่านี้จะทำให้เชื้อราไม่สามารถผลิตกรดโคจิกเลย นอกจากนี้ยังยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราเล็กน้อยด้วย

Wei *et al.* (1991) ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus candidus* ATCC 44054 ในอาหารเหลวที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ อาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek – Dox liquid medium ซึ่งใช้กลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนอาหารของ Tadera ซึ่งใช้กลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน และอาหาร Yeast Extract Sucrose (YES) ซึ่งใช้ซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที พบว่าผลิตกรดโคจิกสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร YES ได้ 57 – 59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7– 9 วัน และไม่พบสารอะฟลาทอกซินเกิดขึ้น

Rosfarizan *et al.* (1998) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อราจากธรรมชาติที่สามารถผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยทำการทดลองคัดเลือกเชื้อราที่สามารถเจริญในอาหารที่มีแป้ง (Soluble starch) จากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ ดอกไม้ อาหารหมัก ผลไม้ น้ำพุร้อนและดิน แล้วนำเชื้อที่

คัดเลือกได้ไปเลี้ยงในอาหารสำหรับสร้างกรดโคจิก ผลการทดลองพบว่าเชื้อราสายพันธุ์ S 33 – 2 ซึ่งแยกจากดอกไม้ Morning glory flower ซึ่งเป็นไม้เถาชนิดหนึ่งตระกูลผักบุ้งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Bixa orellana* สามารถเจริญบนอาหารแป้งและสร้างกรดโคจิกได้ปริมาณมาก เมื่อนำเชื้อ S 33 – 2 ไปจัดจำแนกสายพันธุ์พบว่าเป็น *Aspergillus flavus* หลังจากทดลองเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่ประกอบด้วยยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กันได้แก่ แป้งสาคู แป้งมันฝรั่ง และแป้งข้าวโพดพบว่าเชื้อ S 33 – 2 สามารถเจริญได้ดีในแป้งทุกชนิด แต่สร้างกรดโคจิกได้ดีที่สุดในแป้งข้าวโพดซึ่งให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 12.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้แป้งข้าวโพด 75 กรัมต่อลิตร

Mohamad *et al.*(2002) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกให้ได้ปริมาณสูงสุดโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* Link 44-1 เมื่อใช้แป้งสาคูเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 วันในถังหมักขนาด 8 ลิตรแบบแบตช์ (Batch fermentation) และแบบกึ่งแบตช์ (Fed – batch fermentation) การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์กำหนดให้ความเข้มข้นของแป้งสาคูเริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร พบว่าผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 4.51 กรัมต่อลิตรในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงแบบกึ่งแบตช์กำหนดระยะเวลาและปริมาณอาหารที่เติมแตกต่างกัน 2 แบบ ความเข้มข้นของแป้งสาคูเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร หลังจากเพาะเลี้ยง 2 วันเติมแป้งสาคูความเข้มข้น 140 กรัมต่อลิตร แบบที่ 1 เติมแป้งสาคูปริมาตร 1 ลิตรเพียงครั้งเดียว แบบที่ 2 เติมแป้งสาคูปริมาตร 200 มิลลิลิตรทุกๆ 2 วัน รวม 5 ครั้ง พบว่าแบบที่ 1 ผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 16.43 กรัมต่อลิตรในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณกรดโคจิกสูงกว่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ประมาณ 4 เท่า แบบที่ 2 ผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 31.07 กรัมต่อลิตรในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการปรับปรุงการผลิตกรดโคจิกทำได้โดยเติมแป้งสาคูความเข้มข้น 140 กรัมต่อลิตรปริมาตรเล็กน้อยทุกๆ 2 วันของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งแบตช์ การเพาะเลี้ยงแบบนี้สามารถควบคุมปริมาณก๊าซออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักให้อยู่ระดับสูง (40 – 50 เปอร์เซ็นต์) ระหว่างระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตสูง เพราะใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ใช้ย่อยแป้ง และใช้ผลิตเส้นใยที่ช่วยให้สังเคราะห์กรดโคจิกได้สูงกว่า การควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 3 ตลอดการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งแบตช์ การผลิตกรดโคจิกลดลง (7.26 กรัมต่อลิตร)อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อกำหนดค่าพีเอชเท่ากับ 4 ระหว่างระยะการเจริญเติบโตและค่าพีเอชเท่ากับ 3 ระหว่างระยะการผลิตกรดโคจิก พบว่าผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณต่ำมากคือเท่ากับ 0.93 กรัมต่อลิตร การเพาะเลี้ยง *A. flavus* Link 44–1 เพื่อผลิตกรดโคจิกปริมาณสูง (31 กรัมต่อลิตร) ต้องไม่ควบคุมค่าพีเอชตลอดเวลาการเพาะเลี้ยง หรือไม่ควบคุมค่าพีเอชระหว่างระยะเจริญเติบโต แต่ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 3 ระหว่าง

ระยะการผลิตกรดโคจิก การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของการเพาะเลี้ยงระหว่างระยะการเจริญเติบโตเป็นสิ่งสำคัญที่สุด และมีผลต่อการผลิตกรดโคจิก

2.2.3.2 **แหล่งไนโตรเจน**

ในการผลิตกรดโคจิกแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมาจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัด และ ทริปโตน ส่วนแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ เกลือแอมโมเนียม และเกลือไนเตรท เช่น แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรท เป็นต้น เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มีราคาสูง ดังนั้นจึงมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแทน จากการผลิตกรดโคจิกส่วนมากใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนหรือมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์อื่น ในการผลิตกรดโคจิกจากอาหารสูตรดัดแปลงของ Czapek – Dox – liquid medium ซึ่งมีส่วนประกอบของยีสต์สกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียมไนเตรท 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน (Bentley.1957)

May *et al.* (1931) ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันคือ แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต [$(NH_4)_2HPO_4$] แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) และโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.75 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรท 0.7 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดคือ 18.6 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรท 7 ระดับ คือ 0.142 0.281 0.563 0.75 1.125 2.250 และ 4.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรทเข้มข้น 0.563 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด30.2 เปอร์เซ็นต์

Ogawa *et al* (1995) ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนเมมเบรนหรือวิธี MSLC เปรียบเทียบกับการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดที่มีความเข้มข้นต่างกันดังนี้ คือ 0.05 0.10 0.25 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเลี้ยงเชื้อราบนเมมเบรนให้กรดโคจิกสูงสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 10 จากการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้น 0.05 –1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในอาหารที่มียีสต์สกัด 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 20.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 12

Futamura *et al.* (2001a) ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* MK107-39 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันคือ เมล็ดฝ้ายบด กลูเทน ถั่วเหลืองบด จมูกข้าวสาลี และเมล็ดทานตะวัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน พบว่าเมื่อใช้จมูกข้าวสาลี 7 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 30 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้

ยังแปรผันความเข้มข้นของจมูกข้าวสาลีที่ทำการศึกษาอยู่ระหว่าง 0 - 3.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้น 1.3 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลได้ของกรดโคจิกสูงสุด

Futamura *et al* (2001b)ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* MK107-39 เพื่อผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบairlift ขนาด 3 ลิตร ใช้อาหารกลูโคสกับจมูกข้าวสาลี และเพาะเลี้ยงในถังหมัก พบว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบ airlift ไม่มีการผลิตกรดโคจิก แต่การเพาะเลี้ยงในถังหมักผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณสูง ทำการคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบ airlift ประกอบด้วยแป้งข้าวโพดดิบที่ถูกย่อยบางส่วนและน้ำแช่ข้าวโพดปริมาณเล็กน้อย สามารถผลิตกรดโคจิกได้ประมาณ 40 กรัมต่อลิตรซึ่งเท่ากับปริมาณที่ผลิตได้เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีกลูโคสกับจมูกสาลี อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมที่สุดสำหรับถังหมักแบบ airlift เท่ากับ 2.0 วีวีเอ็ม ราคาแป้งข้าวโพดดิบที่ถูกย่อยบางส่วนและน้ำแช่ข้าวโพดที่ใช้เลี้ยงในถังหมักแบบ airlift ต่ำกว่าราคากลูโคสกับจมูกข้าวสาลีที่ใช้เลี้ยงในถังหมัก 40 เปอร์เซ็นต์ ค่าใช้จ่ายด้านพลังงานของการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้แป้งข้าวโพดดิบที่ถูกย่อยบางส่วนและน้ำแช่ข้าวโพดในถังหมักแบบ airlift น้อยกว่า 1 ใน 4 ของค่าใช้จ่ายด้านพลังงานเมื่อใช้กับกลูโคสกับจมูกข้าวสาลีในถังหมัก

2.2.4 ประโยชน์ของกรดโคจิก

2.2.4.1 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

Uchino *et al.* (1988) ศึกษาปฏิกิริยาสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นกับบะหมี่ดิบ (ยังไม่ได้ผ่านการปรุง) ลักษณะเป็นจุดด่าง สาเหตุเกิดจากเอนไซม์ไทโรซิเนส (Tyrosinase) ในรำข้าวที่ปนเปื้อนอยู่ในแป้งข้าวสาลีหรือแป้งหมี่ จึงทำการวิจัยเพื่อคัดเลือกสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล ได้แก่ กรดโคจิกที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* NF–8701 และ *Aspergillus sojae* NF–8711 กลูตาไทโอน แอลฟาโทคอฟเฟอรอล กรดแอสคอร์บิค และซิสเทอิน แล้วใส่ในส่วนประกอบของบะหมี่ที่ประกอบด้วย แป้งข้าวสาลี 100 กรัม โพแทสเซียมคาร์บอเนต 0.6 กรัม โซเดียมคาร์บอเนต 0.48 กรัม และน้ำ 34 กรัม วิเคราะห์ผลโดยนับจำนวนจุดด่างในส่วนผสมของบะหมี่จากกล้องจุลทรรศน์ วัดกิจกรรมการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน และวัดกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนส พบว่าสารที่ต่อต้านการเกิดจุดด่างมีเพียงชนิดเดียวได้แก่กรดโคจิก กิจกรรมการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันพบในสารทุกชนิด สารที่มีกิจกรรมการต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันสูงสุด ได้แก่ แอลฟาโทคอฟเฟอรอล รองลงมาได้แก่กรดโคจิก สารที่มีกิจกรรมต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันต่ำสุดได้แก่ กรดแอสคอร์บิค สารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในรำข้าวสาลีสูงสุดได้แก่ กรดโคจิก รองลงมาได้แก่ กลูตาไทโอน และสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสในรำข้าวสาลีต่ำสุดได้แก่ แอลฟาโทคอฟเฟอรอล

Chen *et al.* (1991) รายงานว่านักเทคโนโลยีอาหารประสบปัญหาสำคัญในเรื่องผลผลิตทางการเกษตรมีสีคล้ำ สาเหตุเกิดจากเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส (PPO, EC 1.14.18.1) ถึงแม้ว่าผลผลิตที่เกิดสีคล้ำจะไม่มีอันตรายต่อผู้บริโภค แต่ก็ทำให้การยอมรับของผู้บริโภคลดลง และได้ทำการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสของกรดโคจิกในเห็ด มันฝรั่ง แอปเปิล กุ้งฝอย และกุ้งใหญ่โดยใช้วิธี polarographic พบว่ากรดโคจิกยับยั้งภาวะที่มีการสะสมของเมลานินอย่างผิดปกติ โดยแย่งจับกับออกซิเจนที่ใช้เป็นสับสเทรตอย่างหนึ่งในปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล วิธี Spectrophotometric และวิธี Chromatographic ยืนยันว่ากรดโคจิกสามารถลดการเปลี่ยนสารประกอบควิโนนเป็นไดฟีนอล จึงเป็นการป้องกันการเกิดเม็ดสี (เมลานิน) ได้

Wei *et at.* (1991) พบว่ากรดโคจิกสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลหรือปฏิกิริยาบราวนิ่ง (Browning reaction) ซึ่งเกิดขึ้นในผัก ผลไม้ที่มีรอยตำหนิเสียหายที่เกิดจากรอยช้ำ รอยปอก หั่น หรือแช่แข็ง บริเวณที่เสียหายเมื่อถูกอากาศจะเกิดเป็นสีน้ำตาลขึ้น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลนี้เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เรียกว่าฟีนอลเลส (Phenolase) ดังนั้นกรดโคจิกสามารถยับยั้งการทำงานของกลุ่มเอนไซม์ฟีนอลเลสทำให้สีน้ำตาลเกิดขึ้นช้าลง

2.2.4.2 ใช้ในเครื่องสำอาง

Ohyama and Mishima (1990) รายงานว่า มีการนำกรดโคจิกมาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง โดยกรดโคจิกทำหน้าที่ขัดผิวหรือทำให้ผิวขาวขึ้น และสามารถป้องกันแสงอัลตราไวโอเลตจากแสงแดด Nakagawa and Kawai (1995)รายงานว่ามีการทดลองนำกรดโคจิก 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์บำรุงรักษาผิว(Skin care product)เพื่อให้กรดโคจิกทำหน้าที่เป็นตัวเปลี่ยนเม็ดสีผิว (Skin- depigmenting) พบว่าทำให้ผิวขาวขึ้น

2.2.4.3 ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง

Bajpai *et al.* (1982) รายงานว่ากรดโคจิกมีคุณบัติคล้ายแทนนิน (tannin)ซึ่งมีอยู่ทั่วไปในพืช และส่วนใหญ่เป็นพวกไกลโคไซด์ (Glycoside) มีมากในเปลือกต้นโอ๊กและต้นฝาง มีความสามารถในการฟอกหนังได้ โดยทำหน้าที่ในการตกตะกอนโปรตีนและอัลคาลอยด์

2.2.4.4 มีคุณสมบัติยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

Kayahara *et al.* (1990) รายงานว่ากรดโคจิกสามาถต้านทานกิจกรรมของแบคทีเรียพวก *Staphylococcus aureus* 209 P ต่อมาพบว่ากรดโคจิกสามารถต้านการเจริญของราพวก *Pythium graminicola, Fusarium oxysporum และ Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำลายเมล็ดธัญพืช

2.2.4.5 มีคุณสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะ

Yabuta (1913) รายงานว่ากรดโคจิก 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ ต่อมา Morton *et al.* (1945) ได้ทำการศึกษาการใช้กรดโคจิกความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบแบคทีเรีย 166 สายพันธุ์ พบว่ามีแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ได้แก่ *Bacillus mycoides Chromobacterium indicum Clostridium novyi Micrococcus roseus Salmonella enteritidis* และ *Serratia marcescens* ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้กรดโคจิกเข้มข้นในอัตราส่วน 1 ใน 500 ส่วน ต่อมามีรายงานว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งเชื้อ *Leptospira canicola* อย่างสมบูรณ์เมื่อมีกรดโคจิกเพียง 1 ในล้านส่วนเป็นต้น ต่อมามีรายงานว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแกรมบวก Minami (1994) รายงานว่าการใช้กรดโคจิกเป็นส่วนผสมในสารทำลายแมลงพวกนิโคทีน (Nicotine insecticides) โดยทำการทดสอบกับหนอน 2 ชนิดคือพวก *Diaphania hyalinata* L. และ *Prodenia eridania Cram.* โดยกรดโคจิกไม่เป็นสารพิษและไม่เป็นอันตรายต่อพืช ในการทดลองจะใช้ร่วมกับสารพิษนิโคทีนโดยใช้นิโคทีนซัลเฟตไพโรไฟไลต์ (Nicotinesulphate pyrophyllite) 5 เปอร์เซ็นต์ นิโคทีนเบนโทไนต์ (nicotinebentonite) 5 เปอร์เซ็นต์ และกรดโคจิก 5 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาพบว่ายากำจัดแมลงสามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชให้น้อยลง โดยทำให้แมลงตายหรือเป็นโรค

2.2.4.6 ใช้ในทางการแพทย์

Bajpai *et al.* (1982) รายงานว่ามีการนำกรดโคจิกมาใช้เป็นส่วนผสมในยาขยายหลอดลม ยาที่ใช้รักษาโรคโลหะเป็นพิษ ยาสลบ และยาสีฟัน นอกจากนี้ Kayahara *et al.* (1990) ยังรายงานว่ามีการนำกรดโคจิกมาใช้บรรเทาอาการปวดและป้องกันแผลอักเสบด้วย

2.2.4.7 ใช้ในอุตสาหกรรมเคมี

Bajpai *et al.* (1982) รายงานว่ากรดโคจิกมีคุณสมบัติเป็นเรซิน ใช้เป็นสารสำหรับวิเคราะห์ธาตุต่างๆ เช่นเหล็ก ทองคำ สังกะสี และวานาเดียม

2.3 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมัก

Patrick *et al.* (1996) ทำการเพาะเลี้ยง *Metarhizium anisopliae* แบบแบตช์ในถังหมักที่มีการกวนเพื่อการผลิต swainsonine จากอาหารที่เพิ่มการผลิต swainsonine พบว่าผลิต swainsonine ได้ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 170 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าปริมาณที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่า 2 เท่า เมื่อใช้อาหารสูตรเดียวกันและเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงเท่ากัน การใช้ใบกวนแบบกังหัน Rushton ธรรมดาเกิดผลเสียเนื่องจากผิวหน้าอาหารเกาะกัน

สำนักหอสมุดกลาง _ พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เป็นก้อนหลังการเพาะเลี้ยงในถังหมัก 90 ชั่วโมง ทำให้อาหารไม่เป็นเนื้อเดียวกันและการผลิตผลผลิตต่ำ การปรับปรุงเพื่อให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันเพื่อผลิต swainsonine ได้มากคือ การเปลี่ยนแบบใบกวนในถังหมัก นอกจากนี้อาจใช้วิธีควบคุมอากาศได้ด้วย

Vial *et al.* (1997) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Carnobacterium divergens* V 41 แบบต่อเนื่อง 3 แบบเพื่อผลิต bacteriocin คือ เพาะเลี้ยงเซลล์อิสระ เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตในถังหมักแบบ plug-flow และเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังหมักที่มีเมมเบรน เปรียบเทียบปริมาณ bacteriocin พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงผลิต bacteriocin ได้ดีที่สุดคือผลิตได้มากกว่า 10^5 AU ต่อลิตรต่อชั่วโมง เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ผลิต bacteriocin ได้ 2.8×10^3 AU ต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าถังหมักที่มีเมมเบรนประสบปัญหาในการแพร่ของ bacteriocin ผ่านเมมเบรน

Takaya *et al.* (2002) ศึกษาลักษณะการเจริญของยีสต์และการผลิตไวน์ที่มีแอลกอฮอลล์สูงในถังหมักจากน้ำองุ่น โดยใส่เชื้อยีสต์แล้วหมักแบบแบตช์ 24 ชั่วโมง เมื่อยีสต์เจริญถึงระยะ stationary จึงหมักแบบต่อเนื่อง พบว่าการหมักแบบต่อเนื่องความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเซลล์และอัตราความเจือจางเป็นแบบ linear เมื่อใช้ถังหมักเดี่ยวความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 18.7 กรัมต่อลิตรและ 76.9 กรัมต่อลิตร (สูงกว่าการหมักแบบแบตช์ 15 และ 60 เท่าตามลำดับ) เมื่ออัตราความเจือจางเป็น 0.1 และ 0.3 ต่อชั่วโมงตามลำดับ ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลือสูงกว่า 10 กรัมต่อลิตร เมื่ออัตราความเจือจางเป็น 0.1 0.2 หรือ 0.3 ต่อชั่วโมง ถังหมักเดี่ยวจึงไม่เหมาะสำหรับผลิตไวน์ที่มีแอลกอฮอลล์สูง (ความเข้มข้นของน้ำตาล 4 กรัมต่อลิตรหรือต่ำกว่า 4 กรัมต่อลิตร) การใช้ถังหมักคู่จึงเหมาะสมที่สุดในการทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำกว่า 4 กรัมต่อลิตร และความสามารถในการผลิตไวน์ที่มีแอลกอฮอลล์สูงของถังหมักคู่สูงกว่าการหมักแบบแบตช์ 28 เท่า

Hongzhang *et al.* (2002) ออกแบบถังหมักแบบใหม่ (ปริมาตร 70 ลูกบาศก์เมตร) สำหรับใช้เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งระดับอุตสาหกรรม โดยมีการเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของอากาศ 2 แบบ ซึ่งนำมาใช้ได้ผลดีจากการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* ได้มากกว่า 18,000 IU ต่อมิลลิกรัม การเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของอากาศ 2 แบบ (รวมทั้งการให้ความดันอากาศเป็นห้วงๆ และการไหลเวียนภายใน) ในถังหมักสามารถเพิ่มมวลเซลล์และการถ่ายโอนความร้อนอีกทั้งยังปรับปรุงช่องว่างในอาหารด้วย ถังหมักนี้จึงเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการหมักในอาหารแข็ง

Chattopadhyay *et al.* (2002) ทำการเพาะเลี้ยง *Podophylum hexandrum* ในอาหารเหลวเพื่อผลิต podophyllotoxin ในถังหมักขนาด 3 ลิตรแบบแบตช์ โดยมีใบพัดกวนที่ทำให้แรงเฉือนต่ำ ใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

49418

ในอาหารที่มีกลูโคส 30 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.8 พบว่าได้มวลเซลล์และ podophyllotoxin เท่ากับ 6.5 และ 4.26 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยง 22 วัน ความสามารถในการผลิต (productivity) podophyllotoxin เท่ากับ 0.19 มิลลิกรัมต่อลิตร.วัน ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่า 27 เปอร์เซ็นต์

Kahar *et al.* (2002) ทำการเพาะเลี้ยง *Streptomyces albulus* S 410 เพื่อการผลิต ε - poly – L – lysine (ε - PL)ในถังหมักแบบ airlift ขนาด 5 ลิตร เพื่อให้ต้นทุนการผลิตและกระบวนการเก็บเกี่ยวต่ำที่สุด พบว่าผลิต ε - PL ได้ 30 กรัมต่อลิตรใช้กำลังงาน 0.3 กิโลวัตต์ต่อตารางเมตร ปริมาณที่ผลิตได้เท่ากับการผลิตในถังหมักที่มีการกวนขนาด 5 ลิตร ใช้กำลังงาน 8 กิโลวัตต์ต่อตารางเมตร นอกจากนี้การรั่วของกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์ในถังหมักแบบ airlift น้อยกว่าการรั่วของกรดนิวคลีอิกภายในเซลล์ในถังหมักที่มีการกวน ถังหมักแบบ airlift จึงเหมาะสมสำหรับการผลิต ε - PL ใช้ทุนต่ำมากกว่าถังหมักชนิดที่มีการกวน

2.4 น้ำอ้อย

น้ำอ้อยสดเป็นเครื่องดื่มที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากเพราะคั้นมาจากพืชที่มีรสหวานตามธรรมชาติ มีคุณค่าทางโภชนาการ ไม่มีสารเคมีผสมอยู่จึงไม่เกิดปฏิกิริยาต่อร่างกายแต่ประการใด ไม่ว่าจะดื่มมากหรือน้อย (จริยา จริยานุกูล.2542) นอกจากนี้อาจใช้น้ำอ้อยทำเป็นไอศกรีมได้อีกด้วย ในตำรับยาแผนโบราณมีการใช้อ้อยแดงมาต้มกับเครื่องยาอย่างอื่น ที่เรียกว่าอ้อยแดงเพราะมีเปลือกสีแดงจนเกือบดำ บางครั้งจึงมีผู้เรียกว่าอ้อยดำหรืออ้อยขมเนื่องจากตาและเปลือกมีรสขม น้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบสำหรับโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาล น้ำตาลที่สร้างขึ้นในลำต้นอ้อยมีหลายชนิด แต่ที่เราแยกเอามาทำเป็นน้ำตาลที่ใช้บริโภคคือผลึกของซูโครสที่ได้จากน้ำอ้อย (เกษม สุขสถาน.2527)

ปรีชา สุริยพันธุ์และสมเกียรติ พัฒนาเมธีกูร (2523) รายงานว่าการควบคุมขบวนการผลิตน้ำตาลอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อให้ได้น้ำตาลบริสุทธิ์จะต้องทราบถึงปริมาณและชนิดของส่วนประกอบในอ้อยและน้ำตาลเสียก่อน ส่วนประกอบของอ้อยย่อมผันแปรไปตามพันธุ์อ้อย อายุ สภาพแวดล้อมคือดินและลมฟ้าอากาศ อ้อยที่นำมาทำน้ำตาลมีส่วนประกอบดังนี้

ส่วนประกอบของน้ำอ้อย	เปอร์เซ็นต์
น้ำ	65 – 76
ของแข็ง (Solids)	24 – 27
เยื่อ (Fiber)	11 –16
ของแข็งที่ละลายได้ (Soluble solids)	10 – 16

ของแข็งที่ละลายได้	เปอร์เซ็นต์
น้ำตาล	75 –79
น้ำตาลซูโครส	70 – 88
น้ำตาลกลูโคส	2 – 4
น้ำตาลฟรักโทส	2 – 4
เกลือ	3 – 7.5
เกลือของกรดอนินทรีย์	1.5 – 4.5
เกลือของกรดอินทรีย์	1.0 – 3.0
กรดอินทรีย์อิสระ	0.5 – 2.5
กรดคาร์บอกซิลิก (Carboxylic acids)	0.1 – 0.5
กรดอะมิโน (Amino acids)	0.5 –2.0
สารอื่นที่ไม่ใช่น้ำตาล (Other organic nonsugars)	3.8 – 6.5
โปรตีน	0.5 – 0.6
แป้ง	0.001 – 0.05
ยาง (Gums)	0.3 – 0.6
ไขและขี้ผึ้ง (Wax and fats)	0.05 – 0.15
สารอื่นที่ไม่ทราบแน่ชัด	3.0 – 5.0

2.5 การใช้ประโยชน์จากน้ำอ้อย

2.5.1 น้ำอ้อยใช้เป็นเครื่องดื่ม

ลำต้นอ้อยใช้สำหรับขบเคี้ยวบริโภคน้ำอ้อยโดยตรง หรือบีบเอาน้ำออกมาเพื่อบริโภค อ้อยเคี้ยวจะมีเปลือกนิ่ม ชานนิ่ม มีความหวานปานกลางถึงค่อนข้างสูง ปลูกเพื่อนำน้ำอ้อยมาบริโภคโดยตรงหรือใช้สำหรับรับประทานสด การสะสมน้ำตาลในลำต้นอ้อยจะเริ่มจากส่วนโคนไปหาปลาย ดังนั้นส่วนโคนจึงหวานก่อน และมีความหวานมากกว่าส่วนปลาย การสะสมน้ำตาลจะมีมากขึ้นโดยลำดับ จนกระทั่งส่วนโคน ส่วนกลางและส่วนปลายมีความหวานใกล้เคียงกัน เรียกว่า ระยะสุกของอ้อย (เกษม สุขสถาน. 2523)

2.5.2 ใช้ในอุตสาหกรรมน้ำตาล

อ้อยเป็นวัตถุดิบสำหรับโรงงานอุตสาหกรรมน้ำตาล น้ำตาลที่ผลิตจากอ้อยมีชื่อเรียกต่างๆ กันตามความบริสุทธิ์และกรรมวิธีการผลิต เช่น น้ำตาลทรายดิบ (Raw sugar) น้ำตาลทรายขาว

(Plantation white sugar) น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (Refined sugar) น้ำตาลทรายแดง (Brown sugar, Jaggery, Muscovado) น้ำตาลทรายสีรำ และน้ำตาลทรายอัดก้อนหรือน้ำตาลปอนด์ (นพพร สายัมพล. 2542)

น้ำตาลทรายดิบ (Raw sugar) หมายถึงผลึกซูโครสที่มีความบริสุทธิ์ต่ำ ลักษณะเป็นเกล็ดใสสีน้ำตาลอ่อนถึงเข้มตามสีของกากน้ำตาลที่หุ้มอยู่รอบผลึก มีความชื้นสูง เกล็ดน้ำตาลจะจับเกาะติดกัน ไม่ร่วน น้ำตาลชนิดนี้ผลิตจากอ้อยโดยตรง และส่งจำหน่ายเป็นสินค้าออกไปต่างประเทศโดยบรรจุในกระสอบป่านกระสอบละ100 กิโลกรัม

น้ำตาลทรายขาว (Plantation white sugar) หมายถึง ผลึกซูโครสที่มีความบริสุทธิ์สูงมีลักษณะเป็นเกล็ดใสสีขาวถึงสีเหลืองอ่อน เกล็ดน้ำตาลร่วนไม่ติดกันและมีกากน้ำตาลติดอยู่เป็นส่วนน้อย น้ำตาลชนิดนี้ผลิตจากอ้อยโดยตรง ใช้บริโภคภายในประเทศเป็นส่วนใหญ่ บรรจุในกระสอบป่าน 100 กิโลกรัม กรรมวิธีการผลิตใช้กำมะถันหรือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวฟอกสีของน้ำอ้อย

น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ (Refined sugar) หมายถึงผลึกซูโครสที่มีความบริสุทธิ์สูงที่สุด มีลักษณะเป็นเกล็ดใส มีสีขาวสะอาดปราศจากกากน้ำตาล เกือบไม่มีความชื้นเลย น้ำตาลชนิดนี้ผลิตจากอ้อยโดยตรงบรรจุในกระสอบป่าน 100 กิโลกรัม หรือในถุงพลาสติกปริมาณ 1 กิโลกรัม ใช้บริโภคภายในประเทศเป็นส่วนใหญ่

น้ำตาลทรายแดง (Brown sugar, Jaggery, Muscovado) ลักษณะเป็นผงละเอียดหรืออาจจับกันเป็นก้อน มีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลเข้ม มีความชื้นมาก มีกลิ่นน้ำตาลไหม้ น้ำตาลชนิดนี้ผลิตจากอ้อยโดยตรงโดยการเคี่ยวในกะทะ บรรจุในกระสอบฟางหนัก 60 กิโลกรัม

น้ำตาลทรายสีรำ ลักษณะเป็นเกล็ดใสแต่เกล็ดเล็กกว่าน้ำตาลทรายดิบเล็กน้อย มีสีน้ำตาลอ่อนมีความชื้นน้อยกว่า น้ำตาลทรายดิบ เกล็ดน้ำตาลร่วนไม่จับติดกันเหมือนน้ำตาลทรายดิบ น้ำตาลชนิดนี้ผลิตจากน้ำเชื่อมหรือน้ำตาลทรายแดง บรรจุในกระสอบป่าน 100 กิโลกรัม

น้ำตาลทรายอัดก้อนหรือน้ำตาลปอนด์ มีลักษณะเป็นก้อนรูปสี่เหลี่ยม นิยมใช้ในการชงเครื่องดื่มประเภทน้ำชา กาแฟ เป็นน้ำตาลซึ่งได้จากการเอาน้ำตาลทรายขาวมาอัดเป็นก้อนแล้วผ่านเข้าอบด้วยความร้อนจากแสงอินฟราเรดเพื่อลดความชื้นลงให้เหลือเพียง 0.5 – 1.0 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงเป่าด้วยลมเย็นเพื่อให้แข็งเป็นก้อน บรรจุในกล่องกระดาษมีพลาสติกบุกล่องละ 30 – 80 ก้อน

เกษม สุขสถาน. (2527) รายงานว่าน้ำตาลนอกจากจะใช้เป็นอาหารโดยตรงแล้ว ยังใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น อุตสาหกรรมนมและอุตสาหกรรมน้ำอัดลม นอกจากนี้น้ำตาลยังใช้ผลิตสารเคลือบผิว และผงซักฟอกที่ไม่ก่อให้เกิดมลภาวะอีกด้วย

ตารางที่ 2.2 แสดงปริมาณของเกลือแร่ในน้ำอ้อย น้ำเชื่อม และกากน้ำตาล

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์ของของแข็ง)			
	น้ำอ้อยดิบ	น้ำอ้อยใส	น้ำเชื่อม	กากน้ำตาล
โพแทสเซียม (K_2O)	1.31	-	0.90	6.55
ซัลเฟต (SO_3)	0.52	0.41	0.61	1.10
คลอไรด์ (Cl)	-	0.22	0.46	1.11
แคลเซียม (CaO)	0.29	0.30	0.35	-
แมกนีเซียม (MgO)	0.28	0.16	0.25	0.68
ซิลิกา (SiO_2)	0.71	0.14	0.07	0.05
ฟอสเฟต (P_2O_5)	0.40	0.08	0.02	0.14
เหล็ก (Fe_2O_3)	-	-	0.01	-
เถ้าซัลเฟต	-	-	3.43	17.73
เถ้าคาร์บอเนต	3.64	3.55	-	13.32

ที่มา : Fort and Smith (1952)

ตารางที่ 2.3 แสดงปริมาณกรดคาร์บอกซิลิกในน้ำอ้อยสด

ชนิดของกรด	ของแข็งอบแห้ง (เปอร์เซ็นต์)		
	ปริมาณต่ำที่สุด	ปริมาณสูงที่สุด	ปริมาณเฉลี่ย
กรดอะโคนิติก	1.00	2.06	1.54
กรดซิตริก	0.12	0.30	0.18
กรดมาลิก	0.03	0.25	0.12
กรดออกซาลิก	0.02	0.16	0.11
กรดไกลโคลิก	ปริมาณเล็กน้อย	0.13	0.05
กรดเมสาโคนิก	ปริมาณเล็กน้อย	0.08	0.04
กรดซัคซินิค	ปริมาณเล็กน้อย	0.05	0.02
กรดฟูมาริก	ปริมาณเล็กน้อย	0.04	น้อยกว่า 0.01
กรดไซริงจิก	ปริมาณเล็กน้อย	น้อยกว่า 0.01	ปริมาณเล็กน้อย

ที่มา : Roberts and Martin (1960)

ตารางที่ 2.4 แสดงปริมาณโลหะหนักในน้ำตาลทรายดิบ

ชนิดของโลหะ	ปริมาณ (ส่วนในล้านส่วน)
เหล็ก	10.71
แมงกานีส	3.58
ทองแดง	1.22
สังกะสี	0.50
ตะกั่ว	0.20
นิเกิล	0.12
โครเมียม	0.07
โคบอลต์	0.04
แคดเมียม	0.005
เงิน	0.0002

ที่มา : Clarke (1973); Clarke (1974)

2.5.3 ใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์

การผลิตแอลกอฮอล์จากน้ำอ้อยโดยนำน้ำอ้อยที่มีความหวาน 10 – 13° บริกซ์มาหมักกับยีสต์ เอนไซม์ชื่อไซเมส (Zymase) ในยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทิลแอลกอฮอล์ และเอทิลแอลกอฮอล์ที่ได้จะมีความเข้มข้นประมาณ 5–8 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงนำไปกลั่นให้ได้เอทิลแอลกอฮอล์ 95.5 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่านั้นต่อไป (ปรีชา สุริยพันธุ์. 2523)

การหมักเพื่อทำให้เกิดเอทิลแอลกอฮอล์เป็นวิธีการสำคัญและได้สารที่สำคัญอย่างอื่นด้วยเป็นผลพลอยได้ ดังแสดงในตารางที่ 2.5

น้ำอ้อยและกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบที่สามารถนำไปใช้ผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ทดแทนกันได้หรือนำเข้าขบวนการผลิตในโรงงานเดียวกันได้ ดังนั้นกรรมวิธีการผลิตจึงมีลักษณะเหมือนกัน จะแตกต่างกันเฉพาะขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบเพื่อนำเข้าถังหมักเหล้าเท่านั้น ขั้นตอนแรกเตรียมน้ำอ้อยเช่นเดียวกับการทำน้ำตาล นำน้ำอ้อยไปผ่านเครื่องกรอง (Screen) ซึ่งจะแยกสิ่งสกปรกออก สิ่งสกปรกที่กรองออกนำไปทำอาหารสัตว์หรือปุ๋ยได้ จากนั้นน้ำอ้อยจะไหลเข้าสู่ถังเตรียม (Mash preparation Tank) ถังนี้เป็นถังผสม อาจจะนำกากน้ำตาลมาผสม ถ้าใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบก็จะนำเข้ามาปรุงในถังเตรียมนี้เช่นกัน ขั้นตอนนี้มีการเติมธาตุอาหารของยีสต์ ได้แก่ ซูเปอร์ฟอสเฟต แมงกานีสซัลเฟต แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท เป็นต้น แล้วนำเข้าสู่ถังหมัก (Fermentation drum) ซึ่งจะเติมเชื้อยีสต์ในถังนี้ ขณะเดียวกันก็เติมธาตุอาหารของยีสต์คือซูเปอร์ฟอสเฟตลงไปด้วยตามความต้องการ ระยะนี้จะมีความร้อนเกิดขึ้นจึงต้องมีระบบระบายความร้อน

โดยใช้น้ำเย็นชะโลมถังหมักด้านนอก โดยพยายามรักษาอุณหภูมิให้ได้ 30 องศาเซลเซียส ในขณะเดียวกันจะมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้น เมื่อครบ 48 ชั่วโมงน้ำอ้อยจะกลายเป็นไวน์ซึ่งมีเอทิลแอลกอฮอล์ประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ ไวน์จะผ่านเข้าถังเหวี่ยง (centrifugal tank) แยกเอาตะกอนยีสต์ออกและนำไปใช้ใหม่หรือทำแห้งเป็นอาหารโปรตีน SCP ส่วนไวน์นำไปกลั่นในหอกลั่น (Distillery) ซึ่งเป็นหอกลั่นแยกส่วน หอที่หนึ่งผลที่กลั่นออกมาได้เอทิลแอลกอฮอล์ 96.5 เปอร์เซ็นต์ พร้อมกับผลพลอยได้อื่น เช่น อัลดีไฮด์และฟิวเซลออยล์ (Aldehyde and Fusel Oil) ส่วนส่าเหล้า (Dunder or stillage) นำไปทำปุ๋ยหรืออาหารสัตว์ ถ้าต้องการทำให้เป็นเอทิลแอลกอฮอล์ 99.7 เปอร์เซ็นต์ จะต้องผ่านเข้าสู่หอกลั่นที่สอง เมื่อกลั่นแล้วจะได้เอทิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ปรีชา สุริยพันธุ์. 2523)

ตารางที่ 2.5 แสดงปริมาณสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่เป็นผลพลอยได้และจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักเอทิลแอลกอฮอล์

ผลพลอยได้	จุลินทรีย์	ผลผลิต (เปอร์เซ็นต์)
Ethyl alcohol	*Saccharomyces cerevisiae*	> 90
	Schizosaccharomyces pombe	
Acetone-1-Butanol	*Clostridium acteobutylicum*	9
Citric acid	*Citromyces or Aspergillus niger*	50
Dextran	*Leuconostoc mesenteroides or*	
	L.desctranicum	25
Fumaric acid	*A. fumaricus or Rhizopus*	50
Itaconic acid	*nigricans*	15
Kojic acid	*A. terreus*	60
Lactic acid	*A. flavus or A. oryzae*	95
Glycerol	*R. oryzae*	≤ 28
Fat	*S. cerevisiae*	≤ 80
	Eudomyces vernalis	
	Fusaria lycoperseci	
Amino acid	*Rhodotorula gracilis*	ปริมาณเล็กน้อย
	Bacillus subtilis	
	Neurospora crassa, etc	

ที่มา : ปรีชา สุริยพันธุ์ (2523)

Borzani *et al.* (1977) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบต่อเนื่อง ในสภาวะที่มีอากาศโดยใช้กากน้ำตาลดำเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอัตราการให้อากาศมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต โดยเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 1.3 – 1.6 วีวีเอ็ม เป็น 3.3 วีวีเอ็ม ทำให้ปริมาณเซลล์ เพิ่มขึ้นจาก 5.0 กรัมต่อลิตร เป็น 9.0 กรัมต่อลิตร

Queiroz *et al.* (1983) ทำการศึกษาอิทธิพลของปริมาณเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่อปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ผลิตได้ในการหมักเอทานอลแบบแบตช์จากกากน้ำตาลดำ โดยแปรผันปริมาณเซลล์เริ่มต้นระหว่าง 1.1 – 57.1 กรัมต่อลิตร และแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นระหว่าง 90.9 – 226.2 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดอยู่ระหว่าง 20-25 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 160 กรัมต่อลิตร

2.6 อ้อย

อ้อยเป็นพืชพวกหญ้า อยู่ในวงศ์ Gramineae เข้าใจว่ามีแหล่งกำเนิดอยู่ตามหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิคตอนใต้ แล้วภายหลังได้แพร่เข้าไปยังผืนแผ่นดินใหญ่ของทวีปเอเชีย แล้วจึงแพร่ไปยังแหล่งอื่น ๆ ของโลก

อ้อยขึ้นได้ดีในประเทศที่ตั้งในเขตร้อน (Tropical) และกึ่งร้อน (Subtropical) จากน้ำตาลที่ผลิตได้ทั้งหมดในโลกในแต่ละปี 60 เปอร์เซ็นต์ ผลิตมาจากอ้อย ที่เหลืออีก 40 เปอร์เซ็นต์ ได้มาจากหัวผักกาดหวาน (Sugar beets) เขตการปลูกอ้อยของโลกจำกัดอยู่ระหว่างเส้นรุ้งที่ 35 องศาเหนือและใต้ อ้อยชอบแสงแดดจัดเพื่อการเจริญเติบโตและสร้างน้ำตาลสะสมภายในลำ โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิเฉลี่ยทั้งปีไม่ควรต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนแต่ละปีควรจะอยู่ระหว่าง 1,500 – 2,000 มิลลิเมตร ปลูกกันโดยทั่วไป ตั้งแต่ระดับน้ำทะเลไปจนถึงระดับสูง 500 เมตร

พืชในตระกูลอ้อยมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เกษม สุขสถาน.(2523) ได้แบ่งชนิดของอ้อยไว้ดังต่อไปนี้

1. อ้อยปลูก (*Saccharum officinarum L.*) คือ อ้อยเคี้ยวต่าง ๆ ที่มีกำเนิดมาแต่ดั้งเดิมก่อนมีการผสมพันธุ์ อ้อยชนิดนี้จะมีน้ำตาลในลำสูงและมีเส้นใยในลำน้อย มีสีสดและมีลำขนาดใหญ่กว่าชนิดอื่น ๆ

2. พงหรือเลา (*Saccharum Spontaneum L.*) เป็นพืชที่ขึ้นอยู่ทั่วไป มีลักษณะคล้ายหญ้าไม่มีความสำคัญอะไร นอกจากใช้ในการผสมพันธุ์

3. อ้อยอินเดีย (*Saccharum barberi Jeswiet*) เป็นอ้อยที่ขึ้นอยู่ในดินฟ้าอากาศกึ่งเมืองร้อนแถบเหนือของอินเดีย มีปลูกกันในอินเดียมานานแล้ว ใบแคบ ปล้องสีเขียว เทา หรือขาวนวล

4. อ้อยจีน (*Saccharum Sinense Roxb.*) มีใบกว้าง ลำยาว ข้อโป่ง มีปลูกกันในประเทศจีน

5. อ้อหรือแขม (*Saccharum robustum*) เป็นพืชป่าขึ้นอยู่ตามริมฝั่งน้ำ บางครั้งลำยาวถึง 10 เมตร มีน้ำตาลในลำน้อยและเส้นใยในลำมาก ใช้ประโยชน์ในการผสมพันธุ์เท่านั้น

6. อ้อยนิวกินี (*Saccharumedule Hassk.*) เป็นอ้อยที่ต่างจากอ้อยชนิดอื่นตรงที่ช่อดอกจะพองและไม่ติดเมล็ด บางครั้งชาวพื้นเมืองจะกินช่อดอกนี้เป็นอาหาร มีลักษณะคล้ายกับอ้อหรือแขมมาก ต่างกันตรงลักษณะของช่อดอกเท่านั้น

ลักษณะอ้อยประกอบด้วยส่วนสำคัญ 3 ส่วน คือ ราก ลำต้น และใบ (เกษม สุขสถาน.2523)

รากคือ ส่วนที่อยู่ใต้ดิน รากอ้อยจะแผ่กระจายแบบระบบรากเรียกว่าระบบรากฝอย รากส่วนใหญ่จะกระจายอยู่ตามผิวดินไปจนถึงประมาณ 25 เซนติเมตร เมื่อลึกลงไปอีกจะมีรากน้อยลงตามลำดับ เคยมีการศึกษาพบว่า บางครั้งรากฝอยสามารถชอนไชลึกลงไปได้ถึง 6 เมตร รากนี้เป็นส่วนที่จะดูดน้ำและธาตุอาหารของอ้อย

ลำต้นอ้อยมีลักษณะเป็นปล้อง ๆ กลม คล้ายลำต้นของหญ้า แต่ภายในไม่กลวงเหมือนต้นหญ้า มีหน้าที่สำคัญอยู่หลายประการเช่น ช่วยชูใบให้ได้รับแสงสว่าง เป็นทางส่งน้ำ และแร่ธาตุอาหารจากรากขึ้นไปยังส่วนยอด เป็นทางลำเลียงอาหารที่ปรุงจากใบกลับไปสู่ราก และที่สำคัญที่สุดก็คือเป็นที่สะสมน้ำตาลซูโครสที่นำมาใช้เป็นประโยชน์นั่นเอง บริเวณข้อทุกข้อจะมีตา 1 ตา สามารถตัดทอนลำต้นเป็นท่อน ๆ แล้วนำตานี้ไปปลูกขยายพันธุ์ได้ ปกติอ้อยต้นหนึ่ง ๆ จะแตกเป็นกอจากพื้นดินมีหลายลำ

ใบอ้อยประกอบด้วยกาบใบที่ห่อหุ้มลำต้นอยู่ และตัวใบซึ่งยาวเรียวเหมือนหอก ใบอ้อยนี้เป็นที่รับแสงแดดและปรุงอาหาร และสร้างน้ำตาลเพื่อเก็บสะสมในลำ

วงจรการเจริญเติบโตของอ้อย อ้อยมีช่วงการเจริญเติบโตที่สำคัญพอแบ่งได้เป็น 3 ระยะ คือ

1. ระยะแตกกอ เมื่อนำท่อนหรือส่วนของลำต้นที่มีข้อและตาไปปลูก ตาจะเจริญเติบโตขึ้นเป็นหน่อแทงโผล่พ้นดินขึ้นมา ปกติอ้อยจะงอกภายในเวลา 7 – 10 วัน ถ้าเป็นตาที่ไม่แก่เกินไปและมีความชื้นในดินพอเหมาะ หลังจากนั้นใบจะคลี่และเจริญเติบโตขึ้นเรื่อยๆ พออายุได้ 1 – 1 1/2 เดือน จะมีหน่อใหม่แตกขึ้นมาที่โคนของหน่อแรกอีกหลายหน่อ และจะเป็นเช่นนี้ไปจนถึงอายุประมาณ 3 เดือน จึงเรียกระยะนี้ว่าระยะแตกกอหรือแตกหน่อ

2. ระยะย่างปล้องและเจริญเติบโต หลังจากอ้อยมีอายุ 3 เดือนแล้ว หน่ออ้อยจะเริ่มมีปล้อง คือเจริญเป็นลำขึ้นที่โคน ระยะจากนี้ไปอ้อยอาจสร้างหน่อใหม่ขึ้นที่โคนอีกบ้างแต่ไม่มากเหมือนในระยะแรก ลำอ้อยจะเจริญเติบโตยาวขึ้นเรื่อย ๆ โดยมีจำนวนปล้องมากขึ้น

3. ระยะออกดอก การเจริญเติบโตของลำอ้อยจะสิ้นสุดลงเมื่ออ้อยออกดอก ที่ปลายสุดของลำจะมีช่อดอกเจริญออกมา อายุจากปลูกจนถึงออกดอกของอ้อยแต่ละพันธุ์ไม่เหมือนกัน และขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมต่าง ๆ แต่ปกติอ้อยจะออกดอกได้ลำอ้อยนั้นจะต้องเจริญมาแล้วไม่ต่ำกว่า 6 – 8 เดือน ลำอ้อยที่มีอายุอ่อนกว่านี้แม้จะมีสภาพแวดล้อมเหมาะสมก็มักจะไม่ออกดอก อ้อยบางพันธุ์จะไม่ออกดอกแม้จะมีอายุถึง 24 เดือนก็ตาม การออกดอกยากง่ายเป็นลักษณะประจำพันธุ์อ้อย

การสะสมน้ำตาลของอ้อยนั้นโดยทั่วไปจะไปเริ่มสูงขึ้นเมื่ออ้อยมีอายุ 8 เดือนขึ้นไป และในระยะนี้การเจริญเติบโตจะช้าลง และมักเป็นเวลาปลายฤดูฝนพอดี โดยทั่วไปน้ำตาลที่สะสมในลำอ้อยจะสูงที่สุดเมื่ออ้อยมีอายุ 10 – 12 เดือน ถ้าอ้อยมีอายุเกิน 12 เดือนขึ้นไป น้ำตาลที่สะสมภายในลำจะเริ่มลดลง แต่จะลดลงเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับพันธุ์อ้อยและสภาพแวดล้อมอีกเช่นกัน

2.7 พันธุ์อ้อย

แต่เดิมอ้อยที่ปลูกเพื่อใช้ประโยชน์ไม่ว่าเพื่อเป็นอ้อยเคี้ยวหรือเพื่อทำน้ำตาล มีอยู่ 3 ชนิดเท่านั้น คือ อ้อยปลูกหรือ *S. officinarum* อ้อยอินเดีย หรือ *S. bargeri* และอ้อยจีน หรือ *S. sinense* แต่ละชนิดก็ยังมีอีกหลายพันธุ์ จนกระทั่งเมื่อมีอุตสาหกรรมน้ำตาลเกิดขึ้น จึงมีการผสมพันธุ์ระหว่างอ้อยพันธุ์ต่าง ๆ ภายในชนิดเดียวกัน และระหว่างชนิดขึ้น เพื่อหาพันธุ์อ้อยที่มีความหวานสูงและให้ผลผลิตสูง ต่อมาเมื่อมีปัญหาเรื่องโรคและแมลงเกิดขึ้น จึงได้นำเอาอ้อยป่าเข้ามาร่วมผสมเข้าไปอีก เพื่อหวังนำลักษณะต้านทานโรคจากอ้อยป่าเหล่านี้เข้าไปรวมไว้กับอ้อยปลูก การผสมพันธุ์อ้อยจึงได้เจริญก้าวหน้ามาเป็นลำดับ และการผสมพันธุ์อ้อยนี้เองที่ช่วยให้อุตสาหกรรมน้ำตาลยั่งยืนมาได้ จากโครงการผสมพันธุ์อ้อยที่ดำเนินการอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของโลกนี้เองที่ให้กำเนิดพันธุ์อ้อยใหม่ ๆ หลายร้อยพันธุ์ เฉพาะเท่าที่นำเข้ามาในประเทศไทยก็มีถึงประมาณ 200 พันธุ์

พันธุ์อ้อยที่นำเข้ามาจากต่างประเทศเหล่านี้ ที่เหมาะสมและใช้ได้ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทยก็มีอยู่เพียงบางพันธุ์เท่านั้น และพันธุ์ที่ใช้เปลี่ยนไปเรื่อยๆเมื่อมีพันธุ์อื่นที่ดีกว่าเข้ามาแทน (เกษม สุขสถาน. 2521)

พันธุ์อ้อยที่ใช้อยู่ในประเทศไทยเท่าที่เกษม สุขสถาน(2521) สำรวจมาพบว่า

1. ภาคเหนือ มีพันธุ์ลำปาง 94–5 พินดาร์ F.140 F.146 F.147 F.148 Co.1010 Co.740 Co.798 CB. 22-38 Q.83 และ Trojan

2. ภาคกลาง มีพันธุ์ F.140 Q.83 F.153 F.154 F.137 F.146 F.147 พินดาร์ และ Ragnar

3. ภาคตะวันออก มีพันธุ์ F.134 พินดาร์ F.153 Co.1419 F.140 F.148 และ F.156

4. ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีพันธุ์ H 38/2915 F.140 Co.421 พินดาร์ และ NCo.310

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยได้แก่เชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบัน Northern Regional Research Laboratory, Peorai, Illinois ประเทศสหรัฐอเมริกา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บนอาหารวุ้นผิวเอียงพีดีเอ ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 6 เดือน

3.1.2 สารเคมี ได้แก่

	บริษัทผู้ผลิต
- กรดโคจิก	Sigma
- ทวีน 80 (Tween 80)	Fluka
- แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	Merck
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	Merck
- ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	J.B.Baker
- น้ำตาลซูโครส	Merck
- เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)	Merck
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	Merck
- กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)	Merck
- ฟีนอล (C_6H_5OH)	Merck
- น้ำมันพืชตราองุ่น	น้ำมันพืชไทย จำกัด (มหาชน)
- น้ำอ้อย	ตลาดบางจาก สุขุมวิท 93
- วุ้น (Agar)	S.T. Scientific

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

	บริษัทผู้ผลิต
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)	New Brunswick Scientitific รุ่น INNOVA 4230
- เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)	Shimadzu รุ่น UV – 1601

- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	Mettler Toledo รุ่น PG 5002
	บริษัทผู้ผลิต
- เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง	Mettler Toledo รุ่น PG 803
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius รุ่น A-2005
- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)	Denver Instrument รุ่น 215
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)	Sanyo รุ่น Falcon 6/300
- เครื่องนึ่งอัดไอ (Autoclave)	Harvey รุ่น Hydroclave MC 10
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Larminar air flow)	ISSCO Larminar air flow รุ่น BVT 123
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	Olympus รุ่น CHS
- ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)	Labsystems รุ่น A85810
- เครื่องผสมหลอดทดลอง (Mixer)	Vortex Genie 2 รุ่น G - 560 E
- เครื่องแก้วต่างๆ	Pyrex
- แผ่นนับเม็ดเลือด (Haemacytometer)	Boeco รุ่น Neubauer Bright Line
- ชุดกรองมิลลิพอร์	Millipore Bedford รุ่น MA01730
- กระดาษกรองเบอร์ 1	Whatman International Ltd.
- ถังหมักขนาด 10 ลิตร และชุดควบคุมการทำงาน	B.Braun Biotech International
	รุ่น Biostat C
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	Memmert รุ่น Modell 600
- เตาไมโครเวฟ	SHARP รุ่น Model R – 311
- เดซิกเคเตอร์ (Desiccator)	Glaswerk Wertheim รุ่น GL 32

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงมาจากสูตรของ Kwak and Rhee (1992) (ภาคผนวก ก.2) ใช้สำหรับศึกษาการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา โดยสูตรอาหารมีน้ำอ้อยปริมาตร 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน มีองค์ประกอบดังนี้

แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	5	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.25	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 . 7H_2O$)	0.25	กรัม
น้ำอ้อย	1	ลิตร

น้ำอ้อยสดมีความหวานเท่ากับ 20° บริกซ์ และมีปริมาณน้ำตาล ทั้งหมดเท่ากับ 115.23 กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมเข้าด้วยกัน ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484

เขี่ยเชื้อรา *A. oryzae* NRRL 484 อายุ 7 วันที่เจริญอยู่บนอาหาร PDA ลงในปลายข้าวสุกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เพื่อให้เชื้อราเจริญและสร้างสปอร์ เตรียมสารแขวนลอยสปอร์โดยเติมน้ำกลั่นที่มี Tween 80 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในฟลาสก์ที่มีเชื้อราเจริญอยู่ ใช้ช้อนสแตนเลสด้ามยาวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขูดและตีให้สปอร์ออกจากเส้นใยทำการกรองเส้นใยออกไป โดยกรองผ่านสำลีที่วางบนกรวยแก้วผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำส่วนที่เป็นของเหลวที่กรองได้ซึ่งมีสปอร์แขวนลอยอยู่มานับจำนวนโดยใช้ Haemacytometer เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการศึกษาต่อไป

3.3.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่า

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้สูตรอาหารที่ดัดแปลงจาก Kwak and Rhee (1992) ดังแสดงในภาคผนวก ก.2 หลังจากเตรียมอาหารที่ใช้ในแต่ละการทดลองแล้ว นำอาหารเหลวแต่ละชนิดปริมาตร 65 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์หลุมขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นเติมกล้าเชื้อจากข้อ 3.3.1 ลงไปในแต่ละฟลาสก์ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ให้แต่ละฟลาสก์มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น 1.0×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยในแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

3.3.2.1 ศึกษาปริมาณของน้ำอ้อยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรดัดแปลงของ Kwak and Rhee (1992) โดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส ในปริมาตรต่างๆกันคือ 250 500 750 และ 1,000 มิลลิลิตร สำหรับน้ำอ้อยปริมาตร 250 500 และ 750 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ใส่สารแขวนลอยสปอร์ ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 1.0×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำฟลาสก์ทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วัน เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์หาค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และปริมาณกรดโคจิกทุกวัน

3.3.2.2 **ศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก**

นำสูตรอาหารที่ให้กรดโคจิกสูงสุดจากข้อ 3.3.2.1 มาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตดังนี้คือ 0 5.0 10.0 15.0 และ 20.0 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะเดียวกับข้อ 3.3.2.1 เก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์ทางค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และปริมาณกรดโคจิกทุกวัน

3.3.3 การศึกษาการผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบตช์

เตรียมอาหารสูตรที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.3.2 ปริมาตร 6.5 ลิตร ลงในถังหมักขนาด 10 ลิตร ใส่สารกำจัดฟองโดยใช้น้ำมันพืชตราองุ่น 6.5 มิลลิลิตร หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที เมื่ออาหารเย็นเติมสารแขวนลอยสปอร์ลงไป 100 มิลลิลิตร สปอร์เริ่มต้น 1.0×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ศึกษาความเร็วในการกวนที่ 200 และ 400 รอบต่อนาที ร่วมกับอัตราการใช้อากาศที่ระดับ 1.0 1.5 และ 2.0 วีวีเอ็ม ดังนี้คือ

อัตราเร็วในการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม
อัตราเร็วในการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม
อัตราเร็วในการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม
อัตราเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม
อัตราเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม
อัตราเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม

ควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงในถังหมักที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆวัน เพื่อวิเคราะห์หาค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และปริมาณกรดโคจิก

3.4 วิธีวิเคราะห์

3.4.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ดัดแปลงจากวิธีของ Kwak and Rhee (1992)

วิธีการ

1. นำสารตัวอย่างมา 10 มิลลิลิตร
2. กรองด้วยชุดกรองผ่านกระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 1 ที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว
3. อบในตู้อบที่ 90 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิกเคเตอร์
4. ชั่งน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

5. คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) จากสูตร

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง} = \frac{(W_2 - W_1) \times 1000}{V}$$

W_1 คือ น้ำหนักกระดาษกรอง (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักเซลล์กับกระดาษกรอง (กรัม)

V คือ ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตร)

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิก

การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกตามวิธีของ Bentley (1957) โดยใช้สารละลายเฟอริกคลอไรด์ทำปฏิกิริยากับสารประกอบแอลฟาไฮดร็อกซิลและสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ในกรดโคจิกให้สารละลายสีแดงเกิดขึ้น

สารเคมี

1. สารละลายเฟอริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์

ละลายเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) 1 กรัมด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์แมล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายกรดโคจิกมาตรฐาน

วิธีการ

1. นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองในข้อ 1 ผสมสารให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 นาที

3. นำไปวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร

4. ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นแทน และดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1-3

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดโคจิก

6. นำสารละลายกรดโคจิกความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 50 100 200 300 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาวิเคราะห์โดยดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1-3

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้และความเข้มข้นของกรดโคจิกมาเขียนกราฟมาตรฐานของกรดโคจิก (รูปที่ ข.1)

8. การคำนวณปริมาณกรดโคจิก

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

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol – sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois *et al.* (1956) โดยใช้กรดเข้มข้นย่อยพอลิแซ็กคาไรด์เป็นโมเลกุลเดี่ยวซึ่งสามารถวัดปริมาณน้ำตาลได้ประมาณ 1 – 100 ไมโครกรัมไมโครกรัม และเป็นวิธีการที่รวดเร็วสามารถวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอย่างไม่เฉพาะเจาะจงโดยที่น้ำตาลนั้นอาจจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิวซ์หรือ neutral sugar ทั้งชนิดที่เป็นโมโนแซ็กคาไรด์และพอลิแซ็กคาไรด์

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

   ละลายฟีนอล (C_6H_5OH) 5 กรัมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น
3. สารละลายซูโครสมาตรฐาน

วิธีการ

1. นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองในข้อ 1 ผสมให้เข้ากัน แล้วนำหลอดทดสองไปแช่ในน้ำเย็น
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองในข้อ 2 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
4. นำไปวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น490 นาโนเมตร
5. ทำแบลงด์โดยใช้น้ำกลั่นแทน และดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1-4
6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลทั้งหมด
7. นำสารละลายซูโครสความเข้มข้นต่างๆกันคือ 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาวิเคราะห์โดยดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1-4
8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้และความเข้มข้นของสารละลายซูโครสมาเขียนกราฟมาตรฐานของน้ำตาลทั้งหมด (รูปที่ ข.2)

9. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

$$\text{น้ำตาลทั้งหมด} = \frac{A_{490} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{สโลปของกราฟมาตรฐาน}}$$

3.4.4 การหาค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดโคจิก

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

$= (\ln x_1 - \ln x_0)/\Delta t$

กำหนดให้ : X_1 = ปริมาณเซลล์ที่เวลา t_1 (กรัมต่อลิตร)

X_0 = ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ t_0 (กรัมต่อลิตร)

Δt = ผลต่างของเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน (t_1-t_0) (ชั่วโมง)

Q_p = อัตราการผลิตกรดโคจิก (กรัมกรดโคจิกต่อลิตร.วัน)

$$= \frac{P}{t}$$

กำหนดให้ : P = ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมกรดโคจิกต่อลิตร)

t = เวลาที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกสูงสุด (วัน)

q_p = อัตราการผลิตกรดโคจิกจำเพาะ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์.วัน)

$$= \frac{Q_p}{\frac{X_1 + X_0}{2}}$$

กำหนดให้ : X_1 = น้ำหนักเซลล์แห้งวันที่กรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)

X_0 = น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

$Y_{x/s}$ = ผลได้ของเซลล์จากน้ำตาล (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล)

$$= \frac{X_1 - X_0}{S_0 - S_1}$$

กำหนดให้ : X_0 = น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

X_1 = น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)

S_0 = ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

S_1 = ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในวันที่น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)

$Y_{p/s}$ = ผลได้ของกรดโคจิกจากน้ำตาล (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล)

$$= \frac{P_1 - P_0}{S_0 - S_1}$$

กำหนดให้ :

P_0 = ปริมาณกรดโคจิกเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

P_1 = ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)

S_0 = ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

S_1 = ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในวันที่กรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)

3.4.5 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

โดยใช้วิธีการวางแผนทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

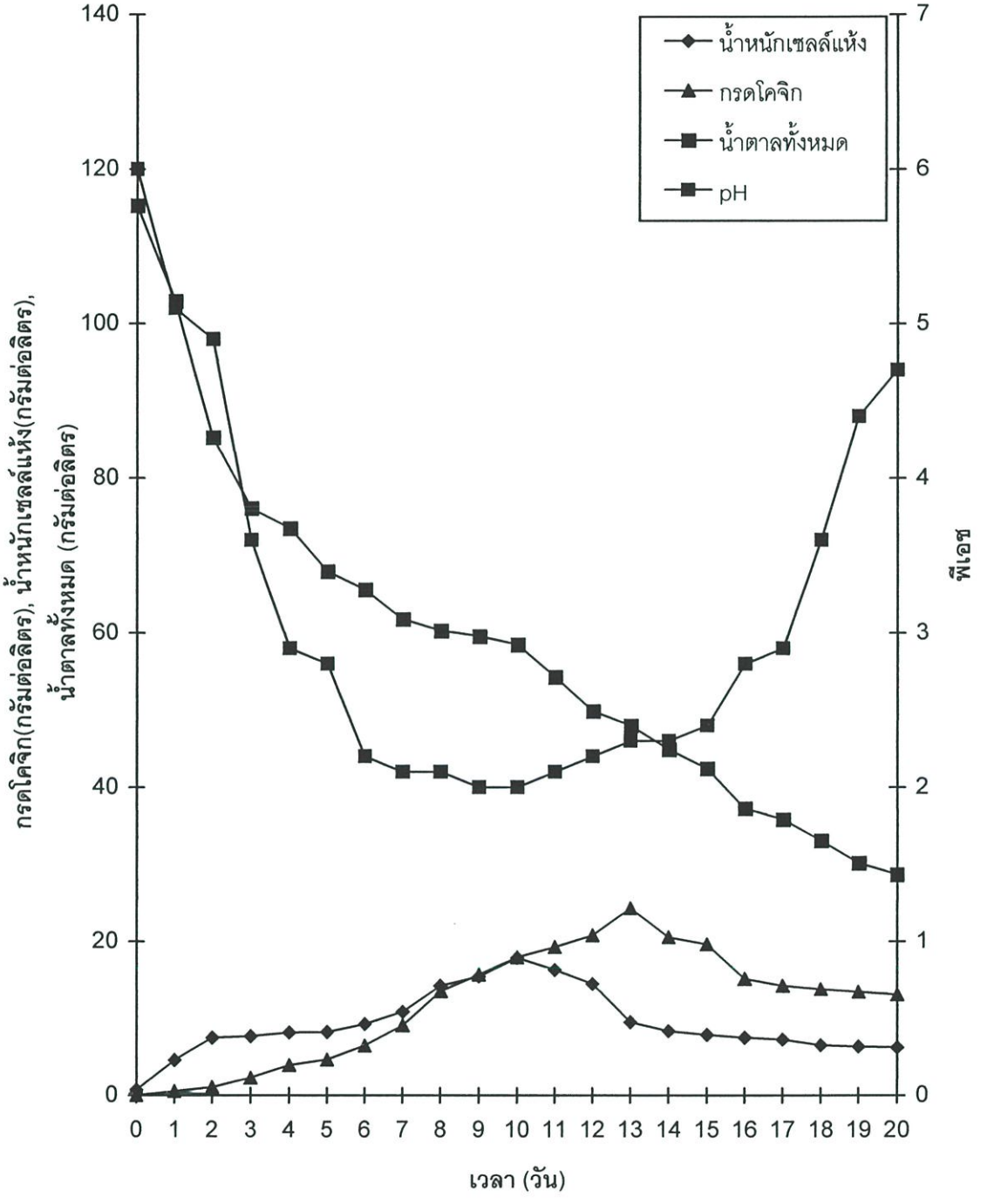
4.1 ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่า

4.1.1 ผลการศึกษาปริมาณของน้ำอ้อยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณต่างๆกัน คือน้ำอ้อยปริมาตร 25 50 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอาหารเหลวที่ใช้น้ำอ้อย 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดคือ 24.32 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.1) รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำอ้อย 75 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดโคจิก 15.07 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.2) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำอ้อยปริมาตร 50 เปอร์เซ็นต์ ให้กรดโคจิกเพียง 11.25 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 8 วัน (รูปที่ 4.3) การผลิตกรดโคจิกจะต่ำที่สุดคือ 5.86 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 9 วัน (รูปที่ 4.4)

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อราในอาหารที่มีน้ำอ้อยปริมาตรต่างๆกัน พบว่าอาหารที่ใช้น้ำอ้อยปริมาตร 100 เปอร์เซ็นต์ ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 17.86 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเลี้ยง สำหรับอาหารที่ใช้น้ำอ้อยปริมาตร 75 50 และ 25 เปอร์เซ็นต์ จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 15.68 19.17 และ 16.04 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 9 6 และ 6 วันตามลำดับ หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชในอาหารแต่ละสูตร พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่เหมือนกัน คือ หลังจากเลี้ยงเชื้อ 1 วัน ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกสูตรเริ่มลดลงและมีค่าพีเอชต่ำสุด 2.0 จากนั้นค่าพีเอชก็จะสูงขึ้นเล็กน้อย เมื่อสิ้นสุดการหมัก พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่าง 4.4 – 4.8 จากการเปรียบเทียบผลของปริมาตรน้ำอ้อยในสูตรอาหารทั้ง 4 สูตรทางสถิติ พบว่าปริมาตรน้ำอ้อยที่แตกต่างกัน ให้ผลการผลิตกรดโคจิกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังแสดงในตารางที่ 4.5

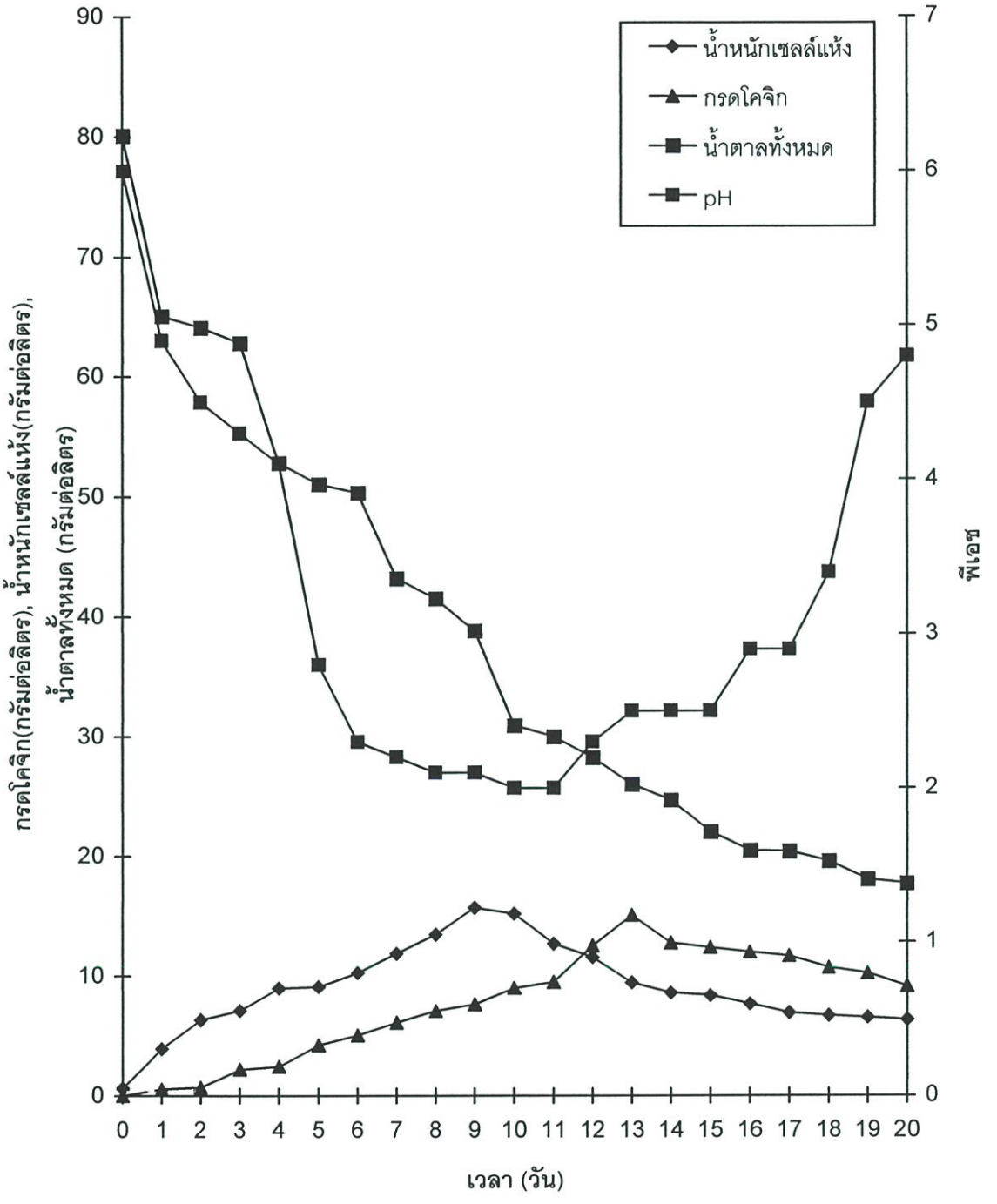
เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆคือ μ Q_P q_p $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/s}$ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำอ้อย 100 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่า Q_P 1.87 กรัมกรดโคจิกต่อลิตร.วัน q_pเท่ากับ 0.36 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์.วัน และ $Y_{p/s}$ เท่ากับ 0.36 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งสูงกว่าอาหารสูตรอื่นๆ จากผลการทดลองพบว่าถ้าเพิ่มปริมาตรน้ำอ้อยสูงขึ้น การผลิตกรดโคจิกก็จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน เมื่อพิจารณาการเพิ่มของเซลล์และอัตราการเจริญจำเพาะ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำอ้อย 50 เปอร์เซ็นต์มีค่า μ สูงที่สุดคือ 0.10 ต่อชั่วโมง ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำอ้อย 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ค่า μ มีค่าเท่ากัน คือ 0.07 ต่อชั่วโมง การที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำอ้อยมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์จะมีผลยับยั้งการเพิ่มของเซลล์ จากการทดลองถ้าต้องการปริมาณเซลล์มาก ในการ



รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 100 เปอร์เซ็นต์

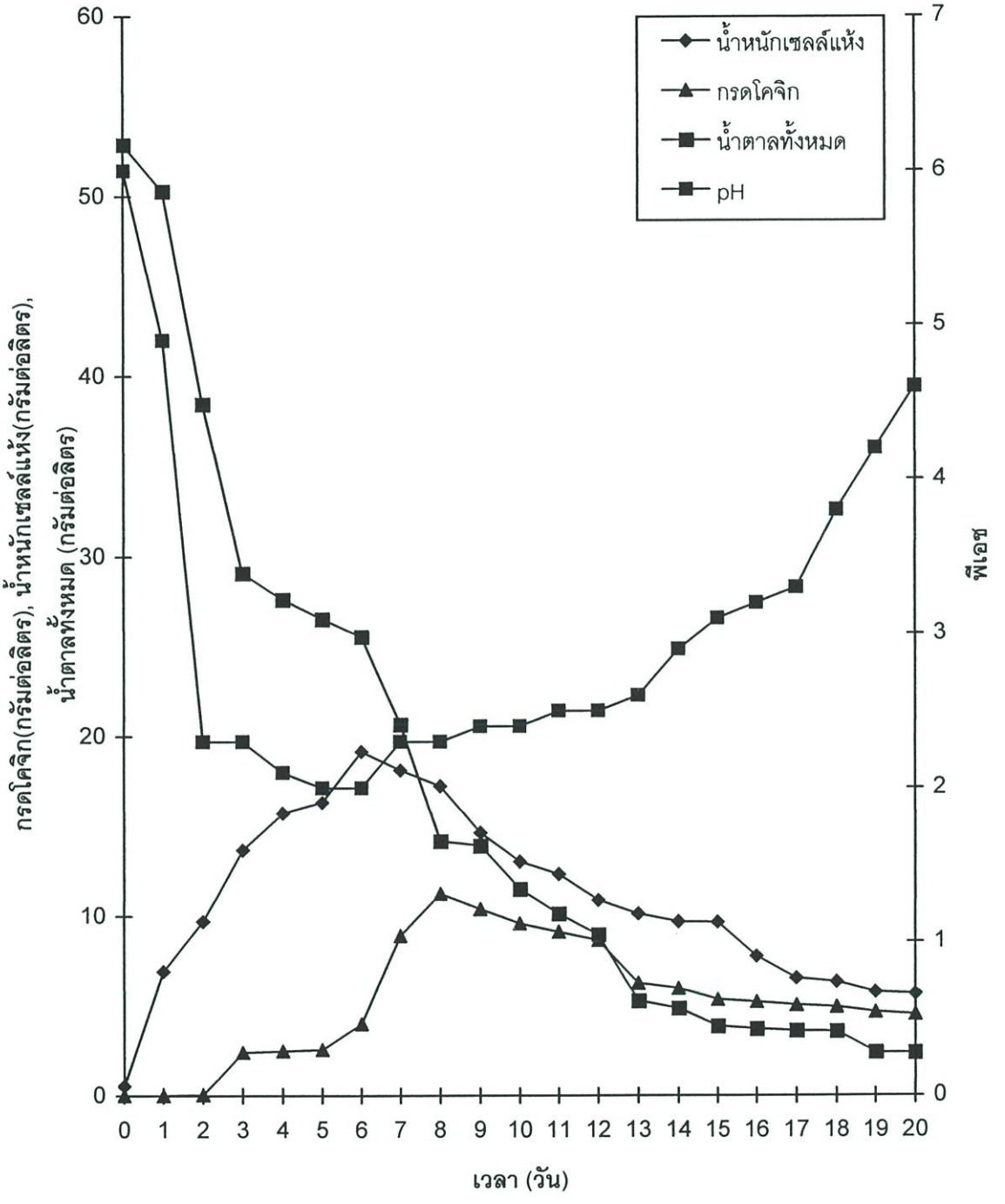
ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.71	0.00	115.29
1	5.1	4.63	0.52	102.94
2	4.9	7.54	1.07	85.29
3	3.6	7.69	2.30	76.17
4	2.9	8.18	3.95	73.52
5	2.8	8.21	4.68	67.94
6	2.2	9.27	6.46	65.58
7	2.1	10.86	9.07	61.76
8	2.1	14.21	13.52	60.29
9	2.0	15.44	15.72	59.57
10	2.0	17.86	17.92	58.44
11	2.1	16.31	19.24	54.26
12	2.2	14.49	20.76	49.88
13	2.3	9.53	24.32	48.00
14	2.3	8.33	20.56	44.88
15	2.4	7.86	19.60	42.41
16	2.8	7.51	15.16	37.23
17	2.9	7.27	14.24	35.82
18	3.6	6.57	13.80	33.10
19	4.4	6.38	13.44	30.14
20	4.7	6.24	13.08	28.68



รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 75 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.2แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 75 เปอร์เซ็นต์

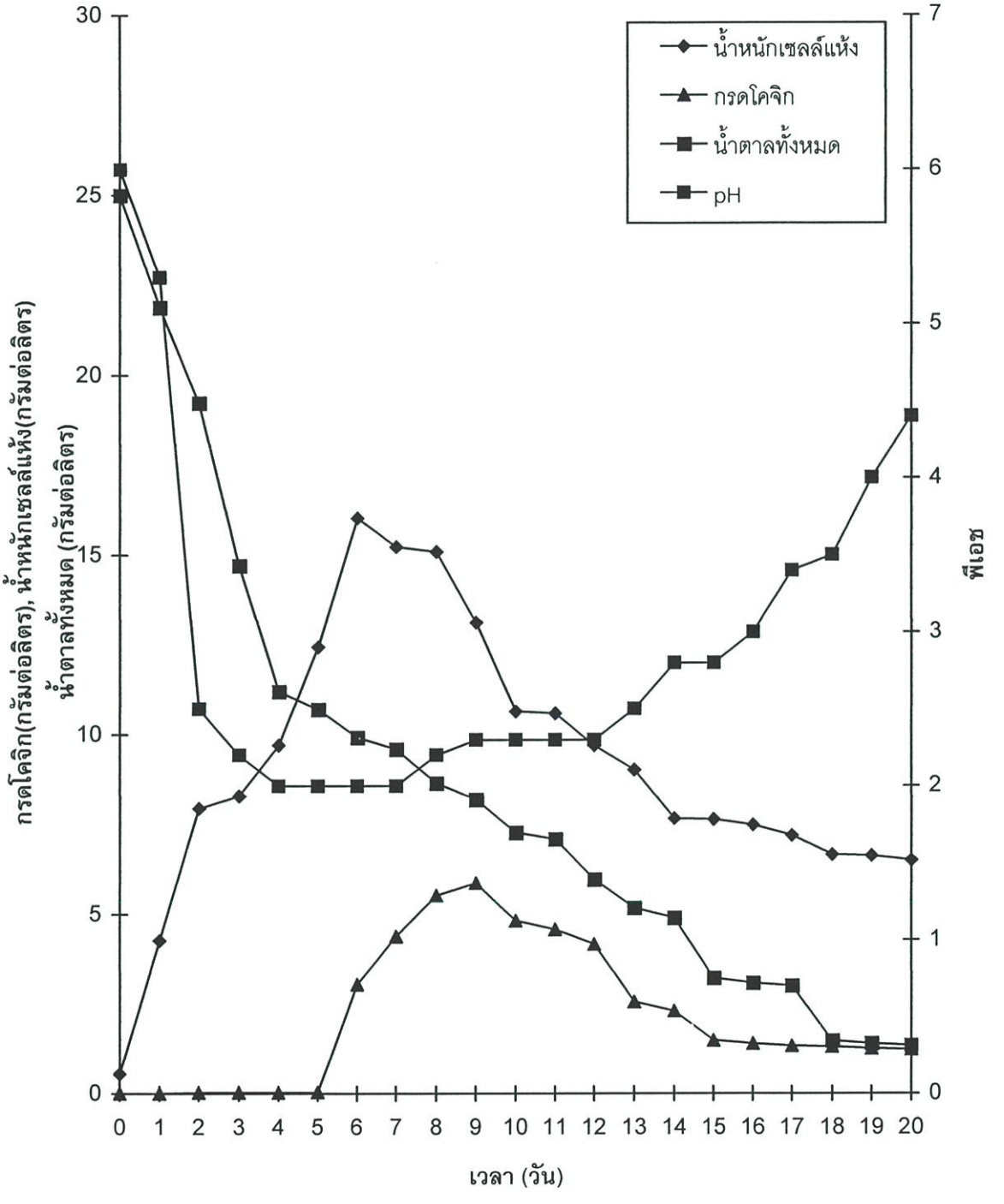
ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.62	0.00	80.11
1	4.9	3.93	0.53	65.05
2	4.5	6.35	0.69	64.11
3	4.3	7.11	2.21	62.82
4	4.1	8.99	2.44	52.82
5	2.8	9.11	4.25	51.05
6	2.3	10.27	5.08	50.35
7	2.2	11.86	6.12	43.17
8	2.1	13.49	7.10	41.52
9	2.1	15.68	7.62	38.82
10	2.0	15.18	8.99	30.94
11	2.0	12.71	9.48	30.00
12	2.3	11.56	12.52	28.23
13	2.3	9.47	15.07	26.00
14	2.5	8.61	12.78	24.70
15	2.5	8.38	12.37	22.02
16	2.9	7.68	12.00	20.50
17	2.9	6.94	11.70	20.42
18	3.4	6.71	10.71	19.57
19	4.5	6.56	10.25	18.08
20	4.8	6.35	9.13	17.73



รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 50 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.3แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 50 เปอร์เซ็นต์

ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.55	0.00	52.88
1	4.9	6.93	0.00	50.29
2	2.3	9.70	0.04	38.47
3	2.3	13.69	2.41	29.08
4	2.1	15.73	2.49	27.62
5	2.0	16.34	2.56	26.54
6	2.0	19.17	4.00	25.55
7	2.3	18.11	8.90	20.65
8	2.3	17.25	11.25	14.18
9	2.4	14.65	10.38	13.90
10	2.4	13.04	9.57	11.50
11	2.5	12.33	9.12	10.12
12	2.5	10.87	8.64	8.96
13	2.6	10.12	6.25	5.27
14	2.9	9.68	5.97	4.84
15	3.1	9.67	5.35	3.86
16	3.2	7.77	5.22	3.72
17	3.3	6.53	5.04	3.61
18	3.8	6.33	4.92	3.58
19	4.2	5.76	4.63	2.42
20	4.6	5.67	4.53	2.38



รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 25เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำอ้อย 25 เปอร์เซ็นต์

ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.55	0.00	25.00
1	5.3	4.27	0.00	21.88
2	2.5	7.95	0.02	19.23
3	2.2	8.29	0.02	14.70
4	2.0	9.71	0.03	11.20
5	2.0	12.45	0.03	10.70
6	2.0	16.04	3.04	9.92
7	2.0	15.23	4.38	9.59
8	2.2	15.09	5.52	8.64
9	2.3	13.12	5.86	8.18
10	2.3	10.64	4.82	7.27
11	2.3	10.59	4.58	7.09
12	2.3	9.70	4.16	5.97
13	2.5	9.02	2.55	5.17
14	2.8	7.66	2.30	4.89
15	2.8	7.64	1.48	3.22
16	3.0	7.49	1.39	3.08
17	3.4	7.19	1.33	3.00
18	3.5	6.66	1.30	1.46
19	4.0	6.63	1.25	1.38
20	4.4	6.50	1.23	1.34

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารที่มีน้ำอ้อยปริมาตรต่างๆกัน

น้ำอ้อย (เปอร์เซ็นต์)	กรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)
25	5.86 [d]
50	11.25 [c]
75	15.07 [b]
100	24.32 [a]

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01
ตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำอ้อยปริมาตรต่างๆกัน

ปริมาตรของน้ำอ้อย (เปอร์เซ็นต์)	μ (ต่อชั่วโมง)	Q_p (กรัมกรดโคจิกต่อลิตร.วัน)	q_p (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์.วัน)	$Y_{x/s}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{p/s}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล)
25	0.08	0.65	0.09	1.06	0.34
50	0.10	1.40	0.15	0.70	0.29
75	0.07	1.15	0.22	0.37	0.27
100	0.07	1.87	0.36	0.31	0.36

เพาะเลี้ยงช่วงแรกควรเติมน้ำอ้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากได้เซลล์สูงตามต้องการ จึงค่อยเติมน้ำอ้อยเพิ่มขึ้นเพื่อให้มีการผลิตกรดโคจิกต่อไป

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลปริมาณเพิ่มขึ้นก็สามารถผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณสูงขึ้น เนื่องจากน้ำอ้อย 100 เปอร์เซ็นต์ มีธาตุอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และเกลือแร่ เป็นปริมาณที่เพียงพอต่อการผลิตกรดโคจิกของ *A.oryzae* NRRL 484 จึงทำให้ผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณสูงสุดด้วย ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Lin *et al.* (1991) ซึ่งได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus parasiticus* UNBF A 12 จากอาหารที่ประกอบด้วยยีสต์สกัด 2 เปอร์เซ็นต์ และน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ (อาหารYES) พบว่าปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้อยู่ระหว่าง 11.17 – 20.93 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งการทดลองครั้งนี้ได้ปริมาณกรดโคจิกสูงกว่าเล็กน้อย แต่ Wei *et al.* (1991) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus candidus* ATCC 44054 ในอาหารเหลวที่แตกต่างกัน 3 ชนิด

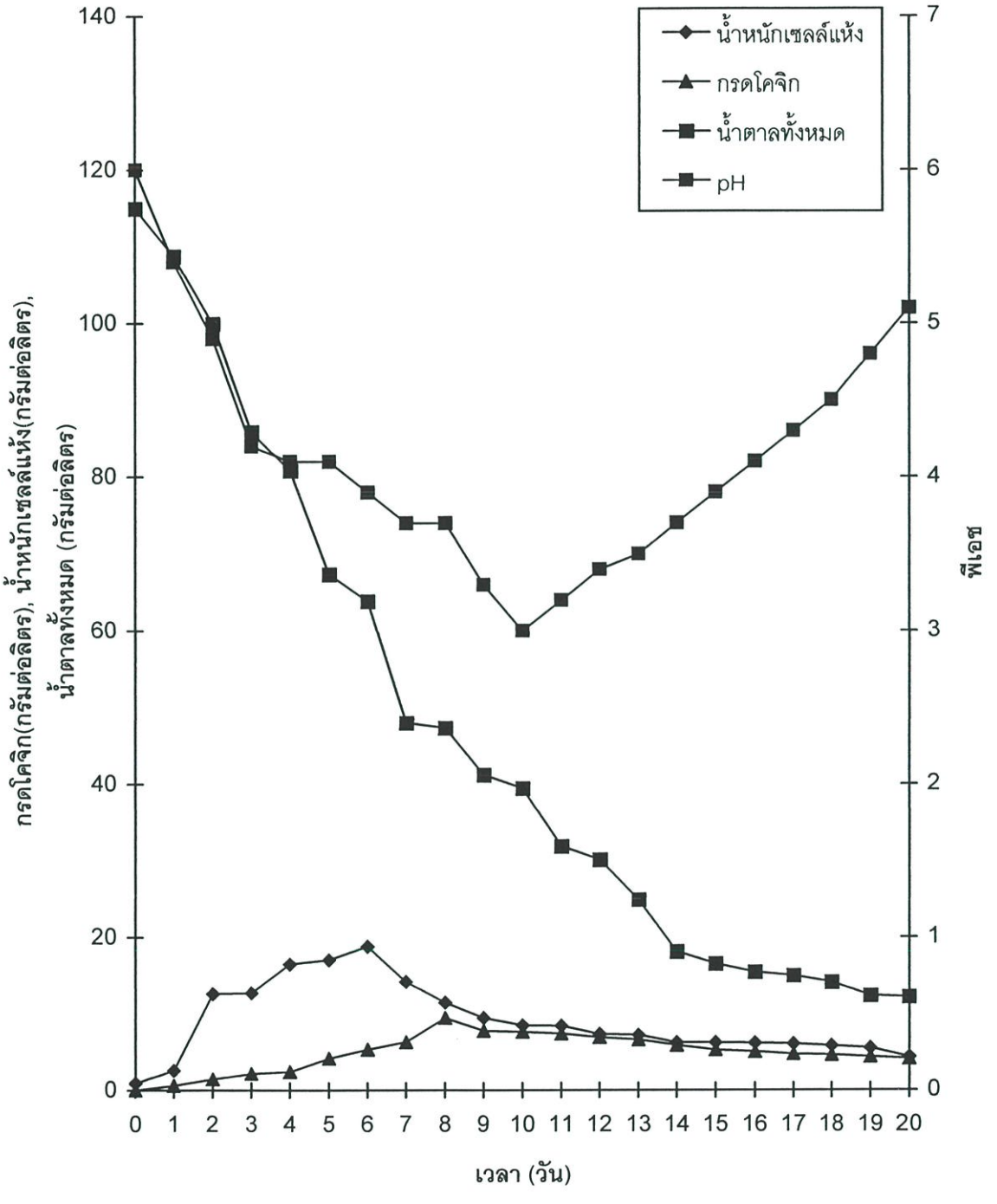
คือ อาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek – Dox liquid medium ซึ่งใช้กลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน อาหารของ Tadera ซึ่งใช้กลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และอาหารของ Yeast Extract Sucrose (YES) ซึ่งใช้ซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร YES เป็นเวลา 7-9 วัน ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 57-59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่าการทดลองครั้งนี้ประมาณ 2.3 เท่า

ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาตรน้ำอ้อย 100 เปอร์เซ็นต์

4.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแอมโนเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในปริมาณต่างๆกัน คือ แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหารเหลวที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดคือ 24.32 กรัมต่อลิตรในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.6) รองลงมาคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิก 15.20 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.7) อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 15 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิก 11.04 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.8) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0 กรัมต่อลิตร ให้กรดโคจิกเพียง 9.48 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 8 วัน (รูปที่ 4.5) การผลิตกรดโคจิกจะต่ำที่สุดคือ 8.61 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 20 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 9 วัน (รูปที่ 4.9)

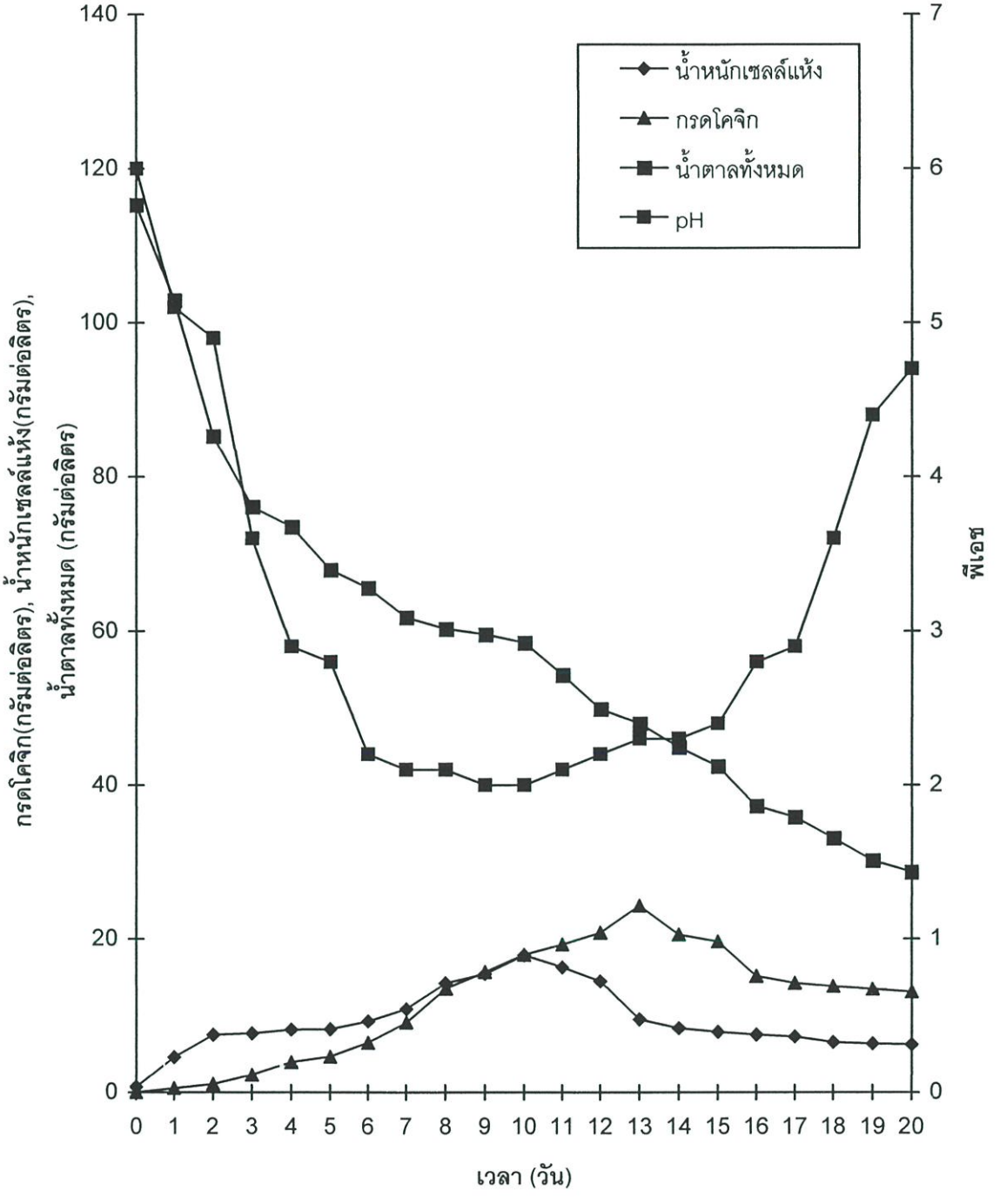
เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อราในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 17.86 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 18.76 17.13 18.83 และ 18.06 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 9 6 และ 7 วัน ตามลำดับ หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชในอาหารแต่ละสูตร พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่เหมือนกัน คือ หลังจากเลี้ยงเชื้อ 1 วัน ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกสูตรเริ่มลดลงและมีค่าพีเอชต่ำสุด 2.0 หลังจากนั้นค่าพีเอชจะสูงขึ้นเล็กน้อย เมื่อสิ้นสุดการหมัก พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่าง 3.9 –5.1 จากการเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สูตร พบว่าผลการผลิตกรดโคจิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังแสดงในตารางที่ 4.12



รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0 กรัมต่อลิตร

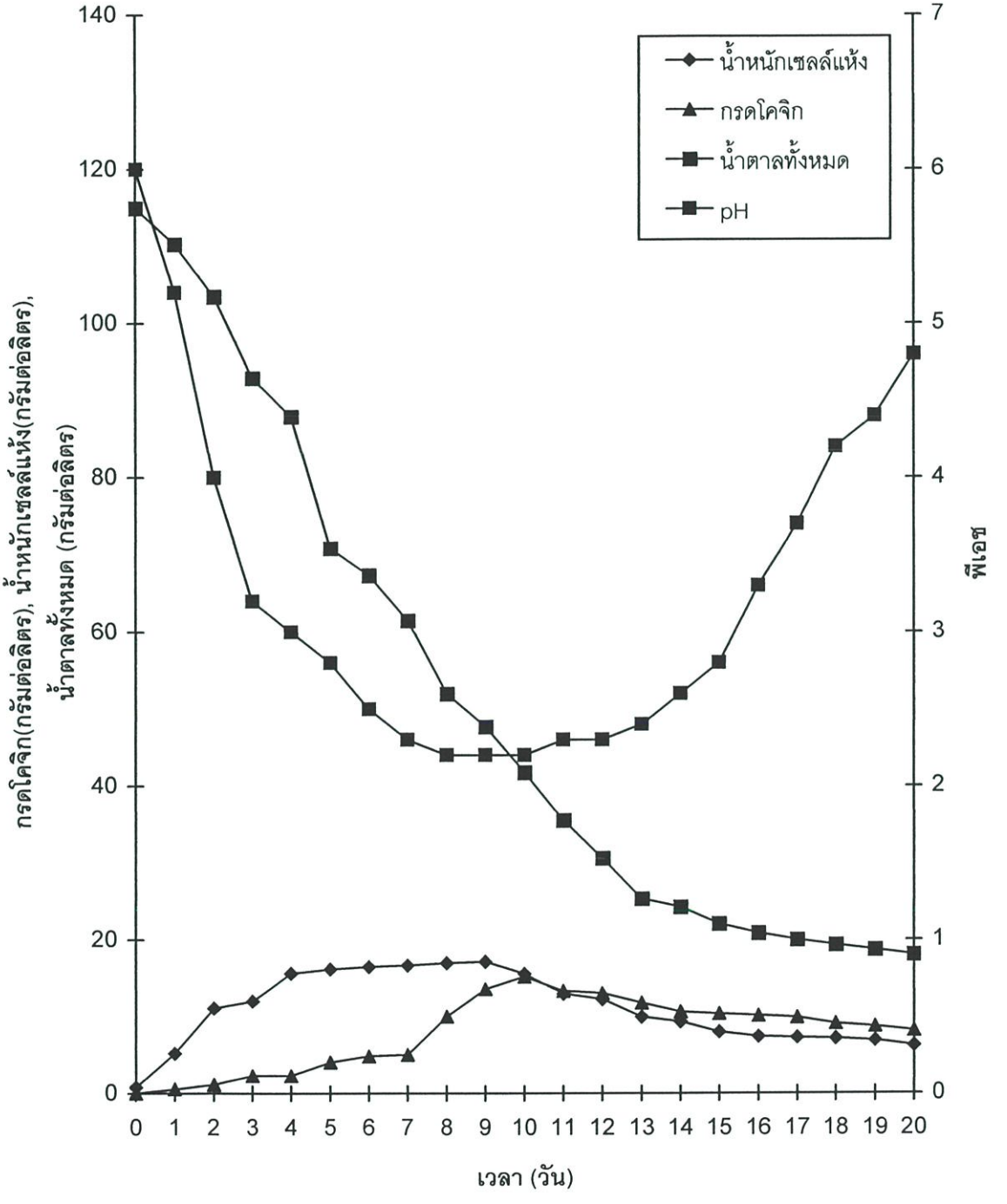
ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.91	0.00	115.00
1	5.4	2.63	0.57	108.82
2	4.9	12.62	1.44	100.00
3	4.2	12.75	2.16	85.88
4	4.1	16.48	2.41	80.88
5	4.1	17.05	4.17	67.35
6	3.9	18.76	5.36	63.82
7	3.7	14.17	6.31	48.00
8	3.7	11.42	9.48	47.29
9	3.3	9.47	7.72	41.17
10	3.0	8.51	7.62	39.41
11	3.2	8.44	7.39	31.88
12	3.4	7.31	6.91	30.11
13	3.5	7.19	6.63	24.88
14	3.7	6.23	5.88	18.11
15	3.9	6.22	5.26	16.52
16	4.1	6.16	5.05	15.47
17	4.3	6.06	4.74	14.94
18	4.5	5.80	4.57	14.11
19	4.8	5.53	4.35	12.38
20	5.1	4.38	4.09	12.20



รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.8 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร

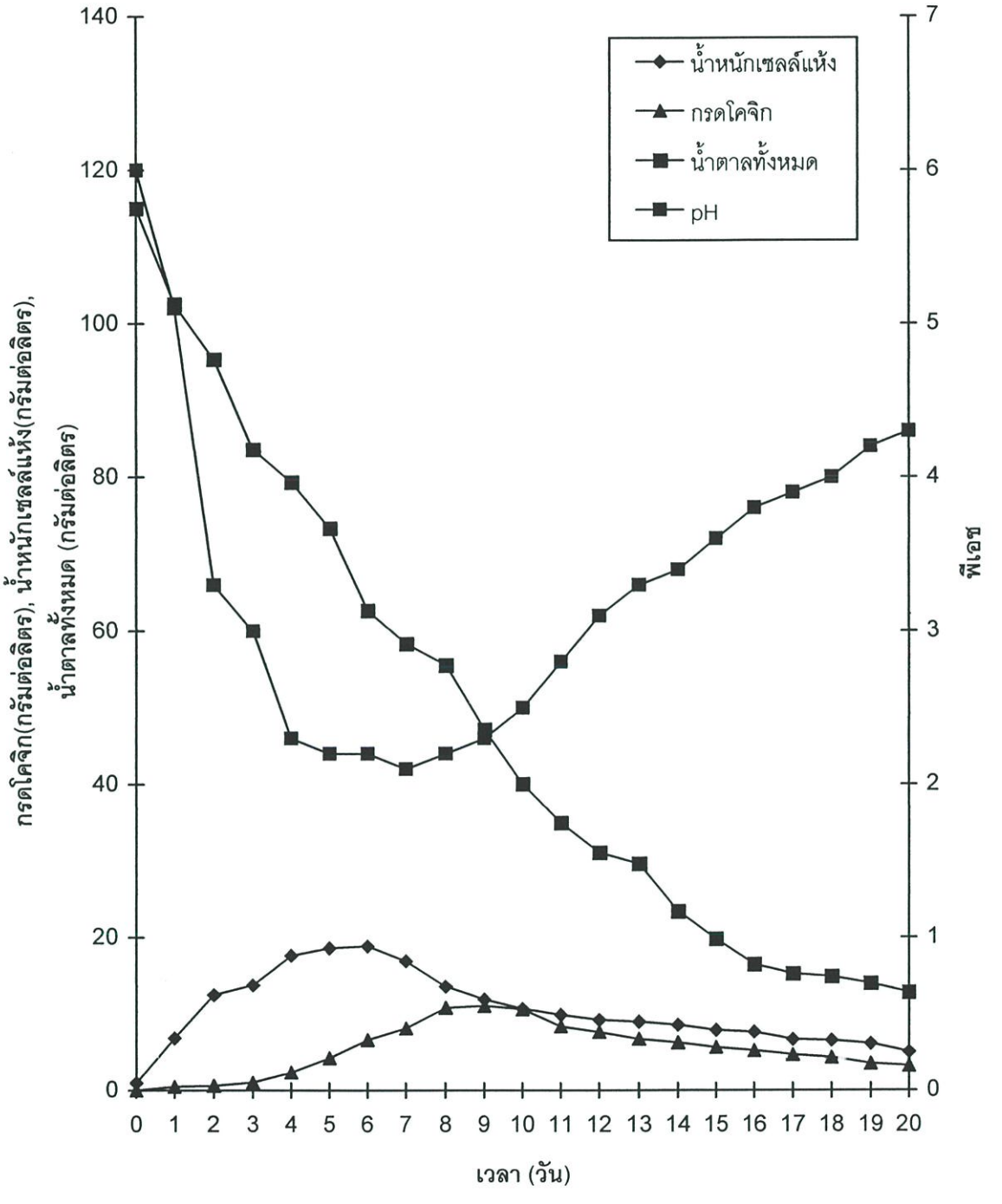
ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.71	0.00	115.29
1	5.1	4.63	0.52	102.94
2	4.9	7.54	1.07	85.29
3	3.6	7.69	2.30	76.17
4	2.9	8.18	3.95	73.52
5	2.8	8.21	4.68	67.94
6	2.2	9.27	6.46	65.58
7	2.1	10.86	9.07	61.76
8	2.1	14.21	13.52	60.29
9	2.0	15.44	15.72	59.57
10	2.0	17.86	17.92	58.44
11	2.1	16.31	19.24	54.26
12	2.2	14.49	20.76	49.88
13	2.3	9.53	24.32	48.00
14	2.3	8.33	20.56	44.88
15	2.4	7.86	19.60	42.41
16	2.8	7.51	15.16	37.23
17	2.9	7.27	14.24	35.82
18	3.6	6.57	13.80	33.10
19	4.4	6.38	13.44	30.14
20	4.7	6.24	13.08	28.68



รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร

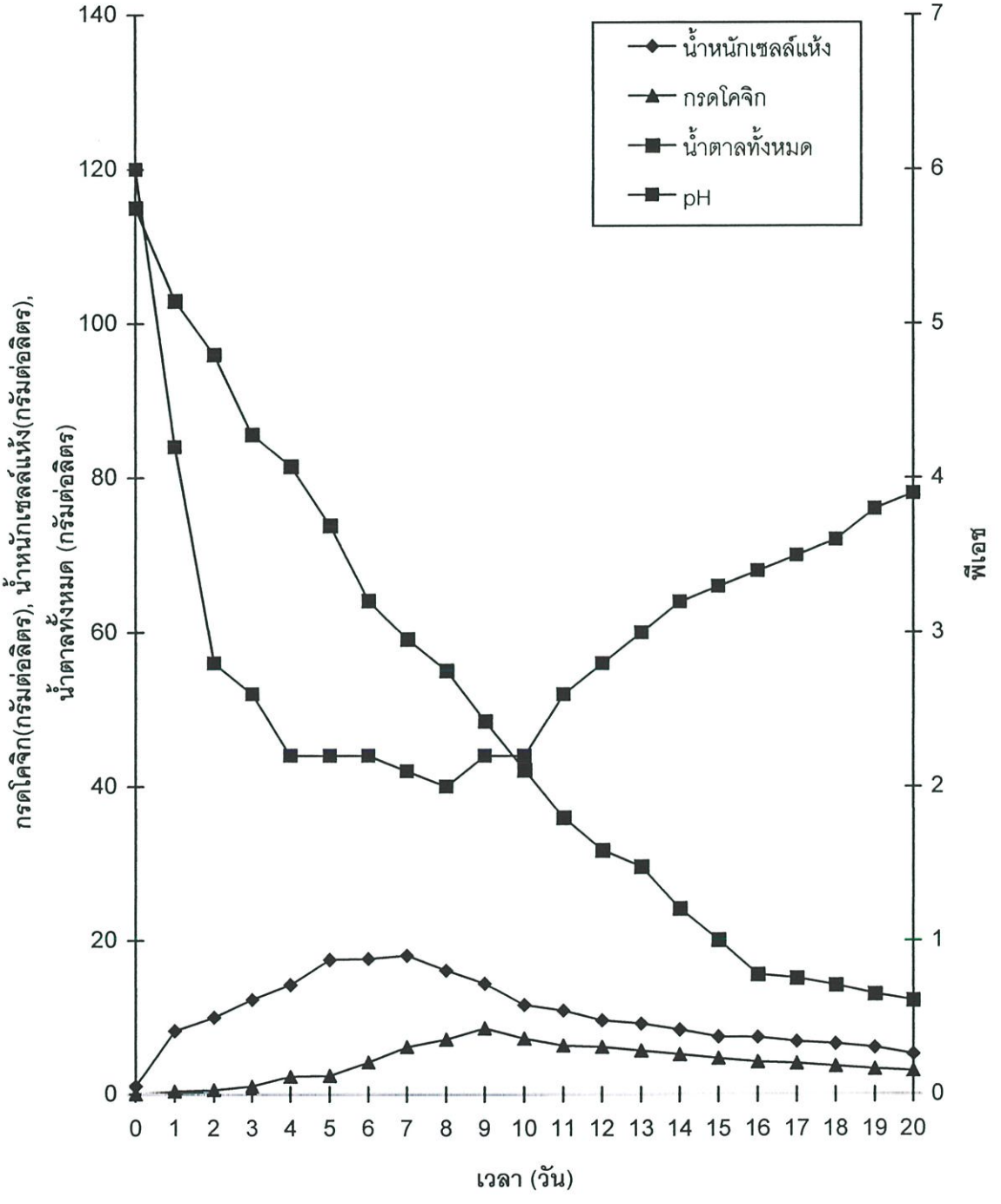
ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.79	0.00	115.00
1	5.2	5.24	0.53	110.29
2	4.0	11.10	1.16	103.52
3	3.2	12.00	2.28	92.94
4	3.0	15.63	2.32	87.94
5	2.8	16.15	4.06	70.88
6	2.5	16.49	4.86	67.35
7	2.3	16.68	5.02	61.47
8	2.2	16.99	10.02	52.00
9	2.2	17.13	13.56	47.64
10	2.2	15.59	15.20	41.76
11	2.3	12.96	13.30	35.52
12	2.3	12.26	13.02	30.58
13	2.4	9.92	11.74	25.32
14	2.6	9.32	10.62	24.23
15	2.8	8.02	10.38	22.05
16	3.3	7.40	10.14	20.82
17	3.7	7.29	9.86	20.00
18	4.2	7.13	9.10	19.35
19	4.4	6.88	8.70	18.70
20	4.8	6.22	8.18	18.05



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 15 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.10 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 15 กรัมต่อลิตร

ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	0.99	0.00	115.05
1	5.1	6.84	0.47	102.58
2	3.3	12.48	0.63	95.41
3	3.0	13.78	1.05	83.64
4	2.3	17.64	2.38	79.41
5	2.2	18.60	4.22	73.41
6	2.2	18.83	6.62	62.70
7	2.1	16.90	8.11	58.35
8	2.2	13.59	10.76	55.52
9	2.3	11.85	11.04	47.11
10	2.5	10.69	10.60	40.05
11	2.8	9.88	8.34	34.94
12	3.1	9.22	7.63	31.05
13	3.3	8.96	6.75	29.64
14	3.4	8.52	6.23	23.41
15	3.6	7.90	5.65	19.82
16	3.8	7.62	5.18	16.47
17	3.9	6.66	4.66	15.29
18	4.0	6.55	4.30	14.88
19	4.2	6.14	3.52	14.00
20	4.3	5.04	3.24	12.76



รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 20 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.11 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 20 กรัมต่อลิตร

ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	1.05	0.00	115.05
1	4.2	8.26	0.35	103.00
2	2.8	10.00	0.54	96.00
3	2.6	12.32	1.04	85.64
4	2.2	14.22	2.27	81.52
5	2.2	17.48	2.42	73.88
6	2.2	17.64	4.18	64.17
7	2.1	18.06	6.15	59.11
8	2.0	16.12	7.12	55.05
9	2.2	14.41	8.61	48.52
10	2.2	11.62	7.25	42.17
11	2.6	10.90	6.34	36.00
12	2.8	9.64	6.16	31.76
13	3.0	9.22	5.68	29.64
14	3.2	8.42	5.24	24.17
15	3.3	7.50	4.71	20.11
16	3.4	7.43	4.22	15.64
17	3.5	6.89	4.03	15.11
18	3.6	6.62	3.68	14.23
19	3.8	6.14	3.35	13.05
20	3.9	5.28	3.06	12.23

ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆกัน

แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)
0	9.48 [cd]
5	24.32 [a]
10	15.20 [b]
15	11.04 [c]
20	8.61 [d]

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01
ตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ตารางที่ 4.13 แสดงค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆกัน

ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	μ (ต่อชั่วโมง)	Q_p (กรัมกรดโคจิกต่อลิตร.วัน)	q_p (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์.วัน)	Yx/s (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล)	Yp/s (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล)
0	0.04	1.18	0.19	0.36	0.14
5	0.07	1.87	0.36	0.31	0.36
10	0.07	1.52	0.18	0.25	0.20
15	0.08	1.22	0.19	0.36	0.16
20	0.08	0.95	0.12	0.32	0.12

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ คือ μ Q_P q_p $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/s}$ ดังแสดงในตารางที่ 4.13 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ให้ค่า Q_P 1.87 กรัมกรดโคจิกต่อลิตร.วัน q_p เท่ากับ 0.36 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์.วัน และ $Y_{p/s}$ เท่ากับ 0.36 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งสูงกว่าอาหารสูตรอื่นๆ จากผลการทดลองพบว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตสูงขึ้น จะทำให้การผลิตกรดโคจิกลดลง เมื่อพิจารณาการเพิ่มของเซลล์และอัตราการเจริญจำเพาะ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 5 และ 10 กรัมต่อลิตร มีค่า μ เท่ากันคือ 0.07 ต่อชั่วโมง ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 15

และ 20 กรัมต่อลิตรมีค่า μ เท่ากันอีกเช่นกันคือ 0.08 ต่อชั่วโมง ค่า μ จะต่ำที่สุดคือ 0.04 ต่อชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อเชื้อรา *A.oryzae* NRRL 484 ได้รับอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณเพิ่มขึ้น แต่ผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณต่ำลง อาจเป็นเพราะว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นมากกว่า 5 กรัมต่อลิตรจะมีผลยับยั้งการผลิตกรดโคจิก และเมื่อพิจารณาตารางที่ 4.13 จะเห็นว่าเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0 5 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร ทำให้ค่า μ ใกล้เคียงกันมาก เนื่องจากในน้ำอ้อยมีสารอาหารและแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้อย่างเพียงพอแล้ว จากการศึกษาของ Davis (1962) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* NTCC 10124 โดยศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคจิก โดยใช้แหล่งไนโตรเจน 26 ชนิดที่มีความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการใช้เคซีน ทริปโตเฟน และกรดกลูตามิก ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 7 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาคืออะลานีนผลิตกรดโคจิกได้ 6 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับยีสต์สกัดและเปปโตนผลิตกรดได้ 5 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนการใช้เปปโตนผลิตกรดโคจิกได้ต่ำสุดคือ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร การใช้แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมคาร์บอเนต พบว่าเชื้อไม่สามารถผลิตกรดโคจิกได้ โดยเฉพาะเมื่อใช้แอมโมเนียมคาร์บอเนต นอกจากไม่ผลิตกรดโคจิกแล้ว ยังพบว่าเชื้อไม่เจริญเติบโตด้วย จากผลการทดลองอธิบายได้ว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *A.flavus* NTCC 10124 ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองนี้ อาจเป็นเพราะว่าเลือกใช้สับสเทรตในการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน เมื่อพิจารณาผลการทดลองของ Kwak and Rhee (1992a) ซึ่งได้ปรับปรุงการผลิตกรดโคจิกโดยการตรึงเส้นใยของ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน พบว่าผลิตกรดโคจิกได้ 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน ซึ่งผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่าการทดลองครั้งนี้ สำหรับผลการทดลองของ Wakisaka *et al.*(1998) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้ ทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในฟลาสก์แบบเขย่า ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ในอาหาร 1 ลิตร ที่มีองค์ประกอบคือ กลูโคส 100 กรัม ยีสต์สกัด 1 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 0.75 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัม พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5 พบว่าผลิตกรดโคจิกได้ 24 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ สุกัญญา สายธิ (2541) ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484

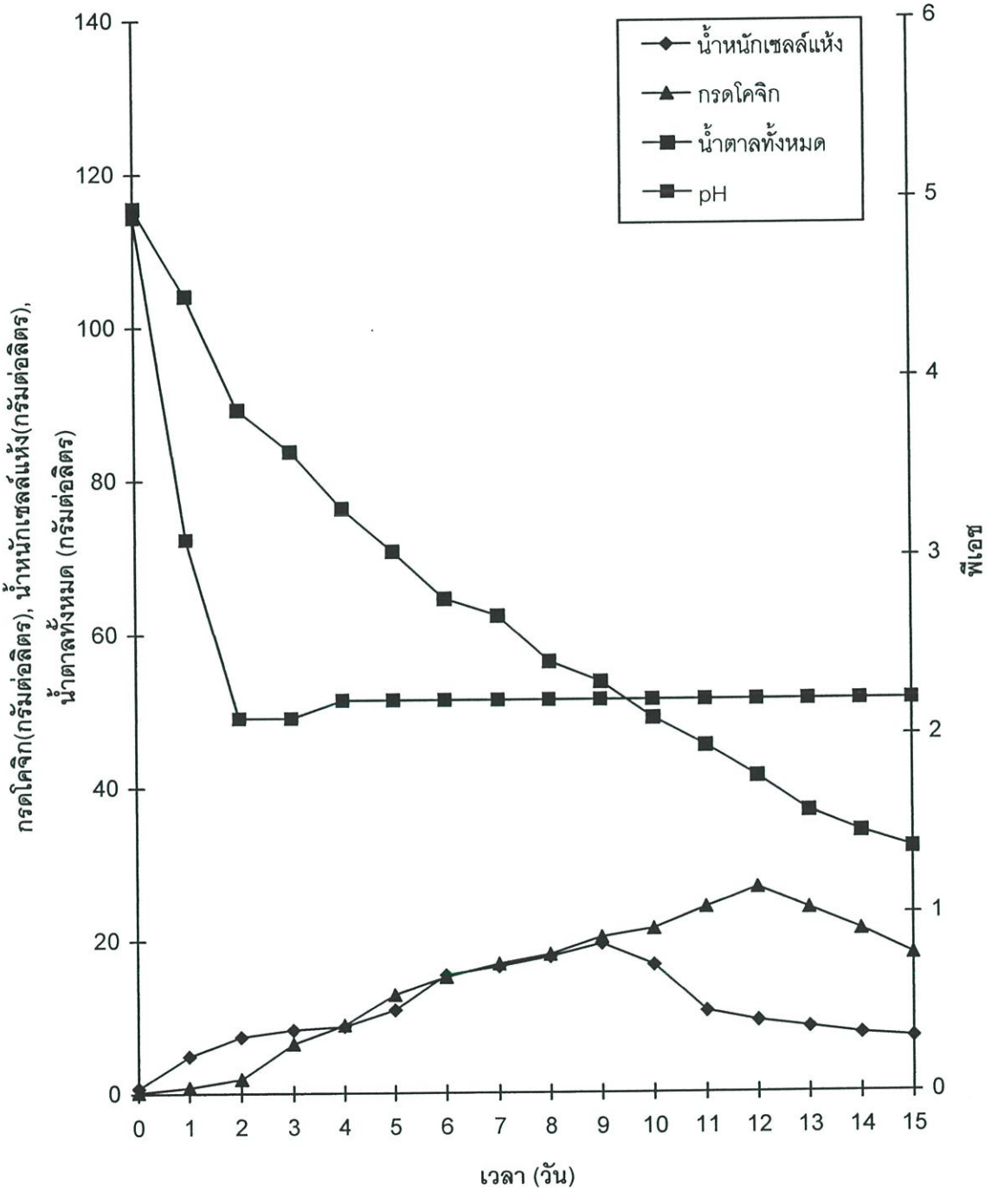
จากน้ำมะพร้าว ทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน ในอาหาร 1 ลิตร ที่มีองค์ประกอบคือ ซูโครส 175 กรัม ยีสต์สกัด 1 กรัม แอมโมเนียมไนเตรท 2 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัม และน้ำมะพร้าว 1 ลิตร พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 พบว่าผลิตกรดโคจิกได้ 34 กรัมต่อลิตร ผลได้ของกรดโคจิกจากน้ำตาลเท่ากับ 0.45 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับการทดลองนี้

ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

4.2 ผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบตช์

การผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบตช์ เมื่อใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม พบว่าให้ปริมาณกรดโคจิก 26.70 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.10) และให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 19.45 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลง ส่วนค่าพีเอชของอาหาร พบว่าหลังจากเลี้ยงเชื้อ 1 วันค่าพีเอชเริ่มลดลง และมีค่าพีเอชต่ำสุด 2.1 จากนั้นค่าพีเอชจะสูงขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อสิ้นสุดการหมัก พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2.2 เมื่อให้อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ได้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 38.10 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.11) และได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 20.26 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชของอาหาร พบว่าหลังจากเลี้ยงเชื้อ 1 วันค่าพีเอชเริ่มลดลง และมีค่าพีเอชต่ำสุด 2.1 หลังจากนั้นค่าพีเอชจะสูงขึ้น เมื่อสิ้นสุดการหมักค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 2.5 แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 2.0 วีวีเอ็ม พบว่าปริมาณกรดโคจิกต่ำที่สุดคือ 24.36 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.12) และได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 17.43 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชของอาหาร พบว่าหลังจากเลี้ยงเชื้อ 1 วันค่าพีเอชเริ่มลดลง และมีค่าพีเอชต่ำสุด 2.1 หลังจากนั้นค่าพีเอชจะสูงขึ้น เมื่อสิ้นสุดการหมักค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 2.4 จากการเปรียบเทียบผลของอัตราการให้อากาศทั้ง 3 ระดับทางสถิติ พบว่าอัตราการให้อากาศที่แตกต่างกัน ให้ผลการผลิตกรดโคจิกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังแสดงในตารางที่ 4.17

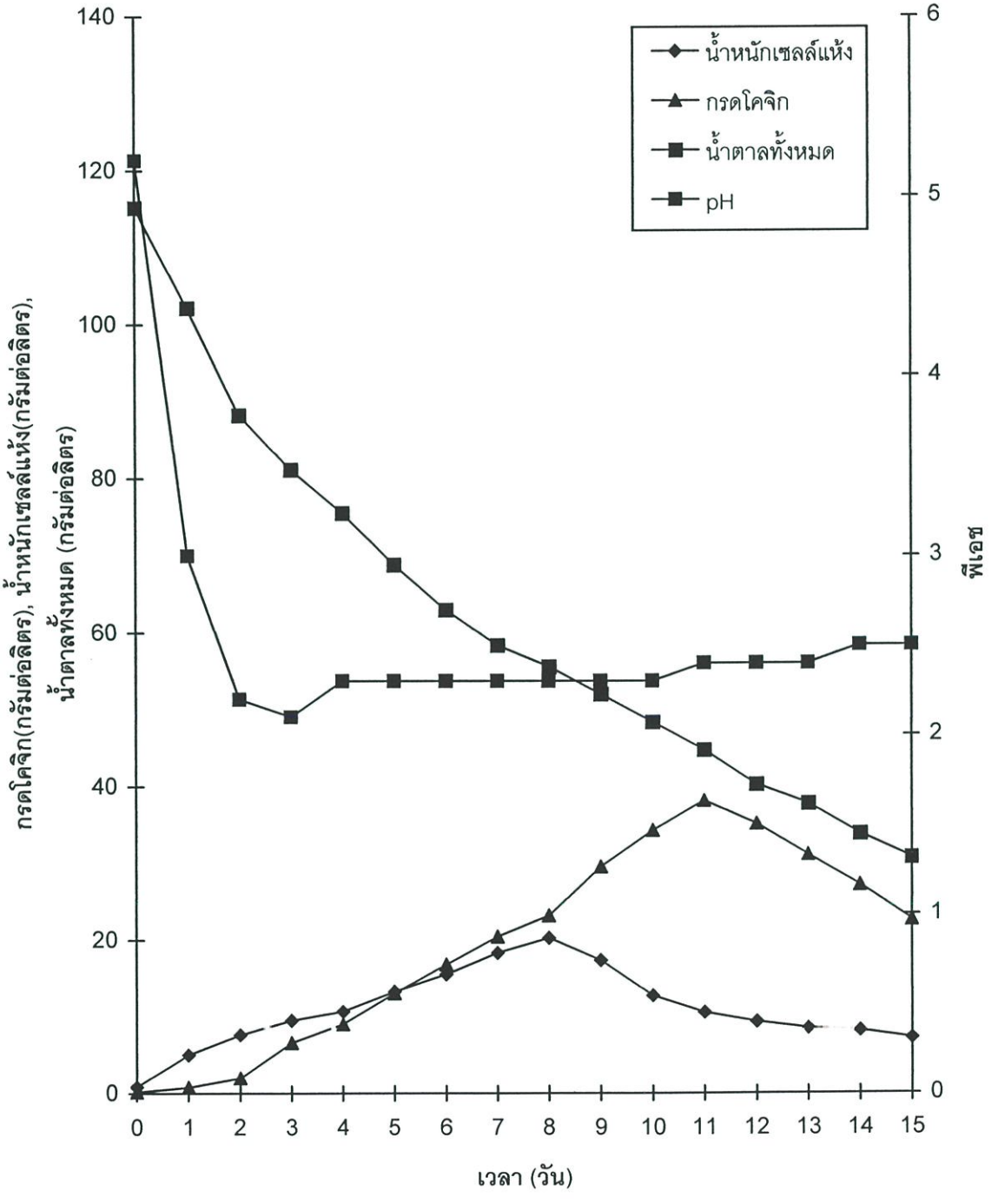
เมื่อนำผลการทดลองมาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆคือ μ Q_p q_p $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/s}$ ดังแสดงในตารางที่ 4.18 พบว่าอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็มให้ค่า Q_p 3.46 กรัมกรดโคจิกต่อลิตร.วัน q_p เท่ากับ 0.60 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์.วัน และ $Y_{p/s}$ เท่ากับ 0.54 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งสูงกว่าอัตราการให้อากาศระดับอื่นๆ เมื่อพิจารณาการเพิ่มของเซลล์และอัตราการเจริญจำเพาะ



รูปที่ 4.10 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม

ตารางที่ 4.14 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ผลิตโดย *A.oryzae* NRRL 484 ในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม

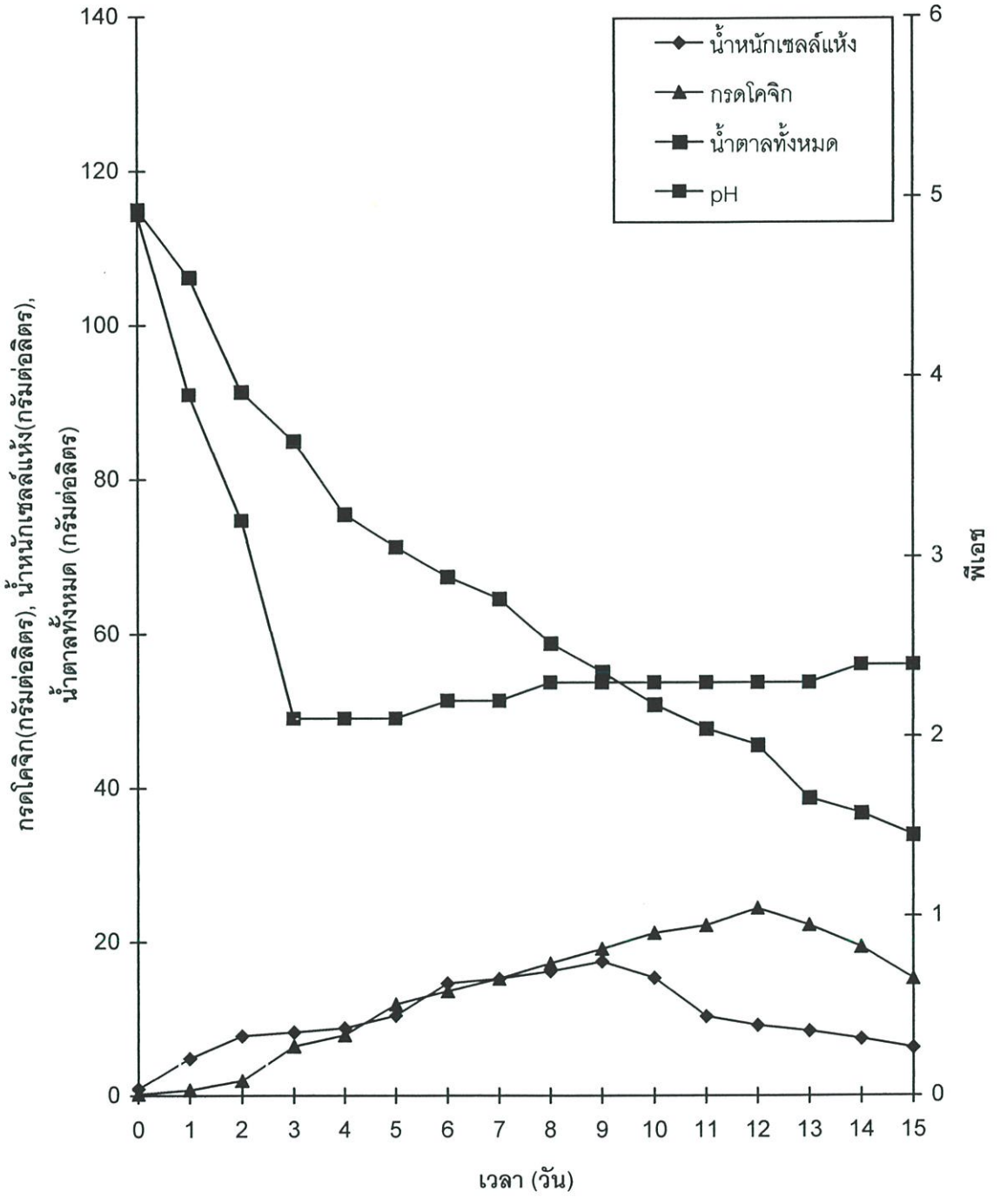
ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	4.9	0.71	0.16	115.58
1	3.1	4.92	0.77	104.11
2	2.1	7.41	1.87	89.29
3	2.1	8.32	6.50	83.82
4	2.2	8.75	8.88	76.41
5	2.2	10.84	12.85	70.76
6	2.2	15.36	15.16	64.58
7	2.2	16.48	16.84	62.35
8	2.2	17.72	18.05	56.35
9	2.2	19.45	20.27	53.64
10	2.2	16.64	21.40	48.94
11	2.2	10.63	24.15	45.29
12	2.2	9.35	26.70	41.29
13	2.2	8.51	23.97	36.76
14	2.2	7.62	21.20	34.05
15	2.2	7.13	17.97	31.94



รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม

ตารางที่ 4.15 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ผลิตโดย *A.oryzae* NRRL 484 ในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม

ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	5.2	0.83	0.18	115.23
1	3.0	5.03	0.81	102.17
2	2.2	7.62	2.01	88.23
3	2.1	9.54	6.63	81.17
4	2.3	10.67	9.04	75.52
5	2.3	13.25	13.03	68.82
6	2.3	15.48	16.76	62.94
7	2.3	18.32	20.42	58.35
8	2.3	20.26	23.16	55.52
9	2.3	17.34	29.50	52.00
10	2.3	12.75	34.20	48.35
11	2.4	10.56	38.10	44.70
12	2.4	9.33	35.10	40.23
13	2.4	8.48	31.05	37.76
14	2.5	8.16	27.12	33.82
15	2.5	7.23	22.60	30.70



รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยง เชื้อในถังหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม

ตารางที่ 4.16 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ผลิตโดย *A. oryzae* NRRL 484 ในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม

ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	PH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	4.9	0.88	0.15	115.05
1	3.9	4.82	0.75	106.23
2	3.2	7.74	1.92	91.41
3	2.1	8.26	6.44	85.05
4	2.1	8.77	7.87	75.52
5	2.1	10.44	11.88	71.29
6	2.2	14.58	13.60	67.41
7	2.2	15.22	15.20	64.58
8	2.3	16.16	17.20	58.76
9	2.3	17.43	19.07	55.05
10	2.3	15.30	21.12	50.82
11	2.3	10.28	22.10	47.64
12	2.3	9.12	24.36	45.52
13	2.3	8.44	22.15	38.70
14	2.4	7.38	19.35	36.70
15	2.4	6.22	15.18	33.88

ตารางที่ 4.17 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้ในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศระดับต่างๆกัน

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	อัตราการให้อากาศ (วีวีเอ็ม)	กรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)
200	1.0	26.70 [b]
200	1.5	38.10 [a]
200	2.0	24.36 [c]

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

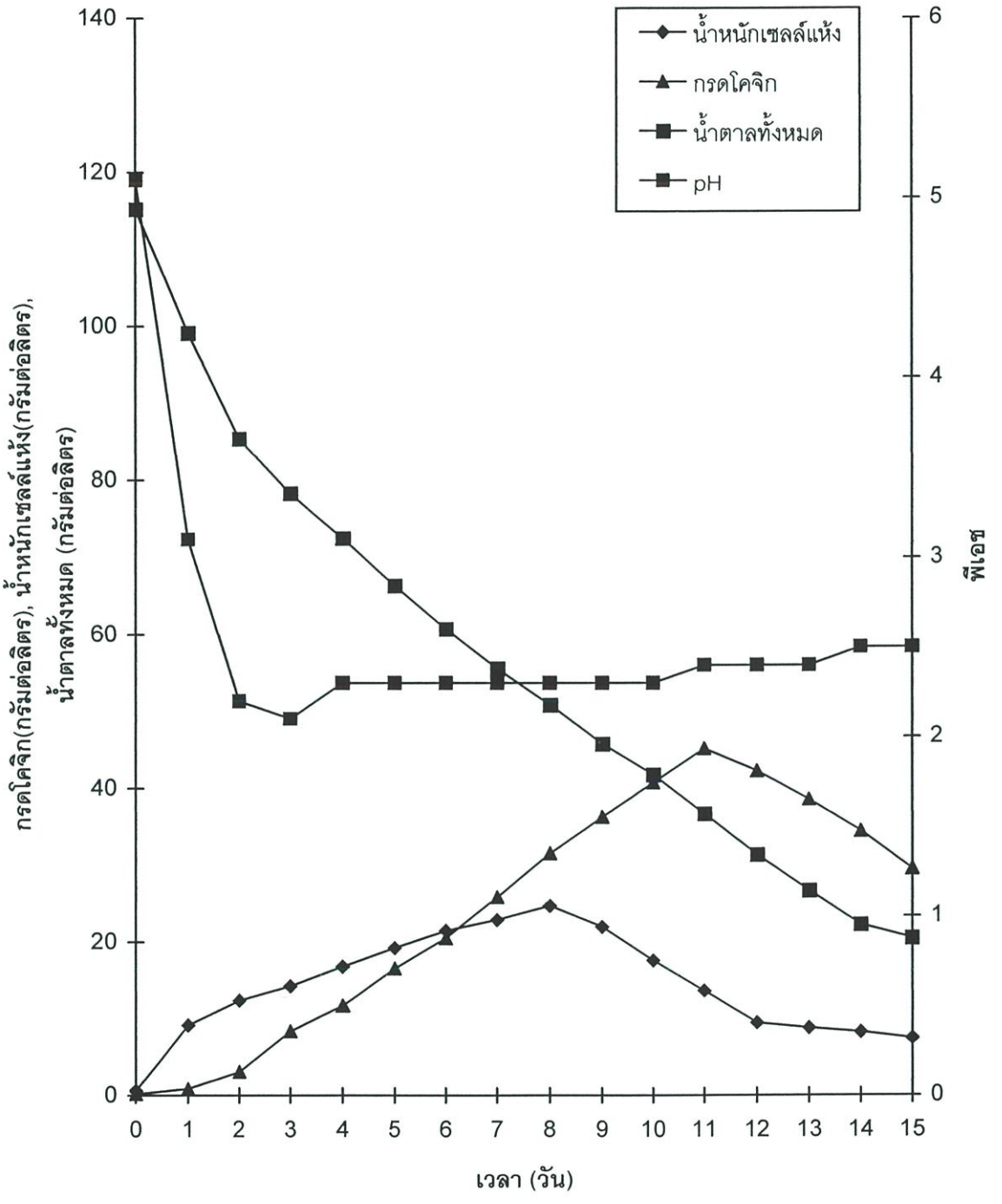
ตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ตารางที่ 4.18 แสดงค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 เมื่อเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมักที่อัตรากวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศระดับต่างๆกัน

อัตราการกวน (รอบ/นาที)	อัตราการให้อากาศ (วีวีเอ็ม)	μ (ต่อชั่วโมง)	Q_p (กรัมกรดโคจิกต่อลิตร.วัน)	q_p (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์.วัน)	$Y_{x/s}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{p/s}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมกรัมน้ำตาล)
200	1.0	0.08	2.22	0.44	0.31	0.35
200	1.5	0.07	3.46	0.60	0.33	0.54
200	2.0	0.07	2.03	0.40	0.29	0.35

พบว่าอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม ให้ค่า μ เท่ากับ 0.08 ต่อชั่วโมง ในขณะที่อัตราการให้อากาศ 1.5 และ 2.0 วีวีเอ็ม ค่า μ มีค่าเท่ากันคือ 0.07 ต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามอัตราการให้อากาศทั้ง 3 ระดับ ให้ค่า μ ใกล้เคียงกันมาก

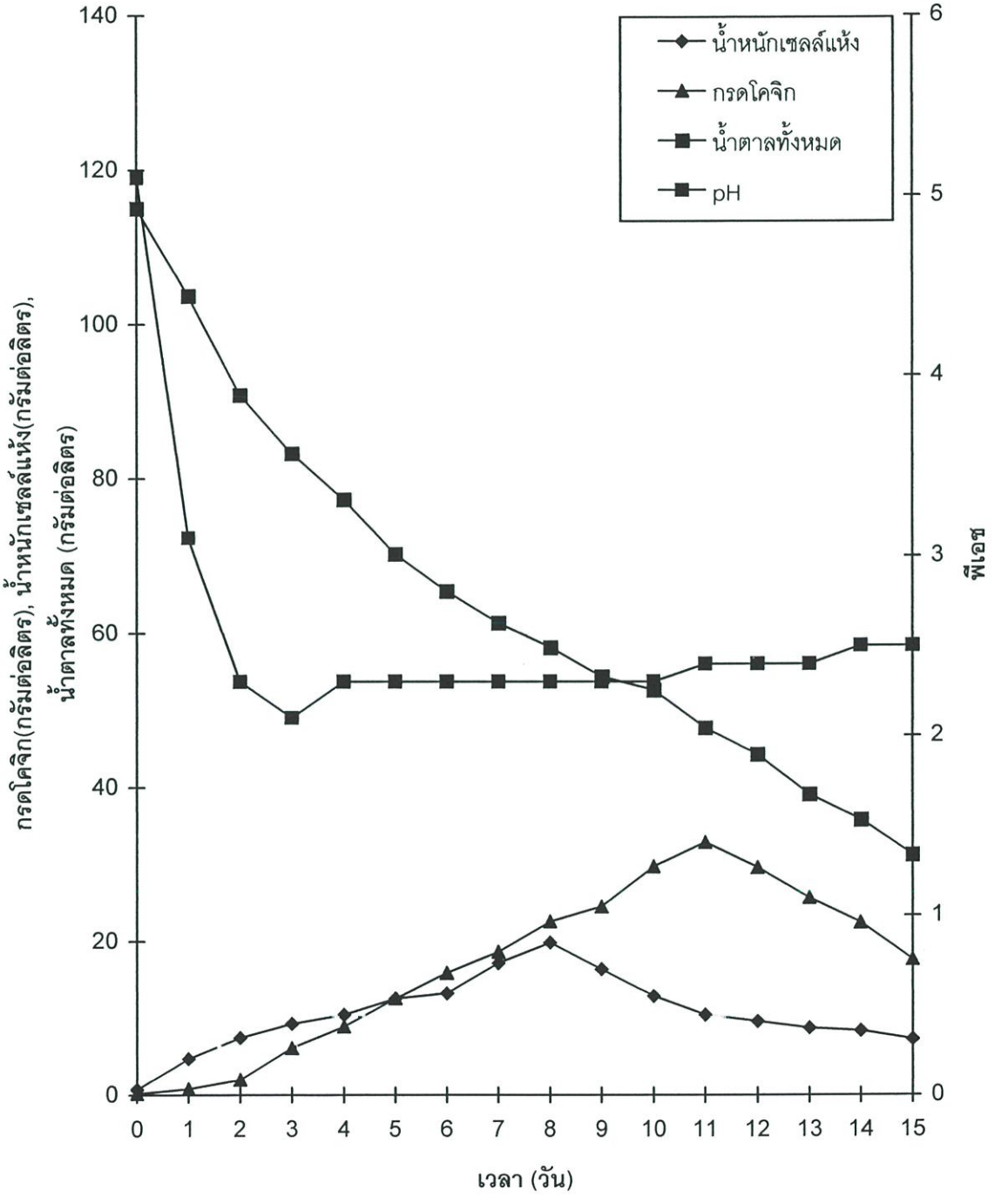
การผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบตช์ เมื่อใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม พบว่าให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 45.15 กรัมต่อลิตรในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.13) และให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 24.66 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลง ส่วนค่าพีเอชของอาหาร พบว่าหลังจากเลี้ยงเชื้อ 1 วันค่าพีเอชเริ่มลดลง และมีค่าพีเอชต่ำสุด 2.1 หลังจากนั้นค่าพีเอชจะสูงขึ้น เมื่อสิ้นสุดการหมักค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 2.5 เมื่อใช้อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ได้ปริมาณกรดโคจิก 32.85 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.14) และให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 19.80 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8



รูปที่ 4.13 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม

ตารางที่ 4.19 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ผลิตโดย *A. oryzae* NRRL 484 ในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม

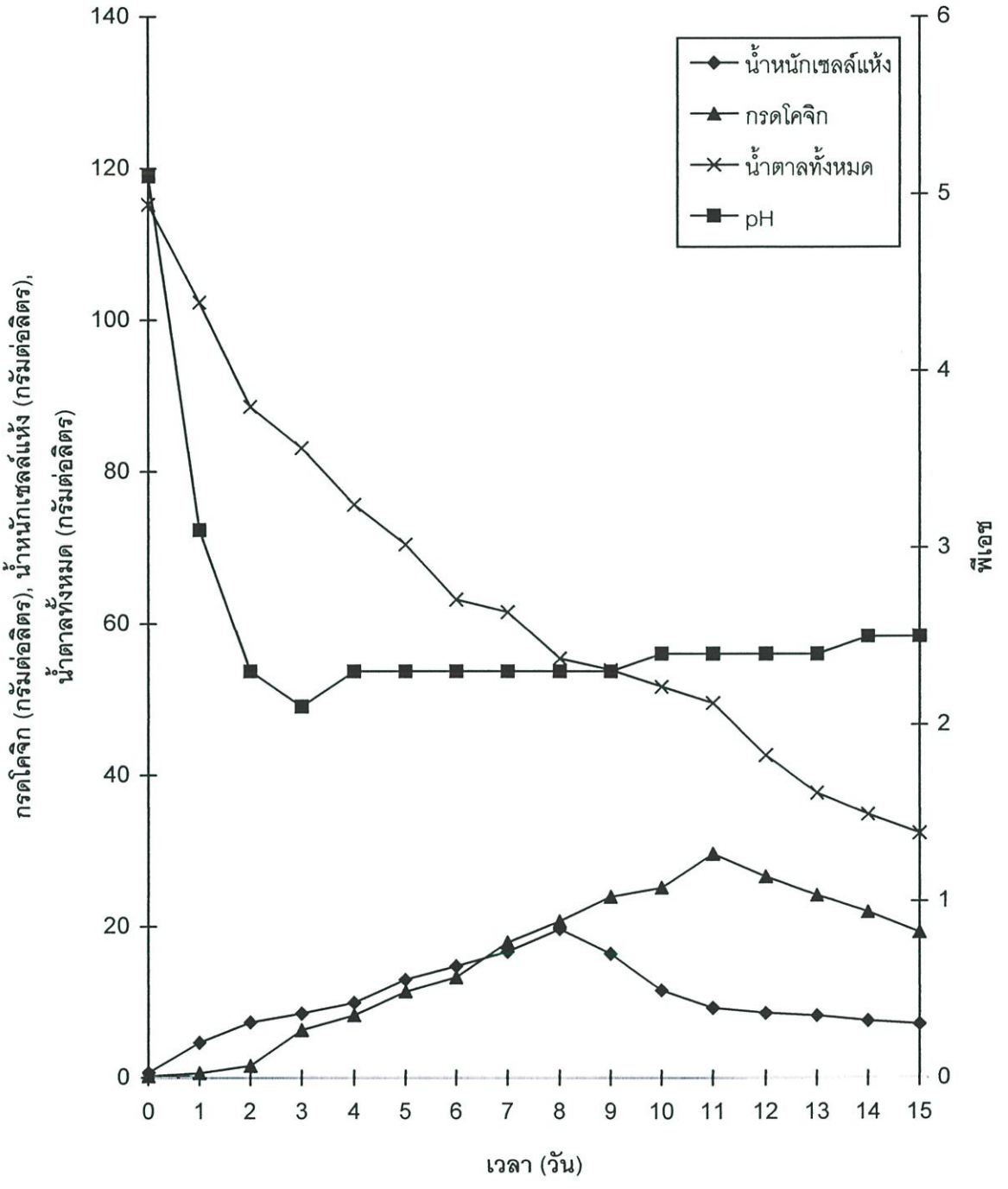
ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	5.1	0.63	0.19	115.23
1	3.1	9.12	0.86	99.17
2	2.2	12.36	3.11	85.41
3	2.1	14.25	8.34	78.35
4	2.3	16.78	11.67	72.52
5	2.3	19.22	16.52	66.35
6	2.3	21.45	20.46	60.70
7	2.3	22.84	25.80	55.52
8	2.3	24.66	31.50	50.82
9	2.3	21.93	36.20	45.76
10	2.3	17.54	40.70	41.76
11	2.4	13.62	45.15	36.64
12	2.4	9.48	42.22	31.29
13	2.4	8.79	38.50	26.64
14	2.5	8.25	34.40	22.23
15	2.5	7.46	29.52	20.47



รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม

ตารางที่ 4.20 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ผลิตโดย *A. oryzae* NRRL 484 ในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม

ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	5.1	0.73	0.17	115.05
1	3.1	4.74	0.78	103.76
2	2.3	7.44	1.99	90.88
3	2.1	9.26	6.12	83.29
4	2.3	10.44	8.88	77.29
5	2.3	12.52	12.52	70.23
6	2.3	13.18	15.90	65.41
7	2.3	17.12	18.62	61.29
8	2.3	19.80	22.56	58.11
9	2.3	16.35	26.46	54.35
10	2.3	12.82	29.68	52.58
11	2.4	10.44	32.85	47.64
12	2.4	9.56	29.56	44.23
13	2.4	8.72	25.62	39.05
14	2.5	8.34	22.44	35.76
15	2.5	7.24	17.65	31.17



รูปที่ 4.15 แสดงปริมาณกรดโคจิก ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม

ตารางที่ 4.21 แสดงค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ผลิตโดย *A. oryzae* NRRL 484 ในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม

ระยะในการเพาะเลี้ยง (วัน)	pH	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	5.1	0.65	0.15	115.23
1	3.1	4.63	0.58	102.35
2	2.3	7.36	1.60	88.58
3	2.1	8.50	6.30	83.11
4	2.3	9.92	8.26	75.70
5	2.3	12.96	11.35	70.41
6	2.3	14.75	13.28	63.17
7	2.3	16.60	17.82	61.52
8	2.3	19.63	20.67	55.41
9	2.3	16.38	23.88	53.88
10	2.4	11.54	25.11	51.64
11	2.4	9.21	29.57	49.52
12	2.4	8.58	26.60	42.58
13	2.4	8.23	24.12	37.64
14	2.5	7.56	21.92	34.82
15	2.5	7.18	19.24	32.35

ตารางที่ 4.22 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้ในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศระดับต่างๆกัน

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	อัตราการให้อากาศ (วีวีเอ็ม)	กรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)
400	1.0	45.15 [a]
400	1.5	32.85 [b]
400	2.0	29.57 [c]

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01
ตัวอักษรเหมือนกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ตารางที่ 4.23 แสดงค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 เมื่อเลี้ยงในระดับถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศระดับต่างๆกัน

อัตราการกวน (รอบ/นาที)	อัตราการให้อากาศ (วีวีเอ็ม)	μ (ต่อชั่วโมง)	Q_p (กรัมกรดโคจิกต่อลิตร.วัน)	q_p (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์.วัน)	$Y_{x/s}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{p/s}$ (กรัมกรดโคจิกต่อกรัมกรัมน้ำตาล)
400	1.0	0.11	4.10	0.57	0.38	0.57
400	1.5	0.07	2.98	0.53	0.34	0.48
400	2.0	0.08	2.68	0.54	0.32	0.45

ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลง ส่วนค่าพีเอชของอาหาร พบว่าหลังจากเลี้ยงเชื้อ 1 วันค่าพีเอชเริ่มลดลง และมีค่าพีเอชต่ำสุด 2.1 หลังจากนั้นค่าพีเอชจะสูงขึ้น เมื่อสิ้นสุดการหมักค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 2.5 แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม พบว่าให้ปริมาณกรดโคจิกต่ำสุดคือ 29.57 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 4.15) และได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 19.63 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลง ส่วนค่าพีเอชของอาหาร พบว่าหลังจากเลี้ยงเชื้อ 1 วันค่าพีเอชเริ่มลดลง และมีค่าพีเอชต่ำสุด 2.1 หลังจากนั้นค่าพีเอชจะสูงขึ้น เมื่อสิ้นสุดการหมักค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 2.5 จากการเปรียบเทียบผลของอัตราการให้อากาศทั้ง 3 ระดับทางสถิติ พบว่าอัตราการให้อากาศที่แตกต่างกัน ให้ผลการผลิตกรดโคจิกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังแสดงในตารางที่ 4.22

เมื่อนำผลการทดลองมาคำนวณหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆคือ μ Q_p q_p $Y_{x/s}$ และ $Y_{p/s}$ ดังแสดงในตารางที่ 4.23 พบว่าอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็มให้ค่า Q_p 4.10 กรัมกรดโคจิกต่อลิตร.วัน q_p เท่ากับ 0.57 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์.วัน และ $Y_{p/s}$ เท่ากับ 0.57 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งสูงกว่าอัตราการให้อากาศระดับอื่นๆ เมื่อพิจารณาการเพิ่มของเซลล์และอัตราการเจริญจำเพาะ พบว่าอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม ให้ค่า μ สูงที่สุดเท่ากับ 0.11 ต่อชั่วโมง ในขณะที่อัตราการให้อากาศ 1.5 และ 2.0 วีวีเอ็ม ค่า μ มีค่าใกล้เคียงกันคือ 0.07 ต่อชั่วโมง และ 0.08 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

จากผลการทดลองจะเห็นว่าเมื่อใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม เชื้อ *A. oryzae* NRRL 484 ผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณสูงสุด เนื่องจากเชื้อรากระจายตัวในอาหารได้ดี จึงได้รับอาหารและอากาศอย่างพอเพียงต่อการนำไปใช้ในการเจริญและการผลิตกรดโคจิก แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 2.0 วีวีเอ็ม พบว่าให้ปริมาณกรดโคจิกต่ำที่สุด เนื่องจากเกิดฟองอากาศในอาหารมาก ถึงแม้ว่าเชื้อจะได้รับอากาศมากขึ้น แต่ทำให้ได้รับอาหารน้อยลง จึงผลิตกรดโคจิกได้น้อยลงด้วย จากการศึกษาของ Ariff *et al.* (1996) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* Link 44-1 เพื่อศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบแบตช์ โดยใช้อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหาร 1 ลิตรที่มีองค์ประกอบคือ กลูโคส 100 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม และ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 3.5 พบว่าอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมระหว่างที่เซลล์เจริญเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และระหว่างที่ผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ ผลิตกรดโคจิกได้ 28.90 กรัมต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าการทดลองครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากใช้อัตราการกวนสูง ทำให้เส้นใยบางส่วนฉีกขาด เชื้อจึงเจริญได้ไม่เต็มที่ และผลิตกรดโคจิกได้น้อยลง สำหรับการทดลองของสุกัญญา สายธิ (2541) ซึ่งได้เพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* NRRL 484 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดโคจิก ในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบแบตช์ โดยใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหาร 1 ลิตรที่มีองค์ประกอบคือ ซูโครส 175 กรัม ยีสต์สกัด 1 กรัม แอมโมเนียมไนเตรท 2 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัม และน้ำมะพร้าว 1 ลิตร พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 พบว่าผลิตกรดโคจิกได้ 37 กรัมต่อลิตร ผลได้ของกรดโคจิกจากน้ำตาลเท่ากับ 0.55 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งผลการทดลองมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองครั้งนี้ ส่วนการศึกษาของ Futamura *et al.* (2001b) ทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* MK107-39 ในถังหมักขนาด 3 ลิตรแบบแบตช์ โดยใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหาร 1 ลิตรที่มีองค์ประกอบคือ กลูโคส 100 กรัม จมูกข้าวสาลี 18.8 กรัม โซเดียมไนเตรท 0.3 กรัม และ

แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัม พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5 พบว่าผลิตกรดโคจิกได้ 43 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองใกล้เคียงกับการทดลองนี้ และผลการทดลองของ Mohamad *et al.* (2002) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus flavus* Link 44-1 เพื่อศึกษาค่าพีเอช และอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก ในถังหมักขนาด 8 ลิตร แบบกึ่งแบตช์ โดยใช้อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหาร 1 ลิตรที่มีองค์ประกอบคือ แป้งสาคู 60 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 3.0 พบว่าระยะที่เซลล์เจริญไม่ต้องควบคุมค่าพีเอช แต่ระยะผลิตกรดโคจิกปรับค่าพีเอชเป็น 3.0 ส่วนอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมคือ 40-50 เปอร์เซ็นต์ในระยะที่เซลล์เจริญ และผลิตกรดโคจิกได้ 31.07 กรัมต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าการทดลองครั้งนี้ อาจเนื่องจากอาหารมีความหนืดสูง ใช้อัตราการให้อาหารต่ำ ทำให้เชื้อได้รับอากาศไม่เพียงพอ จึงเจริญได้ไม่เต็มที่ และผลิตกรดโคจิกได้น้อยลง หรืออาจเป็นเพราะเชื้อนำแป้งสาคูไปใช้ได้ในปริมาณต่ำก็เป็นได้

ดังนั้นในการผลิตในถังหมักแบบใบพัดกวนโดยใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

การผลิตกรดโคจิกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาพบว่าอาหารสูตรที่เหมาะสมที่สุด ประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] 5 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.25 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.25กรัม และน้ำอ้อย 1 ลิตร พีเอช 6.0

จากการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 วัน ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 24.32 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 ที่พีเอช 2.3 ให้ค่า Q_p เท่ากับ 1.87 กรัมกรดโคจิกต่อลิตร.วัน และค่า q_p เท่ากับ 0.36 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์.วัน ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 17.86 กรัมต่อลิตร ค่า μ เท่ากับ 0.07 ต่อชั่วโมง และค่า $Y_{x/s}$ เท่ากับ 0.31 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ส่วนค่า $Y_{p/s}$ ที่ได้เท่ากับ 0.36 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบตช์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดียวกันในถังหมักขนาด 10 ลิตร ทำการศึกษาความเร็วรอบในการกวนที่ 200 และ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.0 1.5 และ 2.0 วีวีเอ็ม พบว่าความเร็วในการกวน 400 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 45.15 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ที่พีเอช 2.4 ให้ค่า Q_p เท่ากับ 4.10 กรัมกรดโคจิกต่อลิตร.วัน และค่า q_p เท่ากับ 0.57 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมเซลล์.วัน ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 24.66 กรัมต่อลิตร ค่า μ เท่ากับ 0.11 ต่อชั่วโมง และค่า $Y_{x/s}$ เท่ากับ 0.38 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ส่วนค่า $Y_{p/s}$ ที่ได้เท่ากับ 0.57 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล

บรรณานุกรม

เกษม สุขสถาน.2521. **หลักการทำไร่อ้อย**. กรุงเทพ ฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เกษม สุขสถาน.2523. อ้อย **สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน**. เล่มที่ 5 : 102 – 106

เกษม สุขสถาน.2527. **พืชเศรษฐกิจ**เล่ม 2 กรุงเทพฯ: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จริยา จริยานุกูล.2542. **เกษตรธรรมชาติแบบไทยไทย**. กรุงเทพฯ: กิจศึกษาเทรดดิ้ง.

นพพร สายัมพล.2542. **พืชเศรษฐกิจ**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุษบา ยงสมิทธ์.2540.**จุลชีววิทยาการหมัก วิตามินและสารสี**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรีชา สุริยพันธุ์.2523. **อ้อย**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรีชา สุริยพันธุ์ และ สมเกียรติ พัฒนาเมธีกูร.2523. **อ้อย**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุกัญญา สายธิ.2541. "การผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL484 จากน้ำมะพร้าว" วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Anon, S. 1992. **Pharmaceutical Company**. Japan : Personal Communications.

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 Microbiol. Technol.** 19 : 545 – 550.

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

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

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

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

Bennett, J.W. 1985. **Taxonomy of fungi and biology of the Aspergilli**. California : Cummings Publishing.

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

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

Borzani, W., Gregori, R.E. and Vairo, M.L.R. 1977. "Some observations on oscillatory change in the growth rate of *Saccharomyces cerevisiae* in aerobic continuous undisturbed culture." **Biotech. Bioeng.** 19 : 1363 – 1374.

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

Chattopadhyay, S., K. Srivastava, S. Bhojwani and S. Bisaria. 2002. "Production of podophyllotoxin by plant cell cultures of *Podophyllum hexandrum* in bioreactor." **J. Biosci. Bioeng.** 93(2) : 215 – 220.

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

Clarke, D. 1973. **Cane Sugar and Its Manufacture.** London : Norman Rodger.

Clarke, D. 1974. **Cane Sugar and Its Manufacture.** London : Norman Rodger.

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

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

Fort, A. and Smith, T. R. 1952. **Sugar J.** 15(7) : 34 – 39.

Futamura, T., Okabe, M., Tamura, T., Toda, K., Matsunobu, T. and Park, Y. S. 2001a. "Improvement of production of kojic acid by a mutant strain *Aspergillus oryzae* MK 107 – 39." **J. Biosci. Bioeng.** 91 : 272 – 276.

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

Hongzhang, C., Fujian X., Zhonghou T. and Zuohu L. 2002. "A novel industrial – level reactor with two dynamic changes of air for solid – state fermentation." **J. Biosci. Bioeng.** 93(2) : 211 – 214

Kahar, P., Kobayash, K., Iwata, T., Hiraki, J., Kojima, M. and Okabe, M. 2002. "Production of ε - polylysine in an airlift bioreactor (ABR)." **J. Biosci. Bioeng.** 93(3) : 274 – 280.

Kayahara, H. 1990. "Amino acid and peptide derivatives of kojic acid and their antifungal properties." **Agric. Biol. Chem.** 54(9) : 2441 – 2442.

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

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

Lin, M.T., J.R. Mahajan, J.C. Dianese and A. Takatsu. 1976. "High production of kojic acid crystals by *Aspergillus parasiticus* UNBFA12 in Liquid Medium." **Appl. Microbiol.** 32 : 298 – 299.

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

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

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

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

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

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

Obara, Y., Ito, T. and Hizu, Y. 1985. "Cosmetic skin whitening by food containing kojic acid and its esters.". **Tokyo Koho.** 60 : 137 – 145.

Ogawa, A. and others. 1995. "Production of kojic acid by membrane – surface liguid culture of *Aspergillus oryzae* NRRL484."**J. Ferment. Bioeng.** 80(1):41-45.

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

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

Patrick, M.S., W. Adlard and T. Keshavarz. 1996. "Swainsonine production from batch cultures of *Metarhizium anisopliae* in stirred – tank reactors." **Enzyme Microbiol. Technol.** 18 : 428 – 432.

Queiroz, V., Fatima, M., Vairo, M.L.R. and Borzani, W. 1983. "Influence of initial yeast and sugar concentrations on the quantity of yeast produced in batch ethanol fermentation of sugar-cane blackstrap molasses." **Ferment. Technol.** 61 : 215 – 218.

Roberts, B. and Martin H. 1960. "Composition of cane and juice." **Sugar. J.** 22:11-16

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

Saito, K. 1907. **Botany Magazine.** Tokyo.

Stanbury, P.F, A. whitaker and S.J. Hall. 1995. **Principal of fermentation Technolohy.** Oxford : Elsevier Science.

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

Takaya, M., Matsumoto, N. and Yanase, H. 2002. "Characterization of membrane bioreactor for dry wine production." **J. Biosci. Bioeng.** 93(2) : 240 – 244.

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

Vial, P.B., Grajek, W., Dusset, X. and Boyaval, P. 1997. "Continuous bacteriocin production with high cell density bioreactors." **Enzyme Microbiol. Technol.** 21 : 450 – 457.

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

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

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

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 อาหาร PDA (Potato Dextrose Agar)

มันฝรั่งปอกเปลือกและหั่น	200	กรัม
Glucose	20	กรัม
Agar	15	กรัม

ต้มมันฝรั่งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นกรองเอาน้ำใส และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เติม Glucose และ Agar ลงไป ต้มให้ละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

ก.2 อาหารเลี้ยงเชื้อของ Kwak and Rhee (1992)

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับศึกษาการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา โดยสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน เป็นกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ มีองค์ประกอบดังนี้

Yeast extract	0.5	กรัม
Ammonium sulfate	0.75	กรัม
K_2HPO_4	0.25	กรัม
KH_2PO_4	0.25	กรัม
$MgSO_4 7H_2O$	0.25	กรัม
HCl solution เข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์	0.5	มิลลิลิตร
Glucose	100	กรัม

HCl solution เข้มข้น 30 เปอร์เซ็น ประกอบด้วย $MnSO_4 . 7H_2O$ 2 เปอร์เซ็นต์ $FeSO_4 . 7H_2O$ 2 เปอร์เซ็นต์ และ $ZnSO_4 . 7H_2O$ 3 เปอร์เซ็นต์

ผสมเข้าด้วยกันทั้งหมดแล้วปรับพีเอชเป็น 6.0 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 2 นอร์แมล เตรียมส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ก.3 อาหารเพาะกล้าเชื้อ

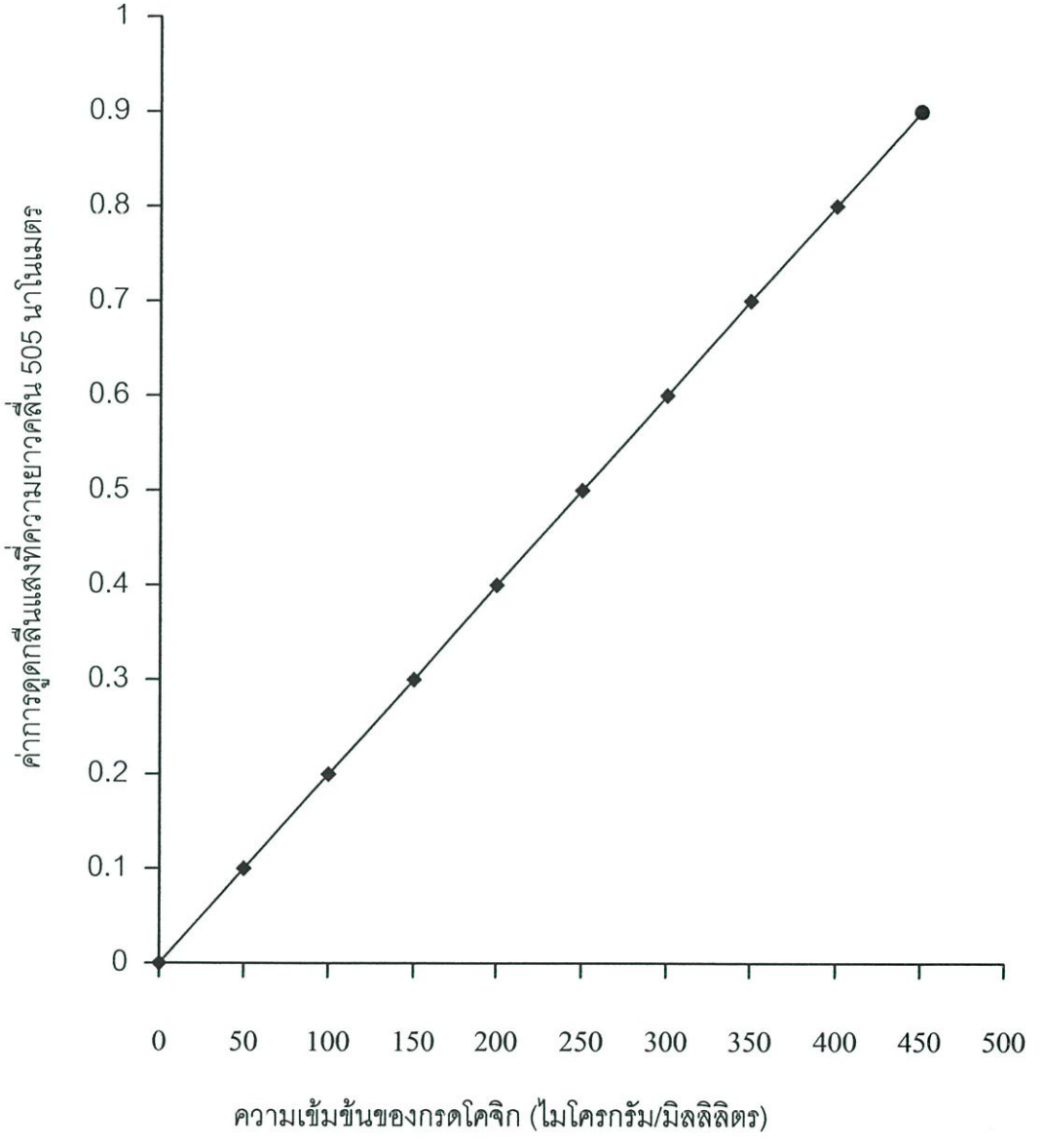
ปลายข้าวแช่น้ำข้ามคืน	25	กรัม
น้ำกลั่น	30	มิลลิลิตร

นำปลายข้าวสุกใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

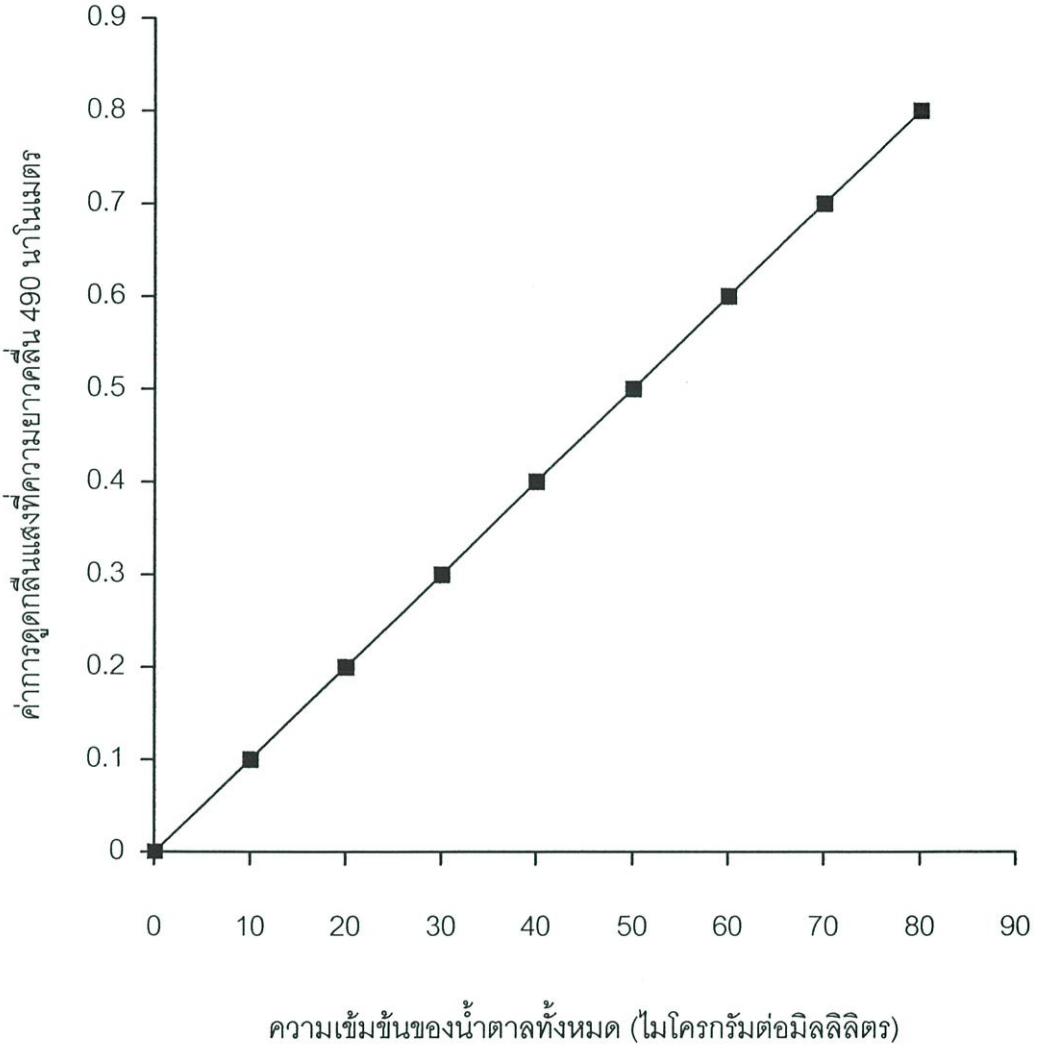
รูปที่ ก.1 แสดงการผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 10 ลิตรแบบแบตช์

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์



รูปที่ ข.1 แสดงกราฟมาตรฐานกรดโคจิก



รูปที่ ข.2 แสดงกราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมด

ภาคผนวก ค
ตารางค่าทางสถิติ

ตารางที่ ค.1 แสดงผลของความเข้มข้นต่างๆของน้ำอ้อยสดที่มีต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *A.oryzae* NRRL484

Source of variation	DF	SS	MS	F
Replication (R)	2	1.622	0.811	<1
Treatment	3	544.220	181.406	184.81 **
Error	6	5.889	0.981	
Total	11	551.732		

CV = 7.0%

$LSD_{0.05}$ = 1.98 กรัมต่อลิตร

$LSD_{0.01}$ = 3.00 กรัมต่อลิตร

** หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ตารางที่ ค.2 แสดงผลของความเข้มข้นต่างๆของแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีต่อการผลิตกรดโคจิกของ *A.oryzae* NRRL484

Source of variation	DF	SS	MS	F
Replication (R)	2	4.213	2.106	2.24 ns
Treatment	4	497.466	124.366	132.48 **
Error	8	7.510	0.938	
Total	14	509.190		

CV = 7.1%

$LSD_{0.05}$ = 1.82 กรัมต่อลิตร

$LSD_{0.01}$ = 2.65 กรัมต่อลิตร

ns หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ตารางที่ ค.3 แสดงปริมาณกรดโคจิกสูงสุดได้จากการเพาะเลี้ยง *A.oryzae* NRRL484 ในถังหมักเมื่อกวนด้วยความเร็ว และการให้อากาศในอัตราแตกต่างกันเป็นเวลา 15 วัน

Source of variation	DF	SS	MS	F
Replication (R)	2	5.306	2.653	3.50 ns
Treatment	5	898.472	179.694	236.75 **
Air (A)	2	305.808	152.904	201.45 **
Speed (S)	1	169.464	169.464	223.27 **
A x S	2	423.199	211.599	278.79 **
Error	10	7.590	0.759	
Total	17	911.368		

CV = 2.7%

$LSD_{0.05}$ = 1.59 กรัมต่อลิตร

$LSD_{0.01}$ = 2.25 กรัมต่อลิตร

ns หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

** หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ประวัติผู้เขียน

นางสาววรรณี สุวรรณเวช เกิดวันที่ 7 เมษายน 2502 ที่จังหวัดสระบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสาขาชีววิทยา คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี ปีการศึกษา 2524 เข้าทำงานที่โรงเรียนเซนต์โยเซฟทิพวัล จ.สมุทรปราการ ในตำแหน่งครูหมวดวิชาวิทยาศาสตร์ ตั้งแต่ปีการศึกษา 2529 – 2542 ต่อมาจึงเข้าศึกษาปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2543 ถึงปีการศึกษา 2546