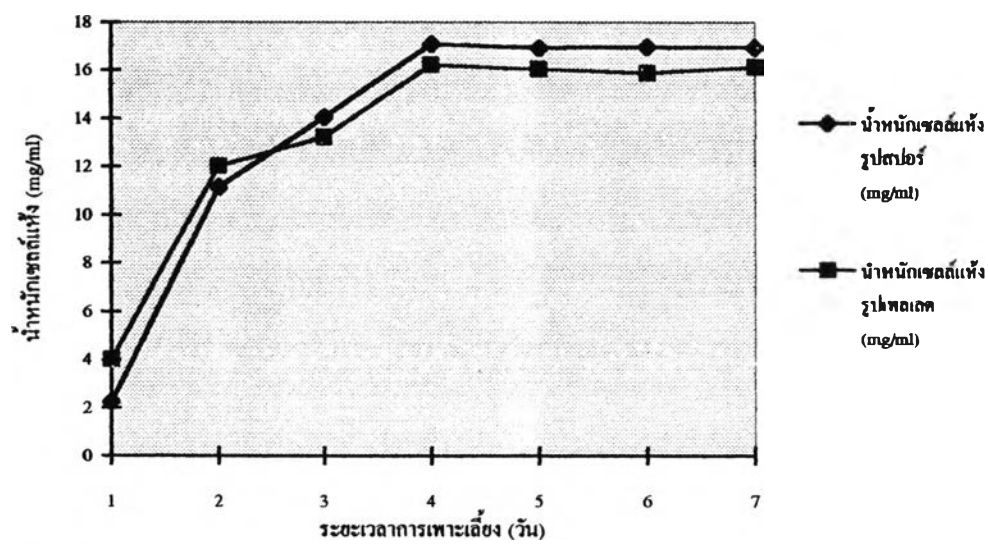
บทที่ 3

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

1. การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้นของ *Aspergillus niger*

จากการทดลองโดยเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น 2 รูปแบบด้วยกัน คือ ในรูปของสปอร์และในรูปของกลุ่มสายใย (เพลเลต) โดยเลี้ยงสปอร์ในอาหารเหลวสูตรควบคุม ซึ่งมีสูตรอาหาร คือ แป้งมันสำปะหลัง 2.3 % แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5% สารสกัดจากยีสต์ 0.4% โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5% และ แมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต 0.02% pH 5.6 และถ้าเป็นรูปของกลุ่มสายใยจะเลี้ยงในอาหาร PDB เป็นระยะเวลา 1-2 วันก่อนนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรควบคุม โดยใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นของกล้าเชื้อเท่ากัน $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบน้ำหนักของเซลล์แห้งที่เกิดขึ้น ในระยะเวลา 7 วัน ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นในรูปสปอร์และในรูปของเพลเลต

จากรูปที่ 7 พบว่า เมื่อใช้กล้าเชื้อในรูปของสปอร์ เมื่อเริ่มเพาะเลี้ยงจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจากวันที่ 1 ถึง วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง มีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 2.228 , 11.146 ,14.037 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จนมีค่ามากที่สุดในวันที่ 4 โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 17.088 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่ในวันที่ 5 , 6 และ 7 โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 16.937 , 16.964 และ 16.950 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นในรูปของกลุ่มสายใย (เพลเลต) นั้น พบว่า วันแรกของการเลี้ยง ให้น้ำหนักแห้งของเซลล์มากกว่าในรูปของสปอร์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในรูปกลุ่มสายใย (เพลเลต) ได้มีการเลี้ยงเพื่อให้ได้เป็นเส้นใยก่อน จึงมีผลทำให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่ามากกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งในรูปของสปอร์ โดยที่วันแรกของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักแห้งของเซลล์มีค่า 4.011 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้น น้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 และวันที่ 3 เป็น 12.003 และ 13.216 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งในระยะเริ่มต้นของการเพาะเลี้ยงในช่วง 1 ถึง 3 วันนั้น ค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ของทั้งกล้าเชื้อเริ่มต้นทั้งในรูปสปอร์และในรูปกลุ่มสายใยมีค่าใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง จะเห็นว่า ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของกล้าเชื้อในรูปกลุ่มสายใยมีค่าน้อยกว่ากล้าเชื้อในรูปของสปอร์ คือให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 16.214 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจะเริ่มคงที่ในวันที่ 5 , 6 และ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 16.014 ,15.876 และ 16.124 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้กล้าเชื้อเริ่มต้นในรูปสปอร์ในการทดลองต่อ ๆ ไป เพราะเป็นการประหยัดเวลา อีกทั้งมีความสะดวกกว่าที่จะต้องมีการเพาะเลี้ยงถึงสองครั้งเหมือนในการเพาะเลี้ยงด้วยกล้าเชื้อเริ่มต้นที่อยู่ในรูปของกลุ่มสายใย

2. การเตรียมแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

แปรผันปริมาณแป้งมันสำปะหลังแตกต่างกัน คือ 2 , 4 , 6 , 8 , 10 และ 12 % ตามลำดับ โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 150 หน่วย ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ 250 มิลลิลิตร เพื่อหาเปอร์เซนต์แป้งสูงสุดที่สามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์ภายในเวลา 30 นาที และตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แสดงผลได้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณเปอร์เซนต์แป้งที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 150 หน่วยภายใน 30 นาที

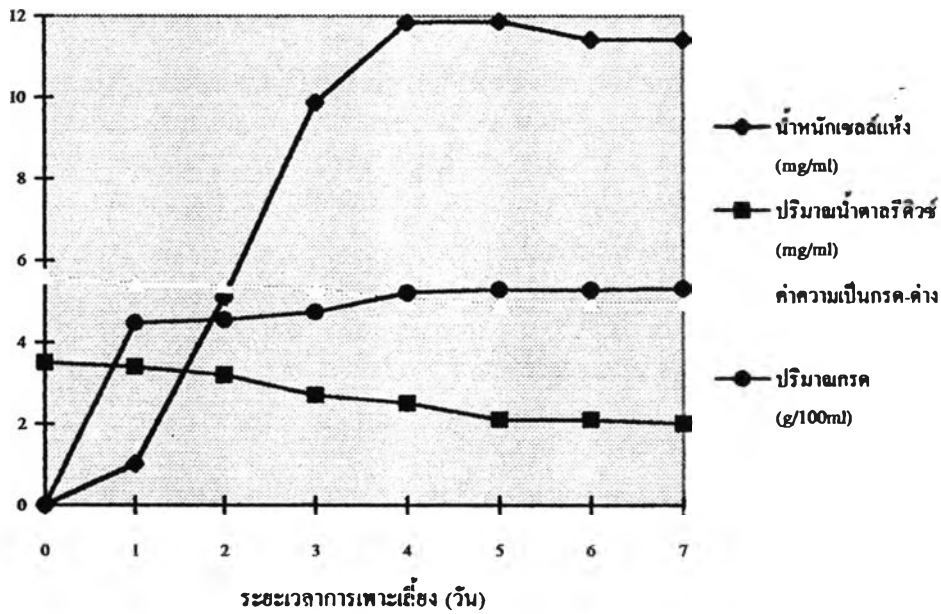
เปอร์เซนต์แป้ง	ความข้นเหนียว ในระยะเวลา 30 นาที	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)
2	ไม่ข้นเหนียว	3.5
4	ไม่ข้นเหนียว	5.5
6	ไม่ข้นเหนียว	6.7
8	ไม่ข้นเหนียว	9.7
10	ข้นเหนียว	-
12	ข้นเหนียว	-

จากตารางที่ 4 พบว่า ปริมาณแป้งที่ใช้ 2 , 4 , 6 และ 8 % สามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์แล้วไม่เกิดความข้นเหนียวจากการสังเกตภายในเวลา 30 นาที ส่วนปริมาณแป้งที่ 10 และ 12 % แป้งมีความข้นเหนียว ถึงแม้จะใช้ปริมาณของเอนไซม์ในการย่อยเท่ากันกับเปอร์เซนต์อื่นๆ และค่าของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์นั้น พบว่า ที่ปริมาณแป้ง 8 % จะให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด เป็น 9.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าลดลงเมื่อปริมาณแป้งลดลงจาก 6 , 4 และ 2 % มีค่าเท่ากับ 6.7 , 5.5 และ 3.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณแป้งที่ 10 และ 12 % ไม่สามารถนำมาหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ เนื่องจากแป้งข้นเหนียวจึงไม่สามารถนำมาทดลองหาค่าปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ได้ ดังนั้นปริมาณเปอร์เซนต์แป้งที่จะใช้ในการทดลองต่อไป คือ ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ 2 , 4 , 6 และ 8 % ตามลำดับ

3. การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเพื่อให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูง

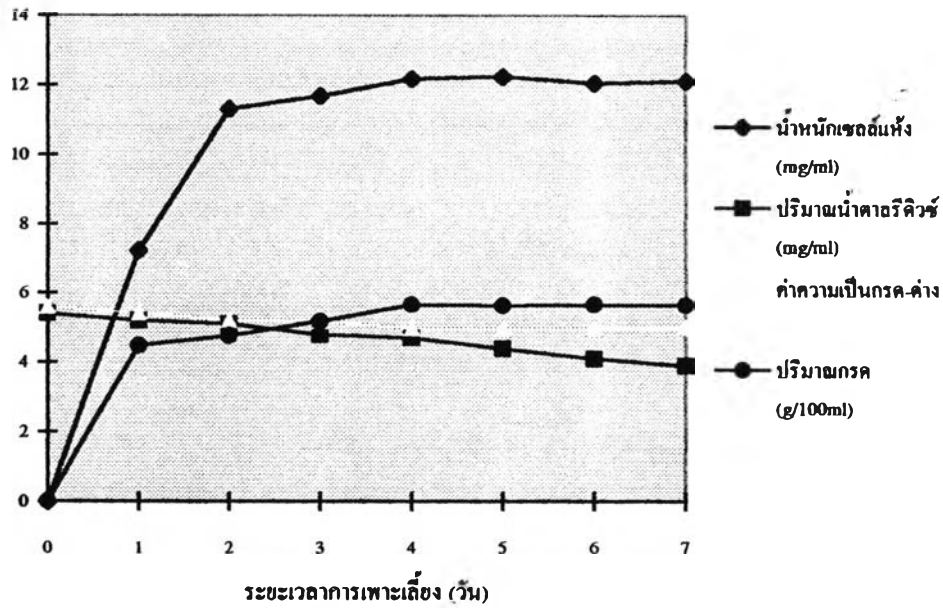
3.1 การคัดเลือกหาปริมาณของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูง

จากข้อมูลข้อ 2 ได้ทำการเตรียมแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เพื่อหาปริมาณเปอร์เซนต์แป้งสูงสุดที่ย่อยได้โดยใช้เอนไซม์ ภายในเวลา 30 นาที พบว่า เปอร์เซนต์แป้งที่สามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์ แล้วเปลี่ยนสภาพเป็นน้ำแทนการเหนียวข้น คือ 2 , 4 , 6 และ 8 % จากนั้นนำเอาเปอร์เซนต์แป้งทั้งหมดมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรควบคุมที่ประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5% โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 % สารสกัดจากยีสต์ 0.4 % และ แมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต 0.02 % pH 5.6 ใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 7 วัน เก็บผลการทดลองทุกวัน เพื่อวิเคราะห์หาว่าที่เปอร์เซนต์แป้งใดที่เหมาะสมที่สุดที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด รวมทั้งหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งผลของการแปรผันเปอร์เซนต์แป้งที่เปอร์เซนต์ต่างๆ แสดงได้ดังนี้



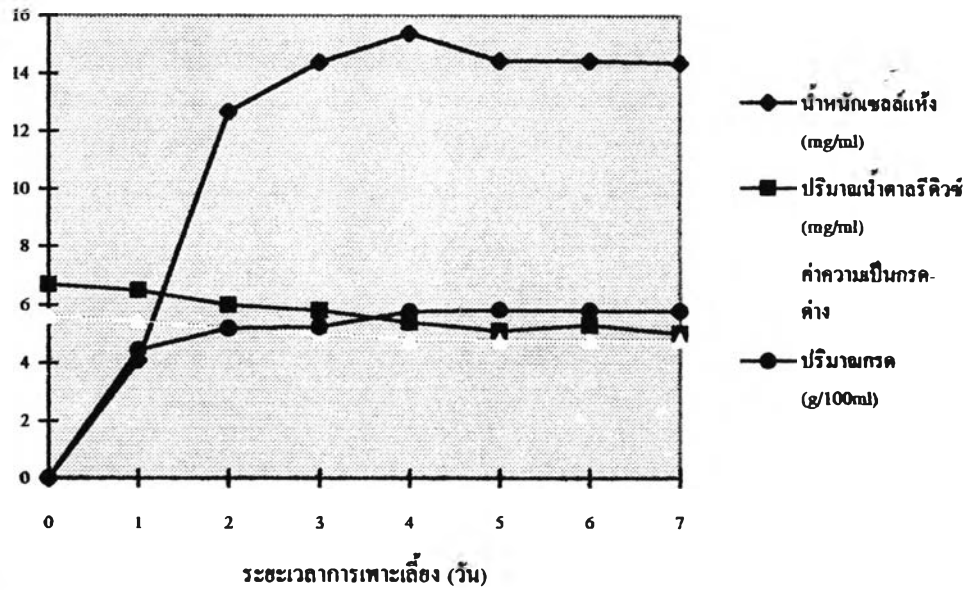
รูปที่ 8 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดที่เกิดขึ้น และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อใช้ปริมาณแป้ง 2 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอน

จากรูปที่ 8 เมื่อนำแป้งปริมาณ 2 % มาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ในช่วง 1 ถึง 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยง จะให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 1.010 , 5.107 และ 9.862 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 11.851 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 และให้ค่าใกล้เคียงกันในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ คือ 11.834 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 และ 7 วัน จะให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งลดลงเป็น 11.408 และ 11.411 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น อยู่ในช่วง 3.4-2.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณกรดที่เกิดขึ้น พบว่า วันที่ 7 ให้ค่าปริมาณกรดมากที่สุด เป็น 5.63 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และมีค่าลดลงเป็น 5.42 ,5.36 ,5.12 ,4.74 ,4.56 และ 4.48 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จากวันที่ 6 ถึง วันแรกของการเลี้ยงเซลล์ ตามลำดับ ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง จะอยู่ในช่วง 5.60-4.97



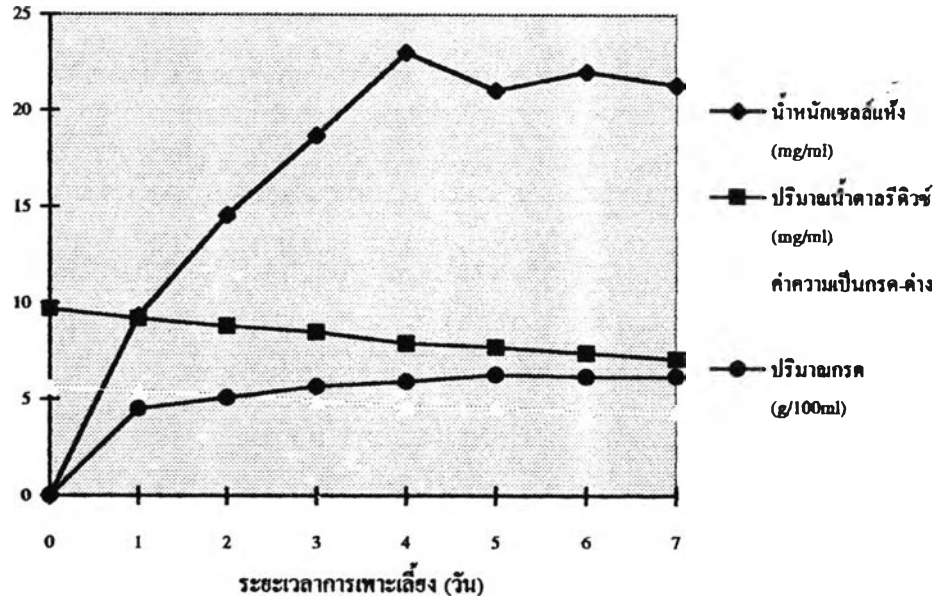
รูปที่ 9 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อใช้ปริมาณแป้ง 4 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอน

จากรูปที่ 9 ผลจากการใช้แป้ง 4 % มาผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 5.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า วันแรกของการเพาะเลี้ยงให้น้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 7.213 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 และ 3 ของการเลี้ยงเป็น 11.304 , 11.679 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เป็น 12.234 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ให้ผลของน้ำหนักเซลล์แห้งใกล้เคียงกัน คือ ในวันที่ 4 และ 7 มีค่าเป็น 12.170 และ 12.108 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีการลดลง ตั้งแต่วันแรกที่เริ่มการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 5.4-4.9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่าปริมาณกรดที่เกิดขึ้นมีค่าเป็น 4.48 , 4.76 ,5.19 ,5.67 ,5.63 5.66 และ 5.65 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จะมีค่าลดลงตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยงและจะลดลงไปจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 5.60-5.01



รูปที่ 10 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อใช้ปริมาณแป้ง 6 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอน

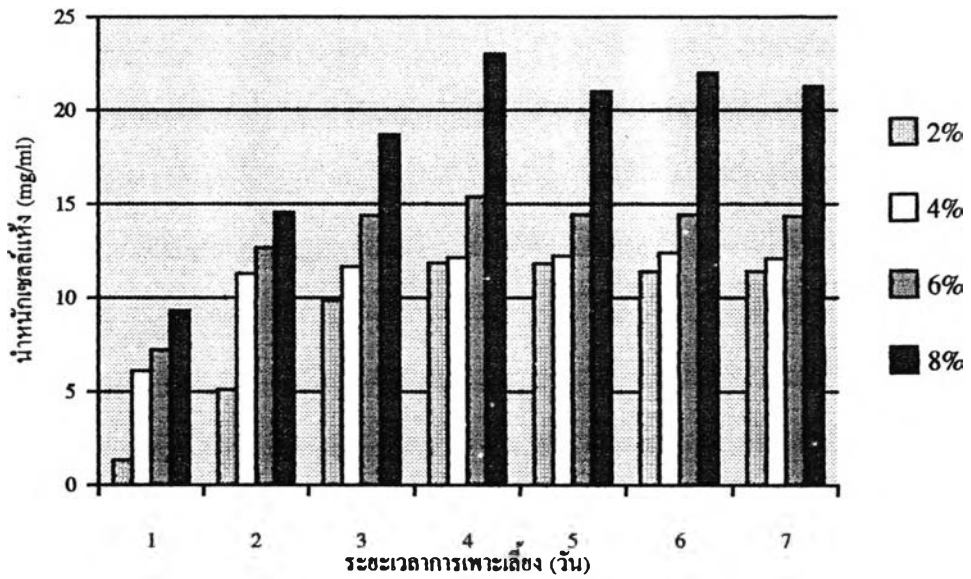
จากรูปที่ 10 เมื่อใช้ปริมาณแป้ง 6 % มาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลกลูโคส เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ 6.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า วันที่ 1 , 2 , 3 ของการเพาะเลี้ยง ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 4.101 , 12.679 และ 14.383 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด คือ 15.392 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ให้ผลของน้ำหนักเซลล์แห้งใกล้เคียงกัน คือ ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง มีค่าเท่ากับ 14.442 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีการลดลง เมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อในวันแรก ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 6.7-5.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ค่าปริมาณกรดที่เกิดขึ้นมีค่ามากขึ้นโดยมีค่าเป็น 4.44 , 5.2 , 5.25 , 5.77 , 5.82 , 5.80 และ 5.79 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในวันแรกไปจนถึงวันสุดท้ายของการเลี้ยงเซลล์ และค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีค่าลดลงตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน และลดลงไปจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 5.60-4.80



รูปที่ 11 กราฟแสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดที่เกิดขึ้น เมื่อใช้ปริมาณแป้ง 8 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอน

จากรูปที่ 11 พบว่า เมื่อใช้ปริมาณแป้ง 8 % ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ ให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 9.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งจะเริ่มเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 , 2 และ 3 ของการเพาะเลี้ยงเป็น 9.324 , 14.561 และ 18.682 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ มีค่าเท่ากับ 23.010 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ให้ผลของน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกัน คือ ในวันที่ 5 , 6 และ 7 ของการเพาะเลี้ยง เป็น 21.023 , 22.005 และ 21.310 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะมีค่าลดลงเมื่อเริ่มทำการเลี้ยงเชื้อ มีค่าอยู่ในช่วง 9.7-7.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นนั้นพบว่าค่าที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการเลี้ยงเพิ่มขึ้น มีค่าเป็น 4.49 , 5.07 ,5.67 ,5.91 ,6.28 ,6.17 และ 6.20 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในวันแรกจนถึงวันสิ้นสุดการเลี้ยงเซลล์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง จะมีค่าลดลงเช่นกัน และลดลงไปจนถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 5.60-4.35

เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณแป้งที่เปอร์เซนต์แตกต่างกันที่ 2 4 6 และ 8 % ที่มีผลให้ผลต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 น้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีเปอร์เซนต์แป้งแตกต่างกัน

จากรูปที่ 12 พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีปริมาณแป้งแตกต่างกัน พบว่า แป้ง 8 % ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 23.010 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งจะน้อยลงเมื่อใช้แป้ง 6 % โดยจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเป็น 15.392 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับวันที่ 5 ซึ่งให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 14.442 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถ้าใช้แป้ง 4 % จะให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 12.234 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ใกล้เคียงกัน คือ 12.107 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงและให้น้ำหนักเซลล์แห้งลดลงเป็น 12.047 และ 12.108 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 และ 7 ตามลำดับ ในกรณีที่ใช้แป้ง 2 % พบว่า ให้น้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เป็น 11.851 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้อยรองลงมาแต่มีค่าใกล้เคียงกันในวันที่ 4 คือ 11.834 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

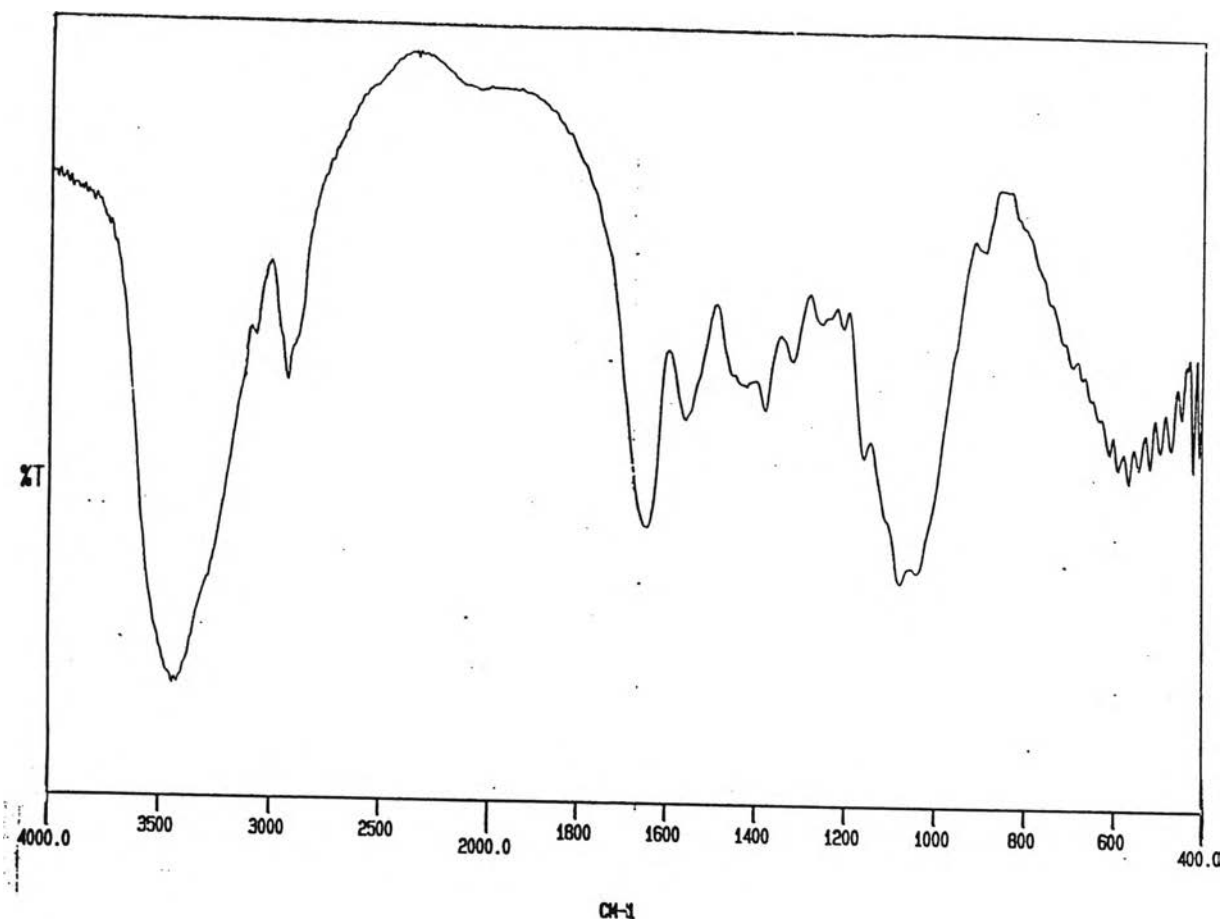
ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะมีการลดลงมากที่สุดเมื่อมีปริมาณของแป้งที่ 8 % รองลงมา คือ 6 % ส่วนปริมาณแป้งที่ 4 และ 2 % จะมีการใช้ลดลง ตามลำดับ

ค่าปริมาณกรดที่เกิดขึ้น พบว่า ปริมาณแป้งที่ 8 % ให้ค่าปริมาณกรดมากที่สุด พบในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ ได้ค่า 6.28 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ มีค่าลดลง เมื่อเปอร์เซนต์ของแป้งในอาหารลดลง โดยแป้ง 6 % ให้ค่าปริมาณกรดมากที่สุด 5.82 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเลี้ยง และ ที่ปริมาณแป้ง 4 % ปริมาณกรดมีค่าสูงสุด เป็น 5.67 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร สุดท้ายที่แป้ง 2 เปอร์เซนต์นั้นจะให้ค่าปริมาณกรดที่เกิดขึ้นน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับแป้งเปอร์เซนต์อื่น มีค่า 5.32 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเปอร์เซนต์แป้งแตกต่างกันจะอยู่ในช่วง 5.60-4.31

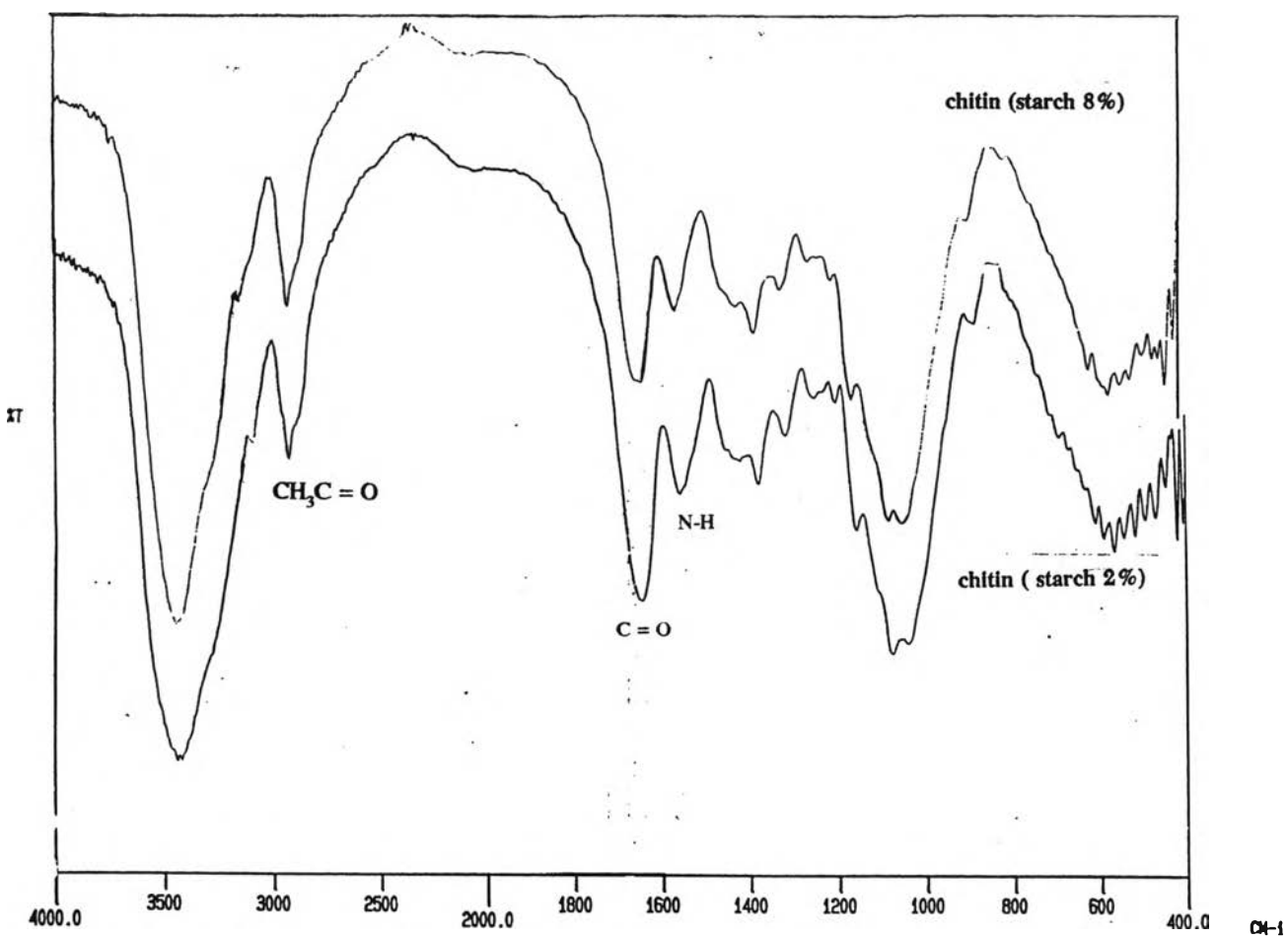
ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากน้ำหนักเซลล์แห้งแล้ว จะเห็นว่า ปริมาณแป้งที่ 8 % ให้ปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์สูงสุด จึงเหมาะสมในการทดลองขั้นต่อ ๆ ไป ซึ่งผลจากงานวิจัยที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Xu และคณะ (1989) ที่ว่าเปอร์เซนต์ของแป้งมันสำปะหลังยิ่งมากย่อมให้ปริมาณน้ำตาลที่จะใช้ในการสร้างเซลล์และแหล่งของคาร์บอนสูงไปด้วยซึ่งได้ทดลองเลี้ยงรา *Aspergillus niger* สายพันธุ์ B60 ในอาหารที่เปอร์เซนต์แป้งของมันสำปะหลังเป็น 2% 2.5% 3% 3.5% 4% 4.5% และ 5% เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง จะพบว่า ปริมาณแป้งที่ 5 % ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด แต่มิได้ใช้แป้งมันสำปะหลังถึง 8 % แต่ในงานวิจัยนี้ทำการเลี้ยง *Aspergillus niger* ที่เปอร์เซนต์แป้งที่เหมาะสม 8% ซึ่งเป็นเปอร์เซนต์ที่สูงกว่างานวิจัยของ Xu และคณะ ไม่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังที่มีเปอร์เซนต์สูงเกินกว่า 5% อาจเป็นเพราะความหนืดของแป้ง จึงทำให้ใช้เปอร์เซนต์แป้งได้ต่ำกว่า เนื่องมาจากในงานวิจัยนี้ได้นำเอาเอนไซม์มาใช้ย่อยแป้ง เพื่อให้เป็นน้ำตาลก่อนใช้ในการเลี้ยงเชื้อ จึงไม่มีปัญหาในเรื่องความหนืดของแป้ง

จากนั้นนำเอาเซลล์ราอบแห้ง จากการเลี้ยงในอาหารที่มีแป้ง 2 % มาทำการสกัดเป็นไคตินด้วยการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ เพื่อเป็นการกำจัดโปรตีนและล้างสีและไขมันด้วยเอทานอลและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% (ซึ่งวิธีการสกัดได้กล่าวไว้แล้วในข้อที่ 9 ในบทที่ 2) จากนั้นนำเอาไคตินที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีการใช้แสงอินฟราเรด แสดงได้ดังรูปที่ 13 และตรวจสอบว่าปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 2 % และไคตินที่ได้จากเซลล์ราที่เลี้ยงในแป้งมันสำปะหลัง 8% เพื่อตรวจสอบว่าเปอร์เซนต์แป้งที่แตกต่างกันมีผลอย่างไรต่อหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญหรือไม่



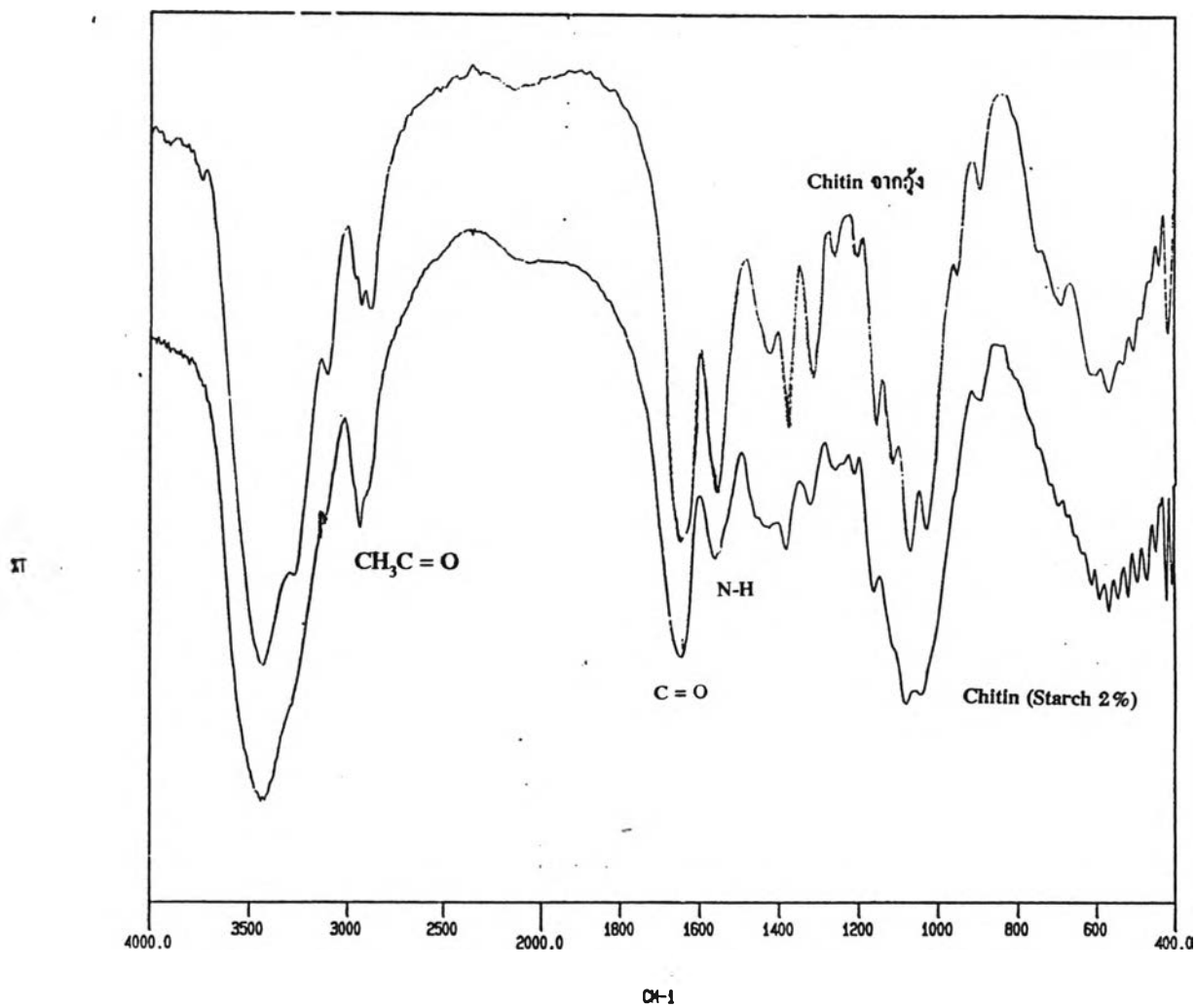
รูปที่ 13 อินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินจากราที่เลี้ยงอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2%

จากการเปรียบเทียบกันระหว่างไคตินจากราที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณแป้ง 2% กับไคตินจากราที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณแป้ง 8% พบว่า absorption band ที่สำคัญเหมือนกัน ทั้ง absorption band ของ carbonyl group (C=O) and amide (-NH) interaction จะพบที่เลขคลื่น 3255-3100 cm^{-1} , carbonyl group (C=O) พบที่เลขคลื่น 1650 cm^{-1} และ acetamido methyl group ($CH_3C=O$) ที่เลขคลื่น 2970-2940 cm^{-1} แสดงได้ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 กราฟแสดงอินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินที่สกัดจากราที่เลี้ยงในแป้งมันสำปะหลัง 2% เปรียบเทียบกับ แป้งมันสำปะหลัง 8%

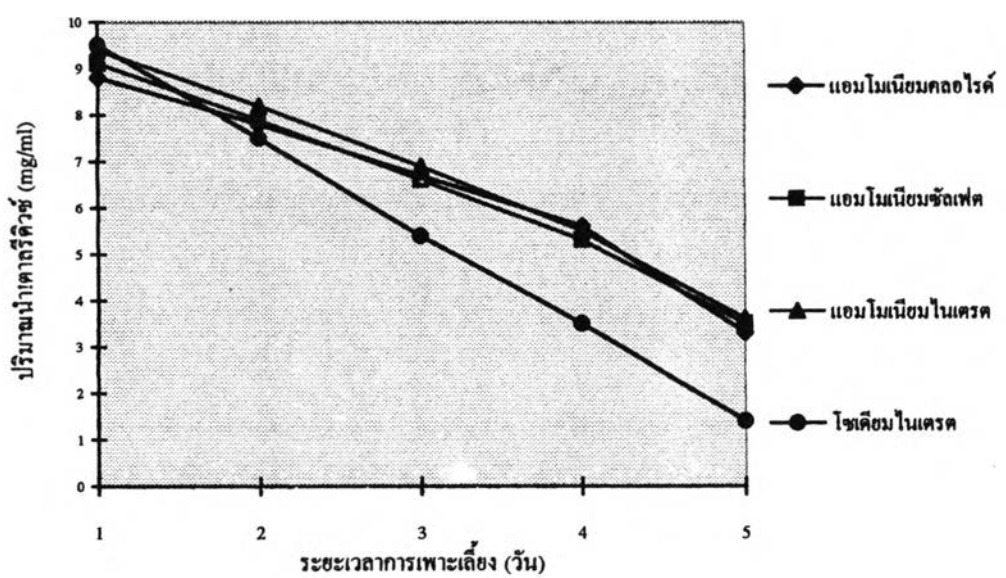
จากการเปรียบเทียบกันระหว่างไคตินจากราที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณแป้ง 2% กับไคตินจากเปลือกกุ้ง พบว่า absorption band ที่สำคัญเหมือนกัน ทั้ง absorption band ของ carbonyl group (C=O) and amide (-NH) interaction จะพบที่เลขคลื่น 3255-3100 cm^{-1} carbonyl group (C=O) พบที่เลขคลื่น 1650 cm^{-1} และ acetamido methyl group ($CH_3C=O$) ที่เลขคลื่น 2970-2940 cm^{-1} แสดงได้ดังรูปที่ 15



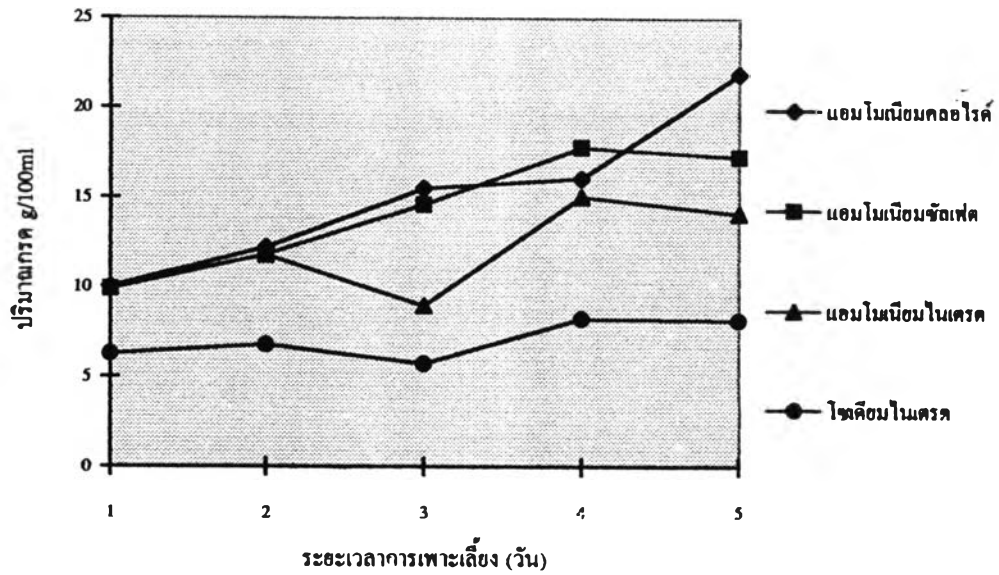
รูปที่ 15 อินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินที่ได้จากการสกัดจากสายใยราที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่มีแป้ง 2 เปอร์เซนต์เปรียบเทียบกับไคตินที่ได้จากกุ้ง

3.2 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

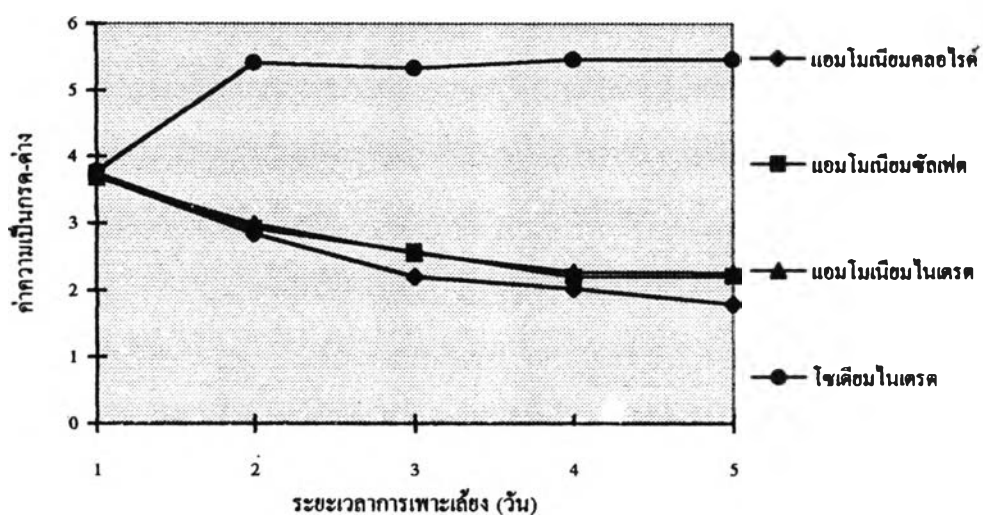
จากข้อ 3.1 พบว่า ปริมาณเปอร์เซนต์แป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด มีปริมาณแป้ง 8 % จึงได้สูตรอาหารที่จะใช้ต่อไปซึ่งอาหารที่ได้ปรับปรุงแล้วมีสูตรดังนี้ แป้งมันสำปะหลัง 8 % นำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 % โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 % ร่วมด้วยสารสกัดจากยีสต์ 0.4 % แมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต 0.02 % pH 5.6 โดยใช้จำนวนสปอร์ $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 4 ชนิด คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) และ โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) โดยใช้ปริมาณของไนโตรเจนเท่ากันกับสูตรอาหารควบคุม แล้วนำเซลล์มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักแห้ง ส่วนน้ำหมักนำมาหาค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด และ ค่า pH ซึ่งผลการทดลองแสดงได้ดังนี้



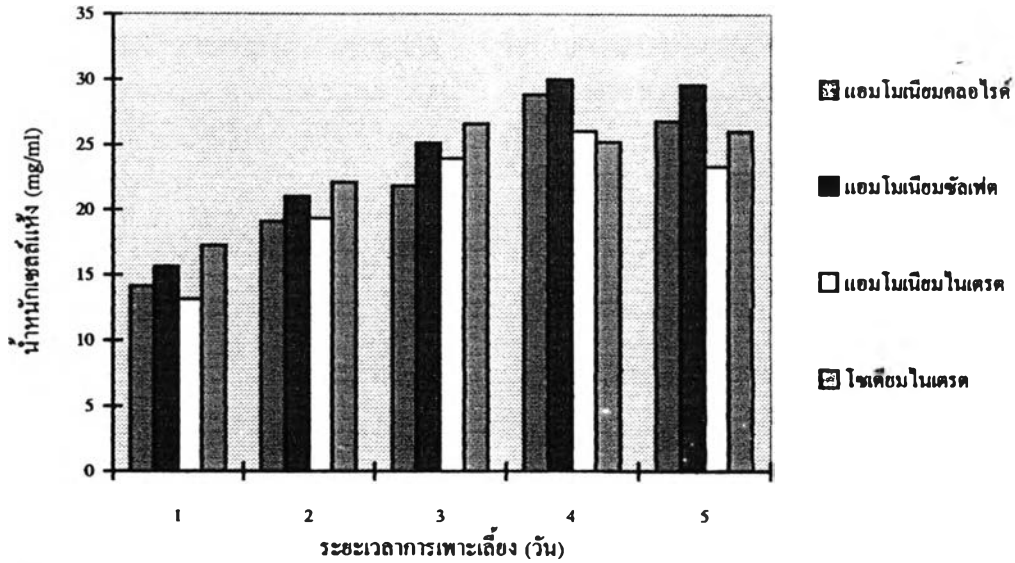
รูปที่ 16 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เมื่อเลี้ยง *Aspergillus niger* ในอาหารโดยแปรผันแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด



รูปที่ 17 กราฟแสดงปริมาณกรด เมื่อเลี้ยง *Aspergillus niger* ในอาหารโดยแปรผันแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด



รูปที่ 18 ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเลี้ยง *Aspergillus niger* ในอาหารโดยแปรผันแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด



รูปที่ 19 น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *Aspergillus niger* ในอาหารโดยแปรผันแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด

ข้อมูลจากรูปที่ 16 ถึง 19 พบว่า เมื่อเลี้ยง *Aspergillus niger* ในอาหารเหลวที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน จากผลการทดลอง แอมโมเนียมซัลเฟต จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด ที่ปริมาณ 20.042 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมา คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งใกล้เคียงกัน คือ 18.904 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน ส่วนแอมโมเนียมไนเตรต และ โซเดียมไนเตรต ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 16.440 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และ 16.067 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ซึ่งผลจากการทดลองสอดคล้องกันกับงานวิจัยของ Yoghitoglu และคณะ(1992) โดยจะเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการเลี้ยงรา *Aspergillus niger* ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการสร้างกรดซิตริกและให้ค่าน้ำหนักแห้งที่สูงเมื่อทำการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณที่เหมาะสมในช่วง 0.25-0.5 เปอร์เซนต์

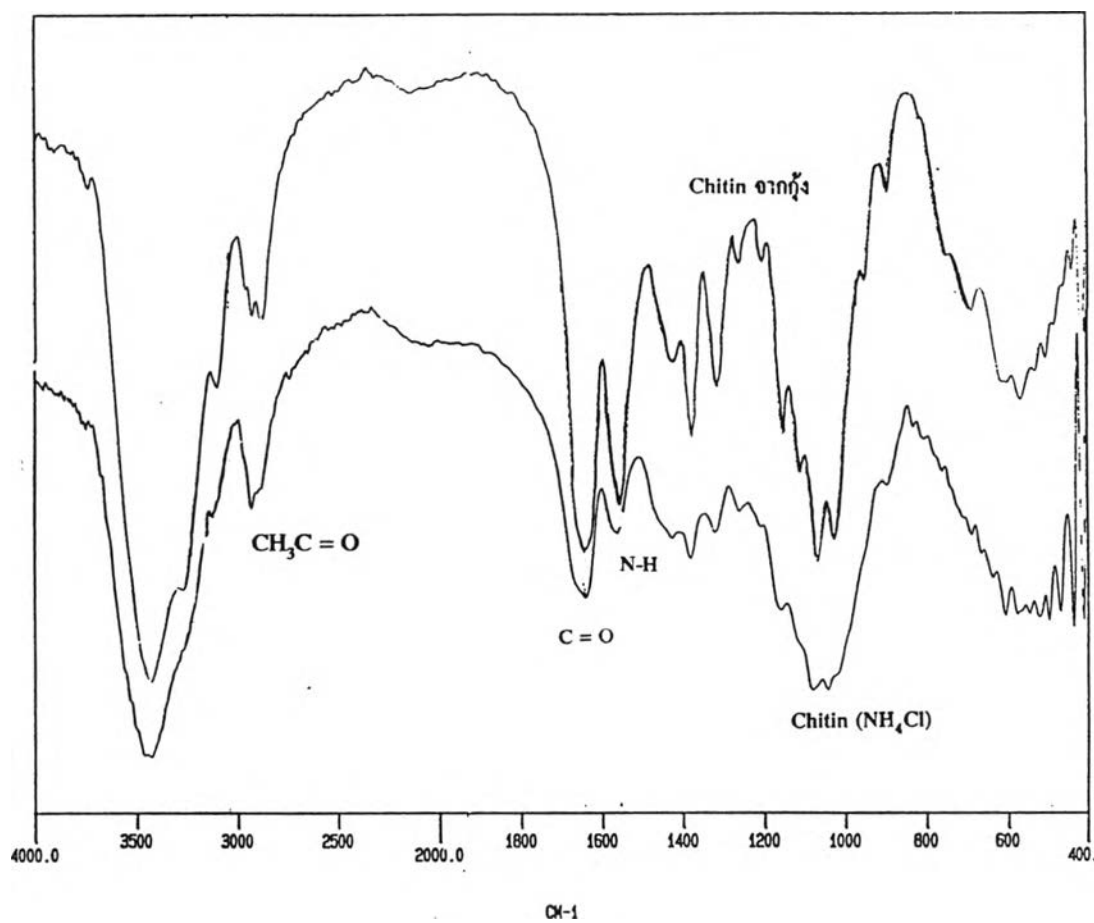
แต่อย่างไรก็ตาม Gupta และคณะ(1976) ยังพบว่าถ้าใช้แอมโมเนียมไนเตรตก็ยังให้ค่าปริมาณกรดซิตริกและค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์สูงเช่นกันแต่ถ้าเติมปริมาณมากเกิน

0.25 เปอร์เซนต์จะก่อให้เกิดการสะสมของกรดชนิดอื่น ๆ อีกด้วย ดังนั้นจึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในงานวิจัยนี้

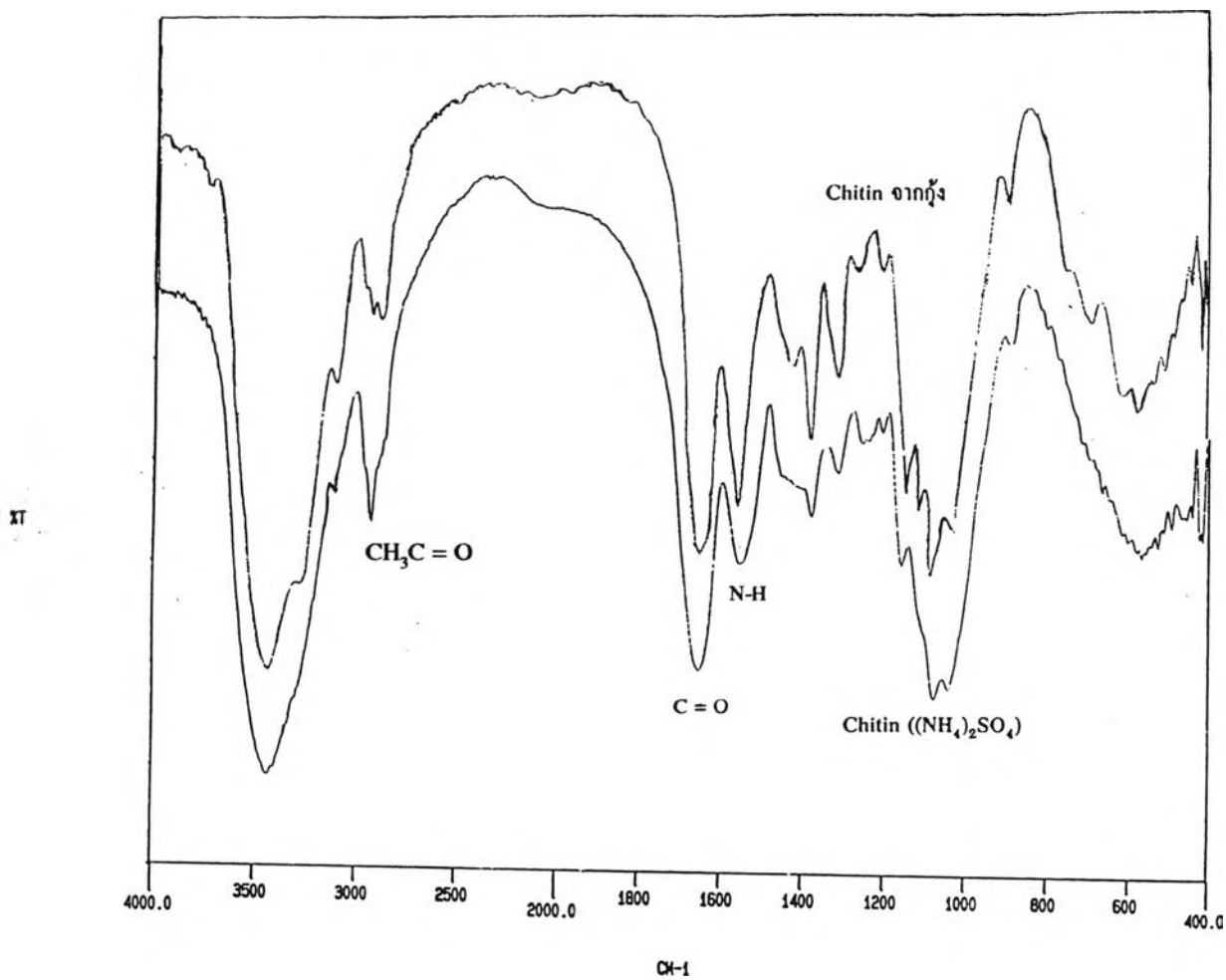
ผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งของไนโตรเจนแตกต่างกัน พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลงในปริมาณที่ใกล้เคียงกันในแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันโดยมีค่าอยู่ในช่วง 6.4-5.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากค่าปริมาณกรดที่เกิดขึ้น มีแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ และ แอมโมเนียมซัลเฟต ให้ค่าปริมาณกรดสูงกว่าอีก 2 ชนิด คือ แอมโมเนียมไนเตรต และ โซเดียมไนเตรต โดยค่าที่ได้จะพบว่ามีปริมาณกรดที่เกิดขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งแอมโมเนียมคลอไรด์ให้ค่าเป็น 21.869 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าค่าของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ให้ค่าปริมาณกรดเป็น 17.789 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนแอมโมเนียมไนเตรตจะให้ค่าของปริมาณกรดมากที่สุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเช่นกันมีค่าเป็น 15.055 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และแหล่งไนโตรเจนที่มีค่าปริมาณกรดที่เกิดขึ้นน้อยที่สุด คือ โซเดียมไนเตรต โดยให้ค่ามากที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงด้วยเช่นเดียวกันกับแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ มีค่าเป็น 8.242 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพราะโดยทั่วไปแล้วราสามารถที่จะใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปเกลือแอมโมเนียมได้ดีกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปเกลือไนเตรตจึงมีผลทำให้เชื้อมีการใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปเกลือแอมโมเนียมเพื่อการเจริญเติบโตและการสร้างกรดซิตริก ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างที่เกิดขึ้น พบว่า ถ้าใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปของเกลือแอมโมเนียม มีผลทำให้เกิดสภาวะเป็นกรดในอาหารจึงมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง และ ถ้ามีการใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปเกลือไนเตรตจะมีผลทำให้เกิดสภาวะเป็นด่างในอาหารทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าสูงขึ้น

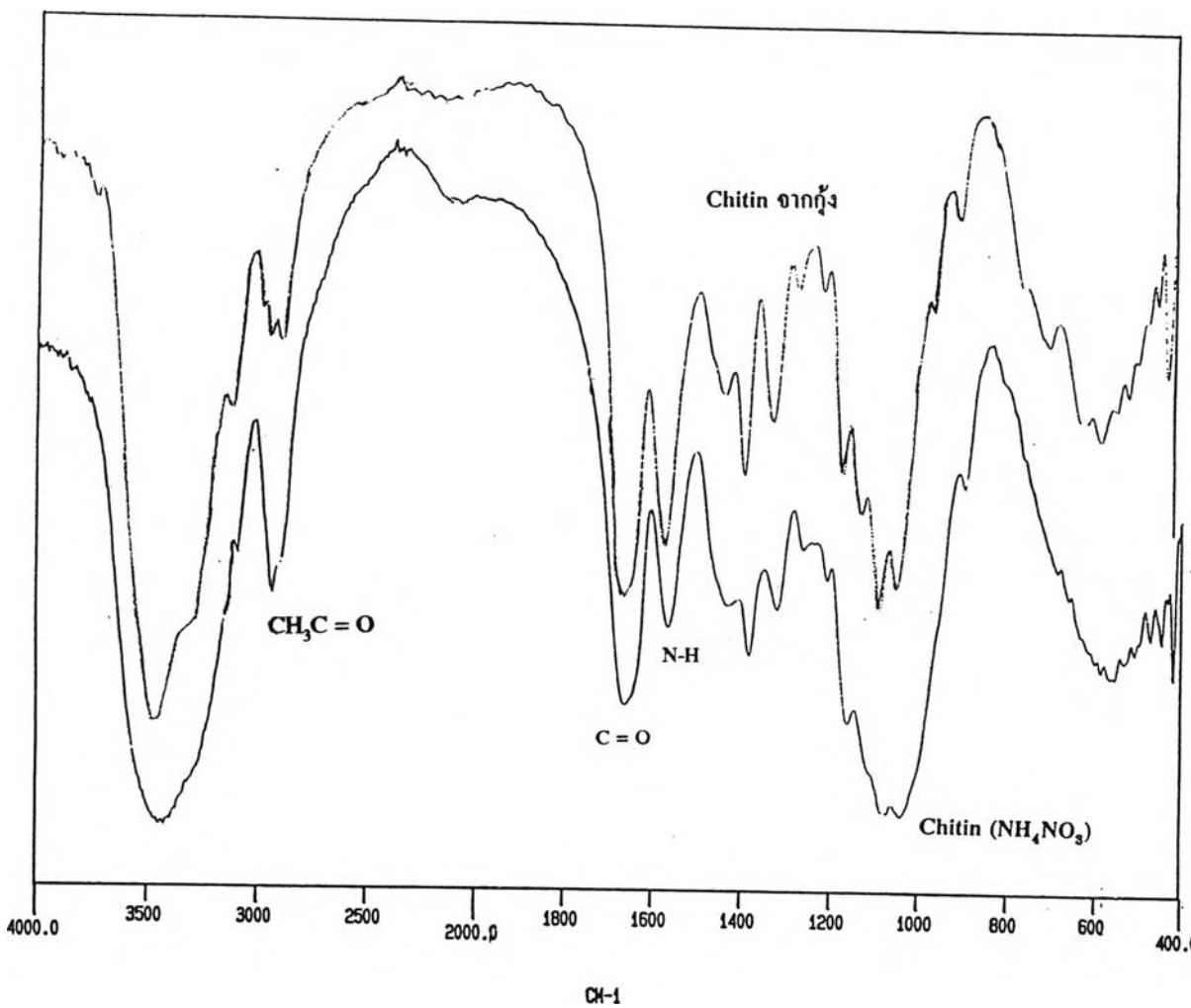
หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะเลี้ยงแล้ว จะนำเอาเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 4 ชนิด มาสกัดให้เป็นไคติน (ตามขั้นตอนในข้อ 9 บทที่2) แล้วทดสอบด้วยวิธีการใช้แสงอินฟราเรด เพื่อดูว่าแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างมีผลอย่างไรต่อฟังก์ชันนัลกรุ๊ปที่สำคัญของไคตินหรือไม่ เมื่อเปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินจากเปลือกกุ้ง แสดงผลได้ดังรูปที่ 20-23



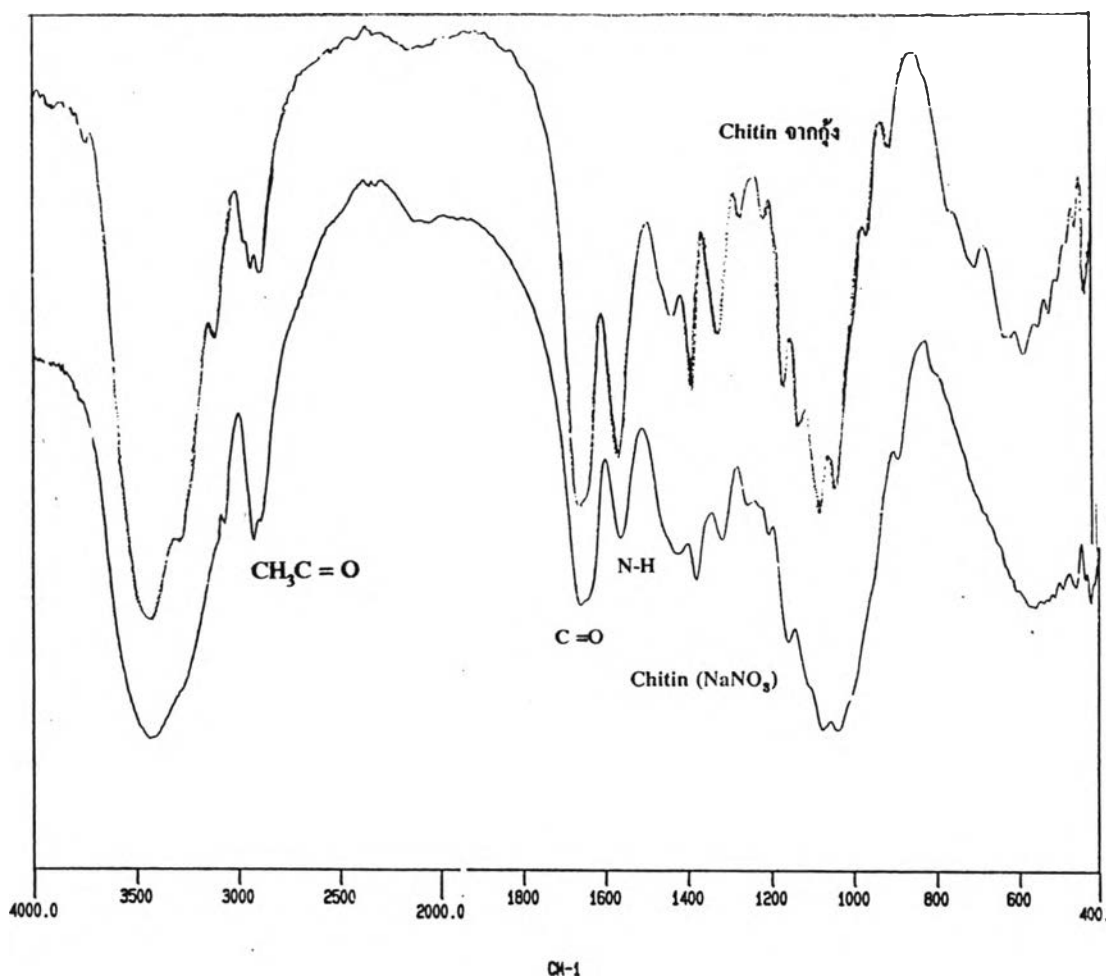
รูปที่ 20 อินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินของราที่เลี้ยงในอาหารโดยที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ เปรียบเทียบกับสเปกตรัมของไคตินจากเปลือกกุ้ง



รูปที่ 21 อินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินที่ได้จากเซลล์ราที่เลี้ยงในอาหารโดยที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเปรียบเทียบกับไคตินที่ได้จากเปลือกกุ้ง



รูปที่ 22 อินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินของราที่เลี้ยงในอาหารที่มี แอมโมเนียมไนเตรต เป็นแหล่งไนโตรเจน เปรียบเทียบกับไคตินจากเปลือกกุ้ง

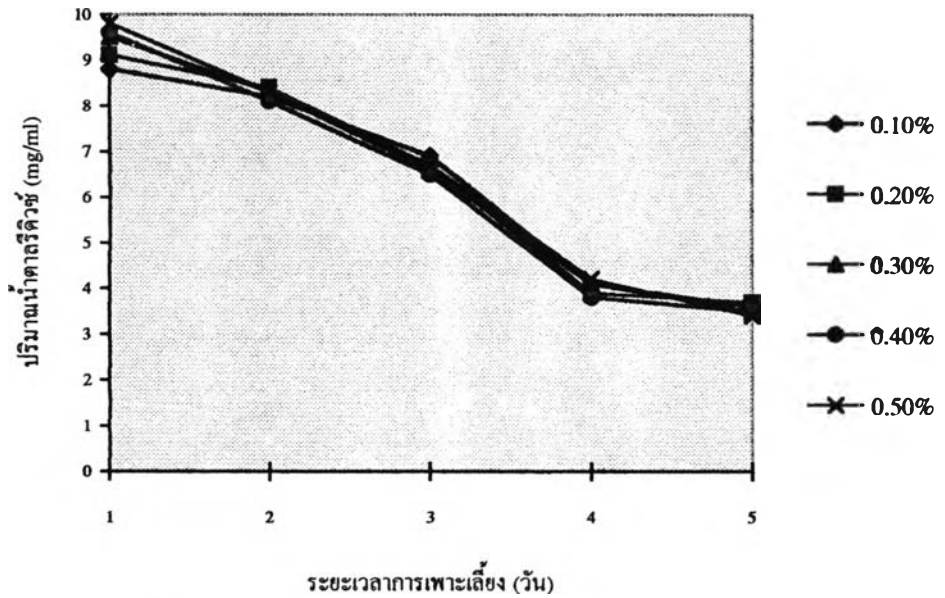


รูปที่ 23 อินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินรา ที่เลี้ยงในอาหารที่มีโซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อเปรียบเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินจากเปลือกกุ้ง

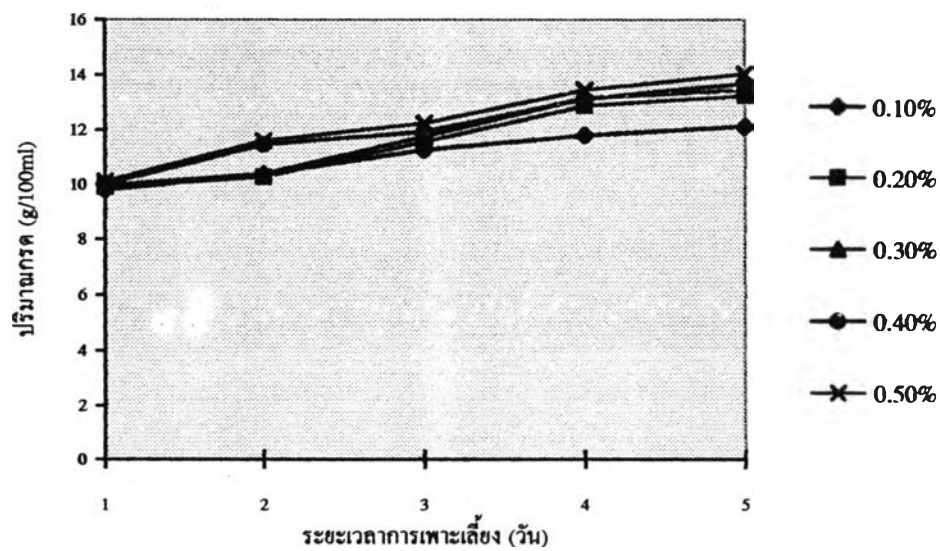
จากรูปที่ 20-23 ไคตินที่สกัดได้จากเซลล์ราที่เลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 4 ชนิด คือ NH_4Cl , $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3 และ $NaNO_3$ พบว่าไคตินที่สกัดได้นั้นจะให้ absorption band ที่สำคัญ คือ absorption band ของ carbonyl group (C=O) and amide (-NH) interaction จะพบที่เลขคลื่น 3255-3100 cm^{-1} carbonyl group (C=O) พบที่เลขคลื่น 1650 cm^{-1} และ acetamido methyl group (CH_3C=O) ที่เลขคลื่น 2970-2940 cm^{-1} อีกทั้งพบ N-H bending ที่เลขคลื่น 1550 cm^{-1} เหมือนกันกับอินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินจากเปลือกกุ้ง แต่ไคตินจากเซลล์ราที่เลี้ยงด้วยแหล่งไนโตรเจนนี้ยังพบกลุ่ม absorption band ของน้ำตาล ที่เลขคลื่นต่างๆ ดังนี้ 1425 cm^{-1} 1390 cm^{-1} 1310 cm^{-1} 1100-1050 cm^{-1} บางเลขคลื่นไม่ตรงกันกับไคตินจากเปลือกกุ้ง แต่ก็ให้ค่าใกล้เคียง ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญนั้นเหมือนกัน ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าไคตินที่ได้จากเซลล์ราที่เลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างนั้นไม่มีผลใดๆต่อหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญของไคติน

3.3 การแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

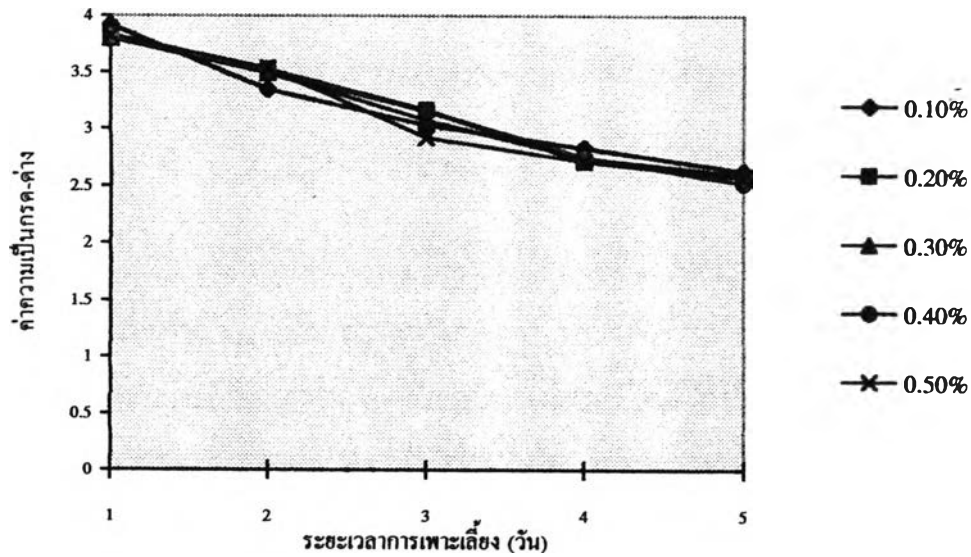
จากข้อ 3.2 พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.4% เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอีก 3 ชนิด ดังนั้นจึงนำ *Aspergillus niger* มาเลี้ยงในอาหารเหลว ที่มีส่วนประกอบ คือ แป้งมันสำปะหลัง 8 % ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเป็น 9.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ เติมสารอาหารอื่นที่เป็นสูตรอาหารควบคุม ได้แก่ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 % สารสกัดจากยีสต์ 0.4 % และ แมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต 0.02 % แปรผันปริมาณของ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 ,0.2 ,0.3 ,0.4 และ 0.5 % pH 5.6 และใช้ปริมาณเริ่มต้นของสปอร์เท่ากัน คือ $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาค่าของปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด และ pH สามารถแสดงได้ดังรูปต่อไปนี้



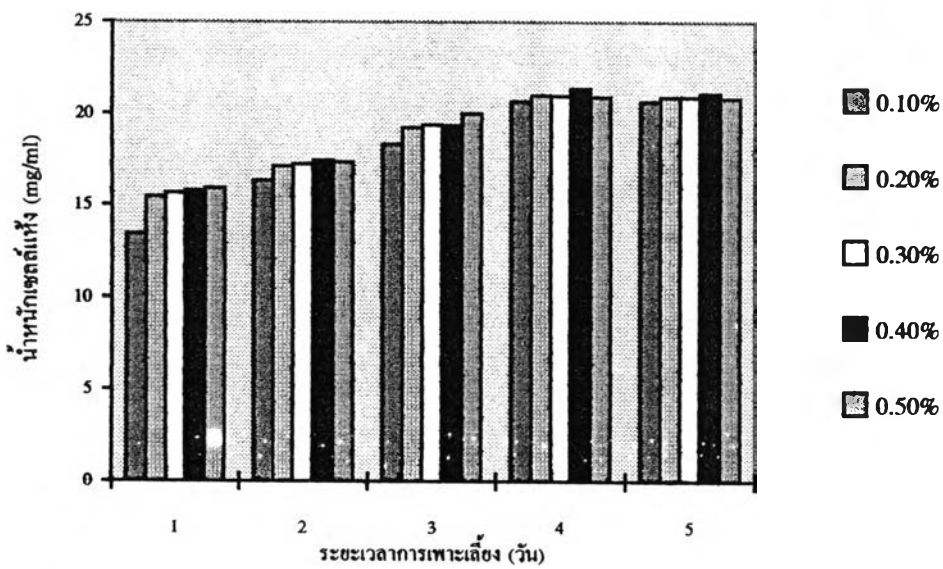
รูปที่ 24 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เมื่อใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน



รูปที่ 25 ปริมาณกรดที่เกิดขึ้น เมื่อใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน



รูปที่ 26 ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อใช้ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน



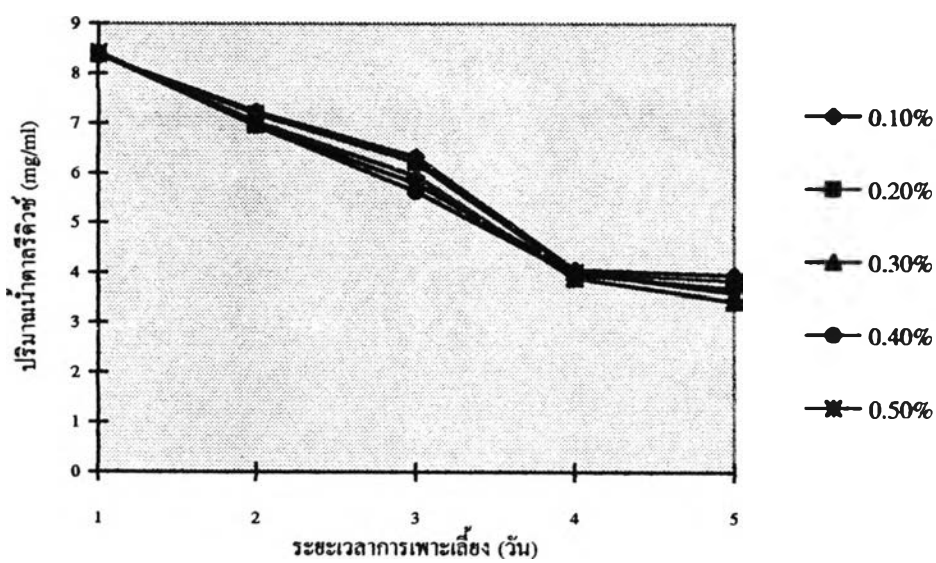
รูปที่ 27 น้ำหนักเซลล์สายใยแห้งเมื่อใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างกัน

ข้อมูลที่ได้จากรูปที่ 24 ถึง 27 เมื่อเลี้ยง *Aspergillus niger* ในอาหารที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตแตกต่างกัน พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเป็น 21.352 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คือ 0.4 % ในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ น้ำหนักเซลล์แห้งจะมีค่าลดลง เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0.1 , 0.2 , 0.3 และ 0.5 % มีค่าเป็น 20.649 , 20.984 , 20.956 และ 20.895 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นและมีการใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วง 9.8-3.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนค่าปริมาณกรดที่เกิดขึ้นพบว่า จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยที่แอมโมเนียมคลอไรด์ที่ 0.5 เปอร์เซนต์ ให้ปริมาณกรดมากที่สุด 14.023 กรัมต่อ100 มิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณกรดจะมีค่าน้อยลงเมื่อใช้ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0.4 , 0.3 , 0.2 และ 0.1 % มีค่าเท่ากับ13.679, 13.435, 13.217 และ 12.106 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตต่างกันจะอยู่ในช่วง 3.91-2.52 ในระยะการเลี้ยง 5 วัน ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yochitoglu และคณะ (1992) ที่ได้รายงานว่า แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Aspergillus niger* เพื่อให้เกิดการสร้างกรดซิตริกและน้ำหนักเซลล์สูงมีค่าอยู่ในช่วง 0.25-0.5% และงานวิจัยของ Kublicek (1986) ที่พบว่าปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ที่ปริมาณ 0.3% ในการผลิตกรดซิตริก ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 19.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 100 ชั่วโมง

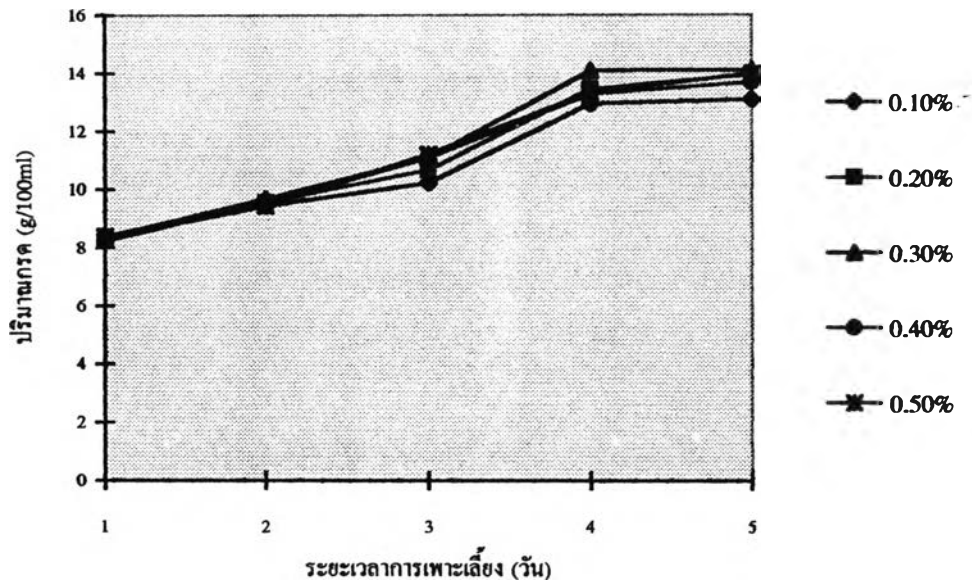
แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลการวิจัยนี้จะพบว่าน้ำหนักแห้งของเซลล์เมื่อใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0.4 และ 0.5 % มีค่าใกล้เคียงกัน เมื่อพิจารณาค่าปริมาณกรดที่เกิดขึ้นพบว่าที่ 0.5 % มีค่ามากกว่า โดยมีค่าเป็น 14.023 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง แต่ก็ให้ค่าที่ใกล้เคียงกับ 0.4 % ให้ค่าปริมาณกรดทั้งหมดเป็น 13.679 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร แต่ความต้องการของการวิจัยนี้ต้องการปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0.4 % เพื่อเป็นการลดปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตจากสูตรอาหารควบคุม ซึ่งจะทำให้ลดต้นทุนของการผลิตได้

3.4 การแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

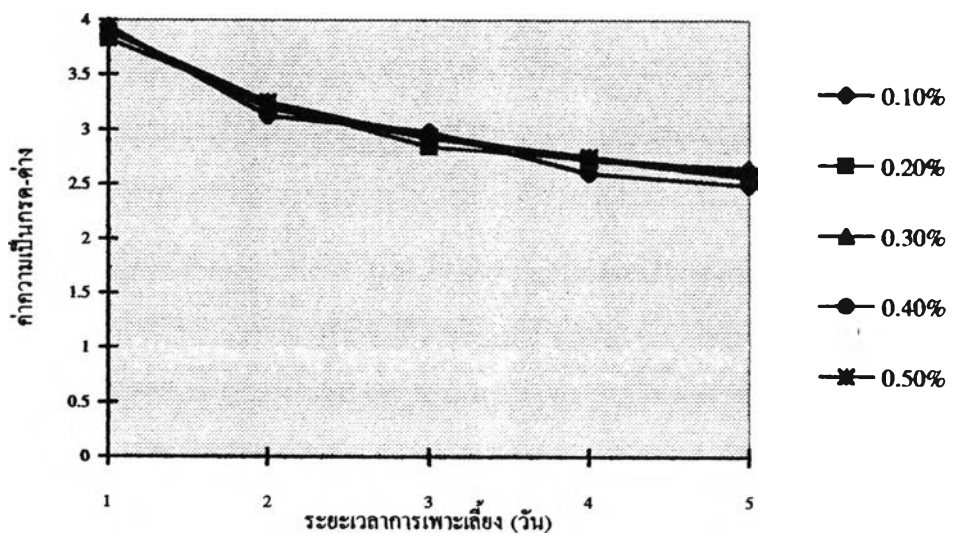
จากข้อมูลที่ 3.1-3.3 พบว่า แหล่งคาร์บอน คือ แป้งมันสำปะหลัง 8 % ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ให้ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ 9.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อได้เป็นน้ำตาลกลูโคส และแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.4 % เติมส่วนประกอบอื่นตามสูตรอาหารควบคุม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 % และ แมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต 0.02 % แปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ เป็น 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5 % โดยใช้ปริมาณกล้าเชื้อที่ $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เวลาการเพาะเลี้ยง 5 วัน จากนั้นวิเคราะห์หา น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 28-31



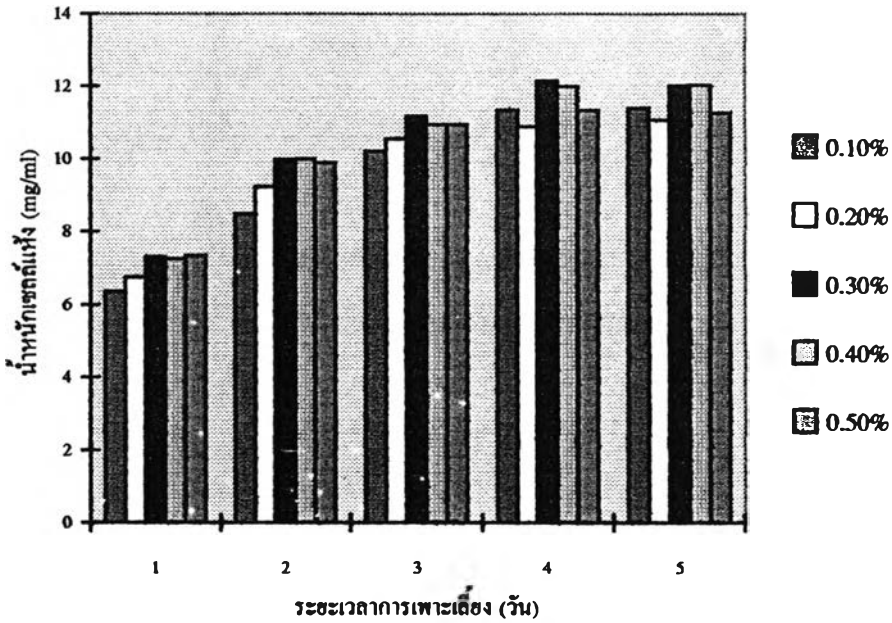
รูปที่ 28 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ เมื่อใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5%



รูปที่ 29 ปริมาณกรดเริ่มต้นและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5%



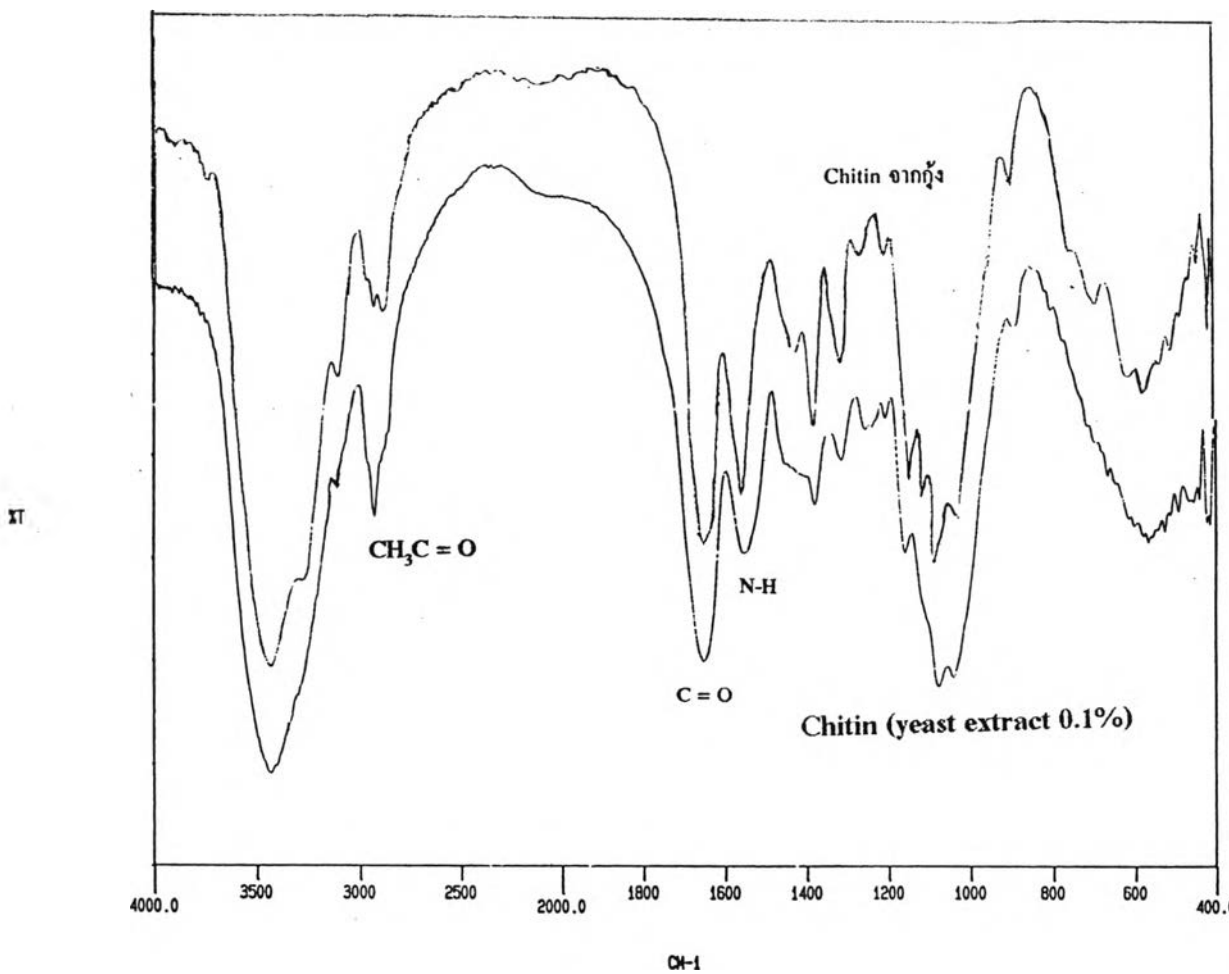
รูปที่ 30 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เมื่อใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์เป็น 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 และ 0.5%



รูปที่ 31 น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 , 0.5%

ผลการทดลองจากรูปที่ 28 ถึง 31 พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีปริมาณสารสกัดจากยีสต์แตกต่างกันนั้นที่ 0.3 % ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 12.151 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และน้ำหนักเซลล์แห้งจะน้อยลงมา เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ 0.1 , 0.2 , 0.4 และ 0.5 % มีค่าเท่ากับ 11.349 , 10.881 , 11.992 และ 11.342 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ มีปริมาณการใช้ที่ใกล้เคียงกัน ในส่วนปริมาณกรดที่เกิดขึ้น พบว่า ที่ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 0.3 % ให้ปริมาณกรดมากที่สุด คือ 14.108 กรัม ต่อ 100มิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และมีค่าน้อยลงใน 0.1 , 0.2 ,0.4 และ 0.5 % เป็น 13.088 , 13.141 , 13.679 และ 13.976 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน และให้ค่าปริมาณกรดที่เกิดขึ้นที่ใกล้เคียงกัน ในวันที่ 4 อีกด้วย ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารที่แปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่แตกต่างกันอยู่ในช่วง 3.94-2.49 ซึ่งผลจากงานวิจัยนี้ สามารถลดปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่ต้องใช้ในการเพาะเลี้ยงจากเดิม 0.4 เป็น 0.3 % และเป็นการลดต้นทุนในการผลิตได้อีกด้วย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่ 0.3 % ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

จากนั้นจะนำเอาเซลล์ราอบแห้งที่ได้จากการใช้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 0.1 % มาสกัดให้เป็นไคติน (วิธีข้อ 9 บทที่ 2) แล้ววิเคราะห์ด้วยการใช้แสงอินฟราเรด เปรียบเทียบกันกับไคตินที่ได้จากกุ้งว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ ซึ่งผลที่ได้แสดงดังรูปที่ 32

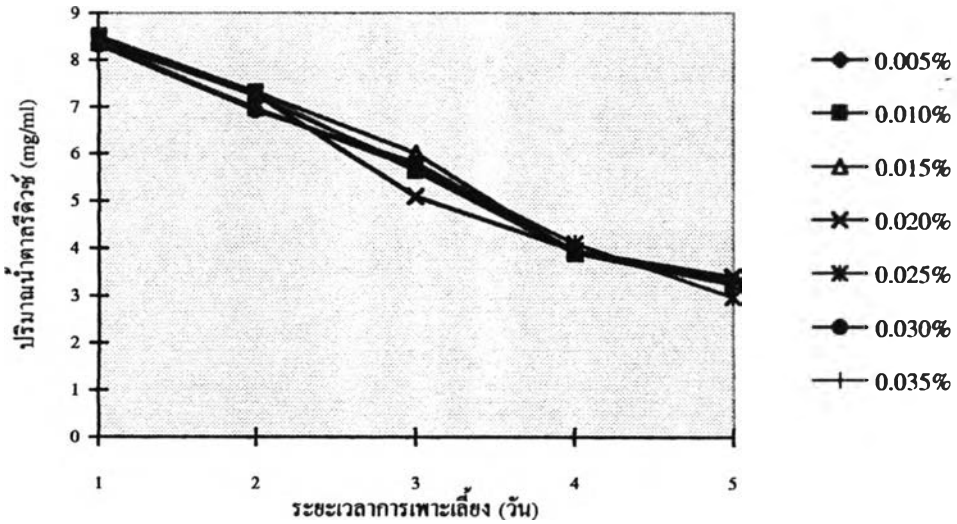


รูปที่ 32 อินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินจากเซลล์ราที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 0.1 เปอร์เซนต์ เปรียบเทียบกับไคตินจากเปลือกกุ้ง

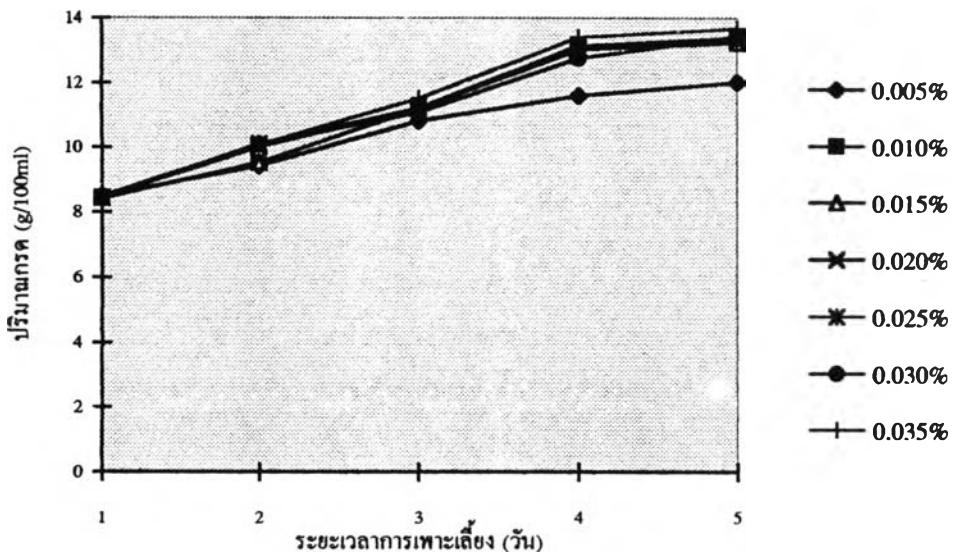
จากรูปที่ 32 พบว่าปริมาณสารสกัดจากยีสต์ไม่มีผลต่อหมู่ฟังก์ชันนัลของไคติน เมื่อเทียบกับอินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินจากเปลือกกุ้ง โดยจะพบ absorption band ที่สำคัญของไคติน คือ carbonyl group (C=O) and amide (-NH) interaction จะพบที่เลขคลื่น 3255-3100 cm^{-1} , carbonyl group (C=O) พบที่เลขคลื่น 1650 cm^{-1} และ acetamido methyl group ($CH_3C=O$) ที่เลขคลื่น 2970-2940 cm^{-1} อีกทั้ง N-H bending ที่เลขคลื่น 1550 cm^{-1} เหมือนกันกับอินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินจากเปลือกกุ้ง

3.5 การแปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรตที่เหมาะสม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

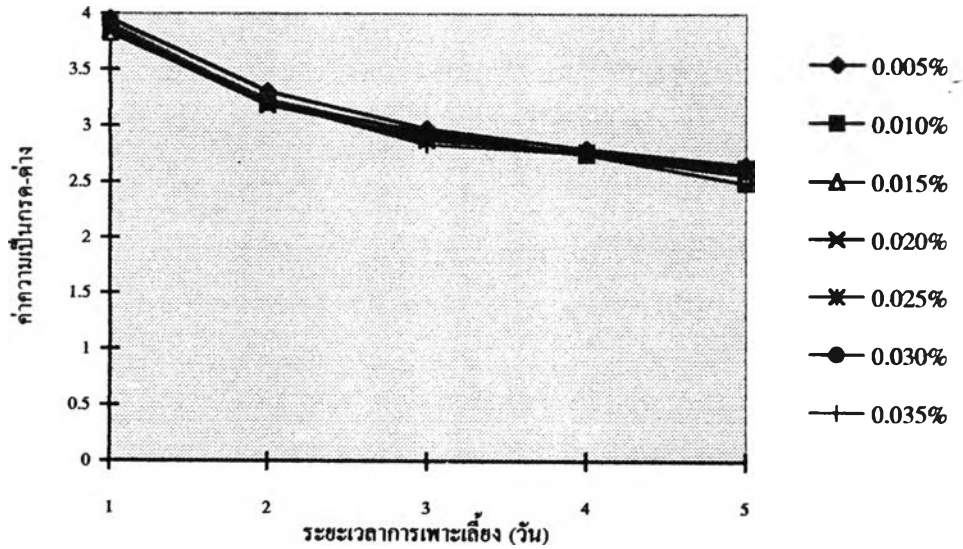
จากข้อ 3.1-3.4 พบว่า อาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 8 % ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เพื่อเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลกลูโคสก่อน และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.4 % สารสกัดจากยีสต์ 0.3 % รวมทั้งมีการเติมสารอาหารอื่น คือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อ เติมกล้าเชื้อในรูปของสปอร์ของ *Aspergillus niger* $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 5 วัน แปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็น 0.005 , 0.01 , 0.015 , 0.02 , 0.025 , 0.03 และ 0.035 % แทน 0.02 % ในสูตรอาหารควบคุม จากนั้นวิเคราะห์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด และ ค่า pH ซึ่งผลของการแปรผันปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต แสดงได้ดังรูปที่ 33-36



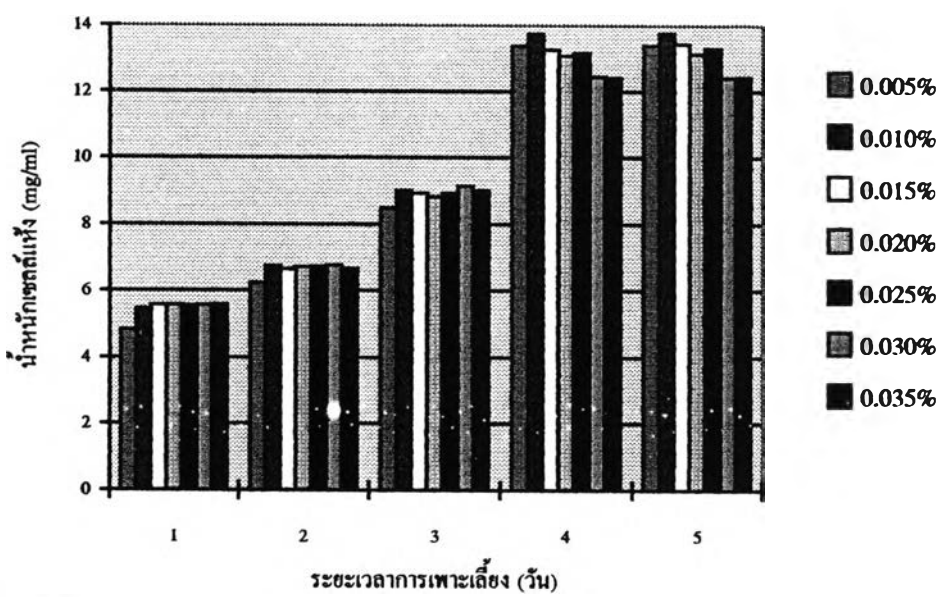
รูปที่ 33 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต 0.005%-0.035%



รูปที่ 34 ปริมาณกรด เมื่อใช้ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรตจาก 0.005% ถึง 0.035%



รูปที่ 35 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นและที่เปลี่ยนแปลงขณะที่มีการเลี้ยงเชื้อเมื่อใช้แมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรตจาก 0.005 ถึง 0.035%



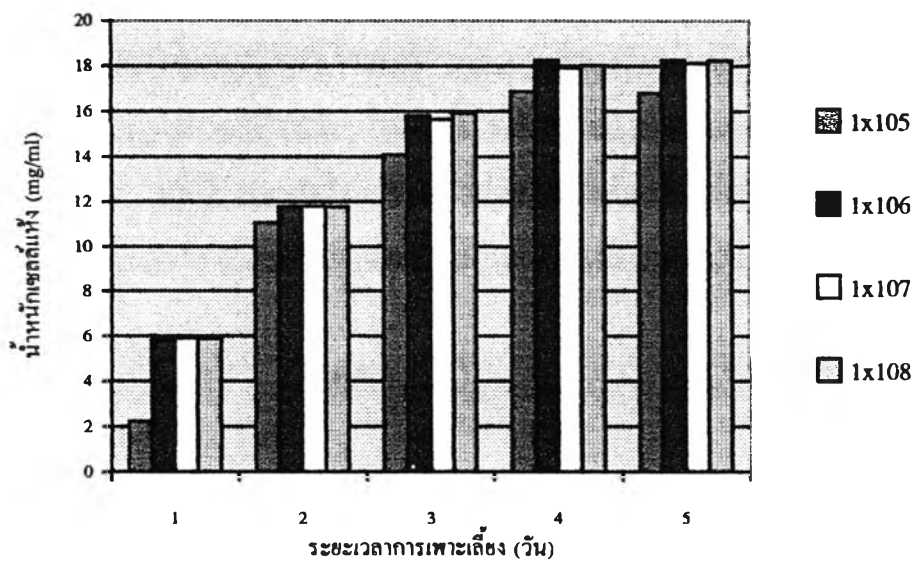
รูปที่ 36 น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต เริ่มจาก 0.005%-0.035%

พิจารณารูปที่ 33-36 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว ที่มีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรตแตกต่างกัน พบว่า ปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรตที่ 0.01% ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด เป็น 13.747 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และที่ 0.005 , 0.015 , 0.02 , 0.025 , 0.03 และ 0.035 % มีค่าน้อยลงมา ให้ค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่มากที่สุดใกล้เคียงกัน 13.362 , 13.255 , 13.083 และ 13.157 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนที่ปริมาณ 0.03 และ 0.035 % จะให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 12.447 และ 12.418 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์นั้นจะลดลงใกล้เคียงกันโดยอยู่ในช่วง 4.99-5.38 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณกรดที่เกิดขึ้น พบว่า ปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต- เฮปตะไฮเดรต 0.03 และ 0.035 % ให้ปริมาณกรดสูง มีค่าเท่ากับ 13.672 และ 13.423 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่าน้อยลงมาแต่ให้ค่าใกล้เคียงกัน คือ ปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรตที่ 0.01 , 0.015 , 0.02 , 0.025 % โดยให้ค่าเป็น 13.394 , 13.235 , 13.310 , 13.320 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากรูปที่ 34 พบว่าถ้าปริมาณแมกนีเซียมน้อยกว่า 0.01 % ให้ค่าปริมาณกรดน้อย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lockwood (1975) ที่ว่า เชื้อ *Aspergillus niger* จะสร้างกรดซิตริกได้ดี ถ้ามีการเติมแร่ธาตุที่เหมาะสม คือ Mg^{2+} ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพราะแมกนีเซียมนี้มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์หลายชนิดภายในเซลล์ ในขณะเดียวกันก็ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดซิตริก พบว่า ปริมาณของแมกนีเซียมที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดซิตริกอยู่ในช่วง 0.01-0.025 % แต่ถ้ามีปริมาณของแร่ธาตุน้อยเกินไป มีผลทำให้การผลิตกรดซิตริกต่ำ และถ้ามีปริมาณสูงเกินไปจะทำให้ระยะเวลาการเจริญยืดยาวออกไป สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรตแตกต่างกัน จะอยู่ในช่วง 3.95-2.49

แต่เมื่อพิจารณาปริมาณของแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรตที่ได้จากการทดลองนี้จะพบว่า 0.01 % เหมาะสมที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารควบคุมที่ต้องใช้ 0.02 % ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยมีค่าน้อยกว่าย่อมเป็นผลดีต่อการลดต้นทุนการผลิต จึงเลือกปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรตที่ 0.01 % เป็นสูตรอาหารเหลวในการทดลองต่อ ๆ ไป

3.6 การแปรผันปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสม เพื่อให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด

จากข้อ 1 พบว่า ชนิดของกล้าเชื้อ (starter) เริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อนั้น กล้าเชื้อในรูปสปอร์ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่า ปริมาณกล้าเชื้อในรูปกลุ่มสายใย (เพลเลต) ดังนั้นได้แปรผันปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในรูปสปอร์ $1x10^5$,$1x10^6$,$1x10^7$ และ $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนประกอบที่ได้มาจากข้อ 3.1-3.5 ซึ่งถือเป็นอาหารสูตรปรับปรุง ประกอบไปด้วย แป้งมันสำปะหลัง 8 % นำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 150 หน่วย ภายในเวลา 30 นาที แอมโมเนียมซัลเฟต 0.4 % โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 % สารสกัดจากยีสต์ 0.3 % และ ใช้ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต 0.01 % โดยใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 5 วัน แสดงผลการทดลองในรูปที่ 37



รูปที่ 37 น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นแตกต่างกัน

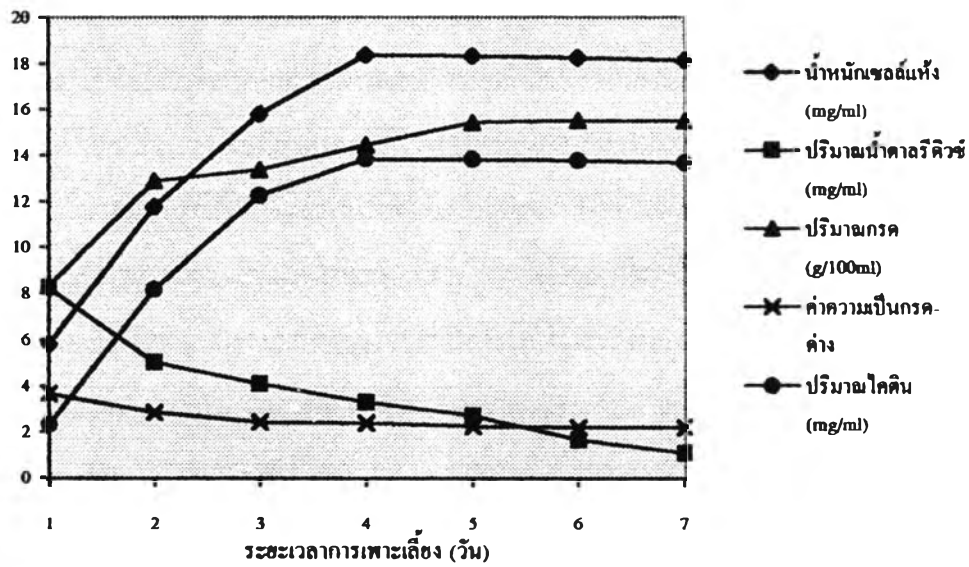
ข้อมูลของรูปที่ 37 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ค่าน้ำหนักของเซลล์แห้งเป็นเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงมีค่าเป็น 2.230 , 11.057 , 14.100 16.876 และ 16.800 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ถึง 5 ของการเลี้ยงเซลล์ ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้น้ำหนักเซลล์

แห้งเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยให้ค่าเป็น 5.830 , 11.775 , 15.812 , 18.271 และ 18.251 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันแรกจนถึงวันสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อตามลำดับ ส่วนปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ $1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ผลของน้ำหนักแห้งของเซลล์ ในระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 5 วัน เป็น 5.900 , 11.780 , 15.628 , 17.917 และ 18.110 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สุดท้ายคือปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ $1x10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 5.887 , 11.764 , 15.912 18.017 และ 18.232 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 ถึง 5 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบค่าของน้ำหนักเซลล์แห้งระหว่างปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ปริมาณแตกต่างกัน 4 ปริมาณ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสูตรเหมือนกัน และเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเท่ากัน และเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน เท่ากัน พบว่า ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร จะให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเป็น 18.271 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าน้อยลงมาใน $1x10^7$ และ $1x10^8$ เป็น 17.917 , 18.017 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองขัดแย้งกับปริมาณสปอร์ที่ใช้ในสูตรอาหารเดิมที่ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นเป็น $1x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร แต่ผลที่ต้องการจากการทดลอง คือ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงในสภาวะการทดลองดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไป

3.7 การหาระยะเวลาเหมาะสมในการเก็บเซลล์ (harvest)โดยเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรปรับปรุง

จากข้อมูลที่แสดงภาวะเหมาะสมในการเลี้ยงทำให้ทราบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ทำการปรับปรุงแล้ว ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 8 % นำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ค่าน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 9.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.4 % โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5% สารสกัดจากยีสต์ 0.3 % และ แมกนีเซียมซัลเฟต-เฮปตะไฮเดรต 0.01 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร pH 5.6 เติมกล้าเชื้อปริมาณ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยขยายเวลาในการทดลอง 7 วัน ตรวจสอบ น้ำหนักแห้งของ

เซลล์ ปริมาณกรด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณไคตินที่สกัดได้ บันทึกผลการทดลอง ทุก ๆ วัน ซึ่งให้ผลการทดลองดังนี้



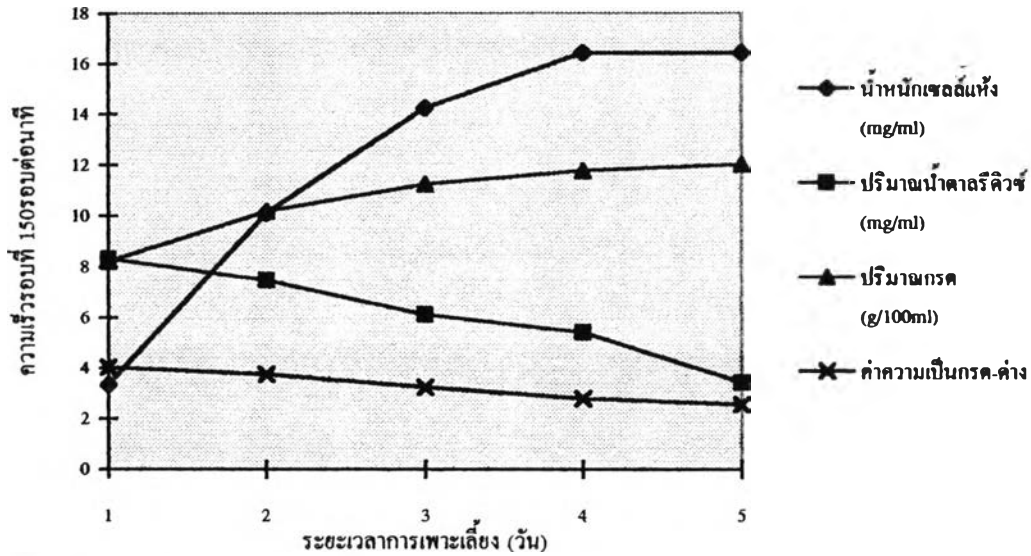
รูปที่ 38 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger*

จากรูปที่ 38 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยงเซลล์ โดยมีค่าเป็น 5.827 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นในวันที่ 2 และ 3 เป็น 11.763 และ 15.800 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงนั้นพบว่ามีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงที่สุด เป็น 18.372 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ เริ่มมีค่าใกล้เคียงกันในวันที่ 5 6 และ 7 มีค่า 18.327 , 18251 และ 18.137 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ปริมาณไคตินที่ได้จากการสกัดจากเซลล์ราอบแห้งมีค่าเป็น 2.341 , 8.185 , 12.254 , 13.842 , 13.821 , 13.773 และ 13.679 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 1 จนถึงวันที่ 7 ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลงตั้งแต่วันแรกจนถึงวันสุดท้าย มีค่าเป็น 8.25 , 5.04 , 4.10 , 3.31 , 2.73 , 1.67 และ 1.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เห็นว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลง แต่น้ำหนักเซลล์แห้งไม่เพิ่มขึ้น เป็นไปได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงนั้นอาจถูกนำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์อื่น หรือ อาจเอาไปใช้ใน

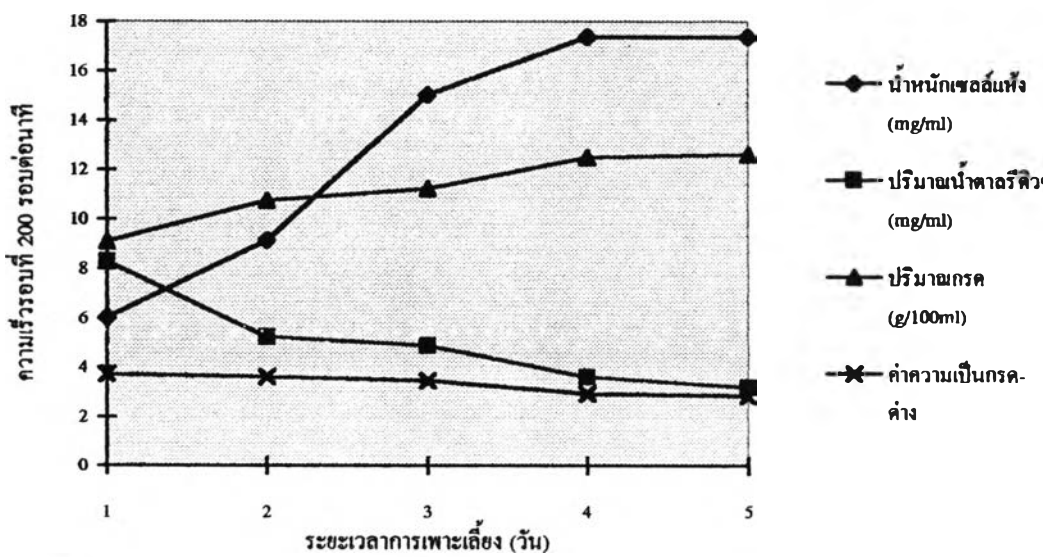
การสร้างเซลล์ แต่อัตราการเกิดและอัตราการตายเท่ากัน จึงทำให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจึงไม่เพิ่มขึ้น ค่าปริมาณกรดนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น มีค่าเท่ากับ 8.349 , 12.876 , 13.369 , 14.448 , 15.432 , 15.508 และ 15.502 กรัมต่อ100 มิลลิลิตร ในวันที่ 1 ถึง 7 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ พบว่า วันที่ 5 ให้ค่าของปริมาณกรดมากที่สุด ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Bigelis (1991) ที่รายงานว่า เมื่อเลี้ยงรา *Aspergillus niger* จะให้ปริมาณของกรดซิตริกมากที่สุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง มีค่า 16.05 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร อีกทั้งยังให้ค่าใกล้เคียงกันวันที่ 4 และ 7 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง 3.68-2.22 ดังนั้น เมื่อพิจารณาจากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงให้ค่าสูงที่สุด และให้ค่าปริมาณไคตินที่สกัดได้มากที่สุด จึงเลือกใช้ระยะเวลานี้ในการทดลองต่อไป เนื่องมาจากถ้ามีปริมาณของน้ำหนักเซลล์แห้งที่มาก จะมีผลทำให้ได้ไคตินมากด้วย

3.8 การคัดเลือกความเร็วรอบของเครื่องเขย่า (rotary shaker) ที่เหมาะสม

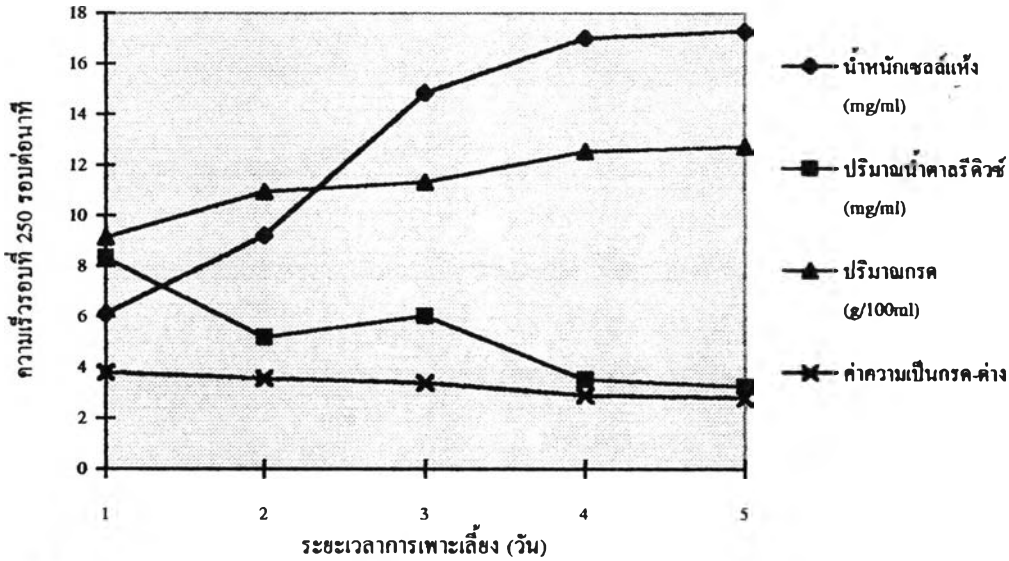
จากข้อ 3.1-3.7 ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูง ซึ่งได้แก่ สูตรอาหารเหลวที่ปรับปรุงแล้ว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 5.60 และใช้อุณหภูมิห้องในการเพาะเลี้ยง องค์ประกอบเหล่านี้เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการให้น้ำหนักของเซลล์แห้งสูง ใช้เวลาการเพาะเลี้ยงทั้งหมด 5 วัน โดยใช้ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าแบบ rotary ที่ 150 , 200 และ 250 รอบต่อนาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 39-42



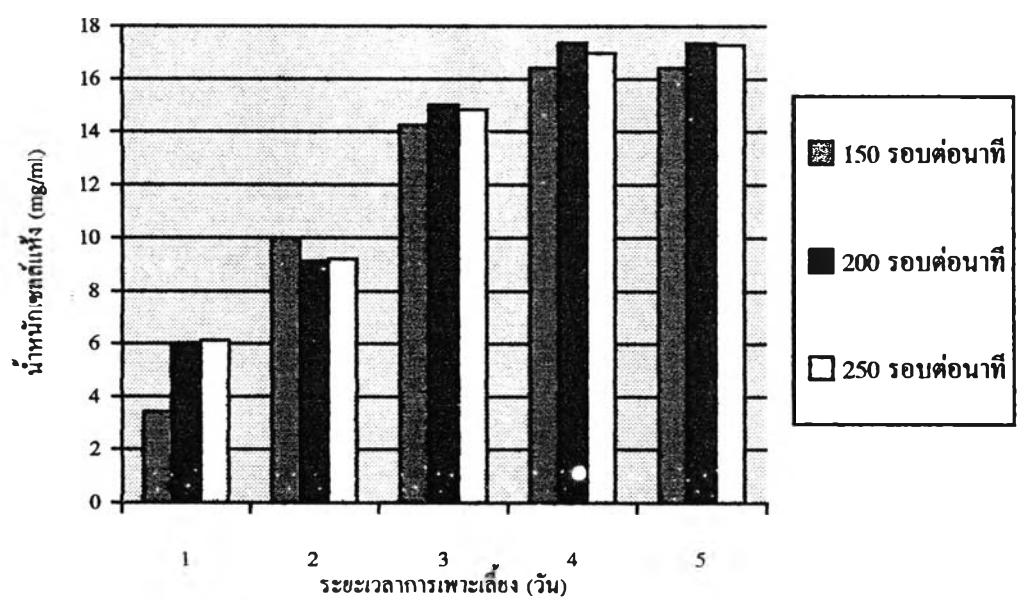
รูปที่ 39 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เปลี่ยนแปลง ปริมาณกรดค่า pH เมื่อใช้ความเร็วรอบเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที



รูปที่ 40 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เปลี่ยนแปลง ปริมาณกรดทั้งหมด และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อใช้ความเร็วรอบเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที



รูปที่ 41 น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด และ ค่าความเป็นกรดด่าง เมื่อใช้ความเร็วรอบเครื่องเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที



รูปที่ 42 เปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบเป็น 150 200 และ 250 รอบต่อนาที

จากรูปที่ 42 พบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบแตกต่างกันเป็น 150 , 200 และ 250 รอบต่อนาที จะให้ผลของน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 5 วัน โดยในวันแรก น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 3.438 , 6.021 และ 6.122 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จากความเร็วรอบที่ 150 , 200 และ 250 รอบต่อนาที ตามลำดับ ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักเซลล์แห้งมีปริมาณเป็น 10.0108 , 9.128 และ 9.203 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 , 200 และ 250 ตามลำดับ และให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เป็น 14.236 , 15.015 และ 14.832 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 150 , 200 และ 250 ตามลำดับ ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง จะพบว่าความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาทีให้ผลน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุด คือ 17.372 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และให้ค่าน้อยลงมาที่ 17.360 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลงใกล้เคียงกัน อยู่ในช่วง 4.88-5.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบแตกต่างกันที่ 150 , 200 และ 250 รอบต่อนาที (รูปที่ 39-41)

ค่าปริมาณกรดที่เกิดขึ้น พบว่า ความเร็วรอบที่ 250 รอบต่อนาทีให้ค่าปริมาณกรดสูงสุดเป็น 12.724 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 41) และมีค่าน้อยลงที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็น 12.532 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง อีกทั้งในวันที่ 4 ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นนั้นมีค่าใกล้เคียงกับวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงอีกด้วย ที่ความเร็วรอบ 200 และ 250 รอบต่อนาที มีค่า 12.478 และ 12.618 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 40-41)

ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เกิดขึ้นที่ความเร็วรอบที่ต่างกัน พบว่า มีค่าลดลงเมื่อเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างกันมาก เมื่อความเร็วรอบแตกต่างกัน โดยมีค่าอยู่ในช่วง pH 4.02-2.56 ดังนั้นเมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งจากรูปที่ 42 แล้วจะพบว่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ให้ค่ามากที่สุด โดยอาศัยความรู้ที่ว่ายิ่งความเร็วรอบของเครื่องเขย่ามากย่อมมีผลทำให้ขนาดของกลุ่มเส้นใยมีค่าเล็กลง ซึ่งจะมีผลต่อน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้น้อยลงไปด้วย แต่ถ้าความเร็วรอบของเขย่าเป็น 150 รอบต่อนาที ก็มีผลทำให้ได้ปริมาณของกรดน้อยลงไปด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lockwood (1975) พบว่าการหมักกรดซิตริกนั้นจัดได้ว่าเป็นการหมักในสภาพที่ต้องมีอากาศ จึงจำเป็นที่จะ

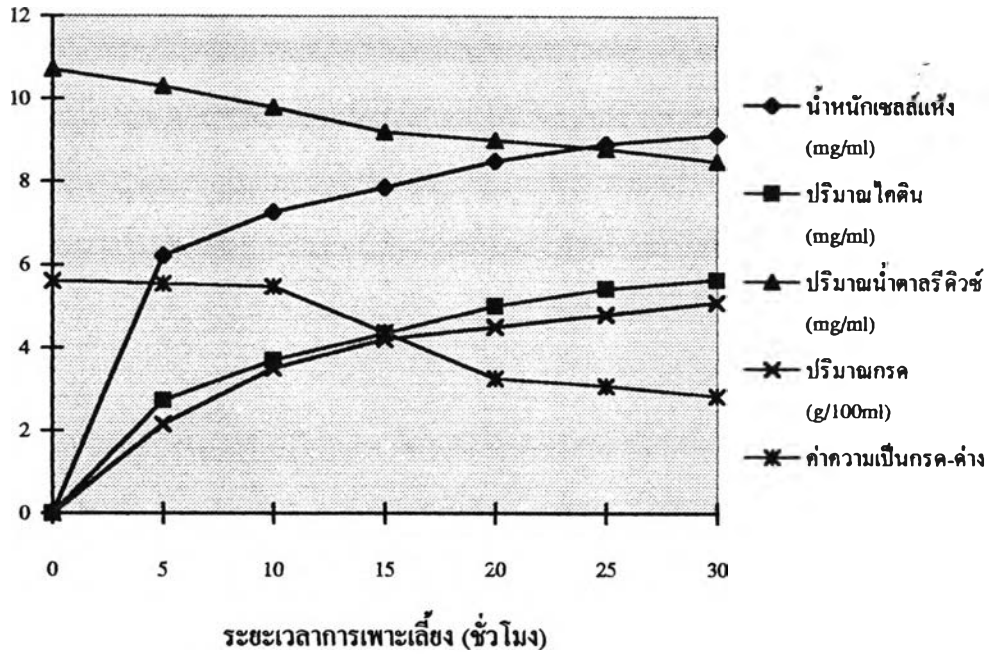
ต้องได้รับอากาศในปริมาณที่มากพอ ที่จะใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างกรดซิตริก และความเร็วรอบที่ใช้ในเพาะเลี้ยงรา *Aspergillus niger* เพื่อให้สร้างเซลล์และสร้างกรดซิตริก ที่เหมาะสมที่สุด คือ 200-250 รอบต่อนาที แต่ในงานวิจัยนี้เลือกความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที เป็นความเร็วรอบที่ใช้ในการทดลองต่อไป

4. การเลี้ยง *Aspergillus niger* ในระดับถังหมัก

นำข้อมูลจากการเลี้ยง *Aspergillus niger* ในระดับขวดเขย่า ได้สูตรอาหารที่ปรับปรุงแล้วรวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์ นำมาทดลองเลี้ยงในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาตรอาหาร 3 ลิตร ใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อ 1 ลิตรของอาหารต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 $^{\circ}C$ ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น $1x10^{6}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงเป็นเวลาทั้งสิ้น 30 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่เก็บทุก ๆ 5 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ได้ผลดังตารางที่ 16 และ รูปที่ 45

ตารางที่ 16 แส7ดงน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด และ pH ของ *Aspergillus niger* เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรปรับปรุงแล้ว โดยใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (mg/ml)	ปริมาณไคติน (mg/ml)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	ปริมาณกรด (g/100ml)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง
0	0	0	10.7	0	5.60
5	6.21	2.72	10.3	2.15	5.54
10	7.26	3.70	9.8	3.5	5.47
15	7.86	4.35	9.2	4.2	4.37
20	8.50	5.01	9.0	4.5	3.25
25	8.91	5.42	8.8	4.8	3.08
30	9.13	5.64	8.5	5.1	2.83
35	ปริมาณเซลล์ราในถังหมักมีมาก ไม่สามารถที่จะเลี้ยงต่อไปได้				



รูปที่ 43 น้ำหนักแห้งของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรด และ pH โดยเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

ข้อมูลจากตารางที่ 16 และ รูปที่ 43 เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเป็น 6.06 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง และมีค่าน้ำหนักแห้งของเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 6.21 , 7.26 , 7.82 , 8.50 และ 9.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 10 , 15 , 20 , 25 และ 30 ตามลำดับ และได้ค่าปริมาณไคตินเพิ่มขึ้นตามน้ำหนักเซลล์แห้งที่เพิ่มขึ้น มีค่าเป็น 2.72 , 3.70 , 4.35 , 5.01, 5.42 และ 5.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่สกัดจากเซลล์ราอบแห้งที่ชั่วโมงที่ 5 จนถึง 30 ตามลำดับ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะมีค่าลดลงจากเริ่มต้น 10.7 เหลือเป็น 8.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 30 เนื่องจากไม่สามารถที่จะทำการทดลองต่อไปได้ในชั่วโมงที่ 35 เพราะมีปริมาณเซลล์มาก จึงมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือมาก ผลที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือปริมาณมากนั้น ทำให้ผู้วิจัยคิดว่าควรจะมีการปรับภาวะในการเพาะเลี้ยงในกระบวนการผลิตในระดับถังหมักอีกครั้ง เช่น ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นในระดับถังหมัก และ ปรับอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อไป ส่วนค่าปริมาณ

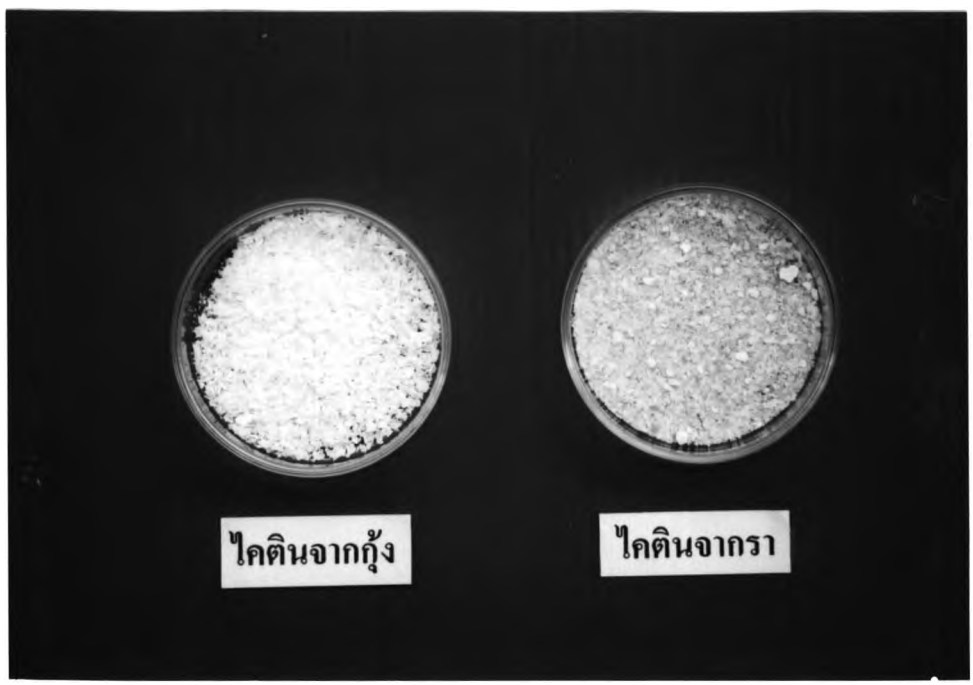
เริ่มต้นในระดับถังหมัก และ ปรับอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อไป ส่วนค่าปริมาณกรดนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าเพิ่มจาก 2.1 เป็น 5.1 กรัมต่อ100มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง และค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเซลล์ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 5.60-2.83 ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ พบว่า ควรจะมีการศึกษาเพิ่มเติมอีก เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมักต่อไป

5. การสกัดไคตินจากเซลล์รา

ทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุง ที่ภาวะเหมาะสมแล้ว นำเซลล์ของรา จากอาหารเลี้ยงเชื้อมากรอง แล้วล้างด้วยน้ำประปาหลายๆ ครั้ง เพื่อให้สะอาดจากอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งยังมีน้ำตาลเหลืออยู่ นำไปอบที่ 50 $^{\circ}$C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จะได้เซลล์ราอบแห้ง ซึ่งแสดงได้ดังรูปที่ 44

รูปที่ 44 สายใยรา *Aspergillus niger* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตรปรับปรุง เป็นเวลา 4 วัน อบแห้งที่ 50 $^{\circ}$C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

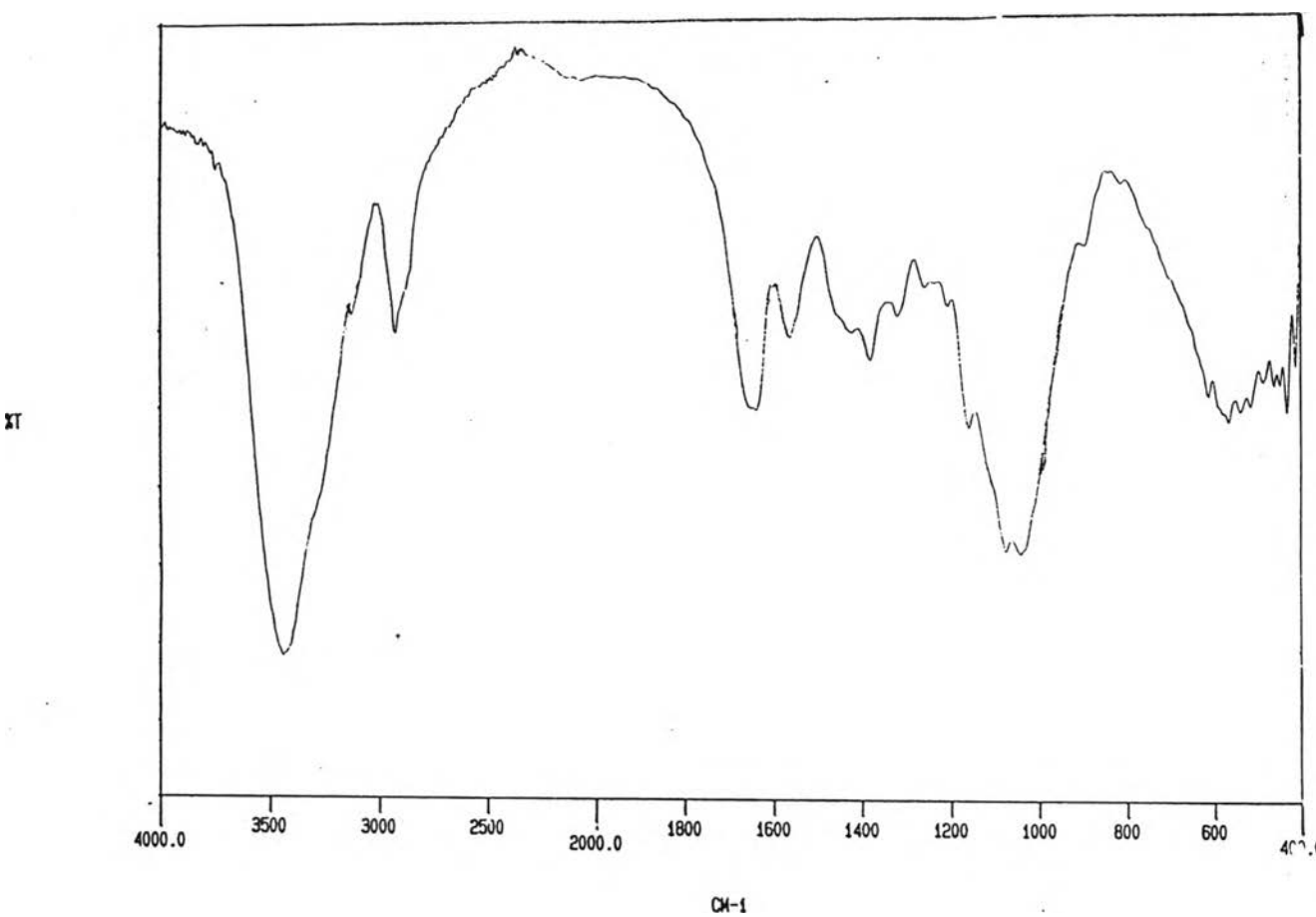
เมื่อได้เซลล์ราอบแห้งแล้ว จะนำเอาเซลล์ราดังกล่าวมาทำการสกัดไคตินด้วยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 M เพื่อกำจัดโปรตีนออก แล้วล้างด้วยน้ำประปาหลายๆครั้ง และล้างสีหรือรงควัตถุ (pigment) และไขมันด้วยเอทานอลและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% จากนั้นล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง แล้วนำไปอบที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วเปรียบเทียบกับไคตินจากกุ้ง ให้ผลดังรูปที่ 45



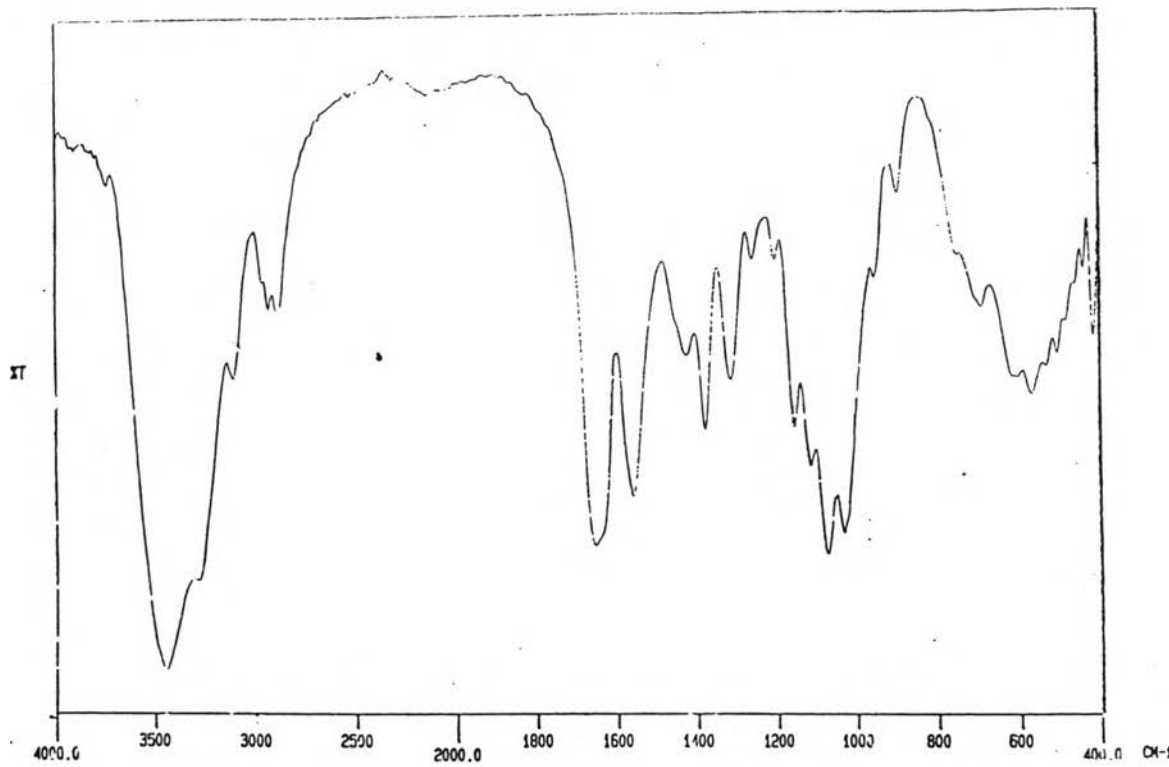
รูปที่ 45 เปรียบเทียบระหว่างไคตินจากกุ้ง (Unicord Co.Ltd.) กับไคตินที่สกัดจากเซลล์รา *Aspergillus niger*

จากรูปที่ 45 จะเห็นว่าไคตินของกุ้งนั้นมีสีขาวกว่าไคตินที่สกัดจากเซลล์ราแต่ไม่มากนัก อาจเป็นเพราะองค์ประกอบของผนังเซลล์ของราซับซ้อนกว่าในเปลือกกุ้ง โดยเฉพาะไคตินที่อยู่ตามผนังเซลล์ของรา ส่วนใหญ่จะจับกับองค์ประกอบอื่นๆ เช่น กลูแคน แมนแนน เซลลูโลส (Bartnicki,1968) ดังนั้นเมื่อนำเอาเซลล์ราที่นำมาสกัดไคตินไปอบที่อุณหภูมิ 50 °C องค์ประกอบที่ไคตินจับอยู่อาจเกิดการเปลี่ยนสี เมื่อสัมผัสกับความร้อน

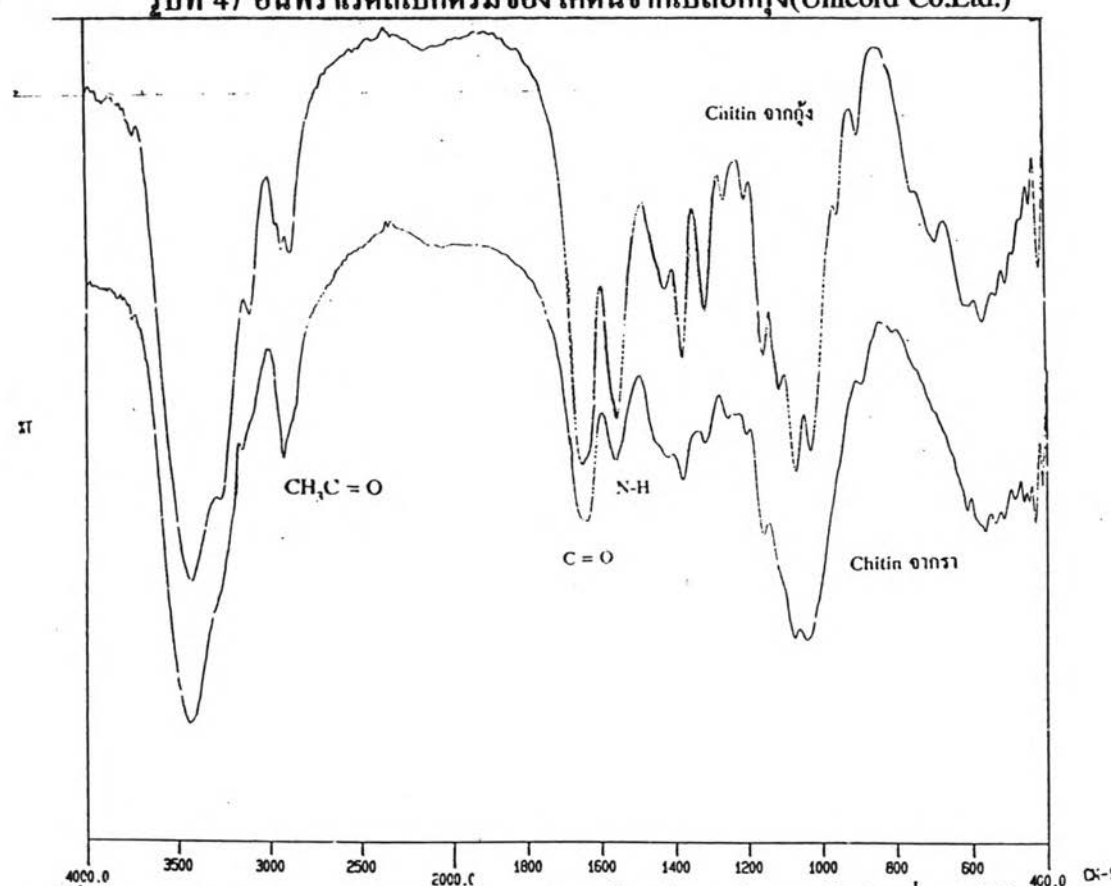
เมื่อได้ไคตินที่สกัดจากเซลล์ราอบแห้งแล้ว นำไคตินที่ได้มาทดสอบด้วยการใช้แสงอินฟราเรด (infrared spectroscopy) โดยใช้เครื่อง FT-IR (Perkin Elmer , model 1760X,USA) โดยใช้เทคนิค KBr disc ได้ผลดังรูปที่ 46 และอินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินจากเปลือกกุ้ง (Unicord Co.Ltd.) ในรูปที่ 47 จากนั้นเปรียบเทียบอินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินจากรากับไคตินจากเปลือกกุ้งแสดงได้ดังรูปที่ 48



รูปที่ 46 อินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินที่สกัดได้จากสายใยรา *Aspergillus niger*



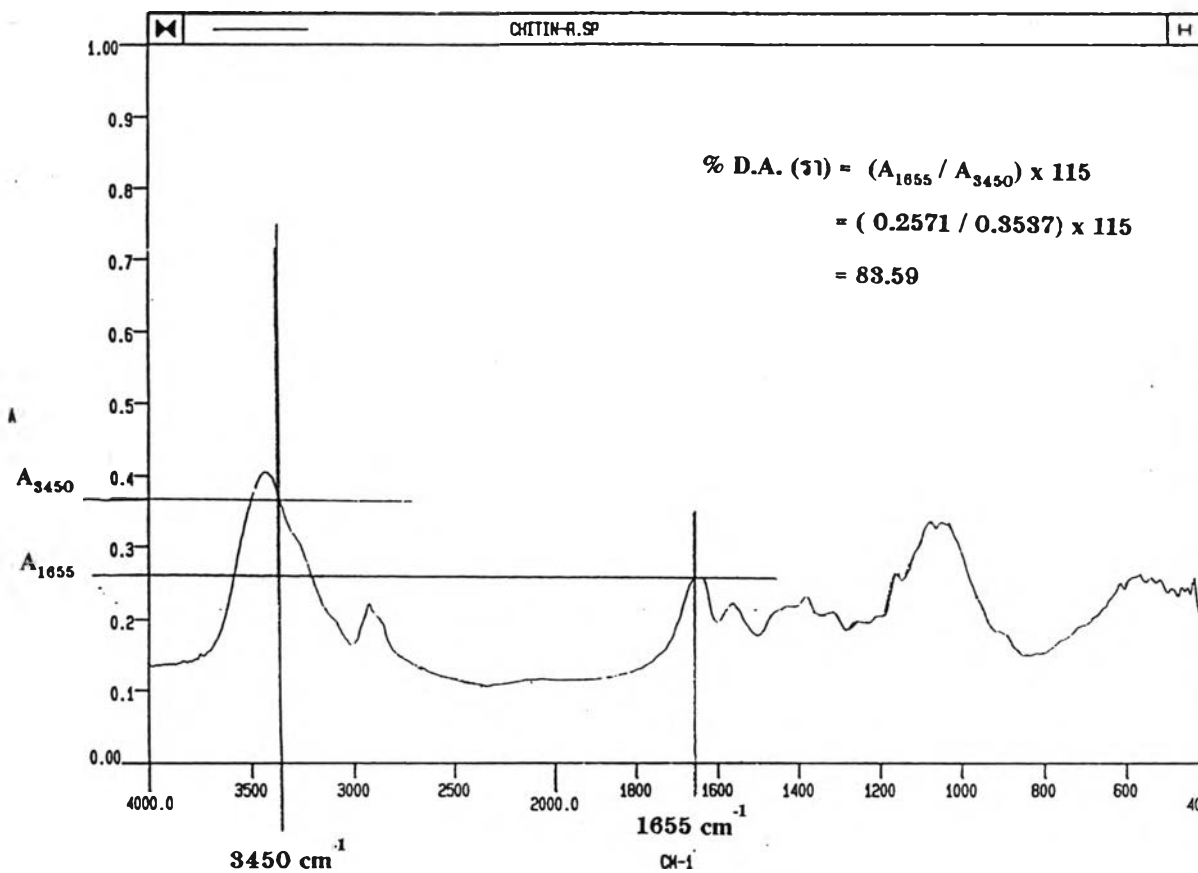
รูปที่ 47 อินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินจากเปลือกกุ้ง(Unicord Co.Ltd.)



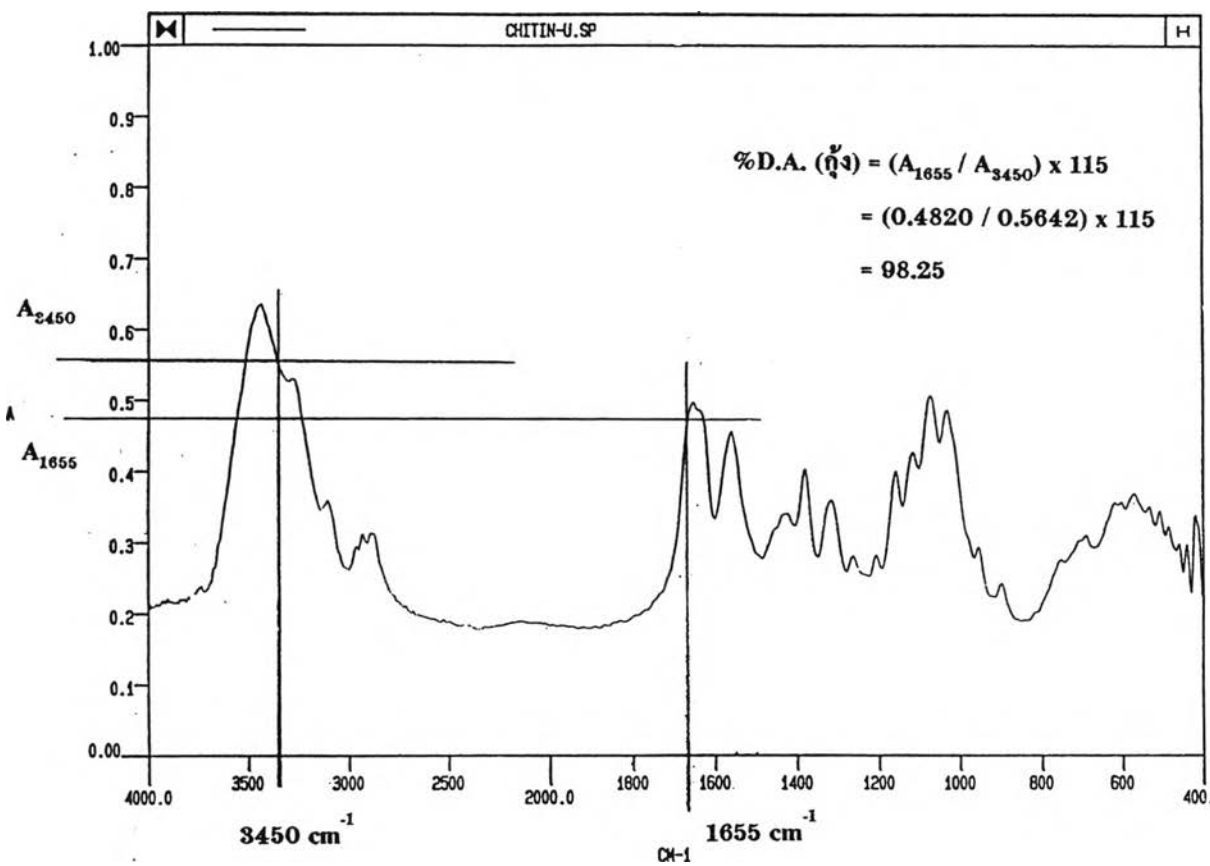
รูปที่ 48 อินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินจากกุ้งเปรียบเทียบกับไคตินที่สกัดได้จากเซลล์รา *Aspergillus niger*

จากรูปที่ 48 จะพบว่า อินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินที่สกัดได้จากราเมื่อเปรียบเทียบกับไคตินที่ได้จากกุ้ง ให้ตำแหน่งของหมู่ฟังก์ชันนัลที่สำคัญ คือ ให้ absorption band ที่สำคัญ คือ absorption band ของ carbonyl group (C=O) and amide (-NH) interaction จะพบที่เลขคลื่น 3255-3100 cm^{-1} และพบ absorption band ของ carbonyl group (C=O) พบที่เลขคลื่น 1650 cm^{-1} และ acetamido methyl group ($CH_3C=O$) ที่เลขคลื่น 2970-2940 cm^{-1} อีกทั้งพบ N-H bending ที่เลขคลื่น 1550 cm^{-1} เหมือนกันกับอินฟราเรดสเปกตรัมของไคตินจากเปลือกกุ้ง และยังพบกลุ่ม absorption band ของน้ำตาล ที่เลขคลื่นต่างๆ ดังนี้ 1425 cm^{-1} 1390 cm^{-1} 1310 cm^{-1} 1280 cm^{-1} 1050-1010 cm^{-1} ด้วย

คำนวณหาค่า Degree of Acetylation , (%D.A.) ได้จากกราฟของค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของไคตินที่สกัดได้จากรา *Aspergillus niger* และ กราฟค่าการดูดกลืนแสงอินฟราเรดของไคตินจากกุ้ง (Unicord Co.Ltd.) โดยใช้วิธีของ Robert (1992) โดยการคำนวณจากสูตร $\%D.A.=(A_{1655}/ A_{3450}) \times 115$ จากรูปที่ 49 และ 50 สามารถหาค่า %D.A. ของรามีค่าเท่ากับ 83.59% ค่า %D.A. ของกุ้งเท่ากับ 98.25% และเมื่อพิจารณาค่า %D.A. แล้วจะพบว่ามีค่าอยู่ในช่วงที่มากกว่า 60% จึงถือว่าเป็นไคตินซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Muzzarelli (1985) ที่กล่าวว่า ถ้ามีการดึงหมู่อะซิติลออกไปเกิน 60% จะเรียกไคตินนั้นว่าไคโตแซน



รูปที่ 49 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของอินฟราเรดของไคตินที่สกัดได้จากรา *Aspergillus niger* ในงานวิจัย และการคำนวณค่า % D.A.

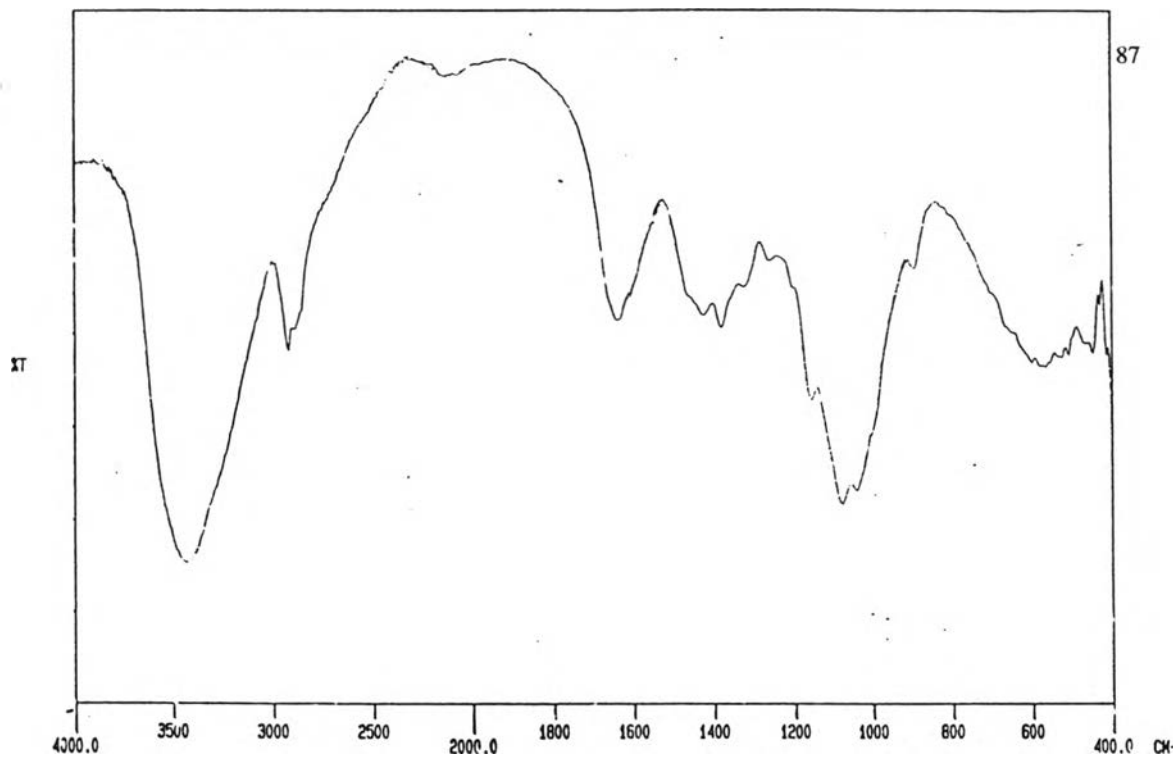


รูปที่ 50 กราฟค่าการดูดกลืนแสงของอินฟราเรดของไคตินจากกุ้ง (Unicord Co.Ltd.) และการคำนวณหาค่า %D.A.

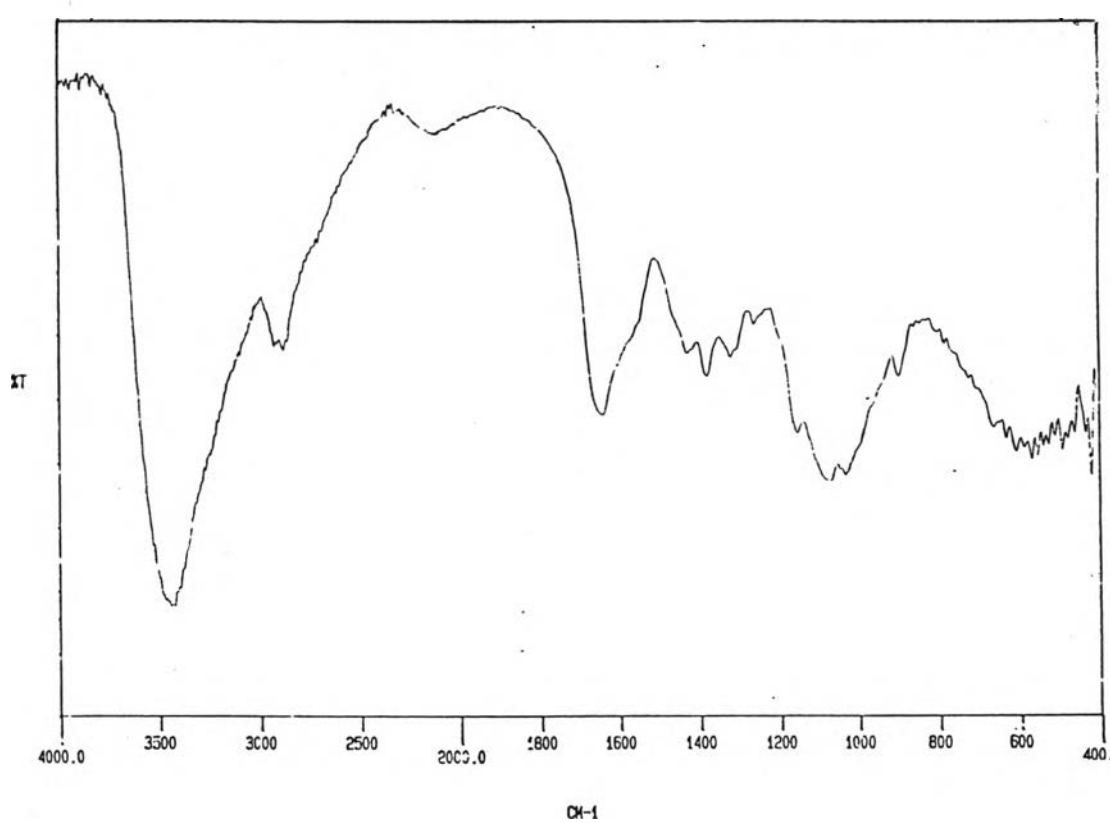
6. การเปลี่ยนไคตินให้เป็นไคโตแซนด้วยวิธีทางเคมี

เมื่อได้ไคตินจากขั้นตอนสกัดแล้วจะนำมาเปลี่ยนให้เป็นไคโตแซน ด้วยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 50% (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลังจากที่ทำการสกัดตามขั้นตอนแล้ว ล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง แล้วนำไปอบที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จะได้เป็นไคโตแซน ได้ดังรูปที่ 51 จากนั้นจะนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอินฟราเรดสเปกโตสโคปี (infrared spectroscopy) โดยใช้เครื่อง FT-IR (Perkin Elmer,model 1760X,USA) โดยใช้เทคนิค KBr disc ได้อินฟราเรดสเปกตรัมของไคโตแซนจากกุ้ง ในรูปที่ 52 และเปรียบเทียบกับไคโตแซนของรากับไคโตแซนของกุ้ง (Sigma,USA) ให้ผลได้ดังรูปที่ 53

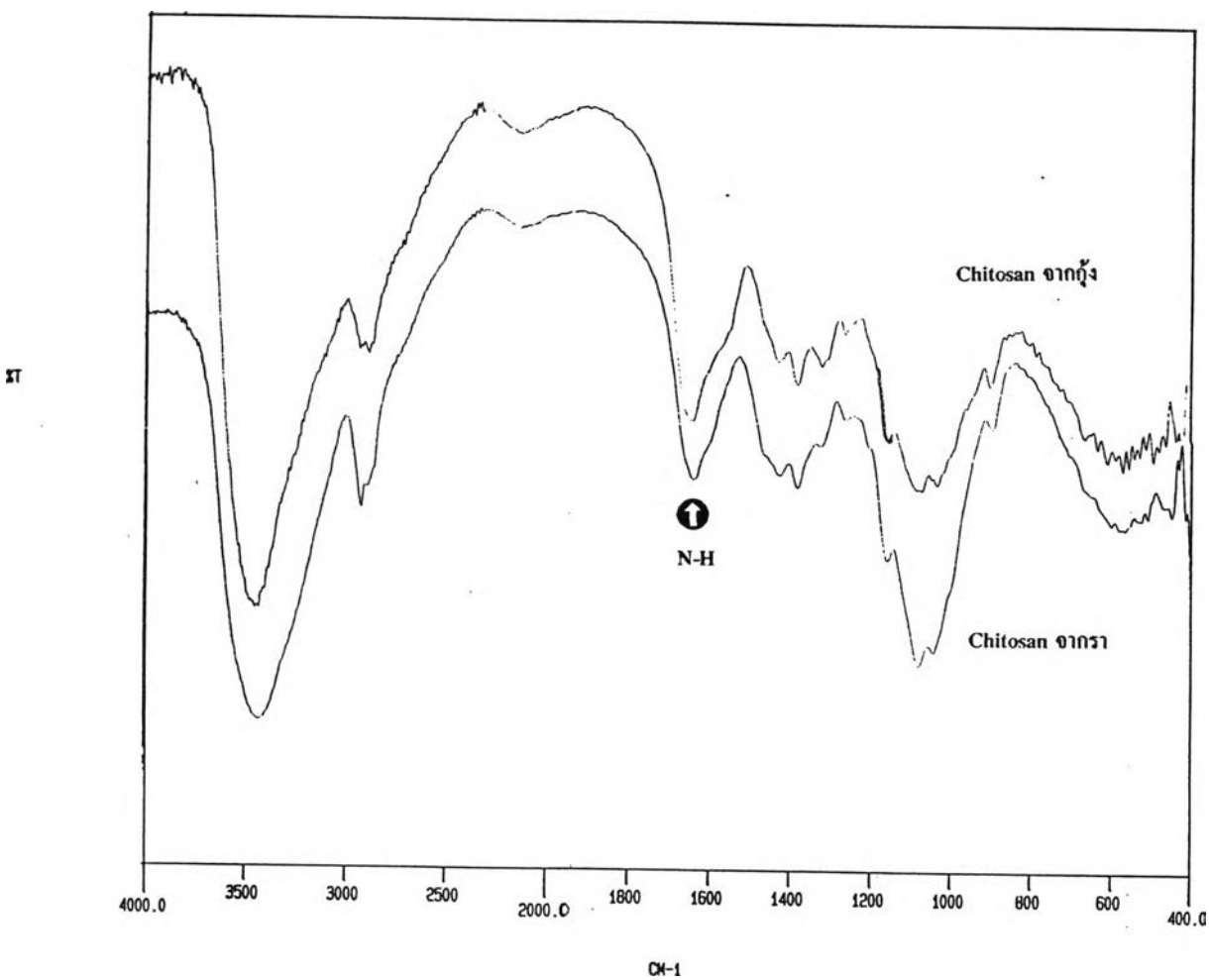
รูปที่ 51 ไคโตแซนจากกุ้ง (Sigma,U.S.A.) กับไคโตแซนที่ได้จากรา *Aspergillus niger*



รูปที่ 52 อินฟราเรดสเปกตรัมของไคโตแซนจากรา *Aspergillus niger* ที่ใช้จากงานวิจัย



รูปที่ 53 อินฟราเรดสเปกตรัมของไคโตแซนจากกุ้ง (Sigma, U.S.A.)



รูปที่ 54 อินฟราเรดสเปกตรัมของไคโตแซนจากกุ้งเปรียบเทียบกับไคโตแซนที่ได้จากรา *Aspergillus niger*

จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีอินฟราเรดสเปกตรัมของไคโตแซนจากราเปรียบเทียบกันกับไคโตแซนของกุ้ง ซึ่งให้ผลคล้ายกัน โดยมี absorption band ของไคติน ซึ่งให้ความเข้มลดลง ที่ absorption band หมู่คาร์บอนิลที่เลขคลื่น 1650 cm^{-1} และมี absorption band ของ primary amine มีความเข้มขึ้นในช่วงคลื่น 1650-1590 cm^{-1}

เมื่อได้ไคโตแซนจากราแล้วจะนำมาหาค่า Degree of Deacetylation (%D.D.) ด้วยการไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.0876 นอร์มัล โดยต้องเตรียมไคโตแซนให้อยู่ในรูปของไคโตแซนไฮโดรคลอไรด์ก่อน ซึ่งขั้นตอนการทำแสดงไว้ในวิธีการทดลองข้อ 11 ซึ่งผลการวิเคราะห์ให้ค่า %D.D. ของรามีค่าเท่ากับ 68.24% และให้ค่า %D.D. ของกุ้งมีค่าเท่ากับ 72.21% วิธีการคำนวณค่า %D.D. (ภาคผนวก ง)