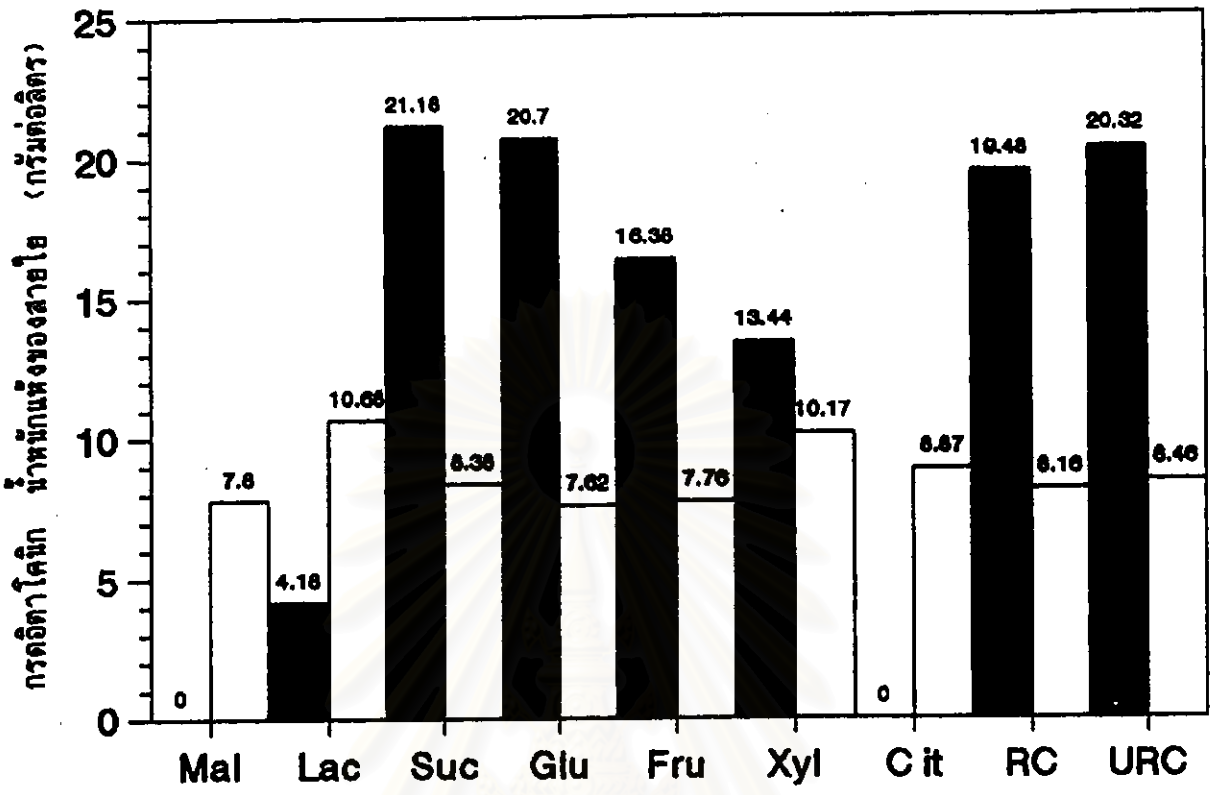
บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ผลการหาชนิดและปริมาณที่เหมาะสมขององค์ประกอบหลัก ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก

1.1 ผลการหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิกเป็น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลแลกโตส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลทรายขาว น้ำตาลทรายแดง และกรดซิตริก โดยใช้ปริมาณของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ เท่ากับ 66 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 5) เป็นเวลา 6 วันพบว่า น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลทรายขาว ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงใกล้เคียงกันเท่ากับ 21.18 20.70 20.32 และ 19.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และให้การเติบโตของสายใยใกล้เคียงกันเท่ากับ 8.38 7.62 8.46 และ 8.16 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ รองลงมา คือ น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลไซโลส และ น้ำตาลแลกโตส โดยให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเท่ากับ 16.38 13.44 และ 4.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ให้การเติบโตของสายใยเท่ากับ 7.76 10.17 และ 10.68 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลมอลโตส และกรดซิตริกไม่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเลย แต่ให้การเติบโตของสายใยใกล้เคียงกับน้ำตาลตัวอื่น ๆ เท่ากับ 7.80 และ 8.87 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5 จะเห็นได้ว่าน้ำตาลซูโครส และน้ำตาลกลูโคส ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงไล่เลี่ยกัน และเป็นอันดับ 1 และอันดับ 2 ตามลำดับ แต่น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกกว่าน้ำตาล



รูปที่ 5 ปริมาณกรดอิตาโคนิกและน้ำหนักแห้งของสายใยของ *A. terreus* I 10 เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 วัน

■ หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

□ หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

Mal หมายถึง น้ำตาลมอลโตส

Lac หมายถึง น้ำตาลแลกโตส

Suc หมายถึง น้ำตาลซูโครส

Glu หมายถึง น้ำตาลกลูโคส

Fru หมายถึง น้ำตาลฟรุกโตส

Xyl หมายถึง น้ำตาลไซโลส

C it หมายถึง กรดซิตริก

RC หมายถึง น้ำตาลทรายขาว

URC หมายถึง น้ำตาลทรายแดง

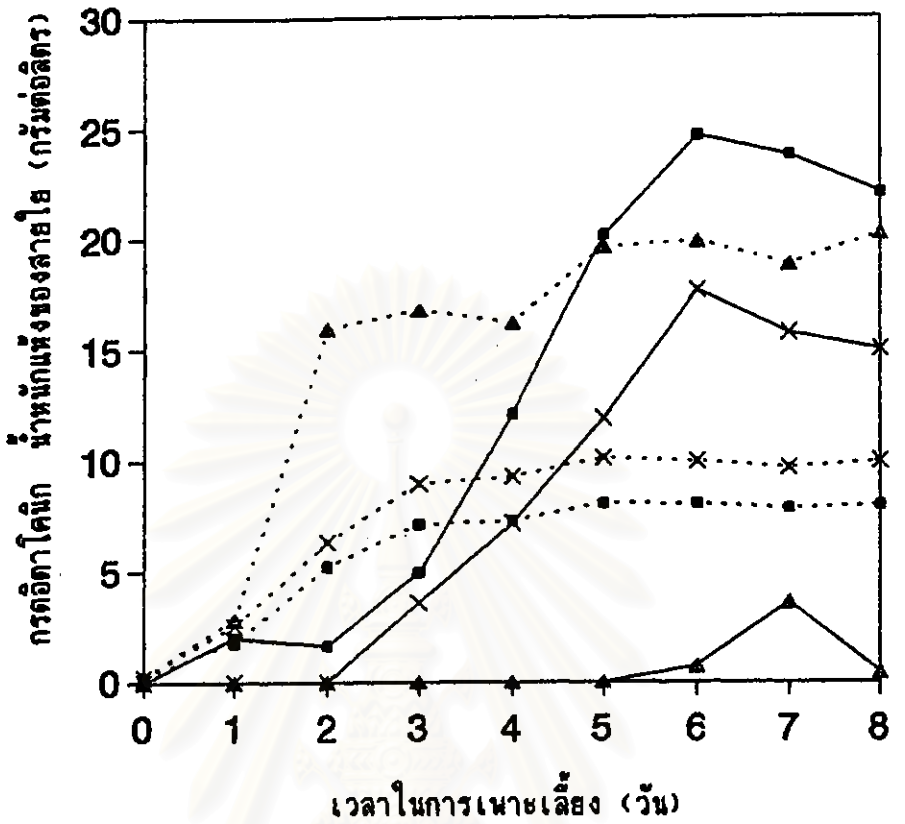
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลูโคสมาก จึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก จึงเลือกใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อไป

1.2 <u>ผลการหาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก</u>

1.2.1 <u>ผลการหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน แปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่าง ๆ กัน 3 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต และ โซเดียมไนเตรต โดยจัดให้ปริมาณไนโตรเจนในแหล่งไนโตรเจนทุกแหล่งเท่ากัน ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับปริมาณที่ได้จากแอมโมเนียมซัลเฟต 2.7 กรัมต่อลิตร พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุด คือให้ปริมาณเท่ากับ 24.67 กรัมต่อลิตร ซึ่งเท่ากับ 37.38 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำตาลซูโครสตั้งต้น) ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เช่นเดียวกับการใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่การใช้แอมโมเนียมไนเตรตจะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเพียง 17.67 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับ 26.77 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำตาลซูโครสตั้งต้น) ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่ำมาก กล่าวคือให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดในวันที่ 7 ของการทดลอง โดยให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเพียง 3.59 กรัมต่อลิตร หรือเท่ากับ 5.44 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนักน้ำตาลซูโครสตั้งต้น) เมื่อวัดการเติบโต พบว่ามีน้ำหนักแห้งของสายใยสูงมาก คือเท่ากับ 20.23 กรัมต่อลิตร ในวันสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรตให้การเติบโตของสายใยเพียง 8.00 และ 9.99 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 6 สำหรับการใช้น้ำตาลพบว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นโซเดียมไนเตรต จะแตกต่างกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนคือ เมื่อใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 6 ปริมาณกรดอิตาโคนิกและน้ำหนักแห้งของสายใย ของ *A. terreus* I 10 เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดยแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

—— หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

------ หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

—■— หมายถึง แอมโมเนียมซัลเฟต

—×— หมายถึง แอมโมเนียมไนเตรต

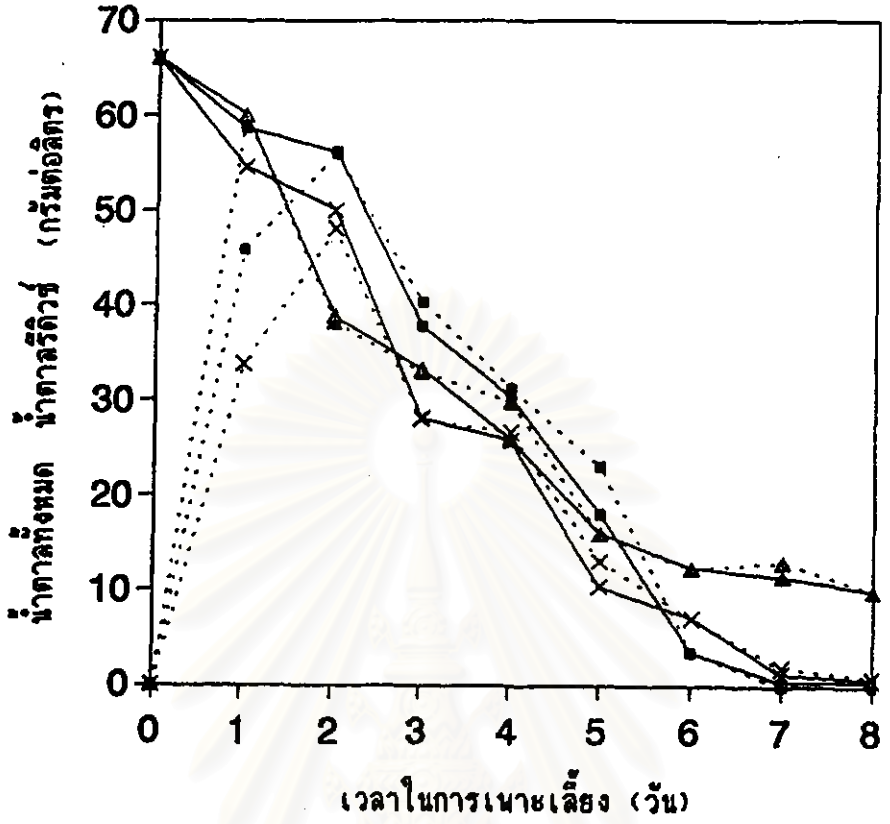
—▲— หมายถึง โซเดียมไนเตรต

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง แล้วค่อย ๆ ลดลงจนเหลือ 10.02 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียม-ไนเตรตจะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และลดลงจนหมดในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และเหลือเล็กน้อยคือเหลือ 0.93 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ตามลำดับ สำหรับน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อในวันสิ้นสุดการทดลอง เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต และโซเดียมไนเตรต เท่ากับ 0.47 0.74 และ 10.00 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 7 การใช้โซเดียม-ไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน จะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งแตกต่างกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียม-ไนเตรตที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลง และลดลงเหลือ 1.68 และ 1.91 ตามลำดับ ในวันสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 8

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิก เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆ กัน พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน จะให้กรดอิตาโคนิกในปริมาณสูงกว่าการใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนอย่างเห็นได้ชัด จึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนในการทดลองแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนในการทดลองต่อไป

1.2.2 <u>ผลการหาปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนชนิดที่เหมาะสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0.44 0.87 1.31 และ 2.62 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และแปรผันปริมาณแอมโมเนียมไนเตรตในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการทดลอง คือ มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.0926 0.1851 0.2777 และ 0.5553 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อตามลำดับ พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.44 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และแอมโมเนียมไนเตรต 0.2647 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ให้ที่ให้ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ



รูปที่ 7 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* I 10 เมื่อแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

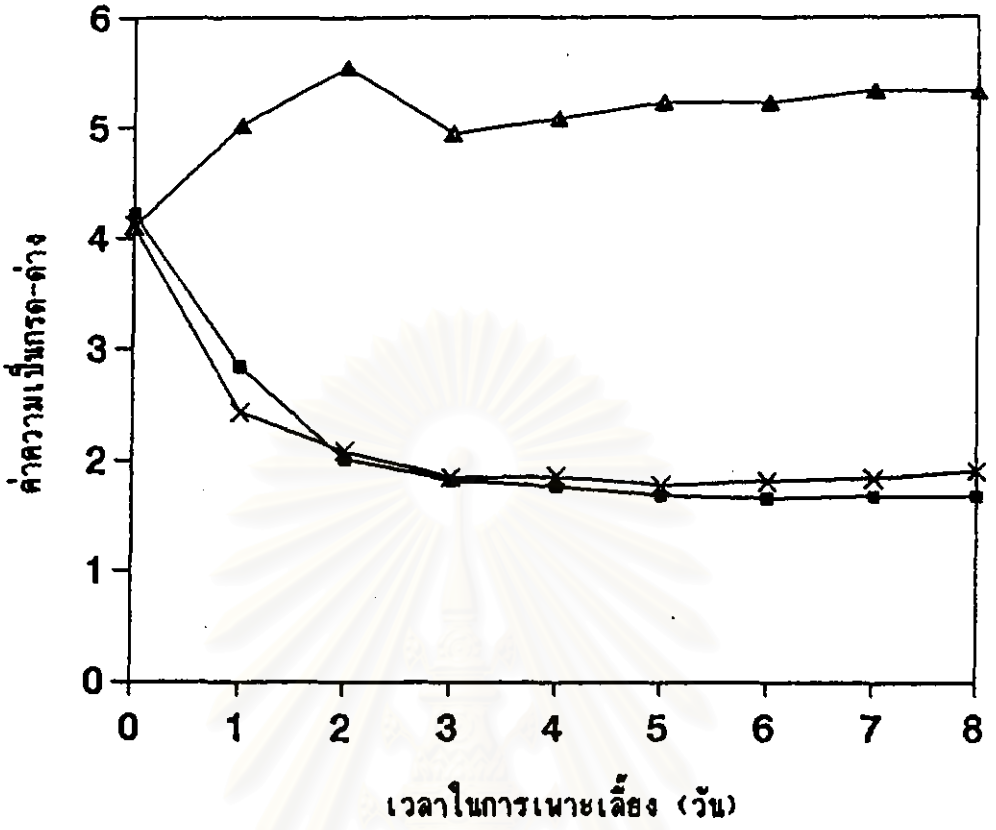
——— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

----- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

—●— หมายถึง แอมโมเนียมซัลเฟต

—×— หมายถึง แอมโมเนียมไนเตรต

—▲— หมายถึง โซเดียมไนเตรต



รูปที่ 8 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกด้วย *A. terreus* I 10 โดยแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

-■- หมายถึง แอมโมเนียมซัลเฟต

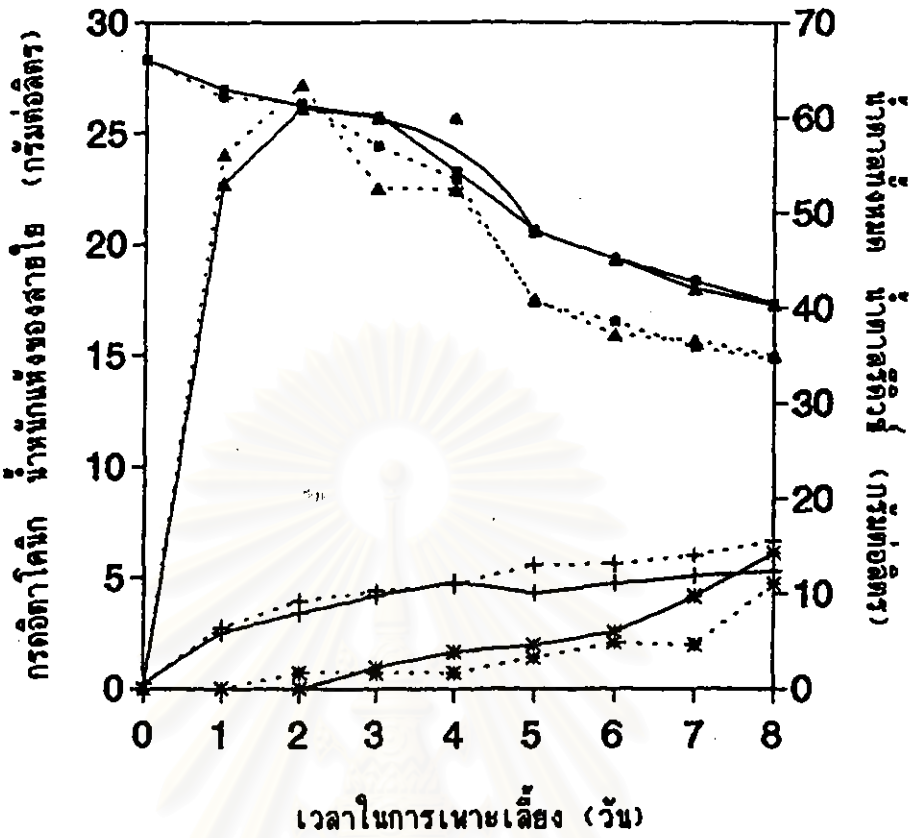
-×- หมายถึง แอมโมเนียมไนเตรต

-▲- หมายถึง โซเดียมไนเตรต

0.0926 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเฉลี่ย 6.12 และ 4.73 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 9 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.87 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมไนเตรต 0.5291 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ให้ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.1851 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเท่ากับ 17.79 และ 3.86 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 10 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1.31 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรต 0.7938 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ให้ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.2777 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเท่ากับ 24.16 และ 6.88 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 11 และเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 2.62 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรต 1.5874 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ให้ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.5553 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเท่ากับ 23.15 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง และ 17.02 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 12

สำหรับการเติบโตของสายใย เมื่อใช้ปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน จะแตกต่างกันโดย เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.44 0.87 1.31 และ 2.62 กรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 5.28 5.9 5.65 และ 6.94 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันสิ้นสุดการทดลอง และเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมไนเตรตปริมาณ 0.2647 0.5291 0.7938 และ 1.5874 กรัมต่อลิตร ให้น้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 6.65 7.50 10.91 และ 10.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันสิ้นสุดการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิก ที่ได้จากแหล่งไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิด ดังแสดงในรูปที่ 13 จะเห็นได้ว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก คือ 1.31 กรัมต่อลิตร (ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.2777 กรัมต่อลิตร) ส่วนปริมาณแอมโมเนียมไนเตรต 1.5874 กรัมต่อลิตร (ซึ่งเป็นปริมาณที่ให้ไนโตรเจนเท่ากับ 0.5553 กรัมต่อลิตร) ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงกว่าแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้นอื่น แต่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่ำกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1.31 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ปริมาณ



รูปที่ 9 การผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* I 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนโตรเจนปริมาณ 0.0926 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

——— หมายถึง แอมโมเนียมซัลเฟต

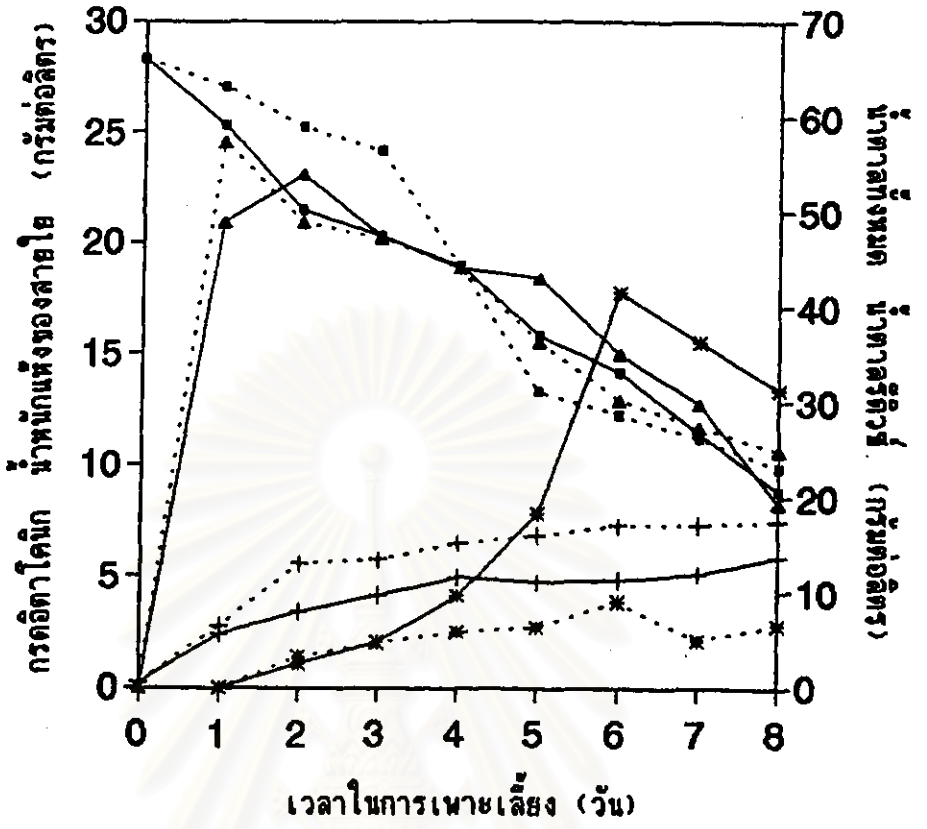
------ หมายถึง แอมโมเนียมไนเตรต

-*- หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

-+- หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

-●- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

-●- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



รูปที่ 10 การผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* I 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนโตรเจนปริมาณ 0.1851 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

——— หมายถึง แอมโมเนียมซัลเฟต

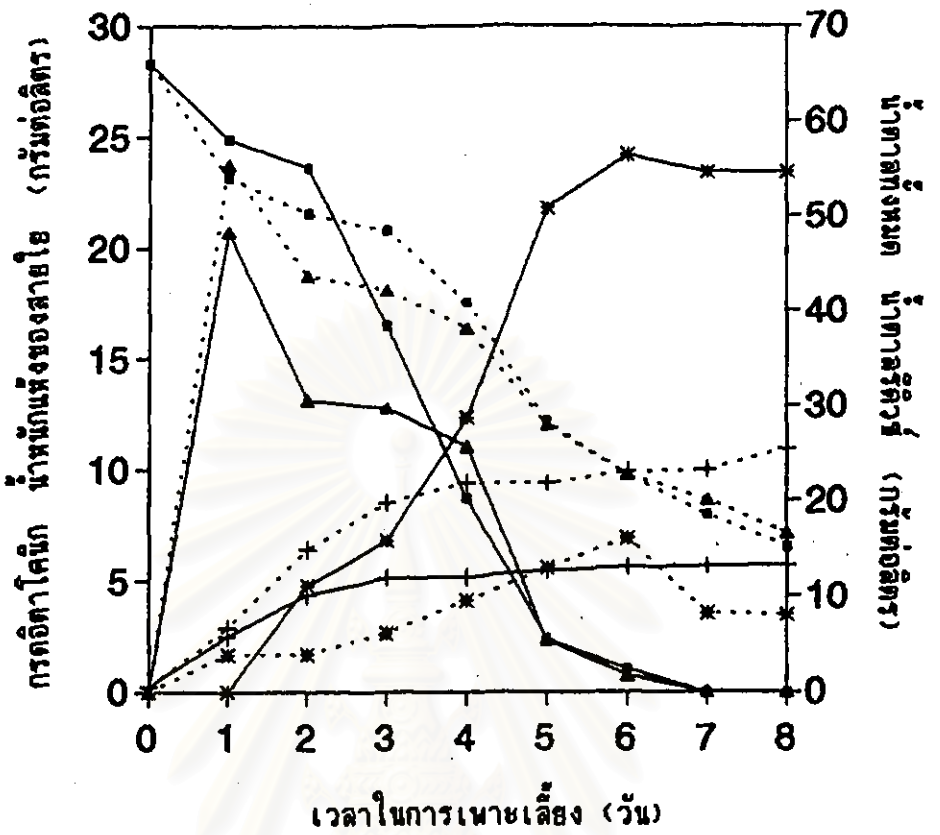
------ หมายถึง แอมโมเนียมไนเตรต

—*— หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

—+— หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

—•— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

—▲— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



รูปที่ 11 การผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* I 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนโตรเจนปริมาณ 0.2777 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

——— หมายถึง แอมโมเนียมซัลเฟต

------ หมายถึง แอมโมเนียมไนเตรต

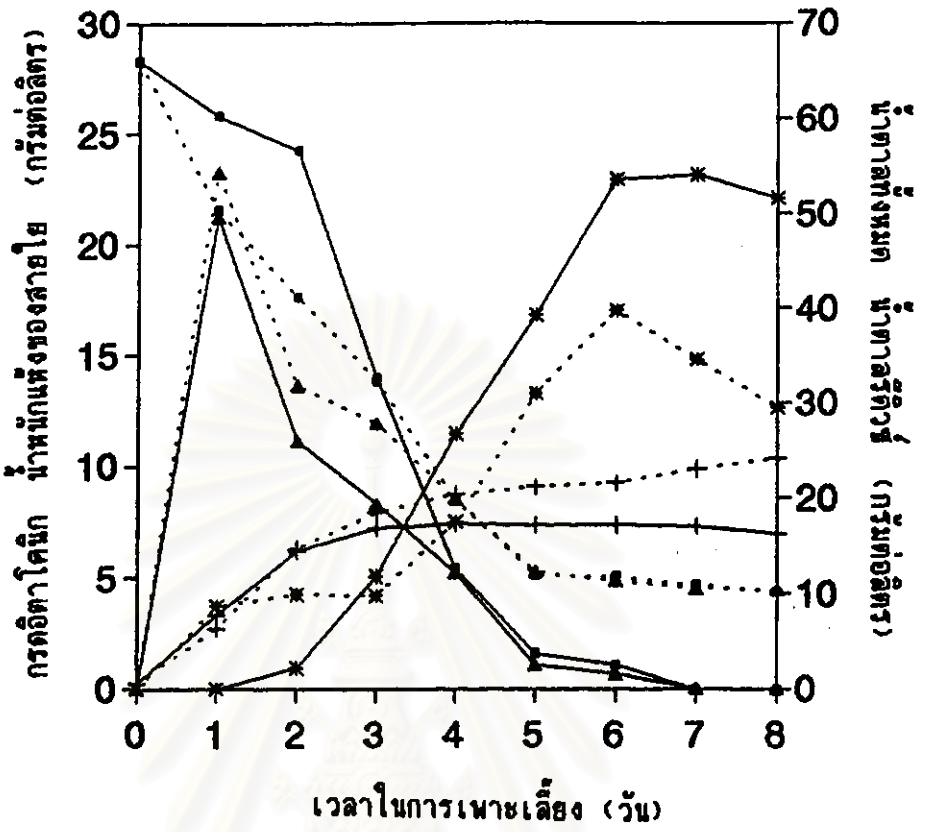
-*- หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

-+- หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

-●- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

-▲- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 การผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* I 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนโตรเจนปริมาณ 0.5553 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

——— หมายถึง แอมโมเนียมซัลเฟต

------- หมายถึง แอมโมเนียมไนเตรต

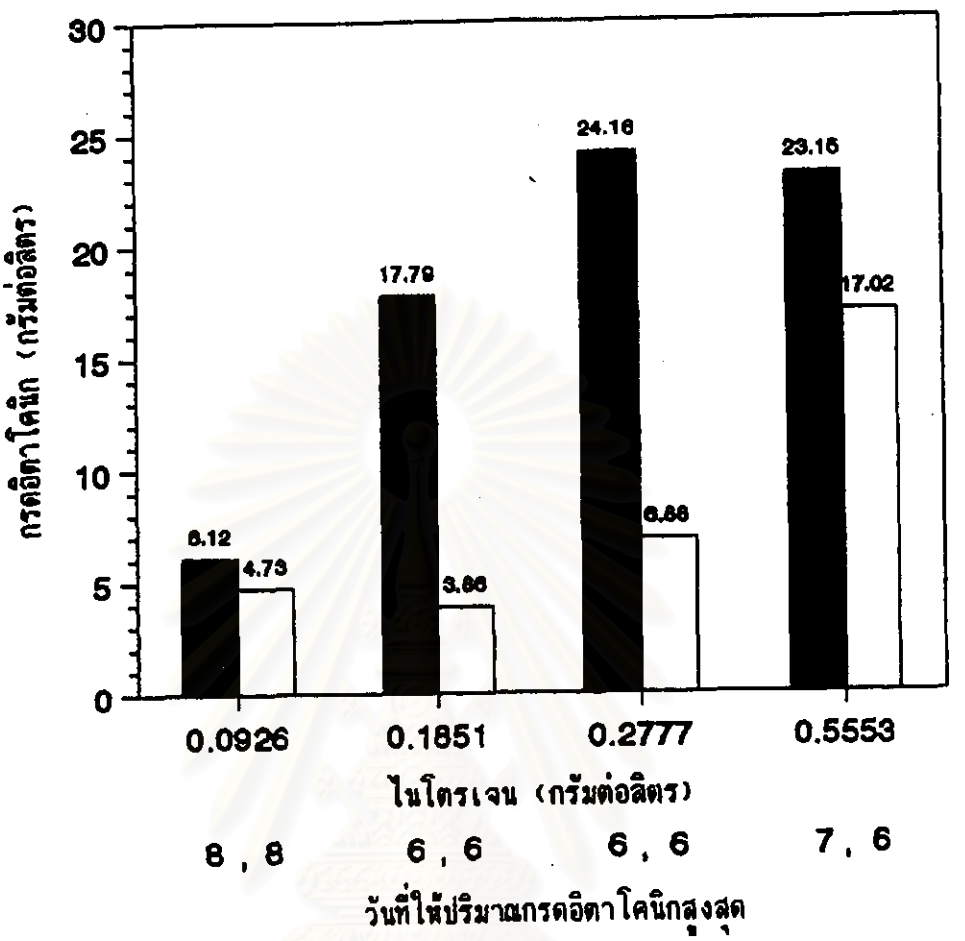
—*— หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

—+— หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

—●— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

—▲— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 เปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกในวันที่ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุด ในการผลิตกรดอิตาโคนิกด้วย *A. terreus* I 10 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียม-ซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต โดยแปรผันปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ กัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

■ หมายถึง แอมโมเนียมซัลเฟต

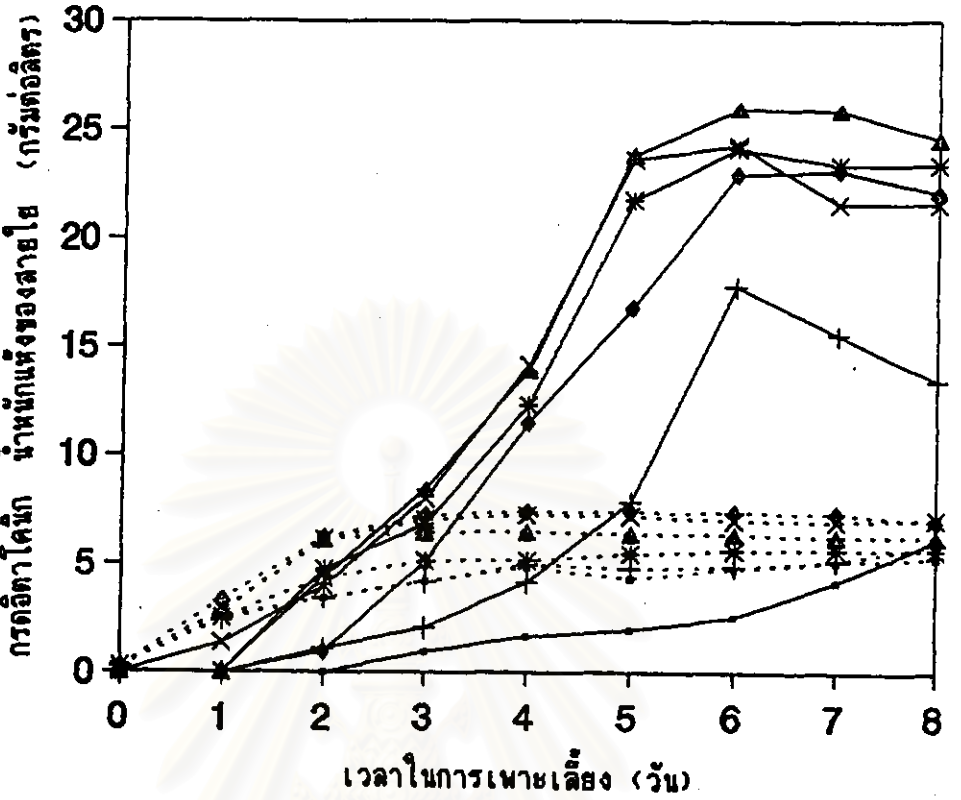
□ หมายถึง แอมโมเนียมไนเตรต

ไนโตรเจนน้อยกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในการทดลองต่อไป และปริมาณที่เหมาะสมคือ 1.31 กรัมต่อลิตร

1.3 <u>ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณคาร์บอน ต่อปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้ผลผลิตกรดอิตาโคนิกสูง</u>

เมื่อแปรผันอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน ต่อปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 300 ต่อ 1 300 ต่อ 2 300 ต่อ 3 300 ต่อ 4 300 ต่อ 5 และ 300 ต่อ 6 โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 66 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วตรวจปริมาณกรดอิตาโคนิกทุกวันระหว่างการผลิต พบว่า อัตราส่วน 300 ต่อ 1 จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเท่ากับ 6.12 กรัมต่อลิตร ในวันสิ้นสุดการทดลองคือวันที่ 8 ของการหมัก อัตราส่วน 300 ต่อ 2 จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 17.79 กรัมต่อลิตรในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง อัตราส่วน 300 ต่อ 3 ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 24.16 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง อัตราส่วน 300 ต่อ 4 ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 25.99 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง อัตราส่วน 300 ต่อ 5 ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 24.30 กรัมต่อลิตรในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และอัตราส่วน 300 ต่อ 6 ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 23.15 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 14

เมื่อตรวจการเติบโตของสายใย พบว่าเมื่อใช้อัตราส่วนต่างกันจะแตกต่างกันโดยการใช้อัตราส่วน 300 ต่อ 6 จะให้น้ำหนักแห้งของสายใยสูงสุด โดยให้น้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 7.41 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือ การใช้อัตราส่วน 300 ต่อ 5 300 ต่อ 4 300 ต่อ 2 300 ต่อ 3 และ 300 ต่อ 1 โดยให้น้ำหนักแห้งของสายใยสูงสุดเท่ากับ 7.24 6.46 5.90 5.65 และ 5.28 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ในวันที่ 4 4 8 8 และ 8 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 14



รูปที่ 14 ปริมาณกรดอิตาโคนิก และน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกด้วย *A. terreus* I 10 โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

—— หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

------ หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

—•— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 1

—+— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 2

—*— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 3

—▲— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 4

—×— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 5

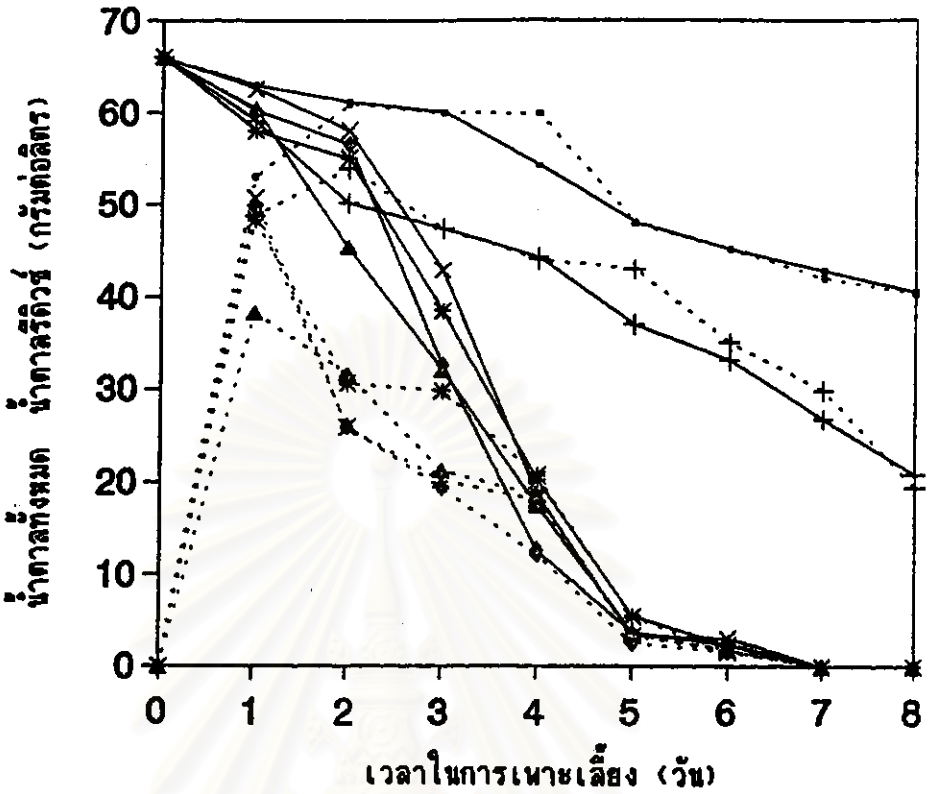
—◆— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 6

สำหรับการใช้น้ำตาลพบว่า เมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 300 ต่อ 6 300 ต่อ 5 300 ต่อ 4 และ 300 ต่อ 3 การใช้น้ำตาลจะเป็นไปอย่างรวดเร็วโดยปริมาณน้ำตาลจะลดลงอย่างรวดเร็วจาก 66 กรัมต่อลิตร ในวันเริ่มต้นการทดลองจนไม่มีน้ำตาลเหลือในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับอัตราส่วน 300 ต่อ 1 และ 300 ต่อ 2 ปริมาณจะค่อย ๆ ลดลงจากวันเริ่มต้นการทดลองโดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงเหลือ 40.49 และ 20.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันสิ้นสุดการทดลอง และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงเหลือ 40.3 และ 19.40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 15

ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน จากค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้น 3.95 จนเหลือประมาณ 2.4 ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงของทุก ๆ อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน หลังจากนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างของอัตราส่วน 300 ต่อ 3 300 ต่อ 4 300 ต่อ 5 และ 300 ต่อ 6 จะค่อย ๆ ลดลงและคงที่จนมีค่าประมาณ 1.8 ตั้งแต่วันที่ 4 จนสิ้นสุดการทดลอง แต่อัตราส่วน 300 ต่อ 1 และ 300 ต่อ 2 จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างคงที่ประมาณ 2.4 ตั้งแต่วันที่ 1 ไปจนสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 16

เมื่อตรวจปริมาณการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต จากการทดลองแปรผันอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ กัน พบว่ามีการใช้ในรูปแบบเดียวกันคือปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจะหมดลงก่อนวันสิ้นสุดการทดลอง คือ อัตราส่วน 300 ต่อ 1 300 ต่อ 2 300 ต่อ 3 และ 300 4 จะใช้แอมโมเนียมซัลเฟตหมดในวันที่ 4 4 5 และ 7 ตามลำดับ ยกเว้นอัตราส่วน 300 ต่อ 5 และ 300 ต่อ 6 จะมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.0008 และ 0.2246 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 17

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตกรดอิตาโคนิก และน้ำหนักแห้งของสายใยในวันที่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดของแต่ละอัตราส่วน จะเห็นได้ว่าอัตราส่วน 300 ต่อ 3 300 ต่อ 4 และ 300 ต่อ 5 ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงไล่เลี่ยกัน แต่อัตราส่วน 300 ต่อ 4 จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงกว่าคือ 25.99 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีน้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 6.33 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 18 ดังนั้นอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณ



รูปที่ 15 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกด้วย *A. terreus* I 10 โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิกเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

——— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

------- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

—•— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 1

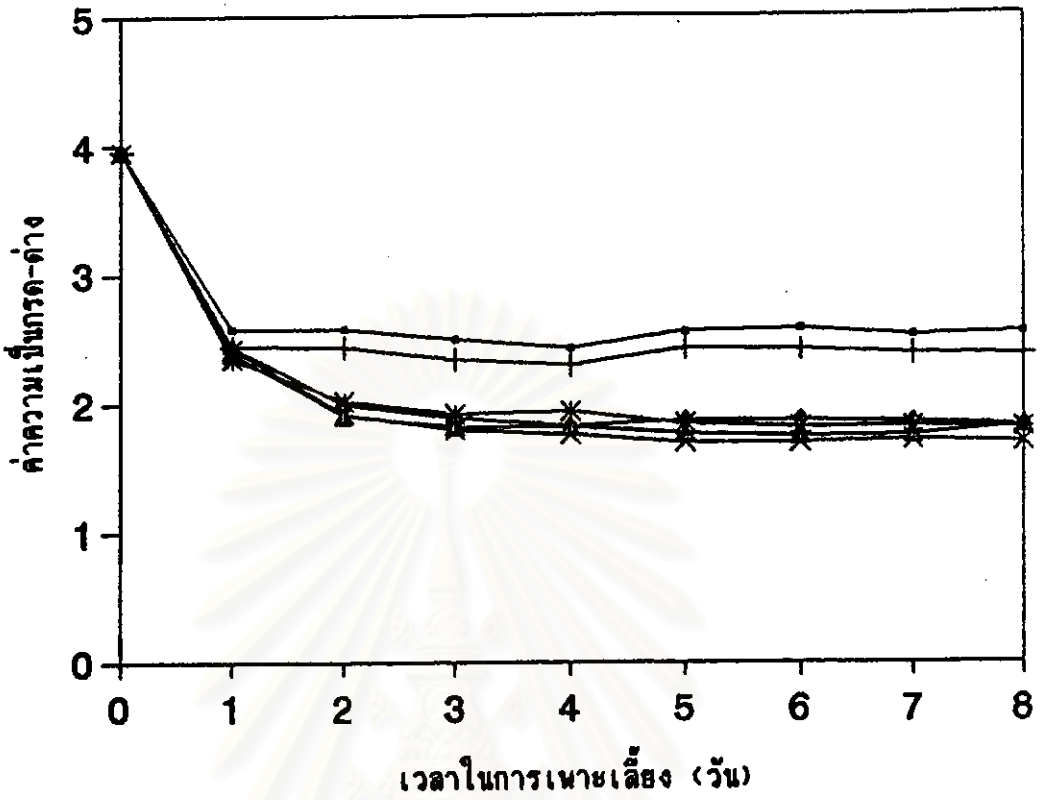
—+— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 2

—*— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 3

—▲— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 4

—×— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 5

—◆— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 6



รูปที่ 16 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิก ด้วย *A. terreus* I 10 โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ กัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

—●— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 1

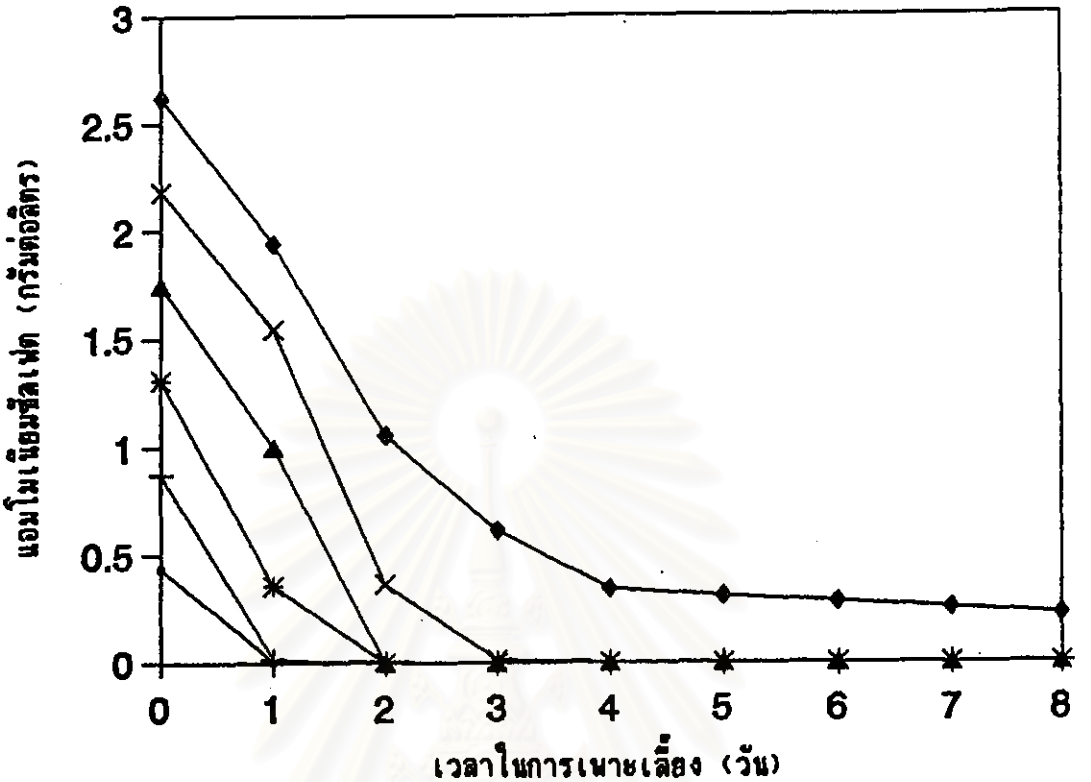
—+— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 2

—✳— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 3

—▲— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 4

—✕— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 5

—◆— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 6



รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก ในระหว่างการผลิตกรดอิตาโคนิกด้วย *A. terreus* I 10 โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ กัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 1

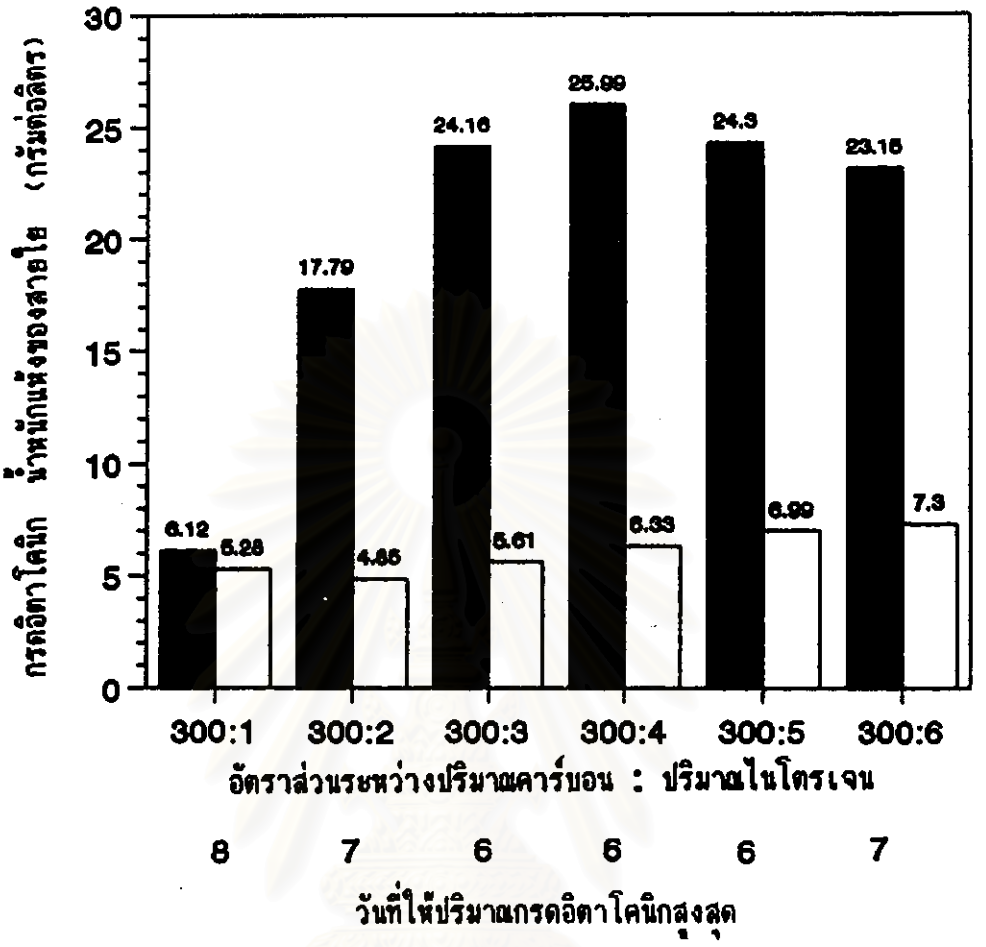
— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 2

— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 3

— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 4

— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 5

— หมายถึง อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน : ปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300 ต่อ 6



รูปที่ 18 เปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกและน้ำหนักแห้งของสายใย ในวันที่ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุด เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกด้วย *A. terreus* I 10 โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอน ต่อปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ กัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

■ หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

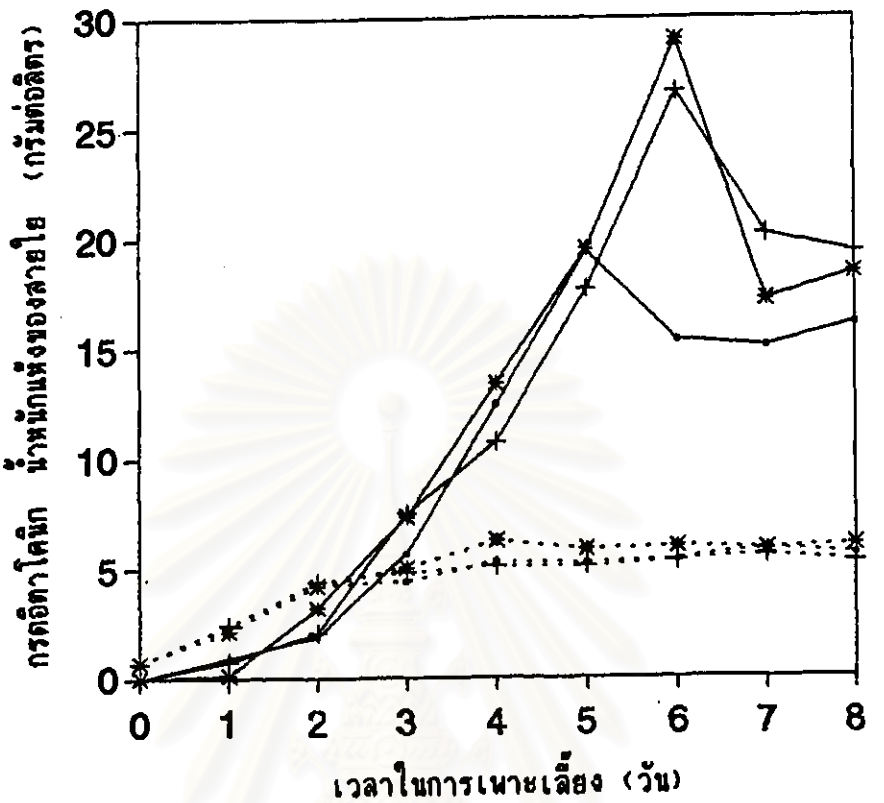
□ หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

ไนโตรเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่อให้ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงคือ 300 ต่อ 4 ซึ่งจะนำไปใช้ในการทดลองต่อ ๆ ไป

1.4 ผลการหาปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนเมื่อผลิตกรดอิตาโคนิก โดยใช้อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจน

เมื่อทดลองผลิตกรดอิตาโคนิกโดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 56 66 และ 76 กรัมต่อลิตร โดยยังคงให้อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจน พบว่าน้ำตาลซูโครส 76 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุด คือให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเท่ากับ 28.99 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ปริมาณสูงขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนปริมาณกรดอิตาโคนิกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครส 66 กรัมต่อลิตร เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และมีค่าสูงสุด 26.61 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครส 56 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเนียง 19.41 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 19

การใช้น้ำตาลซูโครสช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เป็นไปในรูปแบบเดียวกัน หลังจากนั้นแตกต่างกัน ในที่สุดมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือจากการทดลองที่ใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 66 และ 76 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 4.31 และ 18.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันสิ้นสุดการทดลอง และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่เท่ากับ 4.3 และ 18.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการใช้น้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 56 กรัมต่อลิตร น้ำตาลจะหมดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 20 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกที่ผลิตได้กับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไป ในวันที่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 21 จะเห็นได้ว่าการใช้ปริมาณน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 66 กรัมต่อลิตร ให้ผลคุ้มค่าที่สุดแม้จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกน้อยกว่าเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลซูโครสปริมาณ 76 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะมีน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อถึง 18.18 กรัมต่อลิตร ในวันสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 20) จึงเลือกใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น



รูปที่ 19 ปริมาณกรดอิตาโคนิกและน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกด้วย *A. terreus* I 10 โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่าง ๆ กัน โดยกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300:4 เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

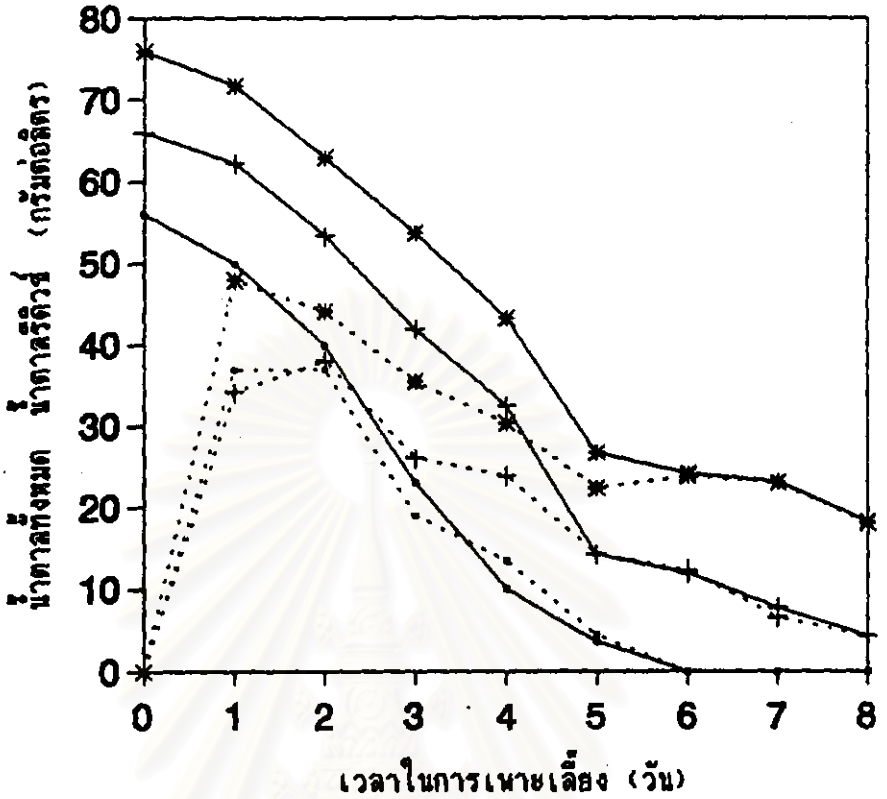
—— หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

..... หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

—•— หมายถึง น้ำตาลซูโครส 56 กรัมต่อลิตร

—+— หมายถึง น้ำตาลซูโครส 66 กรัมต่อลิตร

—*— หมายถึง น้ำตาลซูโครส 76 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 20 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกด้วย *A. terreus* I 10 โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลชูโครสต่าง ๆ กัน โดยกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจน เท่ากับ 300:4 เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

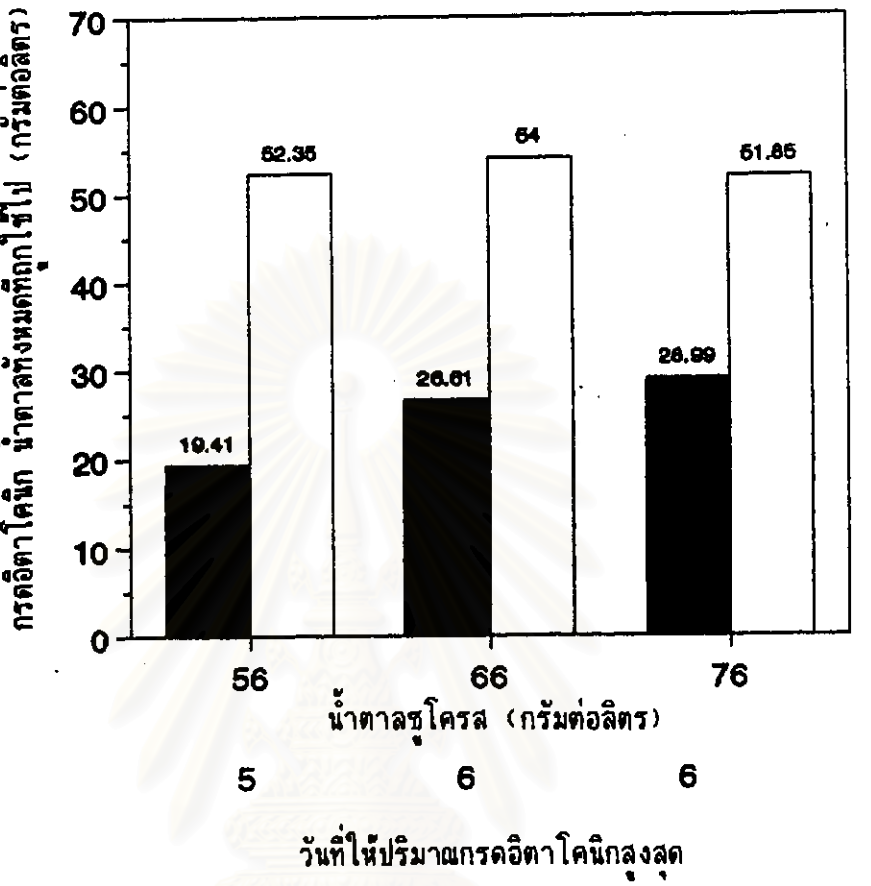
——— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

------ หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

—•— หมายถึง น้ำตาลชูโครส 56 กรัมต่อลิตร

—+— หมายถึง น้ำตาลชูโครส 66 กรัมต่อลิตร

—*— หมายถึง น้ำตาลชูโครส 76 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 21 ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุด จากน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* I 10 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

■ หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

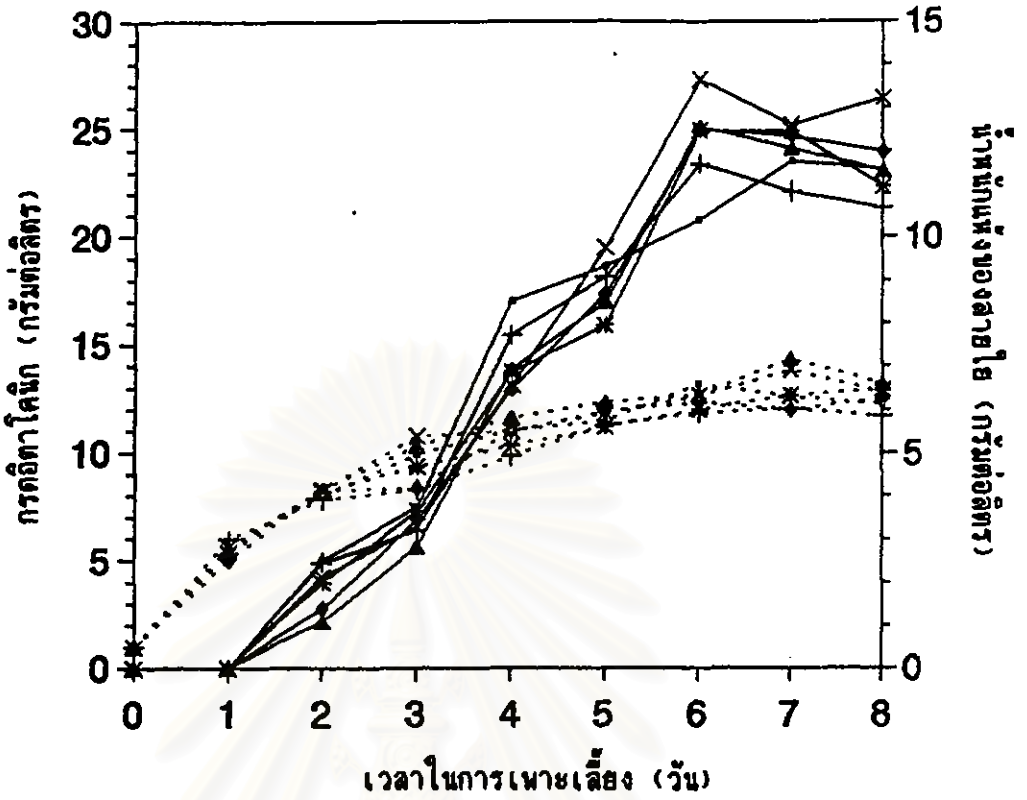
□ หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไป

66 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดลองต่อ ๆ ไป

2. ผลการหาภาวะทางกายภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก

2.1 ผลการหาค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 เพื่อผลิตกรดอิตาโคนิก โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นต่าง ๆ กัน ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 และ 5.0 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้น 2.5 จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 23.52 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้น 3.0 3.5 4.0 4.5 และ 5.0 จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเท่ากับ 23.36 24.91 25.07 27.27 และ 24.97 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 22 เมื่อตรวจการเติบโตของสายใยพบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นต่างกัน มีค่าการเติบโตใกล้เคียงกัน แต่สายใยที่เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 4.0 จะมีน้ำหนักแห้งของสายใยสูงกว่าค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นค่าอื่นเล็กน้อย ตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จนสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 22 สำหรับการใช้น้ำตาล พบว่าในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้เคียงกันในทุกค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้น ดังแสดงในรูปที่ 23 แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นต่างกันจะแตกต่างกันในแต่ละวันของการผลิต โดยที่จะมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ไปจนในที่สุดน้ำตาลรีดิวซ์ของค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้น เท่ากับ 5.0 หมดในวันที่สิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 8) ส่วนที่ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นค่าอื่น ยังคงมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่เล็กน้อย เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 24 เมื่อวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิต พบว่าไม่ว่าจะเริ่มต้นด้วยค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่าใด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงผ่านไป 1 วัน ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลง จนมีค่าความเป็นกรด-ด่างใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 2.14 - 2.24 หลังจากนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงอีกเล็กน้อย และมีค่า



รูปที่ 22 ปริมาณกรดอิตาโคนิก และน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกด้วย *A. terreus* I 10 โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นต่าง ๆ กัน ของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

—— หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

------ หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.5

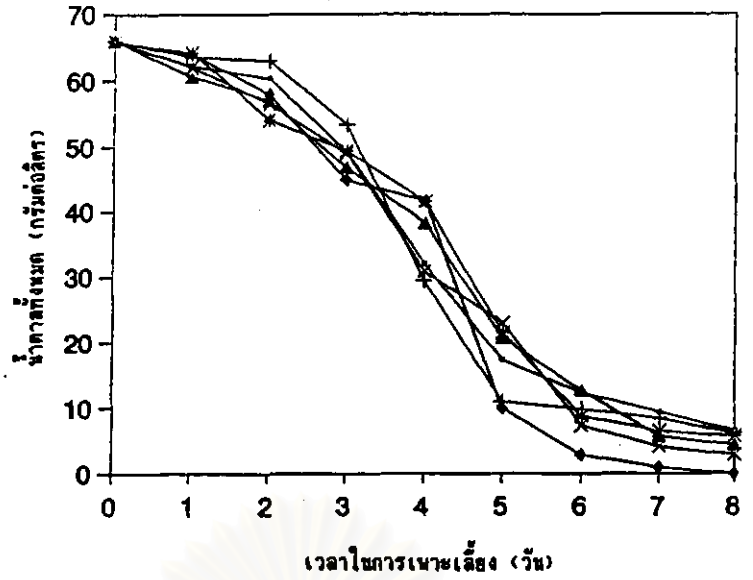
หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.0

หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.5

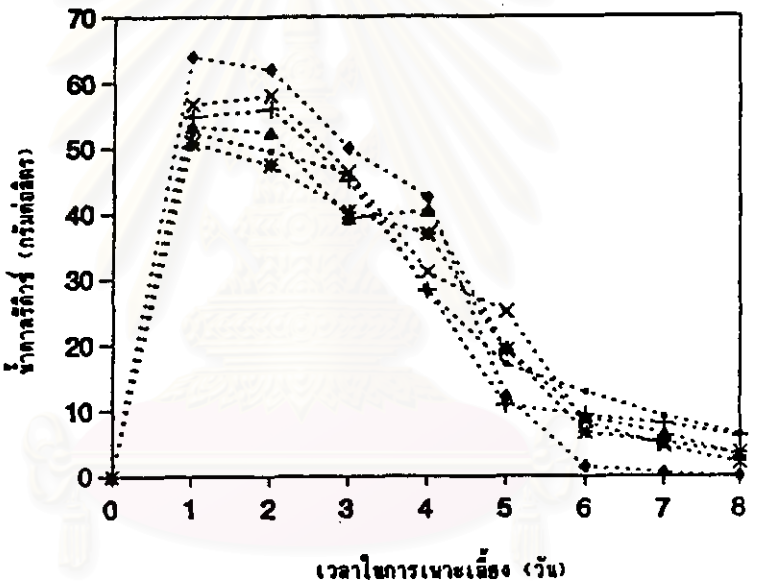
หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0

หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5

หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0



รูปที่ 23 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นต่าง ๆ กัน ของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก



รูปที่ 24 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นต่าง ๆ กัน ของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

— หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.5

— หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.0

— หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.5

— หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0

— หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5

— หมายถึง ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0

ไล่เลี่ยกันจนสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4

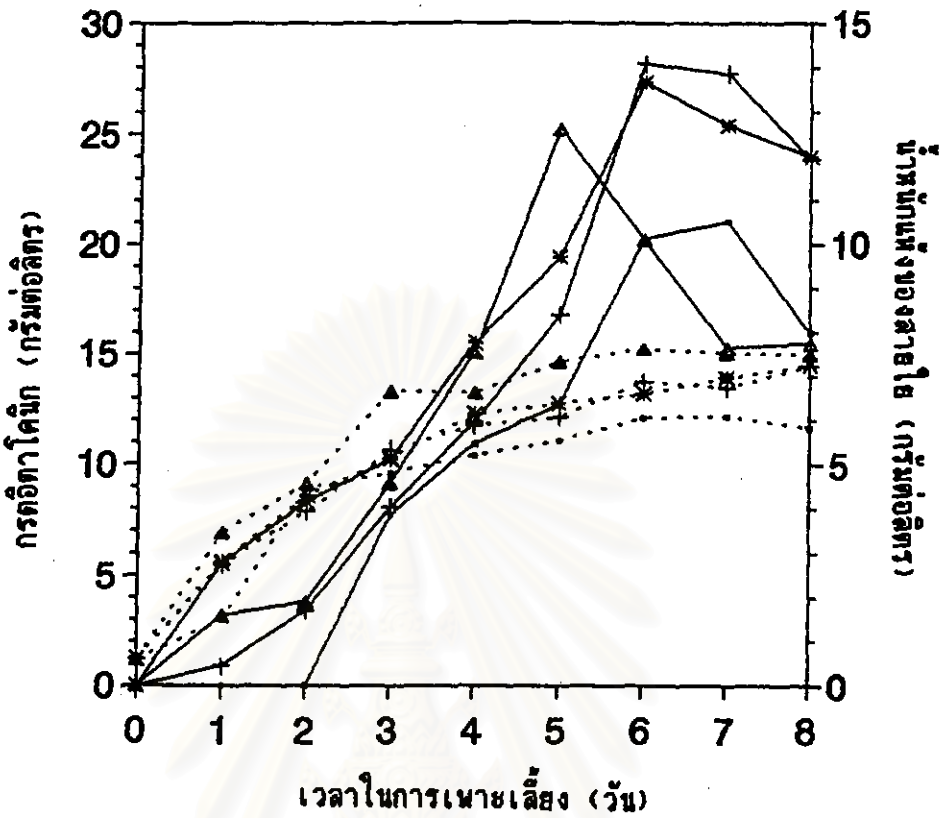
ตารางที่ 4 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในระหว่างการผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A.cereus* I 10 เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นต่าง ๆ กัน

ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง					
0	2.50	3.00	3.50	4.00	4.50	5.00
1	2.14	2.18	2.14	2.18	2.16	2.24
2	2.04	2.01	2.06	2.06	2.12	2.11
3	1.99	1.99	2.02	2.08	2.08	2.05
4	1.96	1.94	1.97	2.02	2.00	2.03
5	1.91	1.92	1.95	2.00	1.98	1.99
6	1.91	1.90	1.94	1.98	1.94	1.92
7	1.90	1.91	1.94	2.00	1.92	1.97
8	1.92	1.94	1.95	2.00	1.96	1.95

เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตกรดอิตาโคนิกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นต่าง ๆ กัน ของอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกคือ 4.5 ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงที่สุดเท่ากับ 27.27 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการผลิต

2.2 ผลการหาอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดอิตาโคนิก

เมื่อทดลองผลิตกรดอิตาโคนิก โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 28 30 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส) พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดคือ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิก 28.19 กรัมต่อลิตรในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเท่ากับ 27.39 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 25.25 กรัมต่อลิตรในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และให้การเติบโตของสายใยสูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง โดยให้น้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 7.32 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิก และการเติบโตของสายใยต่ำ คือให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเพียง 21 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักแห้งของเส้นใยเท่ากับ 6.1 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ให้การเติบโตใกล้เคียงกันคือ ให้น้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 7.28 และ 7.26 กรัมต่อลิตร ในวันสิ้นสุดการทดลองตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 25 สำหรับการใช้น้ำตาลโดย *A. terreus* I 10 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง จะมีการใช้น้ำตาลใกล้เคียงกัน คือปริมาณน้ำตาลจะลดลงอย่างสม่ำเสมอในช่วง 2 วันแรกของการเพาะเลี้ยง จากนั้นปริมาณน้ำตาลจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 2 ถึงวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และการใช้น้ำตาลจะลดลงและคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลอง จะมีน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่เพียง 0.7 และ 0.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จะมีการใช้น้ำตาลอย่างสม่ำเสมอตลอดการทดลอง แต่มีปริมาณการใช้น้ำตาลต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง โดยจะมีน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ 6.46 และ 6.86 กรัมต่อลิตร ในวันสิ้นสุดการทดลอง สำหรับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงเล็กน้อยในช่วงวันที่



รูปที่ 25 ปริมาณกรดอิตาโคนิกและน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกด้วย *A. terreus* I 10 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ กัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

—— หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

----- หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

—— หมายถึง อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

—+— หมายถึง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

—*— หมายถึง อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

—▲— หมายถึง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

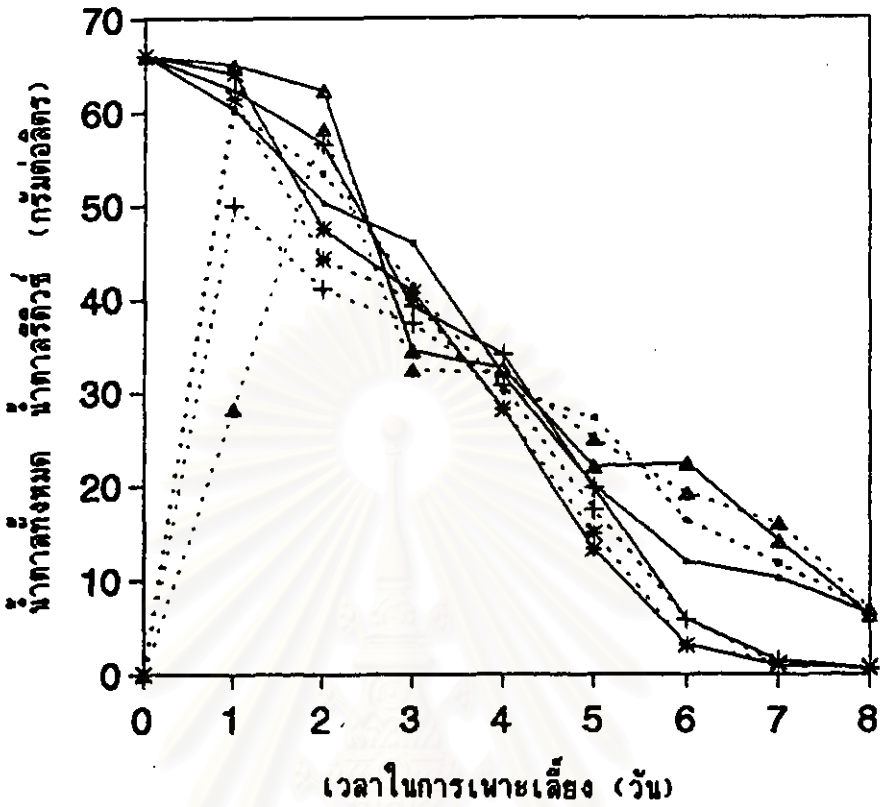
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1 และ 2 ของการเพาะเลี้ยง แต่จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงวันที่ 2 ถึงวันที่ 5 จากนั้นการใช้น้ำตาลจะลดลง และมีน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ 6.28 และ 6.95 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ในวันสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 26 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกจากการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกจะอยู่ในช่วง 30-33 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เหมาะสมที่สุด แต่เนื่องจากการผลิตที่อุณหภูมิห้องสะดวกกว่า และประหยัดพลังงาน จึงเลือกใช้อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส) ในการทดลองต่อไป

3. <u>ผลการเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอกที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอิตาโคนิกสูง</u>

3.1 <u>ผลการหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ทำให้ *A. terreus* I 10 สร้างสปอร์จำนวนมาก</u>

เมื่อเพาะเลี้ยงสปอร์ของ *A. terreus* I 10 ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก แล้วนับจำนวนสปอร์ที่สร้างขึ้น ทุกวัน เป็นเวลา 6 วัน โดยทำการทดลอง 5 ซ้ำ พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส ให้จำนวนสปอร์มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิกอย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในรูปที่ 27 โดยให้จำนวนสปอร์ 6.44×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง และเพิ่มขึ้นทุกวันจนเท่ากับ 3.48×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตรในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิกไม่ให้สปอร์ในวันที่ 1 และให้สปอร์เพียง 2.8×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตรในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 28 จึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรสในการเพาะเลี้ยงสปอร์ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 26 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกด้วย *A. terreus* I 10 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ กัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

——— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

------- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

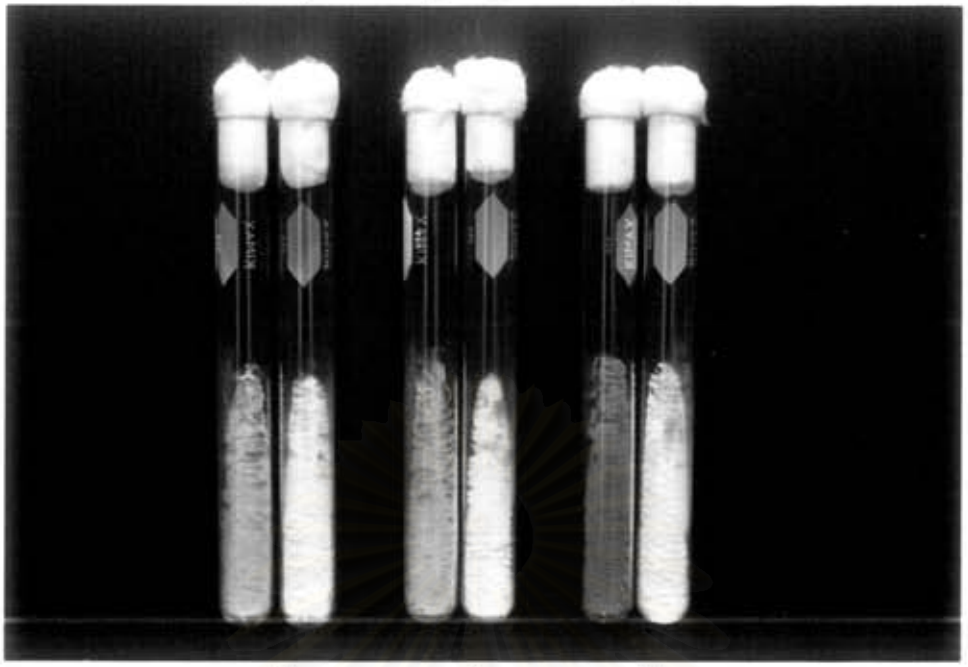
—•— หมายถึง อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

—+— หมายถึง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

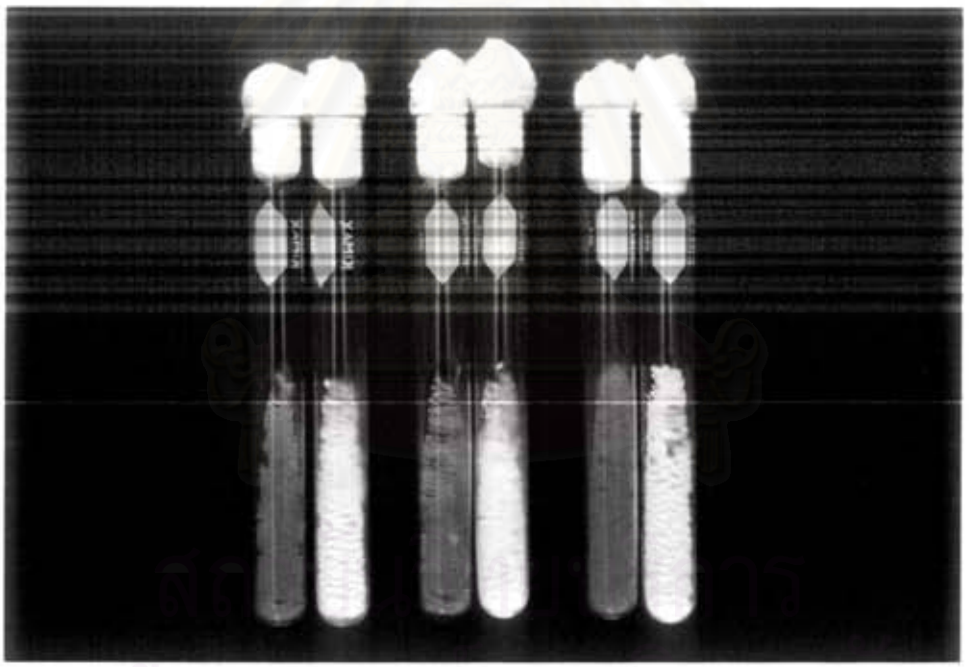
—*— หมายถึง อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

—▲— หมายถึง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ก ข ก ข ก ข



1 วัน 2 วัน 3 วัน



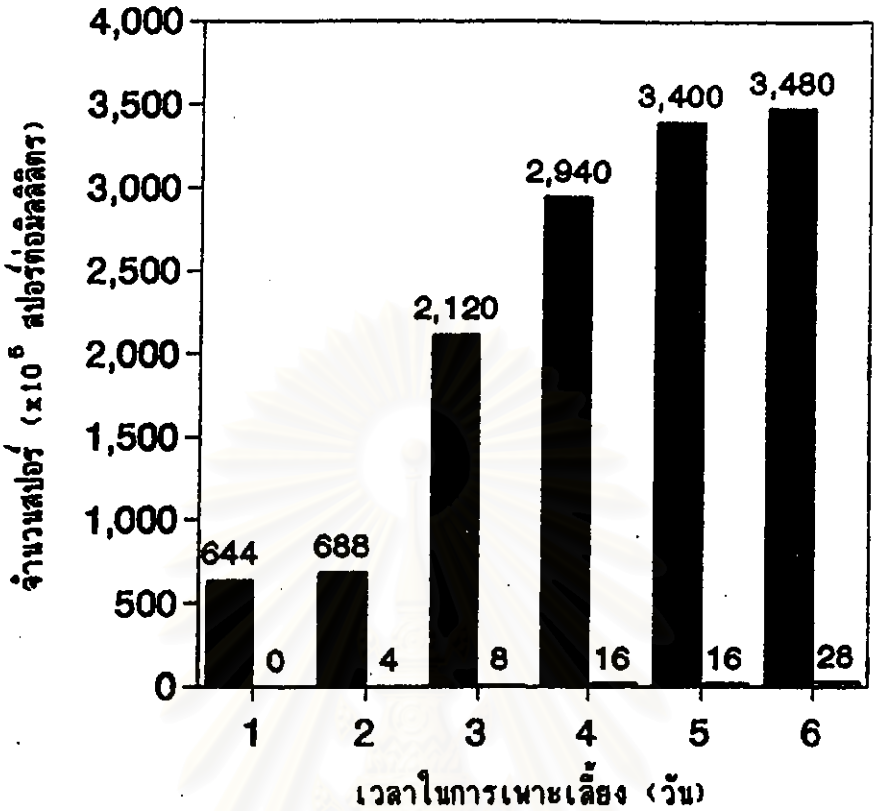
4 วัน 5 วัน 6 วัน

รูปที่ 27 การสร้างสปอร์ของ *A. terreus* I 10 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก เป็นเวลา 1-6 วัน

ก หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส

ข หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อเอียงสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 28 เปรียบเทียบจำนวนสปอร์ของ *A. terreus* I 10 ที่สร้างขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก

■ หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส

□ หมายถึง อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก

3.2 ผลการหาช่วงเวลาและวิธีการที่เหมาะสมในการทำให้สปอร์งอกสมบูรณ์ และไม่เกาะกลุ่ม

เมื่อเพาะเลี้ยงสปอร์ของ *A. terreus* I 10 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกโดยใช้วิธีการต่าง ๆ กัน คือ ไม่ใส่เม็ดแก้ว ใส่เม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร หนัก 15 กรัม และใส่เม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร หนัก 15 กรัม พบว่า ถ้าไม่ใส่เม็ดแก้ว เมื่อสปอร์งอกแล้วจะเกาะกลุ่มกันเป็นกระจุกตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใส่เม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 4 มิลลิเมตร สปอร์ที่งอกแล้วกระจายตัวดีขึ้นในระยะแรก และตรวจนับการงอกได้ 36.97 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง แต่เมื่อหลังชั่วโมงที่ 12 สปอร์ที่งอกแล้วเริ่มเกาะกลุ่มเป็นกระจุก ทำให้ไม่สามารถตรวจนับการงอกของสปอร์ได้เช่นเดียวกับไม่ใส่เม็ดแก้ว ส่วนการใส่เม็ดแก้ว ขนาด 2 มิลลิเมตร มีผลทำให้สปอร์ที่งอกแล้ว กระจายตัวดีตลอดเวลาที่เพาะเลี้ยง มีการงอกของสปอร์เพิ่มขึ้นทุก ๆ ครั้งของการตรวจนับในชั่วโมงที่ 3 6 9 12 และ 15 และไม่งอกเพิ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์สูงสุดเท่ากับ 91.94 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 การเกาะกลุ่มและเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ เมื่อใส่และไม่ใส่เม็ดแก้วในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตหัวเชื้อ

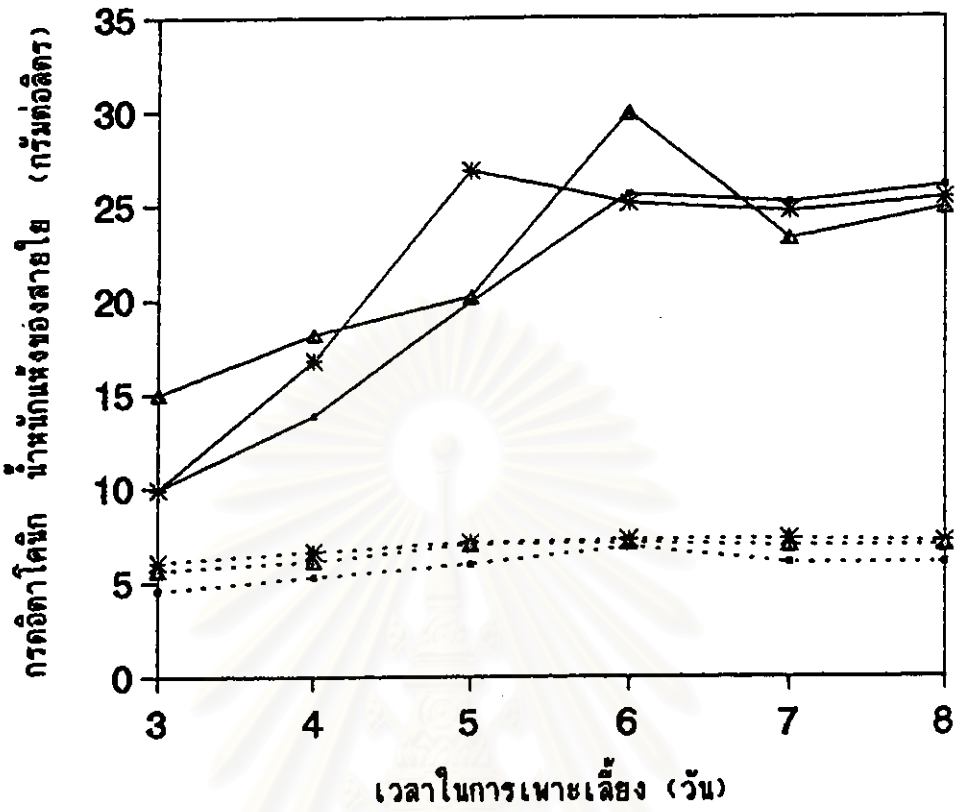
เวลาที่เพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	ไม่ใส่เม็ดแก้ว		ใส่เม็ดแก้ว ขนาด 2 มิลลิเมตร		ใส่เม็ดแก้ว ขนาด 4 มิลลิเมตร	
	การเกาะกลุ่ม	เปอร์เซ็นต์การงอก (%)	การเกาะกลุ่ม	เปอร์เซ็นต์การงอก (%)	การเกาะกลุ่ม	เปอร์เซ็นต์การงอก (%)
0	ไม่พบ	0	ไม่พบ	0	ไม่พบ	0
3	ไม่พบ	1.18	ไม่พบ	2.19	ไม่พบ	1.13
6	ไม่พบ	5.88	ไม่พบ	4.55	ไม่พบ	6.03
9	พบ	-*	ไม่พบ	39.03	ไม่พบ	36.97
12			ไม่พบ	76.24	พบ	-*
15			ไม่พบ	87.17		
18			ไม่พบ	91.94		
21			ไม่พบ	89.97		
24	ไม่ทำการทดลองต่อ		ไม่พบ	92.40	ไม่ทำการทดลองต่อ	
27			ไม่พบ	91.25		
30			ไม่พบ	90.76		
33			ไม่พบ	91.45		
36			ไม่พบ	91.82		

* หมายถึง ไม่สามารถนับจำนวนสปอร์ที่งอกได้ เพราะสปอร์ที่งอกแล้วเกาะกลุ่มกันเป็นกระจุก

3.3 ผลการหาความหนาแน่นที่เหมาะสมของหัวเชื้อสปอร์งอก

เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิก โดยแปรผันความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอก ของ *A. terreus* I 10 ต่าง ๆ กันเท่ากับ $1-2x10^7$ $1-2x10^8$ และ $1-2x10^9$ สปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดอิตาโคนิก 50 มิลลิลิตร พบว่าความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกเท่ากับ $1-2x10^8$ สปอร์งอก จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 29.94 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง การใช้หัวเชื้อสปอร์งอกที่มีความหนาแน่นเท่ากับ $1-2x10^7$ และ $1-2x10^9$ สปอร์งอก จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเท่ากับ 26.02 และ 26.87 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 และวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 29 เมื่อตรวจการเติบโตของสายใย พบว่าการใช้หัวเชื้อที่มีความหนาแน่นเท่ากับ $1-2x10^8$ และ $1-2x10^9$ สปอร์งอก จะให้น้ำหนักแห้งของสายใยใกล้เคียงกันคือ 6.98 และ 7.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการใช้หัวเชื้อความหนาแน่น $1-2x10^7$ สปอร์งอก จะให้น้ำหนักแห้งของสายใยต่ำกว่าการใช้ความหนาแน่น $1-2x10^8$ และ $1-2x10^9$ สปอร์งอก โดยให้น้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 6.06 กรัมต่อลิตร ในวันสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 29

สำหรับการใช้น้ำตาล ในการผลิตกรดอิตาโคนิกโดยใช้หัวเชื้อความหนาแน่นต่าง ๆ กัน จะมีลักษณะคล้ายกัน คือเมื่อตรวจในช่วงวันที่ 3 ถึงวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง มีการใช้น้ำตาลในรูปแบบเดียวกัน คือจะค่อย ๆ ลดลงจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง แต่การใช้สปอร์งอกความหนาแน่น $1-2x10^8$ สปอร์งอก ใช้น้ำตาลรีดิวซ์เร็วกว่าคือหมดในวันที่ 7 ของการทดลอง เมื่อตรวจน้ำตาลทั้งหมด พบว่าการทดลองที่ใช้สปอร์งอกหนาแน่น $1-2x10^8$ และ $1-2x10^9$ สปอร์งอก ไม่มีน้ำตาลทั้งหมดเหลือเมื่อสิ้นสุดการทดลอง แต่การทดลองที่ใช้สปอร์งอกหนาแน่น $1-2x10^7$ สปอร์งอก มีน้ำตาลทั้งหมดเหลือเล็กน้อยเท่ากับ 2.8 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 30



รูปที่ 29 ปริมาณกรดอิตาโคนิกและน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกด้วย *A. terreus* I 10 โดยแปรผันความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์ร่องอกต่าง ๆ กัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

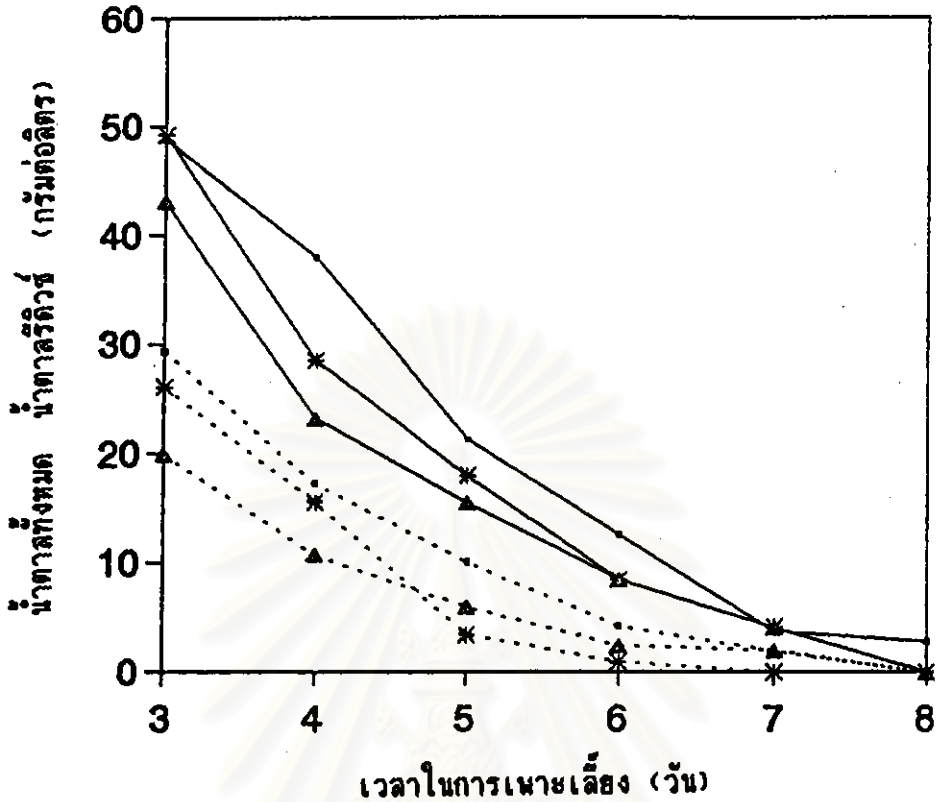
——— หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

-------- หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

—●— หมายถึง ความหนาแน่น $1-2 \times 10^{7}$ สปอร์ร่องอก

—▲— หมายถึง ความหนาแน่น $1-2 \times 10^{8}$ สปอร์ร่องอก

—✳— หมายถึง ความหนาแน่น $1-2 \times 10^{9}$ สปอร์ร่องอก



รูปที่ 30 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกด้วย *A. terreus* I 10 โดยแปรผันความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกต่าง ๆ กัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

——— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

------- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

—•— หมายถึง ความหนาแน่น $1-2 \times 10^{7}$ สปอร์งอก

—▲— หมายถึง ความหนาแน่น $1-2 \times 10^{6}$ สปอร์งอก

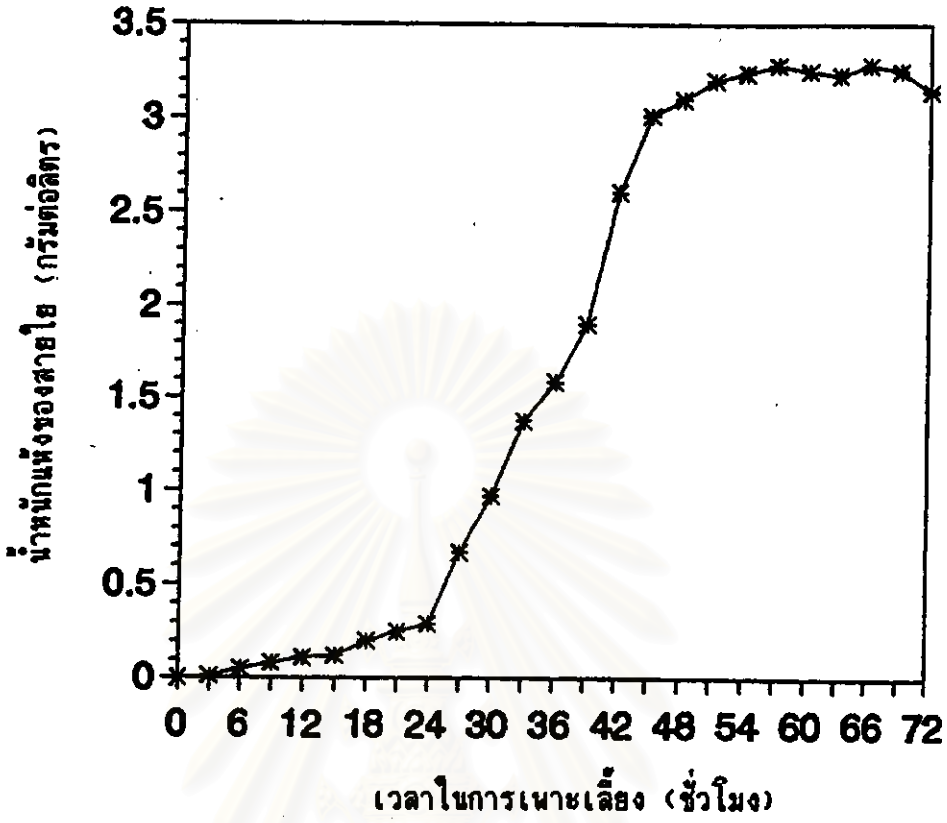
—✳— หมายถึง ความหนาแน่น $1-2 \times 10^{5}$ สปอร์งอก

3.4 ผลการหาการเติบโตของ *A. terreus* I 10 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

เมื่อเพาะเลี้ยงสปอร์ของ *A. terreus* I 10 ความหนาแน่น 1-2x10^{8} สปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยแปรผันช่วงเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าสามารถแบ่งการเติบโตของ *A. terreus* I 10 ได้เป็น 3 ระยะได้แก่ ระยะที่ไม่มีการเติบโตหรือมีน้อย (lag phase) คือระยะการเติบโตตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยงจนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีการเติบโตเล็กน้อย โดยน้ำหนักแห้งเพิ่มจาก 0.01 กรัมต่อลิตร จนเท่ากับ 0.29 กรัมต่อลิตร ระยะที่มีการเติบโตมาก และรวดเร็ว (log phase) คือ ระยะการเติบโตตั้งแต่หลังชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 48 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีการเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยน้ำหนักแห้งเพิ่มจาก 0.29 กรัมต่อลิตร จนเท่ากับ 3.10 กรัมต่อลิตร และระยะที่การเติบโตคงที่ (stationary phase) คือระยะการเติบโตตั้งแต่หลังชั่วโมงที่ 48 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง คือ ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีการเติบโตน้อยมากจนถึงคงที่ และวัดน้ำหนักแห้งของสายใยได้เท่ากับ 3.14 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 31 จะเห็นได้ว่าหัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 36 48 และ 60 ชั่วโมง มีการเติบโตอยู่ในช่วงระยะไม่มีการเติบโตหรือเติบโตช้า ระยะต้นของระยะที่มีการเติบโตมากและรวดเร็ว ปลายของระยะที่มีการเติบโตมากและรวดเร็ว และระยะการเติบโตคงที่ ตามลำดับ จึงเลือกหัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 36 48 และ 60 ชั่วโมง เป็นตัวแทนของหัวเชื้อในแต่ละระยะการเจริญ ในการทดลองหาอายุที่เหมาะสมของหัวเชื้อสปอร์งอกต่อไป

3.5 การหาอายุที่เหมาะสมของหัวเชื้อสปอร์งอก

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก โดยแปรผันอายุของหัวเชื้อสปอร์งอกต่าง ๆ กันเท่ากับ 24 36 48 และ 60 ชั่วโมง พบว่าการใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 36 48 และ 60 ชั่วโมง จะให้ปริมาณกรดกรดอิตาโคนิกสูงสุดใกล้เคียงกันเท่ากับ 29.78 31.93 29.39 และ 28.99 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 31 การเติบโตของ *A.tereus* I 10 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตามลำดับ ในวันที่ 6 ของการผลิต แต่การใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 36 ชั่วโมง จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงกว่าการใช้หัวเชื้ออายุอื่นเล็กน้อย คือให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 31.98 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 32 เมื่อตรวจการเติบโตของสายใย พบว่าให้การเติบโตไล่เลี่ยกันทุกอายุของหัวเชื้อ แต่การใช้หัวเชื้อที่มีอายุ 36 ชั่วโมง จะให้การเติบโตของสายใยมากกว่าการให้หัวเชื้ออายุอื่นเล็กน้อย โดยได้น้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 7.47 กรัมต่อลิตร ในวันสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการใช้หัวเชื้ออายุ 24 48 และ 60 ชั่วโมง จะให้น้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 6.77 7.12 และ 7.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 32

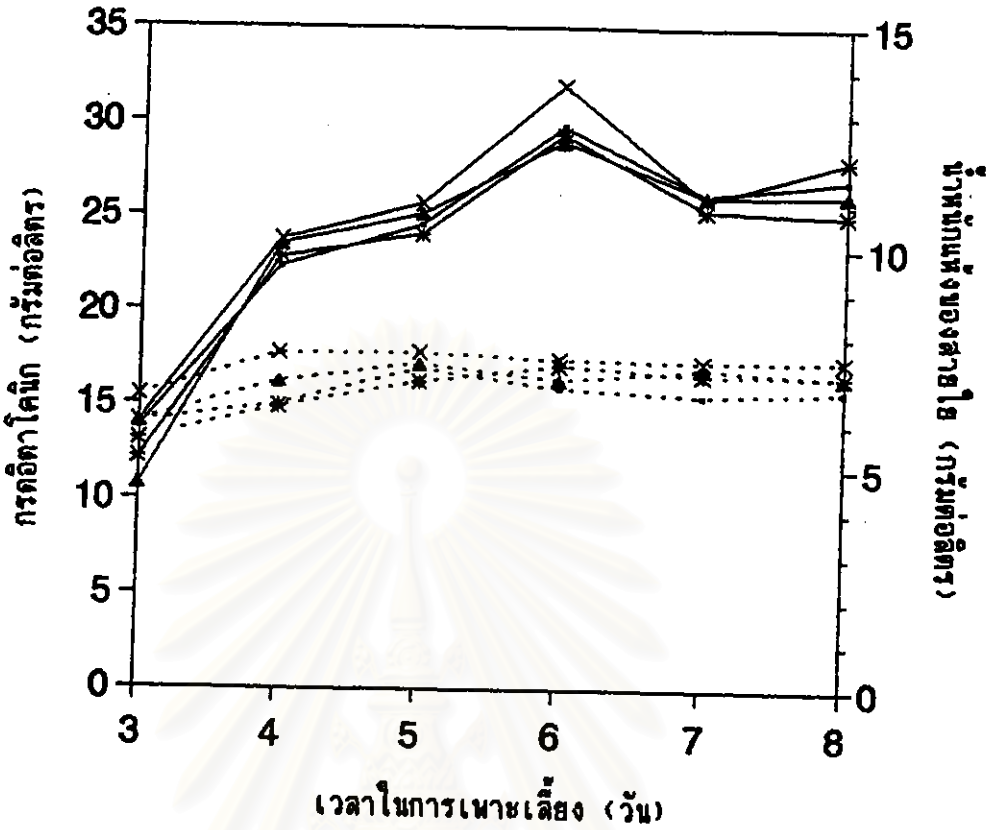
สำหรับการใช้น้ำตาลเมื่อตรวจตั้งแต่วันที่ 3 ของการผลิต พบว่า หัวเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงใช้น้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์ได้รวดเร็วที่สุด คือน้ำตาลทั้งสองหมดในวันที่ 7 ของการผลิต หัวเชื้ออายุ 36 ชั่วโมง ใช้น้ำตาลช้ากว่าหัวเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง แต่ก็ใช้หมดในวันที่ 7 ของการผลิตเช่นกัน ส่วนหัวเชื้ออายุ 48 และ 60 ชั่วโมง จะใช้น้ำตาลหมด หรือเกือบหมดไล่เลี่ยกัน ในวันที่ 8 ของการผลิต ดังแสดงในรูปที่ 33

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิก จากการผลิตโดยใช้หัวเชื้ออายุต่าง ๆ กัน พบว่าหัวเชื้ออายุ 36 ชั่วโมง เป็นหัวเชื้อที่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุด จึงเป็นอายุที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอกที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอิตาโคนิกสูง ดังนั้นจะเลือกใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 36 ชั่วโมง เป็นหัวเชื้อในการทดลองผลิตกรดกรดอิตาโคนิกในระดับขยายส่วนต่อไป

4. ผลการผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับขยายส่วน

4.1 ผลการผลิตกรดอิตาโคนิกโดยใช้แหล่งน้ำตาลชูโครสต่าง ๆ กัน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 36 ชั่วโมง ความหนาแน่น $1-2\times10^{8}$ สปอร์งอกต่อมิลลิลิตร ขนาด 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อ



รูปที่ 32 ปริมาณกรดอิตาโคนิกและน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกด้วย *A. terreus* I 10 โดยแปรผันอายุของหัวเชื้อสปอร์งอกต่าง ๆ กัน ใช้หัวเชื้อความหนาแน่น $1-2 \times 10^{8}$ สปอร์งอก เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

——— หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

------- หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

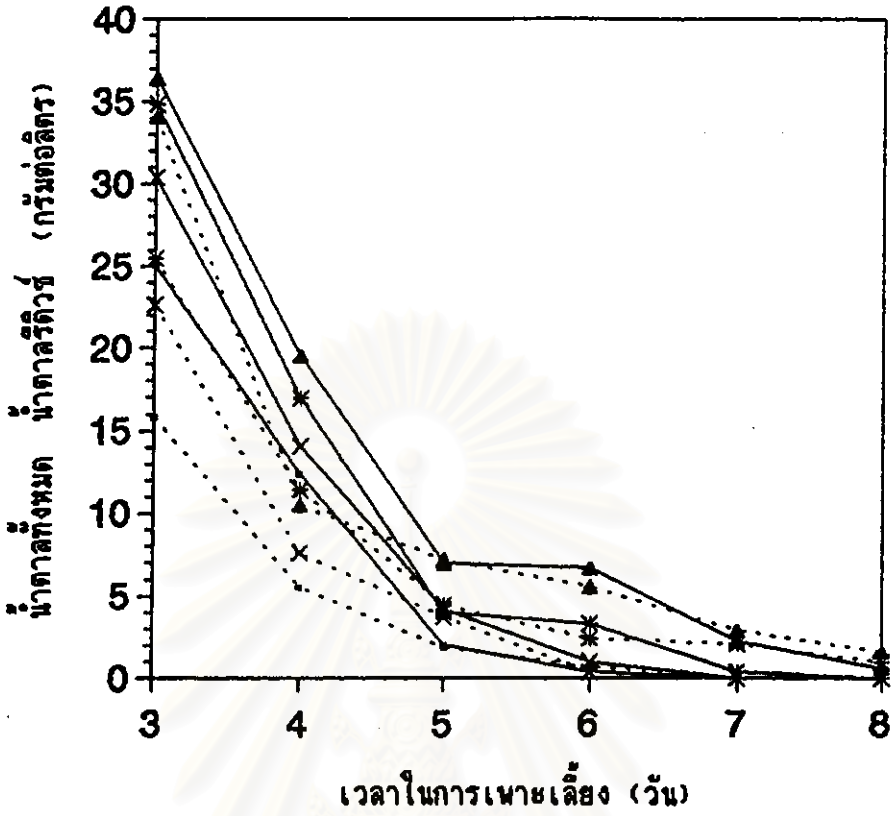
—— หมายถึง หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมง

—×— หมายถึง หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 36 ชั่วโมง

—✳— หมายถึง หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 48 ชั่วโมง

—▲— หมายถึง หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 60 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 33 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกด้วย *A. terreus* I 10 โดยแปรผันอายุของหัวเชื้อสปอร์งอกต่าง ๆ กัน ใช้หัวเชื้อความหนาแน่น $1\text{-}2\times10^{8}$ สปอร์งอก เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส)

—— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

------ หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

—•— หมายถึง หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมง

—×— หมายถึง หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 36 ชั่วโมง

—✳— หมายถึง หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 48 ชั่วโมง

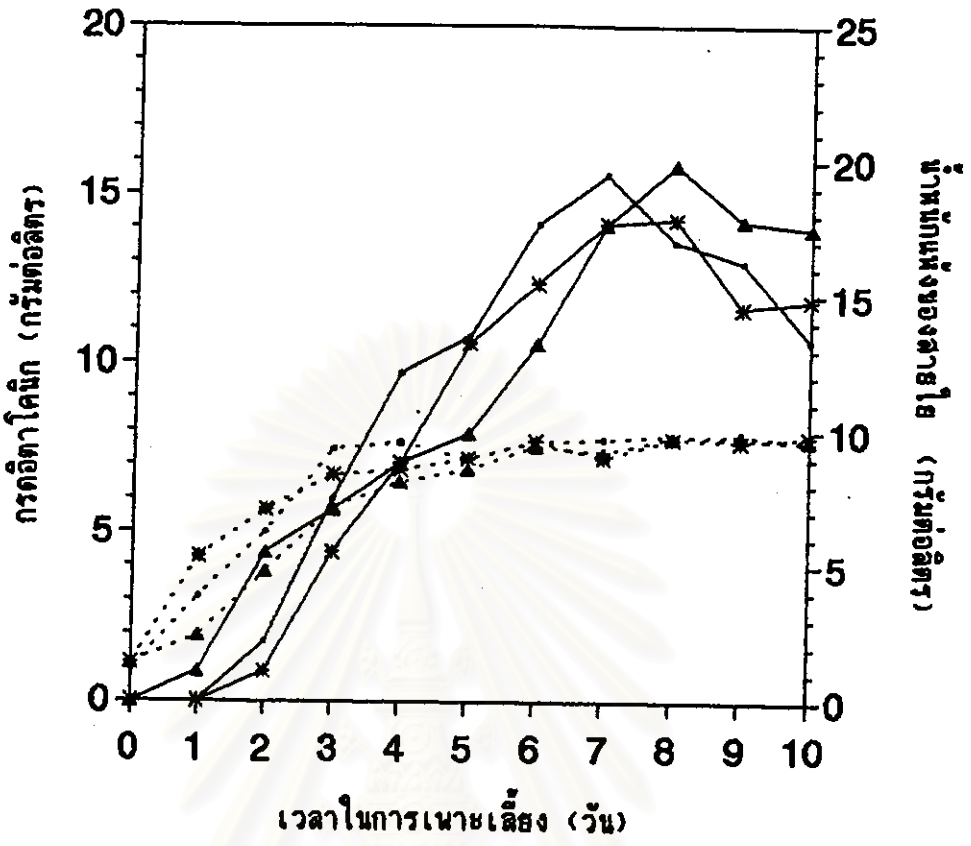
—▲— หมายถึง หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 60 ชั่วโมง

ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) อัตราการให้อากาศ 0.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก (ภาคผนวก ก 4) โดยแปรผันชนิดของแหล่งน้ำตาลซูโครสเป็น น้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายแดง พบว่าน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 15.58 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง น้ำตาลทรายขาวให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 15.88 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนน้ำตาลทรายแดงให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 14.26 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง การเติบโตของสายใยจะใกล้เคียงกันในทุกแหล่งน้ำตาลซูโครส ดังแสดงในรูปที่ 34 เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าน้ำตาลทั้งหมดในช่วงของวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงลดลงรวดเร็วกว่าการใช้น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลทรายแดง เป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 35 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกจากการใช้แหล่งน้ำตาลซูโครสทั้ง 3 ชนิด จะเห็นได้ว่าแหล่งน้ำตาลซูโครสทั้งสามแหล่งให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกไล่เลี่ยกัน ดังนั้นจึงสามารถใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งน้ำตาลซูโครสแทนน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ได้โดยปริมาณกรดอิตาโคนิกไม่ลดลง ส่วนน้ำตาลทรายแดงสามารถใช้เป็นแหล่งน้ำตาลซูโครสได้เช่นกัน แต่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกลดลงเล็กน้อย เมื่อพิจารณาถึงราคาของน้ำตาลทรายขาวซึ่งถูกกว่าน้ำตาลซูโครสมาก จึงเลือกใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดอิตาโคนิกต่อไป

4.2 ผลการผลิตกรดอิตาโคนิกโดยใช้ขนาดหัวเชื้อแตกต่างกัน

4.2.1 ผลการผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับขยายส่วน (ภาคผนวก ก 5) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร มีน้ำตาลทรายขาวความเข้มข้น 66 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน อัตราการให้อากาศเท่ากับ 5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที โดยแปรผันขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 1 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) พบว่าเมื่อใช้ขนาดของ



รูปที่ 34 ปริมาณกรดอิตาโคนิกและน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* I 10 ในระดับขยายส่วนในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยแปรผันชนิดของแหล่งน้ำตาลซูโครสต่าง ๆ กัน

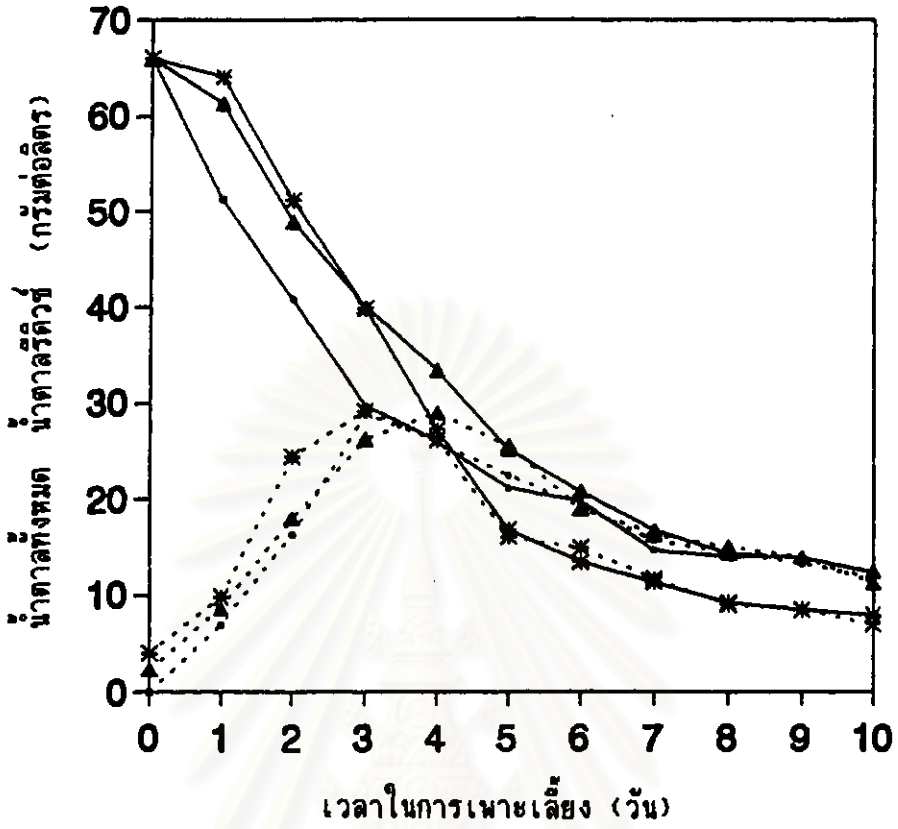
——— หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

..... หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

—•— หมายถึง น้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์

—▲— หมายถึง น้ำตาลทรายขาว

—✱— หมายถึง น้ำตาลทรายแดง



รูปที่ 35 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* I 10 ในระดับขยายส่วนในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยแปรผันชนิดของแหล่งน้ำตาลชูโครสต่าง ๆ กัน

——— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

------- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

—•— หมายถึง น้ำตาลชูโครสบริสุทธิ์

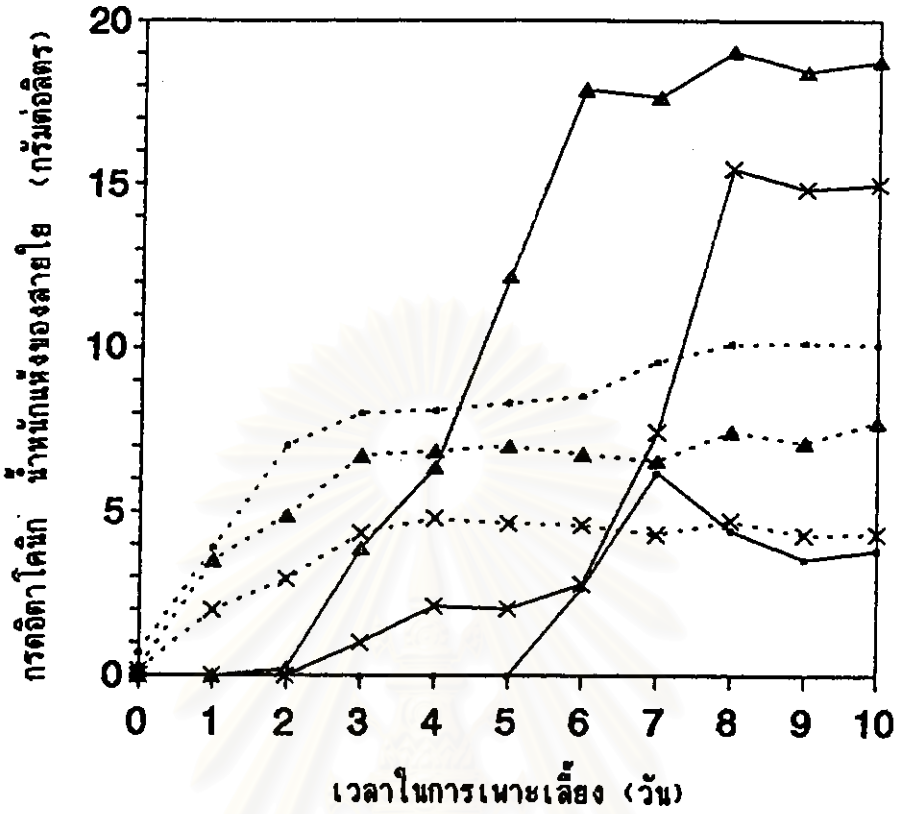
—▲— หมายถึง น้ำตาลทรายขาว

—✱— หมายถึง น้ำตาลทรายแดง

หัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 19.06 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 15.44 ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่ำมาก คือให้ 6.18 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง แต่จะมีการเติบโตสูงมาก โดยมีน้ำหนักแห้งของสายใยสูงถึง 10.08 กรัมต่อลิตร ในวันสิ้นสุดการทดลอง ส่วนขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ให้น้ำหนักแห้งของเส้นใยสูงสุดเท่ากับ 4.78 กรัมต่อลิตร และ 7.73 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 และ 10 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 36 เมื่อใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ จะมีการใช้น้ำตาลในรูปน้ำตาลทั้งหมดอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง จนมีน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.3 กรัมต่อลิตร ในวันสิ้นสุดการทดลอง เมื่อใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ มีการใช้น้ำตาลทั้งหมดไม่มากนักในวันเริ่มต้นจนถึงวันที่ 4 ของการทดลอง แต่มีการใช้น้ำตาลทั้งหมดมากขึ้นในวันที่ 4 และ 5 ของการเพาะเลี้ยง และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่ในปริมาณมากเท่ากับ 34.15 กรัมต่อลิตร ในวันสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ มีการใช้น้ำตาลมากกว่าการใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ แต่น้อยกว่าการใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่ 10.52 กรัมต่อลิตร ในวันสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 37 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกที่ผลิตได้โดยใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 1 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุด จึงเป็นขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสม ในการผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

4.2.2 <u>การผลิตกรดอิตาโคนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร</u>

เมื่อเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรสำหรับการผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับขยายส่วน (ภาคผนวก ก 5) ใช้ภาวะในการเลี้ยงเชื้อดังนี้ อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที อัตราการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาที และใช้อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรผันขนาดของหัวเชื้อ



รูปที่ 36 ปริมาณกรดอิตาโคนิกและน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* I 10 ในระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยแปรผันขนาดของหัวเชื้อต่าง ๆ กัน

——— หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

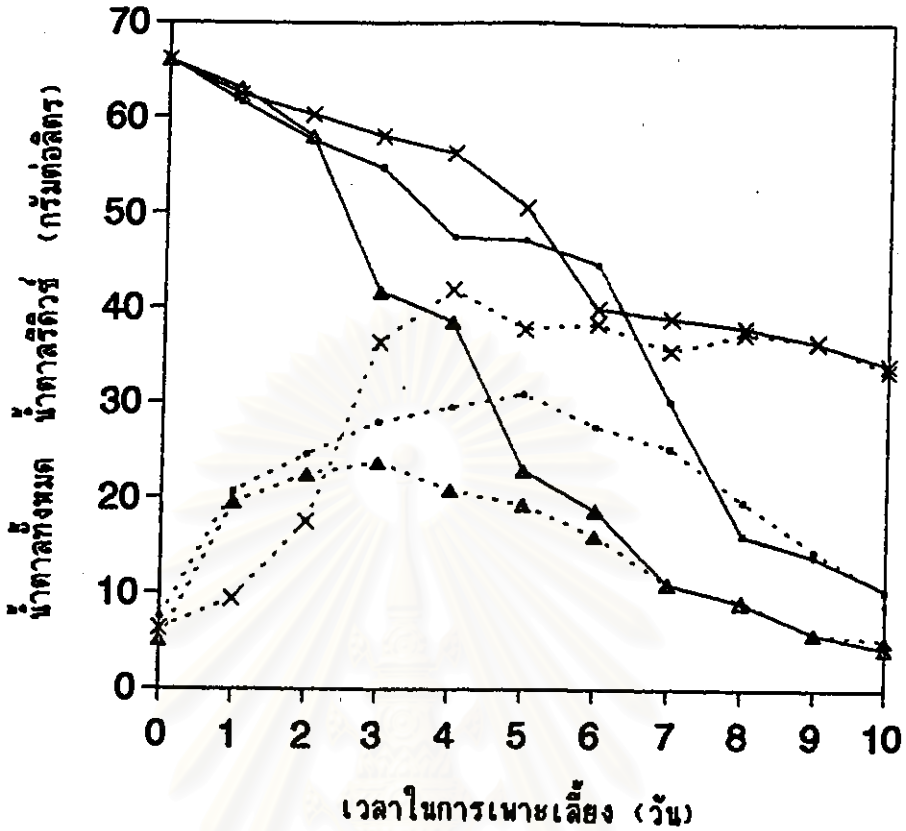
-------- หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

-×- หมายถึง ขนาดหัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์

-▲- หมายถึง ขนาดหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์

— หมายถึง ขนาดหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 37 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* I 10 ในระดับขยายส่วน ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยแปรผันขนาดของหัวเชื้อต่าง ๆ กัน

——— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

------- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

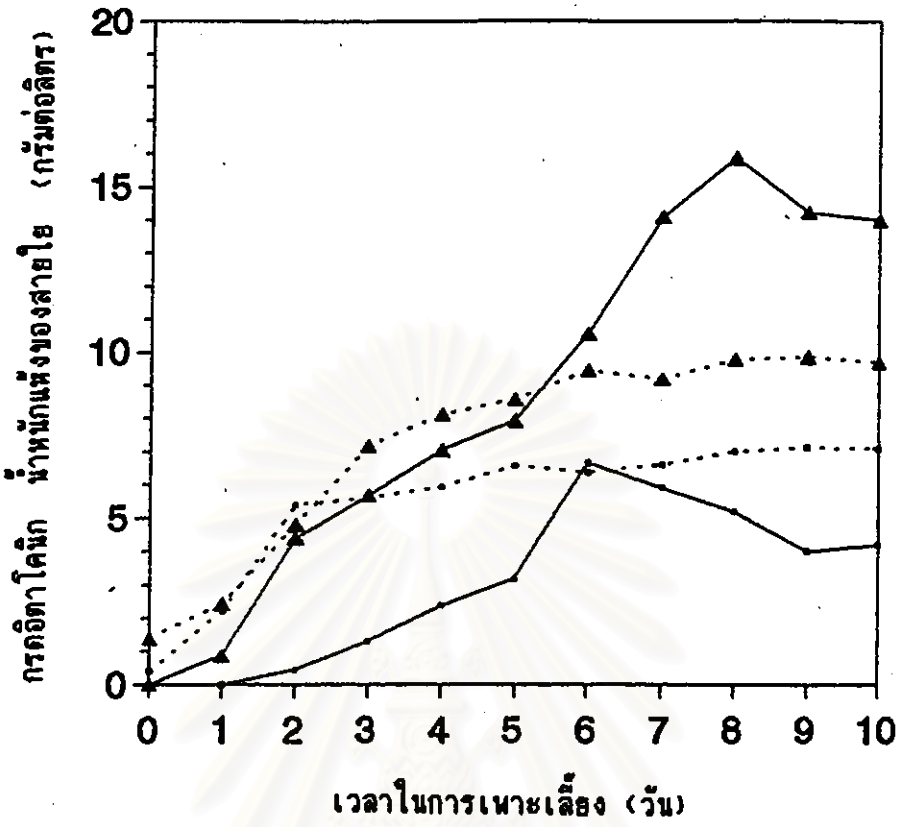
-✳- หมายถึง ขนาดหัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์

-▲- หมายถึง ขนาดหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์

-●- หมายถึง ขนาดหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เท่ากับ 2 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) พบว่าเมื่อใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 15.88 กรัมต่อลิตร และให้น้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 9.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ จะได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่ำกว่าการใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์มาก โดยให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเพียง 6.68 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และให้น้ำหนักแห้งของสายใยสูงสุดเท่ากับ 7.16 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 38 สำหรับการใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเลยตั้งแต่เริ่มทำการทดลองจนถึงวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง จึงหยุดทดลองในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) การใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์จะมีการใช้น้ำตาลสูงกว่าขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยจะมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง โดยมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 12.45 และ 11.31 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ จะมีการใช้น้ำตาลไม่มากนักในช่วงวันแรกของการทดลอง และจะมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็ว ในวันที่ 2 และ 3 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นปริมาณน้ำตาลลดลงเรื่อย ๆ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีปริมาณน้ำตาลเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงมาก โดยมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์อยู่เท่ากันคือ 22.32 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 39 เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดอิตาโคนิก โดยใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์และ 2 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมที่จะใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร มากกว่าขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 38 ปริมาณกรดอิตาโคนิกและน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* I 10 ในระดับขยายส่วนในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ขนาดหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)

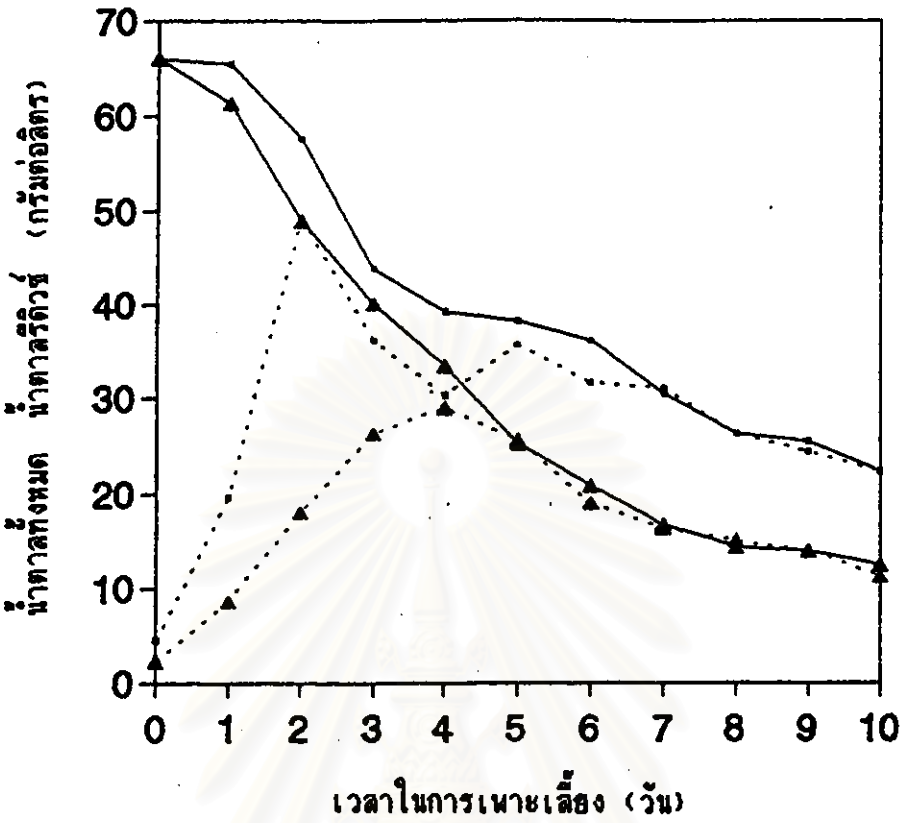
——— หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

------ หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

—•— หมายถึง ขนาดหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์

—▲— หมายถึง ขนาดหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 39 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* 1 10 ในระดับขยายส่วนในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ขนาดหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)

——— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

------- หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

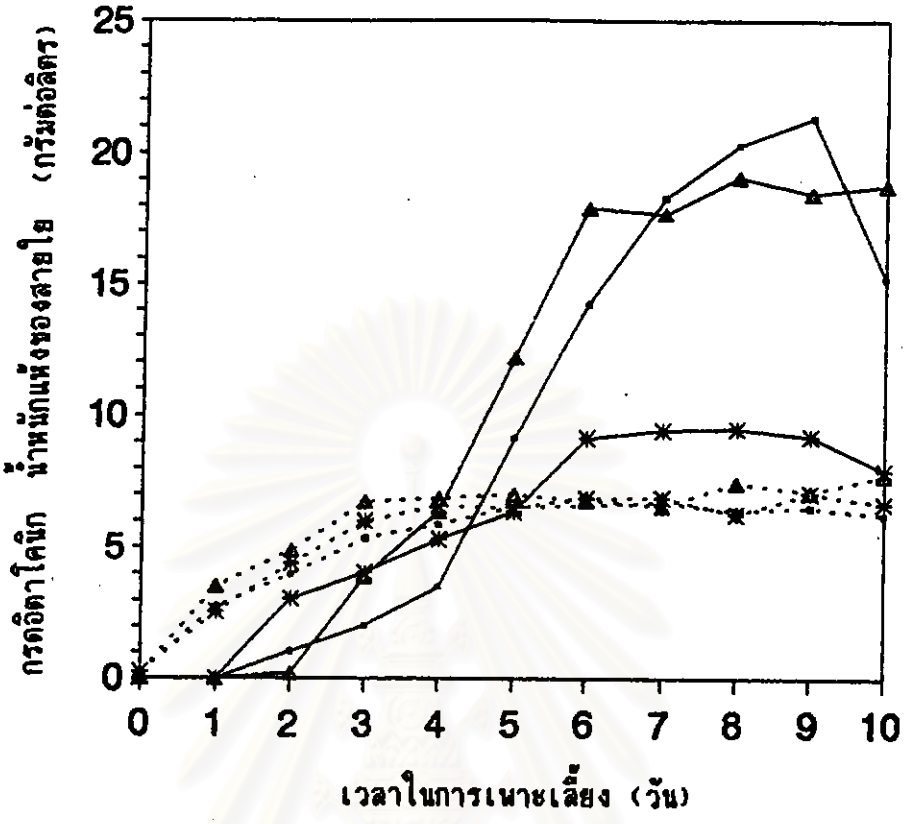
—•— หมายถึง ขนาดหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์

—▲— หมายถึง ขนาดหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.8 <u>การผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยใช้อัตราการให้อากาศแตกต่างกัน</u>

เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 400 มิลลิลิตร ใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) โดยแปรผันอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.5 5 และ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที พบว่า การให้อากาศด้วยอัตรา 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ตั้งแต่วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 21.31 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับการให้อากาศด้วยอัตรา 5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงแล้วค่อนข้างคงที่ตั้งแต่วันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 19.06 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการผลิต ส่วนการผลิตโดยใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่ำมาก โดยให้ปริมาณสูงสุดเพียง 9.50 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง การเติบโตของสายใยเมื่อใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที มีการเติบโตของสายใยน้อยกว่าการให้อากาศเท่ากับ 5 และ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที เล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 40 การใช้น้ำตาลใน 1 วันแรกของการผลิตจะใกล้เคียงกันในทุกอัตราการให้อากาศ หลังจากนั้นการใช้น้ำตาลจะเร็วขึ้นเล็กน้อยเมื่อให้อากาศด้วยอัตรา 2.5 และ 5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ปริมาณน้ำตาลจะลดลงอย่างรวดเร็ว และใช้น้ำตาลเกือบหมด ในวันสิ้นสุดการทดลอง คือมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียง 0.53 และ 0.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับอัตราการให้อากาศ 5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที จะมีน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.30 และ 4.20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในวันสิ้นสุดการทดลอง ส่วนอัตราการให้อากาศ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที จะมีน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ถึง 22.52 และ 21.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 41 เนื่องจากการผลิตกรดอิตาโคนิก



รูปที่ 40 ปริมาณกรดอิตาโคนิกและน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* I 10 ในระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยแปรผันอัตราการให้อากาศต่าง ๆ กัน

——— หมายถึง ปริมาณกรดอิตาโคนิก

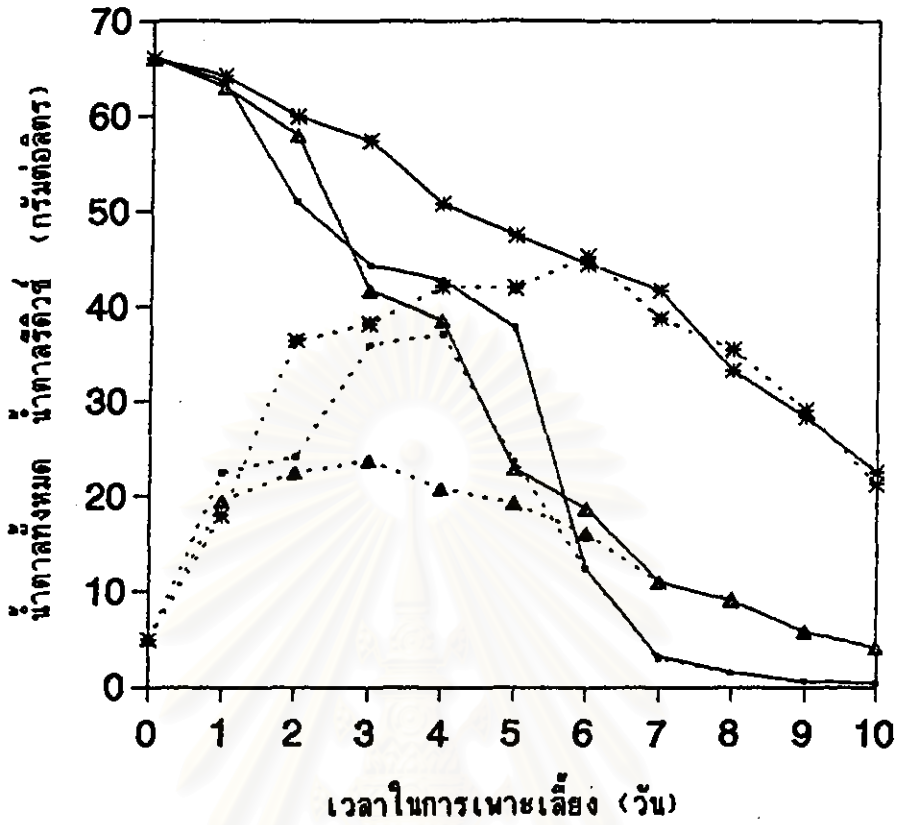
------ หมายถึง น้ำหนักแห้งของสายใย

—•— หมายถึง อัตราการให้อากาศ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

—▲— หมายถึง อัตราการให้อากาศ 5.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

—✳— หมายถึง อัตราการให้อากาศ 10.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 41 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* I 10 ในระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยแปรผันอัตราการให้อากาศต่าง ๆ กัน

—— หมายถึง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

------ หมายถึง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

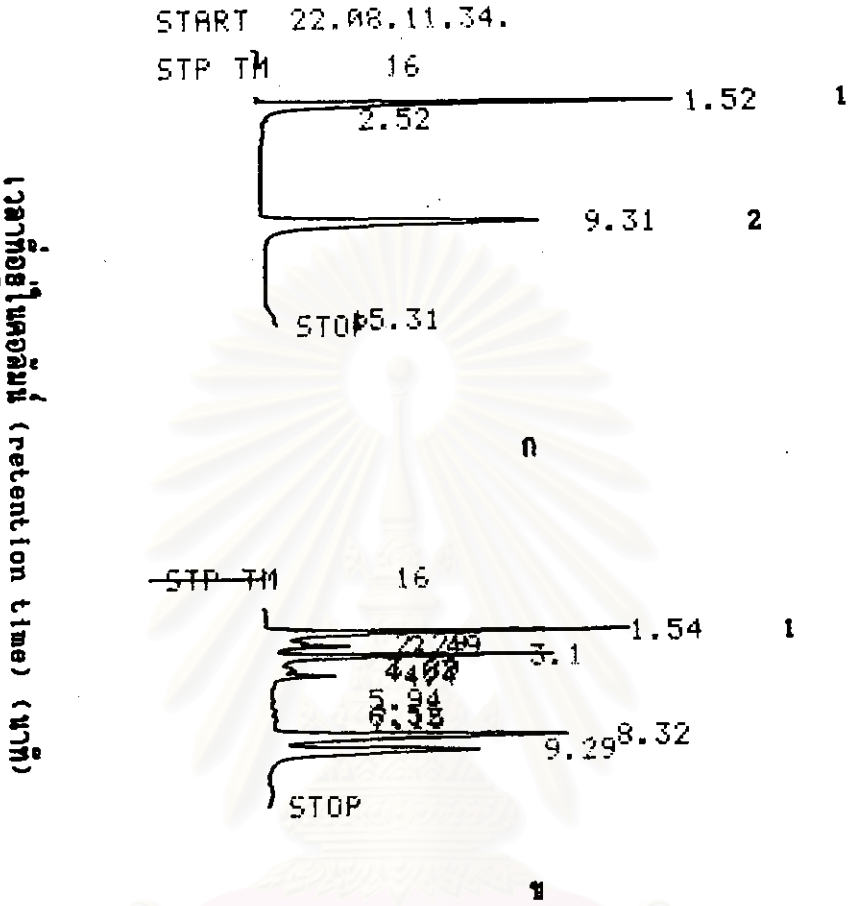
—•— หมายถึง อัตราการให้อากาศ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

—▲— หมายถึง อัตราการให้อากาศ 5.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

—✱— หมายถึง อัตราการให้อากาศ 10.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

โดยใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเพียง 9.50 กรัมต่อลิตร จึงนำตัวอย่างน้ำหมักมาวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้น ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในรูปที่ 42 พบว่าในตัวอย่างน้ำหมักมีกรดอินทรีย์ที่มีช่วงเวลาอยู่ในคอลัมน์เช่นเดียวกับกรดอิตาโคนิกมาตรฐาน และมีกรดอินทรีย์ชนิดอื่นปนเปื้อนในน้ำหมัก ซึ่งมิได้วิเคราะห์ว่าเป็นกรดอินทรีย์ชนิดใด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 42 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb-C18

ก กรดกลูโคนิกมาตรฐาน ผสมกับ กรดอิตาโคนิกมาตรฐาน

ข กรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดย *A. terreus* I 10 ผสมกับกรดกลูโคนิกมาตรฐาน

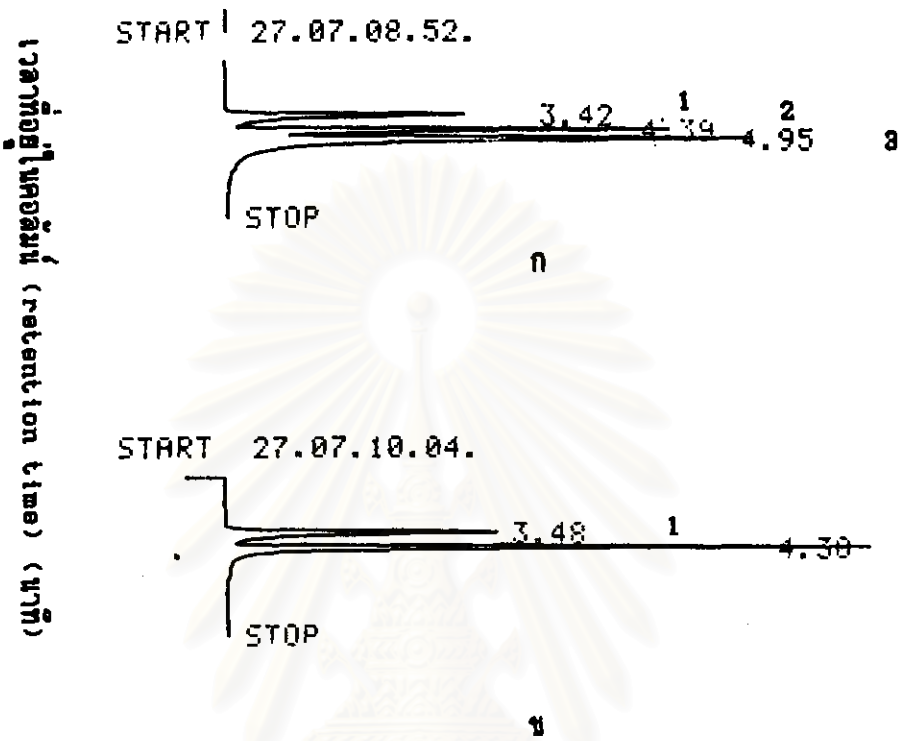
1 หมายถึง กรดกลูโคนิกมาตรฐาน (internal standard)

2 หมายถึง กรดอิตาโคนิกมาตรฐาน

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที เป็นอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการให้อากาศเท่ากับ 5 และ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที และเมื่อสังเกตการไหลของของเหลว ขณะที่มีการผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างด้วยอัตรา 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที พบว่าการไหลของของเหลวในคอลัมน์เป็นไปอย่างช้า ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 5 และ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที จึงไม่ทำการทดลองแปรผันอัตราการให้อากาศต่ำกว่า 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

4.4 ผลวิเคราะห์กรดอิตาโคนิกที่สร้างขึ้นโดย *A. terreus* I 10 ด้วยวิธี HPLC

เมื่อทำการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่ผลิตในขวดเขย่าโดย *A. terreus* I 10 เพื่อยืนยันว่าเป็นกรดอิตาโคนิก โดยใช้ตัวอย่างน้ำหมักที่ได้การเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 เป็นเวลา 6 วัน จากการทดลองในข้อ 13.5 (การทดลองผลิตกรดอิตาโคนิก โดยใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 36 ชั่วโมง) ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 43 พบว่ากรดอินทรีย์ที่สร้างโดย *A. terreus* I 10 มีช่วงเวลาที่อยู่ใน คอลัมน์ Zorbox-C8 เช่นเดียวกับกรดอิตาโคนิกมาตรฐาน เมื่อทดลองวิเคราะห์ชนิดของกรดดังกล่าวซ้ำ เพื่อยืนยันผลโดยใช้ คอลัมน์ Spherisorb-C18 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 44 พบว่ากรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดย *A. terreus* I 10 มีช่วงเวลาอยู่ในคอลัมน์เช่นเดียวกับกรดอิตาโคนิกมาตรฐาน จึงยืนยันได้ว่ากรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้คือ กรดอิตาโคนิก



รูปที่ 43 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 ในระดับขวดเขย่า เป็นเวลา 6 วัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ Zorbox-C8

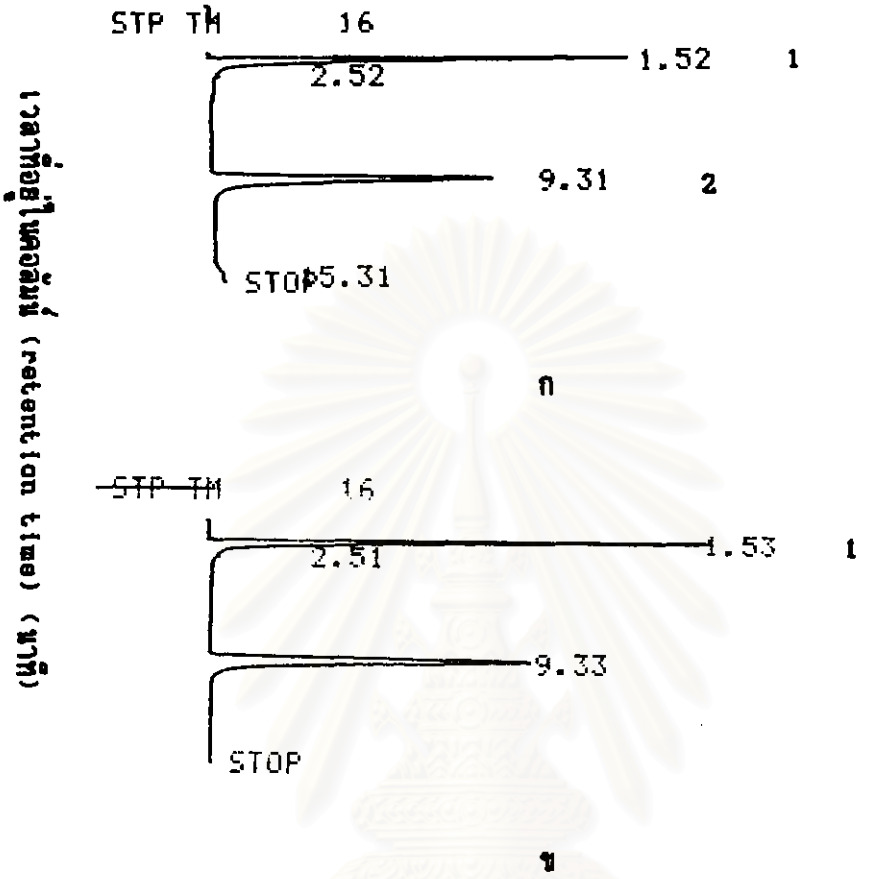
ก กรดกลูโคนิกมาตรฐาน ผสมกับ กรดอิตาโคนิกมาตรฐาน และ กรดโคจิกมาตรฐาน

ข กรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดย *A. terreus* I 10 ผสมกับกรดกลูโคนิกมาตรฐาน

1 หมายถึง กรดกลูโคนิกมาตรฐาน (internal standard)

2 หมายถึง กรดอิตาโคนิกมาตรฐาน

3 หมายถึง กรดโคจิกมาตรฐาน



รูปที่ 44 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 ในระดับขวดเขย่า เป็นเวลา 6 วัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb-C18

ก กรดกลูโคนิกมาตรฐาน ผสมกับ กรดอิตาโคนิกมาตรฐาน

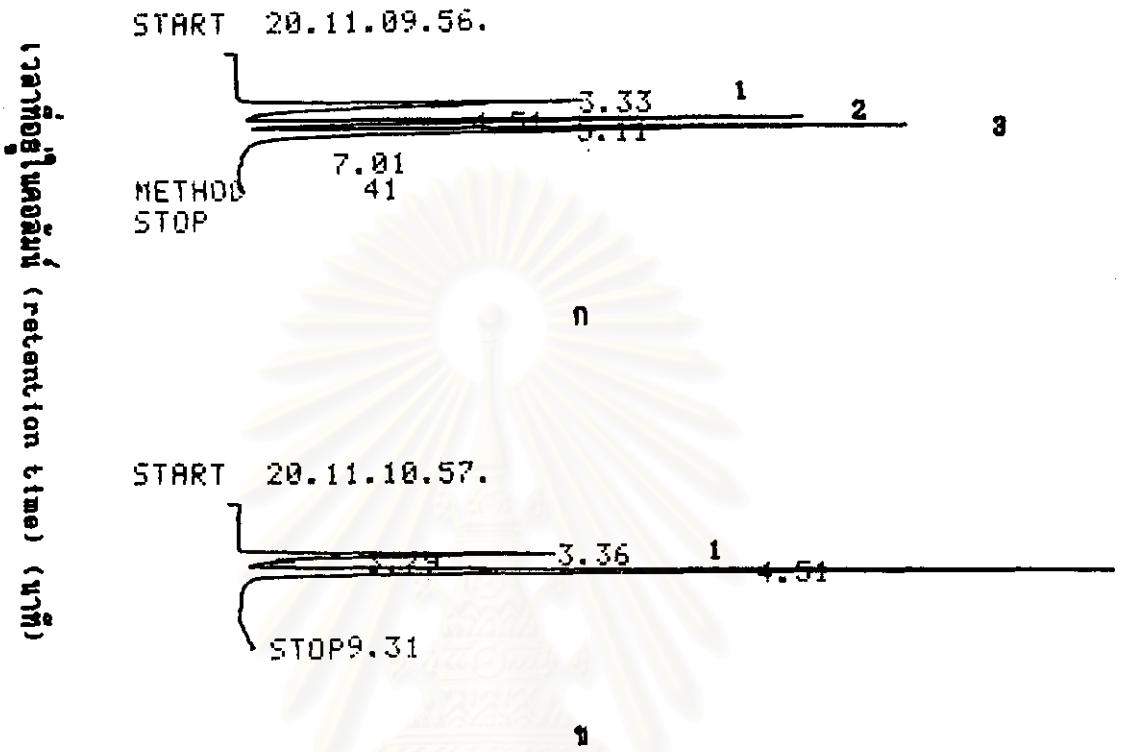
ข กรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดย *A. terreus* I 10 ผสมกับกรดกลูโคนิกมาตรฐาน

1 หมายถึง กรดกลูโคนิกมาตรฐาน (internal standard)

2 หมายถึง กรดอิตาโคนิกมาตรฐาน

เมื่อทำการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่ผลิตในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดย *A. terreus* I 10 เพื่อยืนยันอีกครั้งว่าเป็นกรดอิตาโคนิก โดยใช้ตัวอย่างน้ำหมักจากการทดลองในข้อ 14.2.1 (การทดลองผลิตกรดอิตาโคนิก โดยใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ อัตราการให้อากาศเท่ากับ 5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน) ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 45 พบว่า กรดอินทรีย์ที่ผลิตโดย *A. terreus* I 10 มีช่วงเวลาอยู่ใน Zorbox-C8 คอลัมน์ เช่นเดียวกับกรดอิตาโคนิกมาตรฐาน เมื่อทดลองวิเคราะห์ชนิดของกรดดังกล่าวซ้ำเพื่อยืนยันผล โดยใช้ Spheriserb-C18 คอลัมน์ ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 46 พบว่ากรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดย *A. terreus* I 10 มีช่วงเวลาอยู่ในคอลัมน์เช่นเดียวกับกรดอิตาโคนิกมาตรฐาน จึงยืนยันได้ว่ากรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ คือกรดอิตาโคนิก เช่นเดียวกับการทดลองในระดับขวดเขย่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 45 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ Zorbax-C8

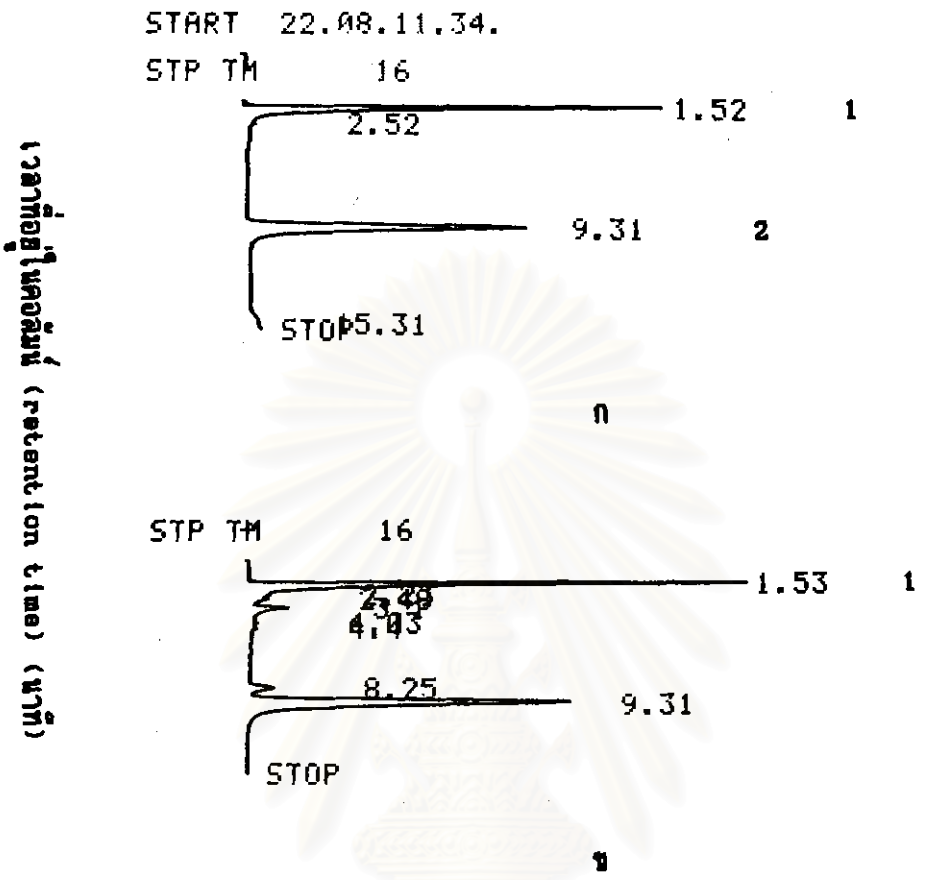
ก กรดกลูโคนิกมาตรฐาน ผสมกับ กรดอิตาโคนิกมาตรฐาน และ กรดโคจิกมาตรฐาน

ข กรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดย *A. terreus* I 10 ผสมกับกรดกลูโคนิกมาตรฐาน

1 หมายถึง กรดกลูโคนิกมาตรฐาน (internal standrad)

2 หมายถึง กรดอิตาโคนิกมาตรฐาน

3 หมายถึง กรดโคจิกมาตรฐาน



รูปที่ 46 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb-C18

ก กรดกลูโคนิกมาตรฐาน ผสมกับ กรดอิตาโคนิกมาตรฐาน

ข กรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดย *A. terreus* I 10 ผสมกับกรดกลูโคนิกมาตรฐาน

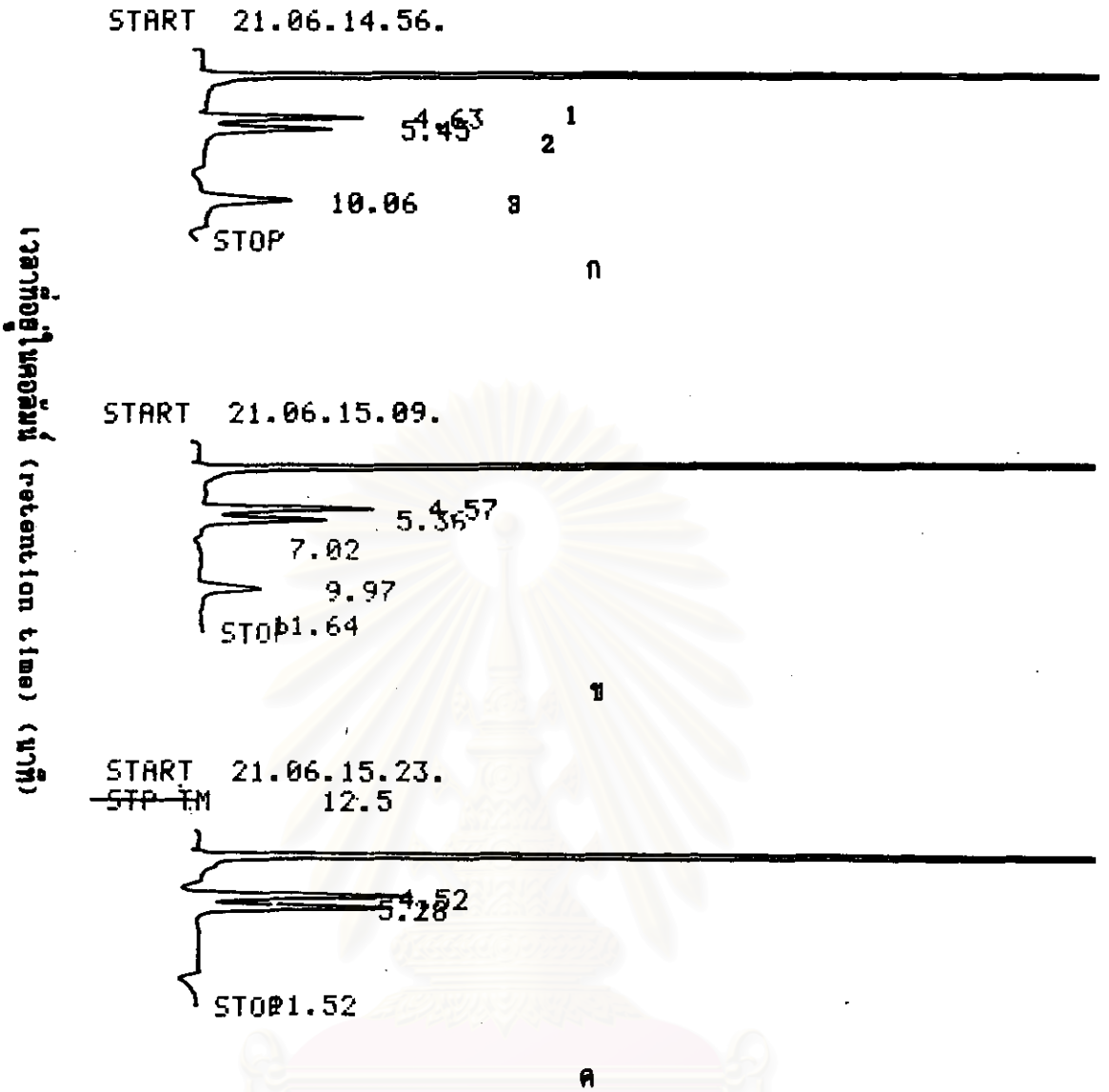
1 หมายถึง กรดกลูโคนิกมาตรฐาน (internal standrad)

2 หมายถึง กรดอิตาโคนิกมาตรฐาน

4.5 ผลการวิเคราะห์น้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่อง HPLC

เมื่อนำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 เป็นเวลา 1 วัน จากการทดลองที่ 2.1 (การทดลองผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับขวดเขย่า โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ผลการทดลองพบว่า ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 5.0 ตรวจไม่พบน้ำตาลซูโครสในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับที่ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 4.5 4.0 3.5 3.0 และ 2.5 ตรวจไม่พบน้ำตาลซูโครสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงตัวอย่าง โครมาโตแกรมของน้ำตาล เมื่อใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 5.0 ผลการทดลอง พบน้ำตาลที่มีช่วงเวลาอยู่ใน คอลัมน์ Spherisorb 10-NH2 (Phenomenex) เช่นเดียวกับน้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส มาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 47 ก และ ข แสดงว่าน้ำตาลซูโครสตั้งต้น ถูกทำให้แตกตัวเป็นน้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลกลูโคส แต่ยังคงมีน้ำตาลซูโครสเหลืออยู่ในน้ำหมัก เมื่อนำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน มาวิเคราะห์ พบว่าไม่มีน้ำตาลซูโครสเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในรูปที่ 47 ค แสดงว่าน้ำตาลซูโครสทั้งหมดถูกทำให้แตกตัวเป็นน้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลกลูโคส ในช่วงวันที่ 1 ถึงวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 47 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ จากการทดลองผลิตกรดอิตาโคนิก โดย *A. terreus* I 10 เมื่อใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb 10-NH2 (Phenomenex)

ก น้ำตาลฟรุกโตสมาตรฐาน ผสมกับ น้ำตาลกลูโครสมาตรฐาน และน้ำตาลซูโครสมาตรฐาน

ข น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน

ค น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน

1 หมายถึง น้ำตาลฟรุกโตสมาตรฐาน

2 หมายถึง น้ำตาลกลูโคสมาตราฐาน

3 หมายถึง น้ำตาลซูโครสมาตรฐาน