การผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K13 บนผิวหน้าอาหารเหลวในถาดตื้น

นางสาวชมจิต ท้าวธงไชย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544

ISBN 974 - 03 - 0376 - 5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

KOJIC ACID PRODUCTION BY *Aspergillus oryzae* K13 ON LIQUID SURFACE CULTURE IN SHALLOW PANS

Miss Chomjit Taothongchai

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974 - 03 - 0376 - 5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K13 บนผิวหน้าอาหารเหลวในถาดตื้น
โดย	นางสาวชมจิต ท้าวธงไชย
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ประกิตติ์สิน สีหนนทน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชมจิต ท้าวธงไชย : การผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K13 บนผิวหน้าอาหารเหลวในถาดตื้น (KOJIC ACID PRODUCTION BY LIQUID SURFACE CULTURE OF *Aspergillus oryzae* K13 IN SHALLOW PANS) อ. ที่ปรึกษา : รศ. กรรณิกา จันทรสอาด, 140 หน้า. ISBN 974 - 03 - 0376 - 5

เมื่อผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นโดยเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวภายใต้การแปรภาวะบางประการ พบว่า ถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 3.2 ลิตรมีความเหมาะสม ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมคือ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ผลิตกรดโคจิกได้ 30.28 กรัมต่อลิตรในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง การเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 2 เซนติเมตรในอัตราเร็วเท่ากับ 50 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาที สามารถเพิ่มผลผลิตขึ้นเป็น 33.27 กรัมต่อลิตรซึ่งช่วยลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงลง 4 วัน ได้ผลิตกรดโคจิกโดยการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิตเพื่อเพิ่มผลผลิตซึ่งพบว่า เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น 2 ลิตรที่มีสารอาหารต่างๆ ตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนแล้วจะทยอยเติมในรูปสารละลายกลูโคส 4 ครั้งในระหว่างการผลิต ปริมาตรรวม 3.2 ลิตร พบว่า ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงขึ้นคือสูงถึง 35.26 กรัมต่อลิตรโดยใช้เวลาการผลิต 17 วัน นอกจากนี้เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำของ *Aspergillus oryzae* K13 โดยอาหารเหลวที่ใช้เติมในซ้ำที่ 1 และ 2 เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนลดลง 10 และ 50 เปอร์เซ็นต์ จะให้ผลผลิตกรดโคจิก 231.04 และ 249.34 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 9.6 ลิตร ซึ่งมีอัตราการผลิตกรดโคจิกต่อวันเท่ากับ 1.95 และ 1.95 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตรต่อวัน ตามลำดับ ดังนั้นผลการศึกษานี้สามารถขยายส่วนผลิตกรดโคจิกด้วยวิธีการดังกล่าวได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ...จุลชีววิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ...จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา ...2544.....

4172263823 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : LIQUID SURFACE / *Aspergillus oryzae* K13 / KOJIC ACID

CHOMJIT TAOTHONGCHAI : KOJIC ACID PRODUCTION BY LIQUID SURFACE CULTURE OF *Aspergillus oryzae* K13 IN SHALLOW PANS, THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. KANNIKA CHUNTARASA-ARD, 140 pp. ISBN. 974 - 03 - 0376 - 5

The Kojic acid production in liquid surface culture by *Aspergillus oryzae* K13 in shallow pan under some varying conditions were studied. The results showed that the 4-liter shallow pan containing 3.2 liters medium was the most suitable. The optimal inoculum size was 5 percent (volume per volume of medium) and 3.28 grams per liter of kojic acid was obtained within 21 days (Yp/s = 0.41). Aeration (50 liter per square meter per minute) was supplied at 2 centimeters above culture surface could increase kojic acid to 33.27 grams per liter and decreased 4 days production times (Yp/s = 0.48). The production by adding nutrient during cultivation was done to improve the yield by using 2 liters suitable medium without carbon source free medium as starting medium and then glucose solution was added 4 times until the total volume of medium was 3.2 liter. By this method kojic acid reached to 35.26 grams per liter within 17 days (Yp/s = 0.56). By repeated batch fermentation, the production period was decreased in the case of using medium containing 10 and 50 percent less nitrogen source than usual and the yields were 231.04 and 249.34 grams per 9.6 liter of medium (1.95 and 1.95 grams per liter per day), respectively. It could be concluded that the scale up of kojic acid production by these methods were done efficiently.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department ...MICROBIOLOGY..... Student's signature .....

Field of study ...INDUSTRIAL MICROBIOLOGY Advisor's signature .....

Academic year ...2001.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำ และแนวทางในการทำงานวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขและสนับสนุนในด้านต่างๆ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณประธานกรรมการ และคณะกรรมการทุกท่าน ที่กรุณาตรวจสอบและแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้อง และสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ คุณสุนันท์ รังษีกาญจน์ ที่ช่วยให้คำแนะนำและช่วยวิเคราะห์กรดโคจิกด้วยเครื่องโครมาโตกราฟี แบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่อบรมสั่งสอนมา รวมทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และช่วยอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยนี้

ความดีของวิทยานิพนธ์นี้ ขอมอบแด่ คุณแม่ และครอบครัวที่ให้การสนับสนุนในทุกด้าน ทั้งด้านกำลังทรัพย์ คำปรึกษา และโดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านกำลังใจ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ท้ายนี้ขอขอบคุณ คุณหฤษฎ์ ธิตินันทน์ เป็นอย่างยิ่งที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้มาโดยตลอด จนกระทั่งวิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ที่สุด

ชมจิต ท้าวธงไชย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ญ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ฌ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย	30
3. ผลการวิจัย	47
4. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	109
รายการอ้างอิง	120
ภาคผนวก	129
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	130
ภาคผนวก ข วิธีเตรียมสารเคมีที่สำคัญที่ใช้ในการทดลอง	131
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน	133
ภาคผนวก ง วิธีการคำนวณหาปริมาณกรดโคจิก และปริมาณไนโตรเจน	137
ประวัติผู้เขียน	140

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	ตัวอย่างสิทธิบัตรเกี่ยวกับกรดโคจิกและอนุพันธุ์ของกรด	7
2.	ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้	12
3.	แหล่งคาร์บอนที่สามารถนำมาใช้ผลิตกรดโคจิก	14
4.	แหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์สามารถใช้ผลิตกรดโคจิก	15
5.	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารอาหารที่เติมระหว่างการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกโดยมีการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิต	41
6.	สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำของ *A. oryzae* K13 ในแต่ละรอบการผลิต	46
7.	เปรียบเทียบผลผลิตกรดโคจิก ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดโคจิกและน้ำหนักแห้งเมื่อแปรผันขนาดของถาดตื้นที่ใช้ผลิตต่างกัน	51
8.	ปริมาณกรดโคจิก ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป และประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดโคจิก ณ. วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด เมื่อใช้ปริมาณของหัวเชื้อต่างกัน	61
9.	ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่วัดได้ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว เมื่อไม่มีการเป่าให้อากาศและมีการเป่าให้อากาศในอัตราเร็วต่างกัน	66
10.	ปริมาณกรดโคจิก ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ และประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดโคจิก ณ. วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดในการทดลองที่มีการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวในอัตราเร็วต่างกัน	73
11.	ปริมาณกรดโคจิก น้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อและประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิกของ *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกโดยที่ขณะเพาะเลี้ยงใช้ผ้าคลุมถาดและไม่ใช้ผ้าคลุมถาดตื้นที่ใช้เป็นภาชนะในการเพาะเลี้ยง	77

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

12. ปริมาณกรดโคจิก น้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป และประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดโคจิก เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว โดยมีการเติมสารอาหารในระหว่างกระบวนการผลิต (ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อรวมต่อการผลิต 1 ครั้ง เท่ากับ 3.2 ลิตร) 80
13. น้ำหนักแห้งของสายใย ณ.วันที่สิ้นสุดการทดลอง จากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกโดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบที่มีการเติมสารอาหารในระว่างการผลิต 85
14. เปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของสายใยราในการผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำ 3 รอบการผลิตกับการผลิตกรดโคจิกแบบกะ (ชุดควบคุม) 94
15. ปริมาณกรดโคจิก เปอร์เซ็นต์การลดลงของกรดโคจิก เปอร์เซ็นต์การลดลงของเวลาที่ใช้ผลิตกรดในแต่ละซ้ำ โดยการใช้สายใยซ้ำของ*A. oryzae* K13 ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิก 98
16. เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกจากวิธีการผลิตแบบกะ แบบที่มีการเติมสารอาหารโดยผลิต 3 ครั้ง และการใช้สายใยซ้ำ จำนวน 2 ซ้ำ (รวม 3 ครั้งของการผลิต) 103
17. เปรียบเทียบผลผลิตกรดโคจิกจากกระบวนการหมักแบบกะโดยใช้ภาชนะแก้วทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร (กนิษฐา ภูวนารถนรานุบาล, 2542) กับการผลิตในถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร (งานวิจัยนี้) และผลผลิตกรดโคจิกจากกระบวนการหมักที่มีการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิต และการใช้สายใยซ้ำในถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร 105

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.	โครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก	2
2.	การทำงานของเอนไซม์ไธโรซิเนสสำหรับการสังเคราะห์คาทีคอลเมลานินในพืชและยูเมลานินในสัตว์	3
3.	ลักษณะโมเลกุลของลิโพโซม	6
4.	อนุพันธุ์ที่เกิดจากกรดโคจิก 2 โมเลกุลกับโลหะหนัก	6
5.	การสังเคราะห์กรดโคจิกจากสารที่มีคาร์บอน 3 อะตอม	8
6.	การสังเคราะห์กรดโคจิกจากน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม	9
7.	การสังเคราะห์กรดโคจิกโดยใช้น้ำตาลฟรักโทสเป็นสารตั้งต้น	10
8.	การสังเคราะห์กรดโคจิกโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น	11
9.	กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ในระดับห้องปฏิบัติการ	20
10.	ถาดตื้นที่ใช้เป็นภาชนะในการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิก	36
11.	อุปกรณ์การเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวที่ประกอบเข้ากับถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิก	38
12.	เครื่องวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ชนิดเคลื่อนย้ายได้	39
13.	เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกและน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นขนาดความจุ 1.5 2.5 และ 4 ลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส นาน 24 วัน ...	48
14.	เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกและอัตราการผลิตกรดโคจิก ณ. วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวในถาดตื้นขนาดความจุ 1.5 2.5 และ 4 ลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส นาน 24 วัน	49

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

15. เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกและค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นขนาดความจุ 1.5 2.5 และ 4 ลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 24 วัน 52
16. ภาพถ่ายจากด้านบนของถาดตื้นเพื่อแสดงการเติบโตของ *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นขนาดความจุ 1.5 ลิตร ... 53
17. ปริมาณกรดโคจิก น้ำตาลกลูโคส และค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 24 วัน 55
18. ภาพถ่ายจากด้านบนเพื่อแสดงการเติบโตของ *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร ใช้ปริมาณของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 24 วัน 56
19. ภาพถ่ายจากด้านบนเพื่อแสดงการเติบโตของ *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร ใช้ปริมาณของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 24 วัน 56
20. ภาพถ่ายจากด้านบนเพื่อแสดงการเติบโตของ *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร ใช้ปริมาณของหัวเชื้อเท่ากับ 8 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 24 วัน 57
21. ภาพถ่ายจากด้านบนเพื่อแสดงการเติบโตของ *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร ใช้ปริมาณของหัวเชื้อเท่ากับ 11 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 24 วัน 57

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

22. ภาพถ่ายจากด้านบนเพื่อแสดงการเติบโตของ *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร ใช้ปริมาณของหัวเชื้อเท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 24 วัน 58
23. เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกและน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกโดยแปรผันปริมาณของหัวเชื้อเท่ากับ 2 5 8 11 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 24 วัน 60
24. เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกและค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกโดยแปรผันขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 5 8 11 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 24 วัน 62
25. ปริมาณกรดโคจิก น้ำตาลกลูโคสและค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกโดยใช้ปริมาณของหัวเชื้อเท่ากับ 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 24 วัน 64
26. เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บริเวณเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 1 เซนติเมตร เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวสำหรับผลิตกรด โคจิก เมื่อเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวในอัตราเร็วเท่ากับ 0 25 50 100 และ 200 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาที 67
27. เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกและน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวสำหรับผลิตกรดโคจิกโดยมีการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 2 เซนติเมตรในอัตราเร็วเท่ากับ 0 25 50 100 และ 200 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาที..... 69

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

28. เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกและค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวสำหรับผลิตกรดโคจิกโดยมีการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวในอัตราเร็วเท่ากับ 0 25 50 100 และ 200 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาที 71
29. เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิก น้ำตาลกลูโคส และค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวสำหรับผลิตกรดโคจิกโดยมีการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวในอัตราเร็วเท่ากับ 50 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาที 72
30. ปริมาณกรดโคจิก และน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือ การทดลองที่ใช้ผ้าคลุมบนถาดตื้นที่ใช้เป็นภาชนะเพาะเลี้ยงและการทดลองที่ไม่ใช้ผ้าคลุมถาด เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน 75
31. ปริมาณกรดโคจิก และค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือ การทดลองที่ใช้ผ้าคลุมบนถาดตื้นที่ใช้เพาะเลี้ยงและการทดลองที่ไม่ใช้ผ้าคลุมถาด เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน 76
32. เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกและค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยเพาะเลี้ยง *A.oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ระหว่างวิธีการเพาะเลี้ยงแบบกะกับวิธีการเพาะเลี้ยงโดยมีการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิต 79
33. ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวโดยมีการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิตที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส นาน 20 วัน 81

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

34. เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกและน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวโดยมีการเติมแหล่งคาร์บอนในระหว่างการผลิต ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ใช้เติมจะอยู่ในรูปสารละลายกลูโคสที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0 กับการทดลองที่เติมในรูปผงกลูโคสซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเลต โดยเติมในวันที่ 6 9 12 และ 15 ของการเพาะเลี้ยง 83

35. เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกและประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดโคจิก เมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวระหว่างวิธีการเพาะเลี้ยงแบบกะกับวิธีการเพาะเลี้ยงโดยมีการเติมสารอาหารในระหว่างการเพาะเลี้ยง 84

36. เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตกรดโคจิกบนผิวหน้าอาหารเหลว โดยใช้สายใยซ้ำของ *A. oryzae* K13 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส นาน 45 วัน 89

37. เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตกรดโคจิกบนผิวหน้าอาหารเหลว โดยใช้สายใยซ้ำ ของ *A. oryzae* K13 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส นาน 45 วัน 90

38. ภาพถ่ายจากด้านบนของถาดที่ใช้ผลิตเพื่อแสดงสภาพการเติบโตของสายใยซ้ำของ *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกครบ 2 ซ้ำ (3รอบการผลิต) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เติมในซ้ำที่ 1 และ 2 เป็นสารละลายกลูโคสที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.00 92

39. ภาพถ่ายจากด้านบนของถาดที่ใช้ผลิตเพื่อแสดงสภาพการเติบโตของสายใยซ้ำของ *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกครบ 2 ซ้ำ (3 รอบการผลิต) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เติมในซ้ำที่ 1 และ 2 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกแต่มีแหล่งไนโตรเจนเพียง 10 เปอร์เซ็นต์จากสูตรอาหารเดิม 92

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

40. ภาพถ่ายจากด้านบนของถาดที่ใช้ผลิตเพื่อแสดงสภาพการเติบโตของสายใยซ้ำของ *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกครบ 2 ซ้ำ (3 รอบการผลิต) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เติมในซ้ำที่ 1 และ 2 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกแต่มีแหล่งไนโตรเจน 50 เปอร์เซ็นต์จากสูตรอาหารเดิม 93

41. ภาพถ่ายจากด้านบนของถาดที่ใช้ผลิตเพื่อแสดงสภาพการเติบโตของสายใยซ้ำของ *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกครบ 2 ซ้ำ (3 รอบการผลิต) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เติมในซ้ำที่ 1 และ 2 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก ปริมาตร 3.2 ลิตร 93

42. เปรียบเทียบประสิทธิภาพการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดโคจิกจากการใช้สายใยซ้ำของ *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกทั้ง 3 รอบการผลิต (ซ้ำ 2 ครั้ง) ณ. วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด 96

43. เปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตกรดโคจิกบนผิวหน้าอาหารเหลว โดยใช้สายใยซ้ำ ของ *A. oryzae* K13 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส นาน 45 วัน 97

44. เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกจากการใช้สายใยซ้ำ ของ *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิกทั้ง 3 รอบการผลิต (ซ้ำ 2 ครั้ง) ณ. วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด 99

45. โครมาโตแกรมของกรดโคจิกมาตรฐานและกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Zorbax C – 8 102

46. เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *A.oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวภายใต้สูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยใช้ภาชนะในการผลิตและกระบวนการผลิตกรดโคจิกแตกต่างกัน 107

สัญลักษณ์และคำย่อ

ก/ล	=	กรัมต่อลิตร
ซม.	=	เซนติเมตร
ปสภ.	=	ประสิทธิภาพ
Yp/s	=	ผลผลิตกรดโคจิกต่อน้ำตาลกลูโคสที่ถูกนำไปใช้
Yp/x	=	ผลผลิตกรดโคจิกต่อน้ำหนักสายใยแห้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย