ผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังและแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062

The Effect of Cassava Starch Concentration and Organic Nitrogen Source on Kojic Acid Production using *Aspergillus* sp. Mutant N-2062

เทอดศักดิ์ ขจรบุญ[1*] และวรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์[2]

Thirdsak Kajornboon and Vorapat Sanguanchaipaiwong

[1]นักศึกษาปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

[2]อาจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Abstract

The study was to investigate the effect of carbon concentration (cassava starch) and organic nitrogen sources on kojic acid production by mutant strain *Aspergillus* sp. N-2062. Cassava starch concentrations of 4, 6, 8 and 10% (w/v) and organic nitrogen sources (yeast extract, peptone, beef extract, casein hydrolysate, tryptone and corn steep liquor) at 0.5% (w/v) were investigated. The result showed that 10% of cassava starch gave the highest kojic acid production of 33.3 g/L. The optimal organic nitrogen source for kojic acid production were yeast extract and tryptone which yield statistically non-significant difference at concentration of 29.6 and 31.4 g/L respectively.

Keyword: *Kojic acid, Cassava starch, Aspergillus*

บทคัดย่อ

การศึกษาผลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (แป้งมันสำปะหลัง) และชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อรา *Aspergillus* sp. N-2062 สายพันธุ์กลาย โดยศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 4 6 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จากระดับแป้งที่ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (ยีสต์สกัด เปบโตน เนื้อสกัด เคซีนไฮโดรไลเซต ทริปโตน และน้ำแช่ข้าวโพด) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 33.3 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก คือ ยีสต์สกัด และทริปโตน ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ความเข้มข้น 29.6 และ 31.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: *กรดโคจิก แป้งมันสำปะหลัง แอสเปอร์จิลลัส*

บทนำ

กรดโคจิก (Kojic acid : 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4-pyrone) เป็นสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) (Yabuta, 1924) ส่วนใหญ่สร้างจากเชื้อราสกุล *Aspergillus* มีบทบาทสำคัญทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมเครื่องสำอางกลุ่มช่วยให้ผิวขาว (whitening agent) เนื่องจากยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส (tyrosinase) ที่ส่งผลต่อกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanogenesis) (Kahn *et al.*, 1995)

กรดโคจิกยังใช้ในด้านอื่นๆ เช่น การแพทย์เป็นยาบรรเทาอาการปวด (analgesic drug) (Beelik, 1956) สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) ต้านการเกิดลักษณะคล้ำในผักผลไม้ (Chen *et al.*, 1991) ด้านเกษตรกรรม (agriculture) สารอนุพันธ์กรดโคจิกมีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลง (pesticide) (Rosfarizan *et al.,* 2010) นอกจากนี้ยังใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ (biodegradable plastic) (Futamura *et al.,* 2001) เป็นต้น

จากความสำคัญข้างต้นจึงเป็นเหตุสนใจต่อการพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตกรดโคจิกด้วยการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกจากแป้งมันสำปะหลัง และเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโดยอาศัยแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์อื่นๆ ที่เหมาะสม เนื่องจากมีการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์แต่แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์จะให้ผลดีกว่า ในการผลิตกรดชนิดนี้ (Coupland and Niehaus, 1987 ; El-aasar, 2006) โดยแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูง ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด (Futamura *et al.*, 2001) เปปโตน (Coupland and Niehaus, 1987) หรือ ยีสต์สกัด (El-aasar, 2006) เป็นต้น

การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นหาปริมาณของแหล่งคาร์บอนและชนิดแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมซึ่งให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

วิธีการวิจัย

จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ในการศึกษา คือ *Aspergillus* sp. N-2062 ซึ่งถูกทำให้กลายพันธุ์ด้วยสารก่อการกลาย N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) (Sigma)

อาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการศึกษา

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาสภาวะที่เหมาะสมดัดแปลงจากสูตรของ Rosfarizan *et al.* (2002) 1 ลิตร ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 5 กรัม KH_2PO_4 1 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม และแป้งมันสำปะหลัง ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ส่วนอาหารทำกล้าสปอร์ใช้อาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) (Hi-media) อาหารทั้งสองชนิดฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา-เซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

การเตรียมกล้าสปอร์ของเชื้อ

นำสารละลายทวีน 80 เข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดอาหารวุ้นเอียงที่เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. N-2062 เป็นเวลา 7 วัน บนอาหาร PDA ใช้เข็มเขี่ยให้สปอร์หลุดออกจากเส้นใย จากนั้นนำสารละลายที่ได้ปั่นผสมเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายทวีนอีก 5 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นับปริมาณสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (Brand)

การศึกษาผลความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงโดยผันแปรระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ 4 6 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์

เมื่อได้ระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด จากนั้นหาสภาวะที่เหมาะสมของชนิดแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ 6 ชนิด ประกอบด้วย ยีสต์สกัด (Hi-media) เคซีนไฮโดรไล-เซต (Hi-media) เนื้อสกัด (Biomark) น้ำแช่ข้าวโพด (Sigma) เปปโตน (Biomark) และทริปโตน (Difco) โดยใช้ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร ตามสูตรเริ่มแรก

สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

ในการทดลองเติมสารแขวนลอยสปอร์ให้มีจำนวนสปอร์สุดท้ายเมื่ออยู่ในอาหารเท่ากับ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (รุ่น IS-97IR บริษัท Lab companion) เขย่าที่ 180 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 6 วัน ตั้งแต่วันที่ 2 จนถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ทำการเก็บทั้งฟลาสก์ทั้งสิ้น 3 ซ้ำ ตรวจสอบค่าต่างๆ ประกอบด้วย ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณกรดโคจิก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ตามลำดับ

การวิเคราะห์

การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดเป็นด่างใช้เครื่องวัด pH (รุ่น UB-10 บริษัท Denver) ปริมาณกรดโคจิกทำการตรวจวัดตามวิธีของ Bentley (1957) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดใช้วิธี Phenol-sulfuric method ของ Dubois (1956) และกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (Bernfeld *et al.,* 1955) ตามลำดับ

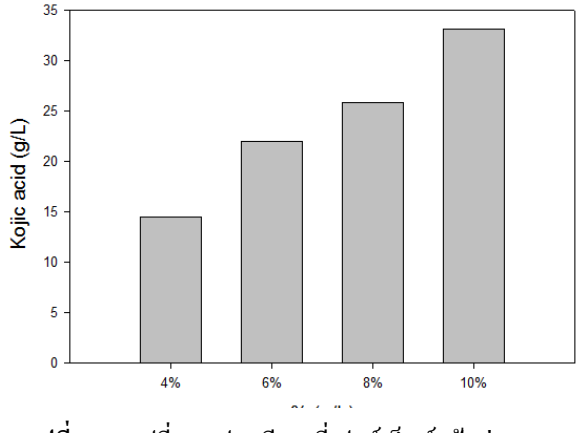
การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

การวิจัยครั้งนี้ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบเชิงซ้อนโดยใช้การเปรียบเทียบแบบ Duncan's New Multiple Ramge Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

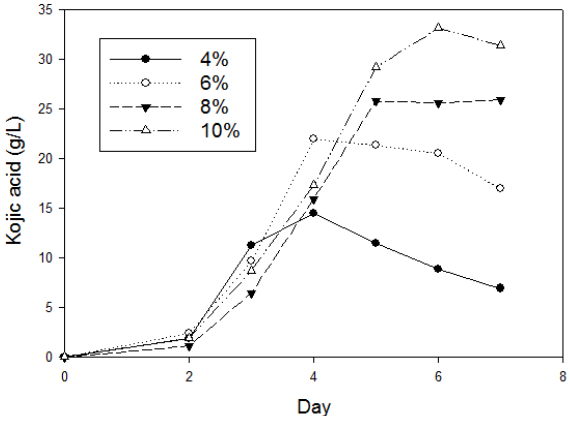
ผลการวิจัย

ผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังต่อการผลิตกรดโคจิก

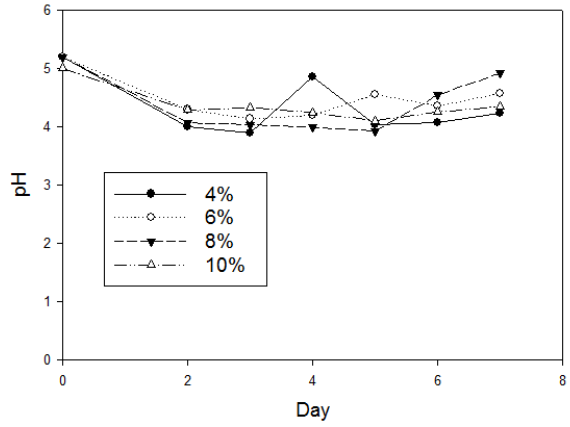
เมื่อเพาะเลี้ยงโดยผันแปรค่าความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังที่ระดับต่างๆ พบว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังปริมาณการผลิตกรดโคจิกของเชื้อจะเพิ่มขึ้น โดยระดับแป้งมันสำปะหลังที่ 4 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 14.5 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ได้ 22.1 กรัมต่อลิตร ทั้งสองระดับความเข้มข้นให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันเดียวกัน คือ วันที่ 4 ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ให้ความเข้มกรดโคจิกสูงสุดที่ 26.0 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดโคจิกถึง 33.3 กรัมต่อลิตรในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงและให้ปริมาณกรดโคจิกสูงที่สุด (ถ้าใช้ความเข้มข้นของแป้งมากกว่านี้แป้งจะมีความหนืดสูงจนไม่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ทดลอง)ขณะเชื้อเจริญและผลิตกรดโคจิกเกิดการเปลี่ยนแปลงระดับค่าความเป็นกรดเป็นด่างไม่มากนักในช่วงประมาณ 4.2 ถึง 5.2 เมื่อระดับกรดโคจิกมากขึ้นระดับของค่าความเป็นกรดเป็นด่างจะค่อยๆ ลดลง และจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งเมื่อการผลิตกรดโคจิกลดลงในวันท้ายๆ ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลทั้งหมดเห็นได้ว่าที่ทุกระดับความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเชื้อสามารถใช้แป้งได้เกือบหมดเหลือแป้งเพียงเล็กน้อยสังเกตจากค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงเพียง 0.5 ถึง 0.8 กรัมต่อลิตร เท่านั้น

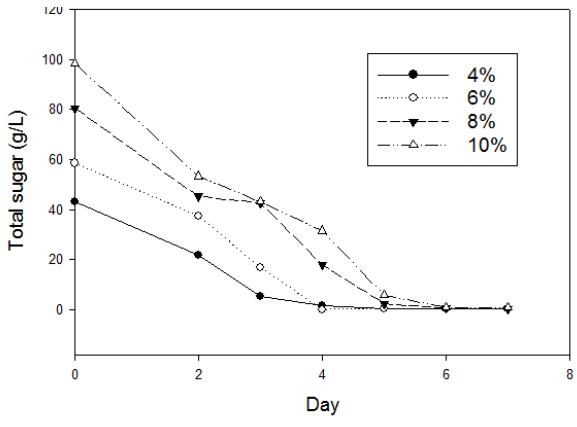


รูปที่ 1 กรดโคจิกสูงสุดที่เปอร์เซ็นต์แป้งต่างๆ



รูปที่ 4 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลทั้งหมดที่เปอร์เซ็นต์แป้ง





แต่การลดลงของค่าน้ำตาลทั้งหมดจะแตกต่างกันยิ่งความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้นสูงการลดลงของค่าน้ำตาลทั้งหมดจะช้ากว่าระดับความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งที่ต่ำกว่า ซึ่งลักษณะของอาหารหลังเตรียมมีลักษณะหนืดที่ระดับเปอร์เซ็นต์ของแป้งสูงเมื่อเทียบกับที่ต่ำ ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลงไม่คงที่แตกต่างกันตามปริมาณของแป้งเริ่มต้น ส่วนใหญ่ช่วงต้นกิจกรรมจะเพิ่มสูงขึ้น และลดลงหลังจากที่เพิ่มแล้ว ส่วนช่วงวันท้ายๆ ของการเพาะเลี้ยงกิจกรรมเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นอีก (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

ส่วนค่าพารามิเตอร์ ประกอบด้วย การผลิตสูงสุด (P_{max}) ความสามารถในการผลิต (Productivity) และผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อการใช้สับสเตรท ($Y_{p/s}$) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าความสามารถในการผลิตต่ำสุด ส่วนความเข้มข้นอื่นๆ ให้ค่าความสามารถในการผลิตไม่แตกต่างกันมากนัก (ตารางที่ 1) ในขณะที่ค่าความสามารถในการเปลี่ยนสับสเตรทเป็นผลิตภัณฑ์ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันไม่ว่าจะใช้ความเข้มข้นของแป้งที่ระดับความเข้มข้นใด

ตารางที่ 1 พารามิเตอร์การผลิตกรดโคจิกที่เปอร์เซ็นต์แป้งต่างๆ

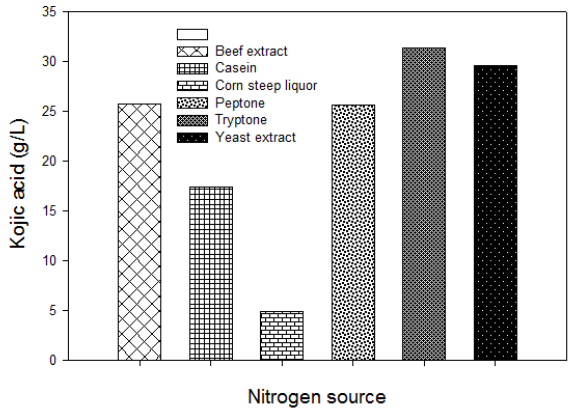
ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	P_{max} (กรัม/ลิตร)	Productivity (กรัม/ลิตร.วัน)	$Y_{p/s}$ (กรัม/กรัม)
4%	14.5 ± 1.7^{c}	3.6	0.35
6%	22.1 ± 1.1^{b}	5.5	0.38
8%	26.0 ± 0.6^{b}	5.2	0.33
10%	33.3 ± 1.4^{a}	5.6	0.34

ที่ระดับความเชื่อมัน 95 เปอร์เซ็นต์

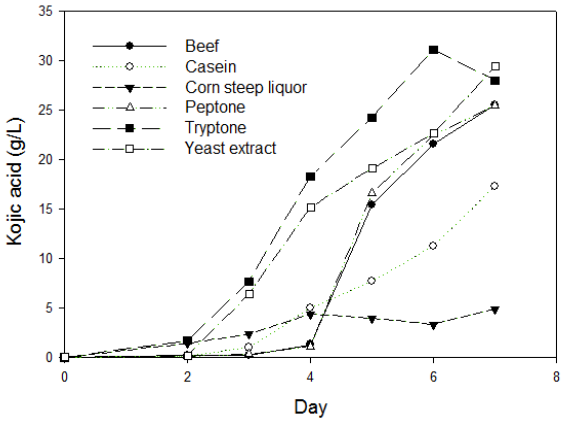
ผลของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่อการผลิตกรดโคจิก

ผลการศึกษาเพื่อหาชนิดแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์สำหรับการผลิตกรดโคจิก จากสูตรเดิมซึ่งใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มาทดสอบแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น พบว่ายีสต์สกัดและทริปโตนให้ปริมาณของกรดโคจิกสูงสุดทั้งคู่ (ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์) น้ำแช่ข้าวโพดให้ผลต่อการผลิตกรดโคจิกน้อยที่สุด ในขณะที่เนื้อสกัดและเปปโตนให้ผลการผลิตกรดโคจิกไม่แตกต่างกันทางสถิติ กรณีของเนื้อสกัดและเปปโตนให้รูปแบบการผลิตกรดโคจิกคล้ายคลึงกันมาก แหล่งไนโตรเจนทั้งสองชนิดให้ปริมาณกรดโคจิกรองจากยีสต์สกัดและทริปโตน ส่วนเคซีนไฮโดรไลเซตให้ปริมาณกรดโคจิกมากกว่าน้ำแช่ข้าวโพดแต่น้อยกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหลือ พบว่าเคซีนไฮโดรไลเซตให้ผลต่อการสร้างชีวมวล (biomass) ของเชื้อมากกว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดอื่นๆ

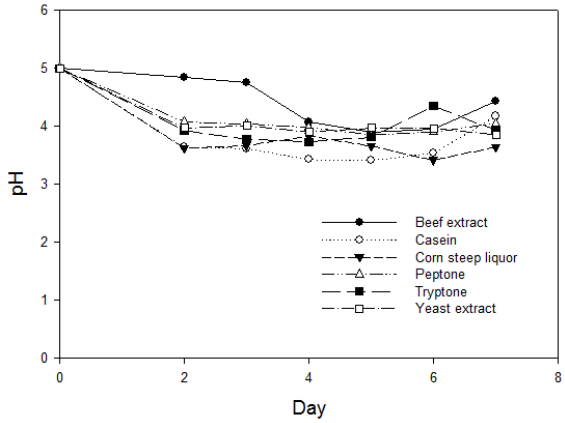
ส่วนค่าความเป็นกรดเป็นด่างพบว่าให้ผลการเปลี่ยนแปลงไม่แตกต่างกัน อีกทั้งมีรูปแบบคล้ายคลึงกัน โดยค่าความเป็นกรดเป็นด่างเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 3.4-5.0 และเมื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงปริมาณแป้งมันสำหลังซึ่งพิจารณาในรูปน้ำตาลทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า แหล่งไนโตรเจนทุกชนิดทำให้แป้งค่อยๆ ลด



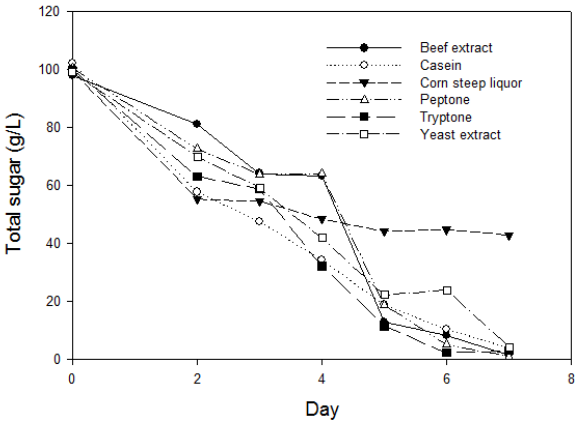
รูปที่ 5 กรดโคจิกสูงสุดในแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดต่างๆ



รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงกรดโคจิกในแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์



รูปที่ 7 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิด



รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลทั้งหมดในแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดต่างๆ

ปริมาณลงจนเกือบหมดยกเว้นน้ำแช่ข้าวโพดที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลือประมาณ 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งคงที่ตั้งแต่วันที่ 4 ถึงวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง เคซีนไฮโดรไลเซตให้อัตราการลดลงของน้ำตาลทั้งหมดมากที่สุดในสามวันแรกของการเพาะเลี้ยง ส่วนเนื้อสกัดและเปปโตนยังให้รูปแบบการลดลงของน้ำตาลทั้งหมดคล้ายคลึงกันมาก เช่นเดียวกับการผลิตกรดโคจิก โดยแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่าความสามารถในการผลิตกรดโคจิกและการเปลี่ยนสับสเตรทเป็นผลิตภัณฑ์สูง คือ ยีสต์สกัดและทริปโตน รองลงมาเป็นเนื้อสกัดและเปปโตนซึ่งให้ค่าเท่ากัน (ดังตารางที่ 2) เคซีนไฮโดรไลเซตและน้ำแช่ข้าวโพดให้ค่าลดหลั่นลงมา ตามลำดับ

ตารางที่ 2 พารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ต่างๆ

แหล่งไนโตรเจน	P_{max} (กรัม/ลิตร)	Productivity (กรัม/ลิตร.วัน)	$Y_{p/s}$ (กรัม/กรัม)
ยีสต์สกัด	29.6 ± 1.1^{a}	4.2	0.32
เคซีนไฮโดรไลเซต	17.4 ± 0.5^{c}	2.5	0.18
เนื้อสกัด	25.7 ± 0.8^{b}	3.7	0.27
น้ำแช่ข้าวโพด	4.9 ± 0.6^{d}	0.7	0.08
เปปโตน	25.6 ± 2.2^{b}	3.7	0.26
ทริปโตน	31.4 ± 1.2^{a}	5.2	0.32

ที่ระดับความเชื่อมัน 95 เปอร์เซ็นต์

อภิปรายผลการวิจัย

เมื่อให้ปริมาณของแป้งเพิ่มขึ้นเชื้อราสามารถใช้เอนไซม์อะไมเลสเปลี่ยนพอลิเมอร์ของแป้งจากสายยาวเป็นสายที่สั้นลง เช่น โอลิโกแซคคาร์ไรด์ น้ำตาลโมเลกุลคู่ หรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เนื่องจากกรดโคจิกมีการเปลี่ยนแปลงโดยตรงจากน้ำตาลกลูโคส (Bently, 2006) ดังนั้นถ้าแป้งเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กลูโคสได้มากจะทำให้เชื้อสามารถสร้างกรดโคจิกได้มากเช่นกัน แต่ปริมาณของแป้งมันสำปะหลังที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อคอลลอยด์ของแป้ง คือ เกิดความหนืดที่สูงทำให้เชื้อมีการเจริญในช่วงต้นค่อนข้างช้า เนื่องจากต้องอาศัยการย่อยของเอนไซม์อะไมเลสก่อน แต่เนื่องจากความหนืดทำให้อัตราการถ่ายเทออกซิเจนลดลง (Stanbury *et al.*, 1995) ผลคือทำให้อัตราการเจริญลดลงตาม ดังนั้นการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจึงลดปริมาณลงเช่นเดียวกัน

แต่ระดับของแป้งมันสำปะหลัง 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถรักษาสมดุลของการเจริญ การใช้สับสเตรท และการสร้างกรดโคจิก สังเกตจากค่าความสามารถในการเปลี่ยนสับสเตรทเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่แตกต่างกันระหว่างความเข้มข้นของแป้งแต่ละระดับ แต่ถ้าเพิ่มปริมาณแป้งมากกว่านี้อาจส่งผลในทางลบต่อการเจริญและการผลิตกรดของเชื้อได้เนื่องจากเหตุผลเกี่ยวกับอัตราการถ่ายเทออกซิเจนซึ่งสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์พบว่ายีสต์สกัดและทริปโตนให้ผลการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด เนื่องจากยีสต์สกัดนอกจากจะเป็นแหล่งของไนโตรเจนแล้วยังเป็นแหล่งของวิตามินบีเพราะจากงานของ Megalla *et al.* (1986) พบว่าเมื่อเติมสารประกอบเชิงซ้อนของทองแดงกับกรดนิโคตินิก (copper(I)-nicotinic acid complex) ที่เป็นสารกลุ่มวิตามินบี 3 และเป็นองค์ประกอบของโคเอนไซม์ NAD และ NADP สำหรับปฏิกิริยาดีไฮเดรจี-เนชัน (dehydrogenation) มีงานวิจัยพบว่าทำให้ *Aspergillus flavus* ผลิตกรดโคจิกสูงขึ้นจากเดิม 47 เปอร์เซ็นต์ เพราะชีวสังเคราะห์ของการผลิตกรดโคจิกมีวิถีการเปลี่ยนแปลงประกอบด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันจากเอนไซม์กลุ่มกลูโคสดีไฮโดร-จีเนส (glucose dehydrogenase) และกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส (gluconate dehydrogenase) จึงเป็นไปได้ที่ยีสต์สกัดจะให้ผลการผลิตกรดโคจิกที่สูง โดยให้สูงกว่าเนื้อสกัด เปปโตน และเคซีนไฮโดรไล-เซต เพราะแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 แหล่งมีค่าไนโตรเจนทั้งหมดสูงกว่ายีสต์สกัด ดังนั้นจึงทำให้ค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอน

ต่อไนโตรเจนต่ำกว่ายีสต์สกัด ผลคือทำให้เชื้อมีแนวโน้มใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญมากกว่า (Ariff *et al.,* 1996) จึงให้ผลการผลิตกรดโคจิกลดลง

กรณีของน้ำแช่ข้าวโพดที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำที่สุดซึ่งไม่สอดคล้องกับ Futamura *et al*. (2001) พบว่าน้ำแช่ข้าวโพดให้ผลการผลิตกรดโคจิกได้เป็นอย่างดีในถังหมักแบบอากาศยกตัว (airlift fermenter) ขนาด 2 ลิตร แต่ใช้ความเข้มข้นเพียง 0.2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าการทดลองนี้ อาจเป็นไปได้ว่าระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้สูงเกินไปจนมีผลต่อกระบวนการเจริญเติบโตหรือกระบวนการสร้างเอนไซม์อะไมเลส

แหล่งไนโตรเจนทุกชนิดให้ค่าการเปลี่ยนแปลงของกรดและด่างไม่ต่ำหรือสูงเกินไป เพราะจากงานวิจัยของ Rofarizan *et al*. (2000) พบว่าถ้าให้ระดับของค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น 2 คือ ต่ำเกินไปเชื้อจะมีการปรับตัวในระยะ lag phase นาน ชี้ให้เห็นว่าค่าความเป็นกรดเป็นด่างที่เปลี่ยนแปลงหลังจากใช้แหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและอาจส่งผลต่อการผลิตกรดโคจิก สาเหตุที่ค่าของกรดและด่างไม่เปลี่ยนไปมากนักเนื่องจากแหล่งไนโตรเจนทุกชนิดมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบธรรมชาติของกรดอะมิโนมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ซึ่งสามารถต้านการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดเป็นด่างได้ ดังนั้นค่าความเป็นกรดเป็นด่างจึงไม่ส่งผลต่อการผลิตกรดโคจิก

ฉะนั้นปริมาณของแป้งมันสำปะหลังที่เพิ่มขึ้นจะส่งเสริมความสามารถในการผลิตกรดโคจิกซึ่งที่ระดับความเข้ม 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณการผลิตกรดโคจิกสูงสุด ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ผลิตกรดโคจิก คือ ยีสต์สกัดและทริปโตน ขณะที่น้ำแช่ข้าวโพดไม่เหมาะที่จะใช้ในการผลิตกรดโคจิกที่ระดับความเข้มข้นนี้ ส่วนเนื้อสกัดและเปปโตนมีคุณสมบัติต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิกคล้ายคลึงกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารอ้างอิง

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

Beelik, A. 1956. Kojic acid. Adv. Carbohydr. Chem. 11: 145-183. Bajpai, P., Agrawala, P.K., and Vishwanathan,

L. 1981. Enzymes relevant to kojic acid biosynthesis in *Aspergillus flavus*. J. Gen. Microbiol. 127: 131-136.

Bentley, R. 1957. Preparation and analysis of kojic acid. Method Enzymol. 3: 238-241. Bentley, R. 2006. From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid. Nat. Prod. Rep. 23: 1046-1062.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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