

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การคัดแยกที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้ง

จากการนำตัวอย่างดินจากไร่มันสำปะหลังและตัวอย่างมันประเภทต่าง ๆ เช่น กากมันสำปะหลัง มันเส้นและมันแวน โดยนำตัวอย่างมาแยกเชื้อบนอาหาร Starch agar เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญของราทุกวันจนกระทั่งพบการเจริญ สามารถแยกได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลท ซึ่งมีลักษณะที่สังเกตได้ขณะเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ลักษณะราที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินและตัวอย่างมันประเภทต่าง ๆ

แหล่งที่มา	ไอโซเลท	ลักษณะโตโดเนบนอาหารแข็ง	ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์
กากมันสด	2-34	เส้นใยสีขาวแผ่	เส้นใยมีผนังกันไม่พบสปอร์
		กระจายเป็นวงกลม	
มันแวน	3-32	เส้นใยมีสีขาวแผ่	เส้นใยมีผนังกัน
		กระจายเป็นวงกลม	พบ Conidiospores
	8-32	มีสปอร์สีดำ	
		เส้นใยมีสีขาวแผ่	เส้นใยมีผนังกัน
	9-32	กระจายเป็นวงกลม	พบ Conidiospores
		มีสปอร์สีดำ	
ดิน+มันเส้น	6-61	เส้นใยมีสีขาวแผ่	เส้นใยมีผนังกัน
		กระจายเป็นวงกลม	พบ Conidiospores
		มีสปอร์สีเขียว	
		อมเหลือง	

ตารางที่ 4-1 (ต่อ)

แหล่งที่มา	ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนีบน อาหารแข็ง	ลักษณะภายใต้กล้อง จุลทรรศน์
แป้งมัน	7-73	เส้นใยฟูมีสีขาวแผ่ กระจายเป็นวงกลม มีสปอร์สีเขียว อมเหลือง	เส้นใยมีผนังกัน พบ Conidiospores
กากมันสำปะหลัง	10-85	เส้นใยฟูสีเทา แผ่กระจายเป็นวงกลม	เส้นใยมีผนังกัน พบ Macroconidia
	4-83	เส้นใยมีสีขาวแผ่ กระจายเป็นวงกลม มีสปอร์สีเหลือง	เส้นใยมีผนังกัน พบ Conidiospores
	5-82	เส้นใยสีขาว แผ่กระจายเป็น วงกลม มีสปอร์สีดำ	เส้นใยมีผนังกัน พบ Conidiospores
	11-74	เส้นใยฟูสีดำปนเทา แผ่กระจายเป็นวงกลม ไม่มีสปอร์	เส้นใยมีผนังกัน ไม่ พบสปอร์

การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายแป้งของรา

จากการนำราที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้งได้จำนวน 10 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ มาทดสอบการย่อยสลายแป้งบนอาหารแข็ง Starch agar นอกจากนั้นในการศึกษานี้ยังได้นำรา *Aspergillus oryzae* TISTR3018 ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายแป้งและเป็นสายพันธุ์ที่มีปริมาณไคตินสูงมาเป็นสายพันธุ์อ้างอิง (ภาพภาคผนวก ง-1) พบว่าความสามารถในการย่อยสลายแป้งของราแต่ละไอโซเลทแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยวัดจากค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดโซนใสและขนาดของโคโลนี (ตารางที่ 4-2) ซึ่งพบว่าราไอโซเลท 2-34 และ *A. oryzae* TISTR3018 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายแป้งได้ดีที่สุดมีค่าเท่ากับ 1.58 และ 1.30 ตามลำดับ ($p < 0.05$) รองลงมาได้แก่ราไอโซเลท 10-85 และ 5-82 มีค่าเท่ากับ 1.13 และ 1.07 ตามลำดับ ($p > 0.05$) ส่วนราไอโซเลทอื่น ๆ คือ 3-32, 4-83, 6-61, 7-73, 8-32, 9-32 และ 11-74 มี

ประสิทธิภาพในการย่อยแป้งไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) คือมีค่าอัตราส่วนขนาดไซนัสต่อขนาดโคโลนีอยู่ในช่วง 1.02-1.04

ตารางที่ 4-2 ประสิทธิภาพการย่อยสลายแป้งของรา 11 ไอโซเลท โดยเฉพาะเลี้ยงราที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

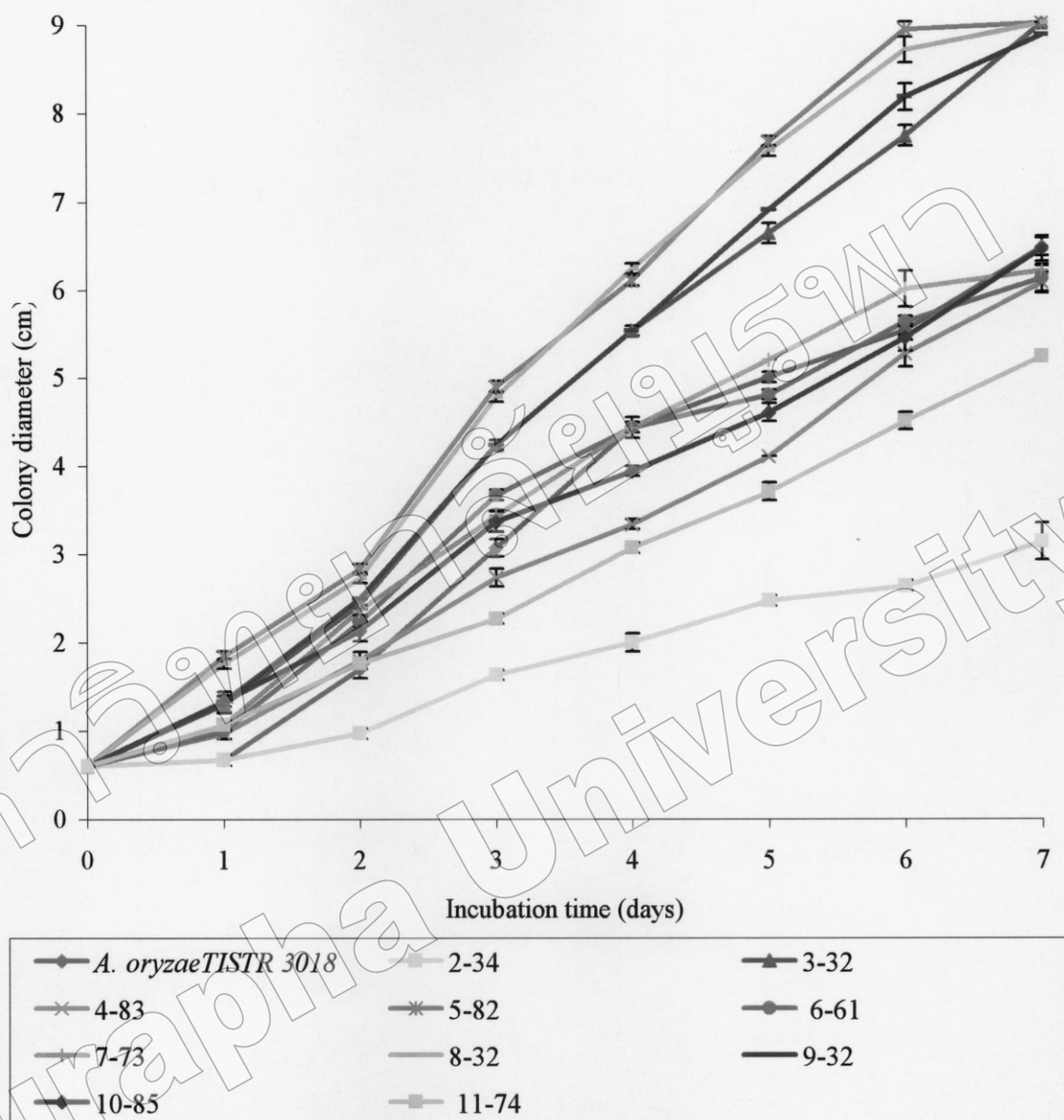
ไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (เซนติเมตร)	ขนาดไซนัส (เซนติเมตร)	อัตราส่วน ขนาดไซนัส : ขนาดโคโลนี
<i>A. oryzae</i> TISTR3018	4.03±0.12	5.23±0.15	1.30 ^b
2-34	1.90±0.20	3.00±0.10	1.58 ^a
3-32	5.40±0.20	5.60±0.17	1.04 ^c
4-83	3.40±0.10	3.50±0.10	1.03 ^c
5-82	6.16±0.15	6.60±0.20	1.07 ^c
6-61	4.43±0.21	4.53±0.06	1.02 ^c
7-73	4.50±0.10	4.60±0.10	1.02 ^c
8-32	5.93±0.25	6.07±0.06	1.02 ^c
9-32	5.27±0.21	5.50±0.10	1.04 ^c
10-85	3.90±0.10	4.40±0.10	1.13 ^c
11-74	3.07±0.06	3.20±0.10	1.03 ^c

หมายเหตุ a,b,c หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

การศึกษาการเจริญของราในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1 การเจริญบนอาหารแข็ง

จากการนำราที่แยกได้จากตัวอย่างดินไร่มันสำปะหลังและตัวอย่างมันประเภทต่าง ๆ ทั้ง 10 ไอโซเลท และ *A. oryzae* TISTR3018 มาศึกษาการเจริญบนอาหาร starch agar บันทึกการเจริญของราโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกวันเป็นเวลา 7 วัน พบว่าราแต่ละไอโซเลทมีความสามารถในการเจริญบนอาหารดังกล่าวได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ภาพที่ 4-1) ราที่เจริญได้เร็วได้แก่ 5-82, 8-32, 9-32 และ 3-32 รองลงมาได้แก่ 7-73, 6-61, 10-85, *A. oryzae* TISTR3018, 4-83 และ 11-74 ส่วนราที่เจริญได้ช้าที่สุดคือ 2-34



ภาพที่ 4-1 การเจริญของรา 11 ไอโซเลท บนอาหารแข็ง Starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2 การเจริญในอาหารเหลว

นําราท้งหมด 11 ไอโซเลท มาศึกษาการเจริญในอาหาร Starch broth โดยให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นในอาหารเป็น 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จัดชุดการทดลองแบบ Batch เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ AIF และกลูโคซามีนด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Elson-morgan (Johnson, 1971)

เมื่อพิจารณาในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าราไอโซเลท 5-82 มีการเจริญที่ดีและให้ปริมาณ AIF สูงสุดคือ 5.71 ± 0.66 กรัมต่อลิตร รองลงมาได้แก่ราไอโซเลท 9-32, 8-32, 10-85, 6-61, 7-73, 3-32, 4-83, 2-34, *A. oryzae* TISTR3018 มีค่า AIF ของเส้นใยอยู่ในช่วง 4.41 ± 0.21 ถึง 1.50 ± 0.20 กรัมต่อลิตร ส่วนราไอโซเลท 11-74 พบว่ามีปริมาณ AIF น้อยที่สุดคือ 1.12 ± 0.20 กรัมต่อลิตร

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนที่มีอยู่ในผนังเซลล์ พบว่าราไอโซเลท 10-85 ให้ค่าสูงสุด 206.06 ± 5.99 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF รองลงมาได้แก่ *A. oryzae* TISTR3018 มีค่ากับ 189.17 ± 8.16 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF ส่วนราไอโซเลท 7-73, 4-83, 6-61, 11-74, 5-82, 3-32, 9-32, 8-32 มีค่าอยู่ในช่วง 180.27 ± 0.50 ถึง 109.36 ± 4.79 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF และราไอโซเลท 2-34 ให้ปริมาณกลูโคซามีนในผนังเซลล์น้อยที่สุดคือ 18.33 ± 0.21 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF (ปริมาณกลูโคซามีนต่อ 1 หน่วย AIF คือคำนวณปริมาณกลูโคซามีนเทียบกับองค์ประกอบที่เป็นผนังเซลล์เท่านั้น ไม่รวมองค์ประกอบอื่น ๆ ที่ถูกกำจัดออกไปโดยการย่อยด้วย NaOH และ HCl)

ส่วนปริมาณผลผลิตกลูโคซามีนที่ได้ทั้งหมดจากการเพาะเลี้ยงราแต่ละไอโซเลทในอาหาร Starch broth พบว่าราไอโซเลท 5-82 ให้ผลผลิตกลูโคซามีนสูงสุดคือ 0.81 ± 0.09 กรัมต่อลิตร และราไอโซเลท 10-85 ให้ปริมาณมากเป็นอันดับสองคือ 0.66 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ส่วนราไอโซเลทอื่น ๆ ให้ค่ารองลงมาตามลำดับคือ 9-32, 6-61, 8-32, 7-73, 4-83, *A. oryzae* TISTR3018, 3-32, 11-74 มีค่าอยู่ในช่วง 0.49 ± 0.00 ถึง 0.18 ± 0.04 กรัมต่อลิตร และปริมาณผลผลิตกลูโคซามีนที่ได้น้อยที่สุดได้แก่ราไอโซเลท 2-34 โดยให้ค่าเท่ากับ 0.03 ± 0.01 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4-3)

ตารางที่ 4-3 ปริมาณ AIF และผลผลิตกลูโคซามีนของรา 11 ไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch broth

ไอโซเลท	AIF (g/L)	Glucosamine (mg/g AIF)	Glucosamine yield (g/L)
<i>A. oryzae</i> TISTR3018	1.50±0.20 ^{gh}	189.17±8.16 ^b	0.28±0.05 ^c
2-34	1.57±0.36 ^{fg}	18.33±0.21 ^h	0.03±0.01 ^g
3-32	2.01±0.09 ^{cf}	126.10±4.38 ^f	0.25±0.02 ^c
4-83	1.77±0.11 ^{fg}	177.42±8.84 ^c	0.31±0.02 ^c
5-82	5.71±0.66 ^a	141.22±3.27 ^c	0.81±0.09 ^a
6-61	2.73±0.82 ^d	172.04±7.70 ^c	0.47±0.01 ^{cd}
7-73	2.32±0.04 ^{de}	180.27±0.50 ^{bc}	0.42±0.01 ^d
8-32	4.09±0.07 ^b	109.36±4.79 ^g	0.45±0.03 ^{cd}
9-32	4.41±0.21 ^b	110.72±4.36 ^g	0.49±0.00 ^c
10-85	3.18±0.02 ^c	206.06±5.99 ^a	0.66±0.02 ^b
11-74	1.12±0.20 ^h	158.84±6.97 ^d	0.18±0.04 ^f

หมายเหตุ ^{a,b,c...} หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

เมื่อพิจารณาถึงผลผลิตกลูโคซามีนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงราในอาหาร Starch broth พบว่ามีราไอโซเลท 5-82 มีผลผลิตกลูโคซามีนสูงที่สุด (0.81±0.09 กรัมต่อลิตร) อีกทั้งราไอโซเลทนี้ยังมีการเจริญสูงที่สุดด้วย โดยวัดจากปริมาณผนังเซลล์ หรือ AIF ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.71±0.66 กรัมต่อลิตร ราไอโซเลทที่มีผลผลิตกลูโคซามีนรองลงมา (0.66±0.02 กรัมต่อลิตร) ได้แก่ 10-85 และยังพบว่าราไอโซเลทนี้มีปริมาณกลูโคซามีนเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์สูงที่สุด (206.06±5.99 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF) ราทั้งสองไอโซเลทดังกล่าวจึงมีความน่าสนใจในการที่จะนำมาศึกษาในขั้นต่อไป ดังนั้นจึงเลือกราไอโซเลท 5-82 และ 10-85 รวมทั้ง *A. oryzae* TISTR3018 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง (มีปริมาณกลูโคซามีนเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เป็นอันดับสอง กล่าวคือ 189.17±8.16 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF) มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไปซึ่งเป็นการศึกษาปัจจัยของธาตุอาหารบางประการที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซาน

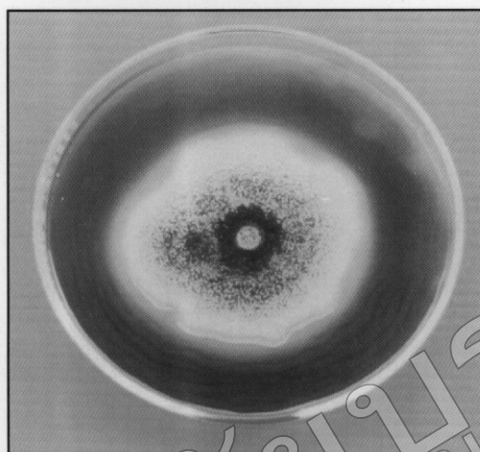
การจัดจำแนกรา

เมื่อนำราทั้งสองไอโซเลทคือ 5-82 และ 10-85 ที่คัดแยกได้มาจำแนกเบื้องต้นโดยการตรวจสอบลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง (Macroscopic characteristics) และสัณฐานวิทยาลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Microscopic characteristics) พบว่าราแต่ละไอโซเลทมีลักษณะและจัดจำแนกได้ดังรายละเอียดต่อไปนี้

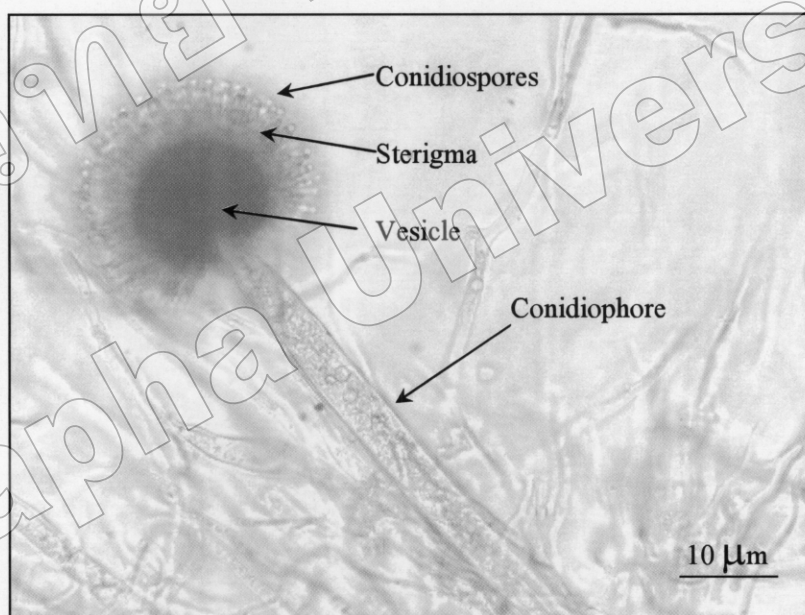
ราไอโซเลท 5-82 เป็นราในกลุ่มที่มีผนังกัน (Septate hypha) ที่ส่วนปลายของโคนิดิโอฟอร์ (Conidiophore) โป่งออกเป็นเวสซิเคิล (Vesicle) รูปร่างกลม และมีส่วนที่ยื่นออกมาเป็นสเตอริกมา (Sterigma) ซึ่งมีชั้นเดียว มีโคนิดิอ์ (Conidia) เป็นเซลล์เดี่ยว (Single cells) ขนาด 0.1-0.2 มิลลิเมตร สร้างสปอร์บนก้านชูแบบที่เรียกว่า Conidiospores ลักษณะของโครงสร้างที่สร้างสปอร์เป็นแบบราในสกุล *Aspergillus* สปอร์สีดำ ซึ่งจำแนกได้เป็น *A. niger* (Alexopoulos & Mims, 1979) (ภาพที่ 4-2)

ส่วนราไอโซเลท 10-85 เส้นใยมีลักษณะปุยสีเทาผนังกัน (Septate hypha) สร้าง Macroconidia เป็นหลายเซลล์ (Multi-cellular) ดังแสดงในภาพที่ 4-3 และจากการจัดจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 18S rRNA (ภาคผนวก ง-1, ง-2 และ ง-3) พบว่าจำแนกได้เป็น *Setosphaeria monoceras* ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ถูกจัดเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank (Accession number DQ238603)

สำหรับ *A. oryzae* TISTR3018 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ้างอิง มีลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง เส้นใยสีขาวแผ่กระจายเป็นวงกลมมีสปอร์สีเหลืองอมเขียว โดยมีลักษณะ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยมีผนังกันและสร้างสปอร์แบบ Conidiospores แสดงดังภาพที่ 4-4

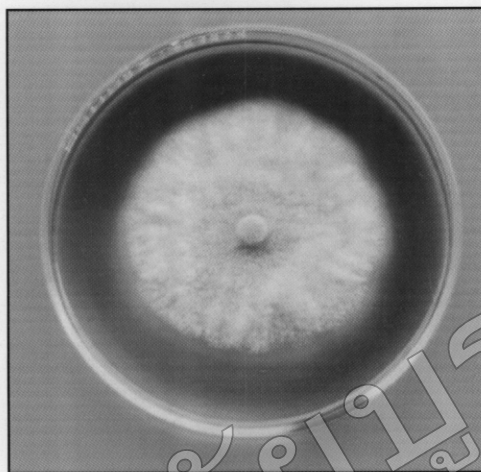


(ก)

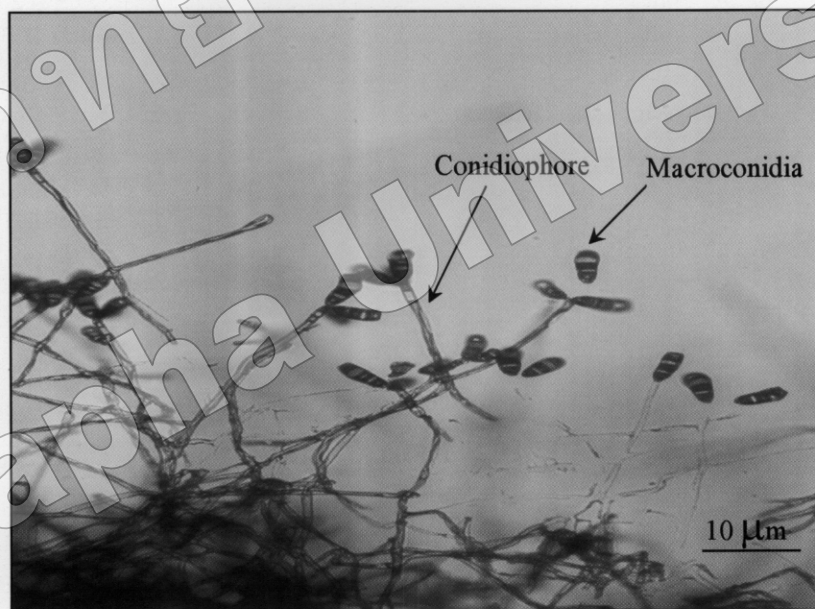


(ข)

ภาพที่ 4-2 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Starch agar อายุ 3 วัน (ก) และสัณฐานวิทยาโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 40 เท่า) (ข) ของ *A. niger* 5-82

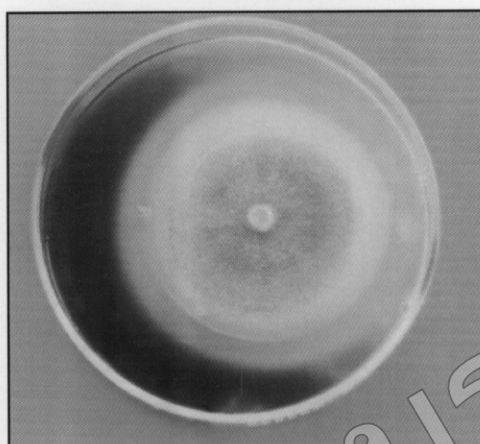


(ก)

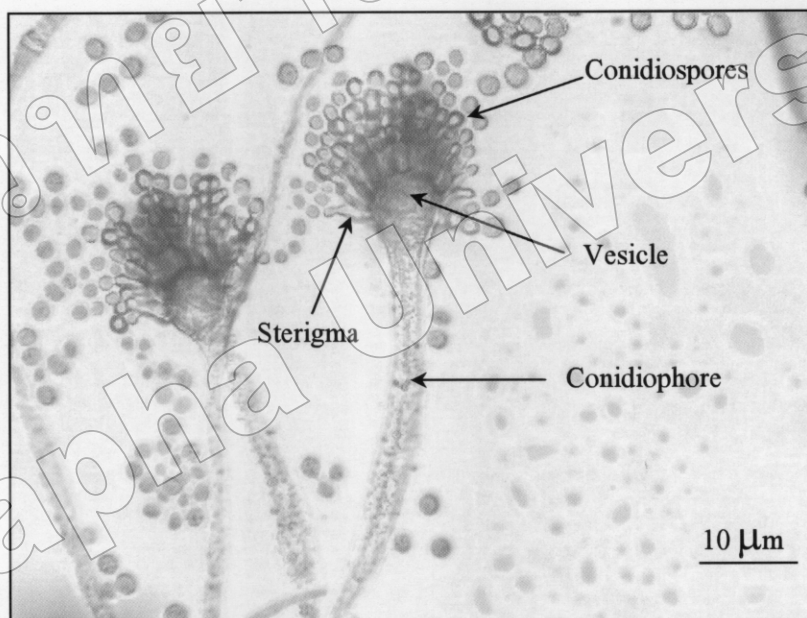


(ข)

ภาพที่ 4-3 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Starch agar อายุ 3 วัน (ก) และสัณฐานวิทยาโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 40 เท่า) (ข) ของ *S. monoceras* 10-85



(ก)



(ข)

ภาพที่ 4-4 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร Starch agar อายุ 3 วัน (ก) และสัณฐานวิทยาโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 40 เท่า) (ข) ของ *A. oryzae* TISTR3018

การศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ไคตินและไคโตซานของรา

1. ผลของความเข้มข้นแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาณไคตินและไคโตซาน

เมื่อแปรผันปริมาณแป้ง (Soluble starch) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch broth เพื่อศึกษาถึงผลกระทบต่อการเจริญและปริมาณไคตินและไคโตซานของราทั้งสามไอโซเลท โดยได้แปรผันความเข้มข้นเป็น 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุมนั้นมีความเข้มข้นของแป้ง 2.3 เปอร์เซ็นต์ (ยูพา ก่อเกียรติพันธ์, 2521) โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นเป็นสปอร์ในปริมาณ 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จัดชุดการทดลองแบบ Batch โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน บันทึกการเจริญของราโดยการวิเคราะห์ปริมาณ AIF ซึ่งเป็นส่วนของผนังเซลล์ ได้ผลการศึกษาดังนี้

1.1 *A. oryzae* TISTR3018

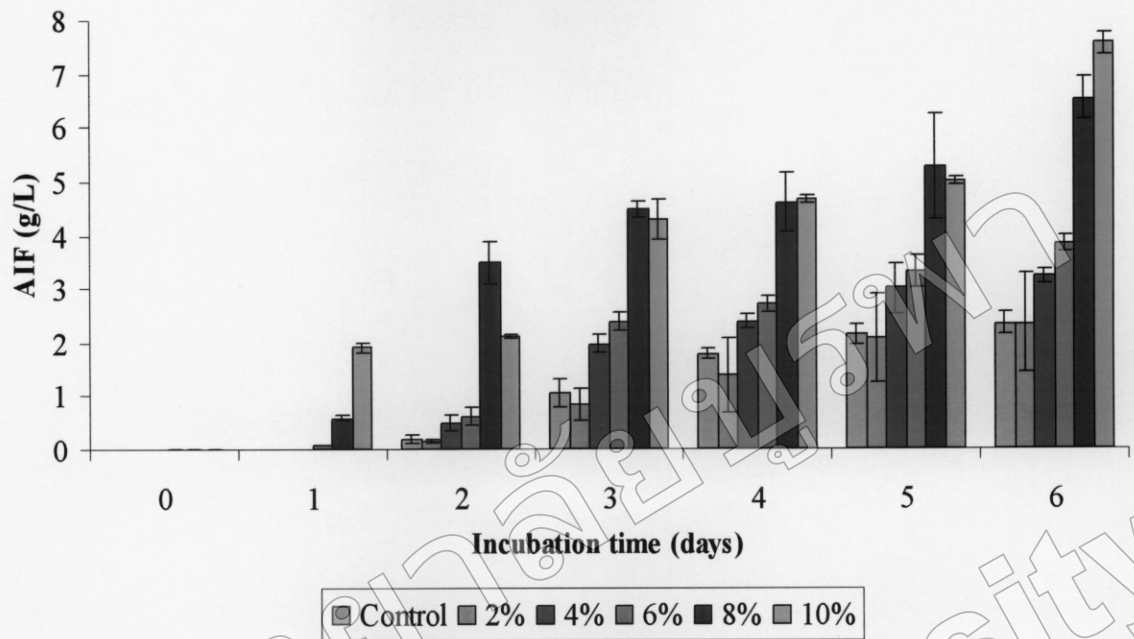
จากการวิเคราะห์ปริมาณ AIF ของเส้นใยราแสดงให้เห็นว่า *A. oryzae* TISTR3018 มีการเจริญเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบในความเข้มข้นต่าง ๆ โดยสังเกตพบการเจริญของร่าก่อนข้างสูงกว่าในอาหารที่มีแป้งความเข้มข้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของร่าชนิดนี้ในอาหาร Starch broth ที่มีแป้งอยู่ในความเข้มข้นทั้งสองระดับดังกล่าวพบว่าในช่วงวันที่ 3-5 นั้นร่าชนิดนี้มีการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตาม *A. oryzae* TISTR3018 มีการเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ในอาหาร Starch broth ที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณ AIF เท่ากับ 7.53 ± 0.19 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-4)

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบที่เป็นไคตินที่มีอยู่ในผนังเซลล์ร่า พบว่าในผนังเซลล์ที่สกัดจากเส้นใยที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้งความเข้มข้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์มีไคตินเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง คือ 0.98 ± 0.00 และ 0.88 ± 0.05 กรัมต่อกรัม AIF ตามลำดับ หลังจากนั้นองค์ประกอบไคตินในผนังเซลล์มีค่าค่อนข้างคงที่หรือเริ่มลดลงเล็กน้อย (ภาพที่ 4-5A) สำหรับผลผลิตไคตินที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* TISTR3018 พบว่าเพิ่มขึ้นอย่างมากหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน ในอาหารที่มีแป้ง 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามปริมาณผลผลิตไคตินที่ได้จากทั้งสองสภาวะมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ($p > 0.05$) โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง กล่าวคือ 6.36 ± 0.37 และ 7.12 ± 0.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-5B)

ในขณะเดียวกันเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบที่เป็นไคโตซานที่ผนังเซลล์ของ *A. oryzae* TISTR3018 พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันมากนักระหว่างอาหาร Starch broth ที่มีแป้งความเข้มข้นต่าง ๆ โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 5-6 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งวิเคราะห์ปริมาณไคโตซานในผนังเซลล์ได้

ประมาณ 33-38 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF ดังแสดงในภาพที่ 4-6A อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณผลผลิตโคโตซานสูงสุดที่ได้จาก *A. oryzae* TISTR3018 เท่ากับ 220.67 ± 19.76 และ 236.33 ± 10.98 มิลลิกรัมต่อลิตร มาจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร starch broth ที่มีแป้ง 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 วัน (ภาพที่ 4-6B)

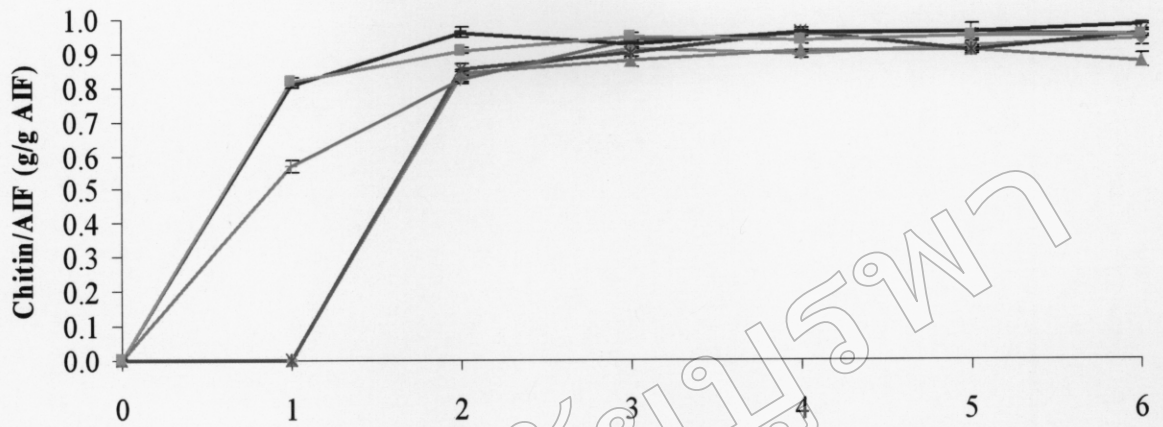
จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า *A. oryzae* TISTR3018 มีการเจริญและการผลิตโคตินและโคโตซานได้ดีในอาหาร Starch broth ที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบในความเข้มข้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าที่ได้จากการใช้แป้งความเข้มข้นดังกล่าวนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) จึงเลือกใช้แป้งความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



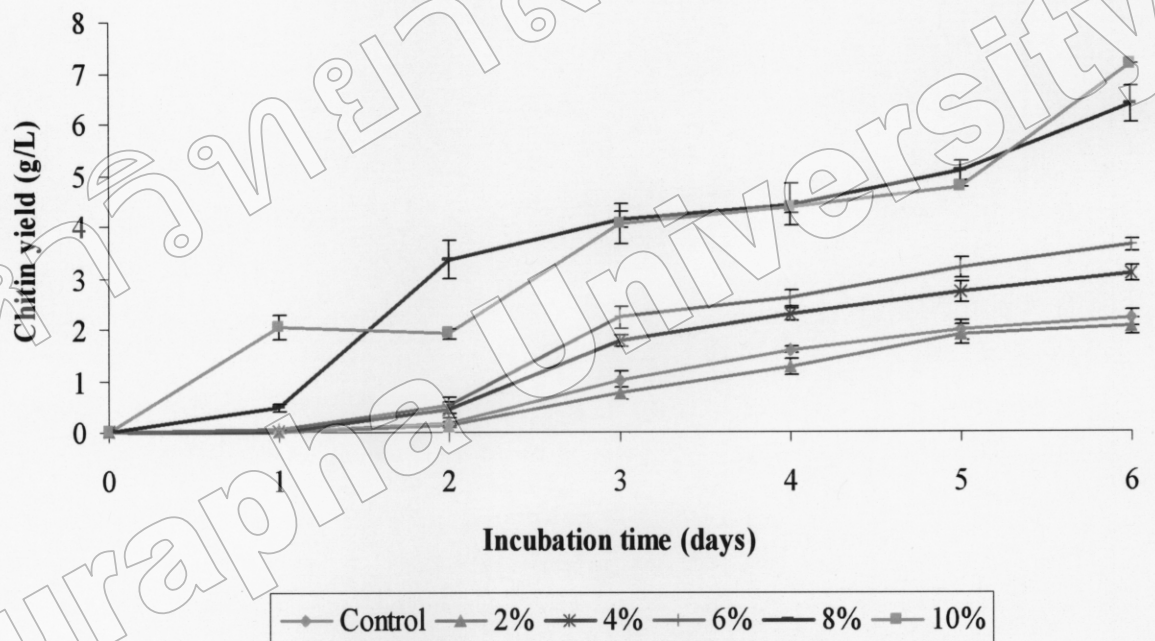
ภาพที่ 4-4 ปริมาณ AIF ของ *A. oryzae* TISTR3018 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่แปรผัน ปริมาณแป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เหย้าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุมเป็น อาหาร Starch broth ที่มีแป้งความเข้มข้น 2.3 เปอร์เซ็นต์

(A)



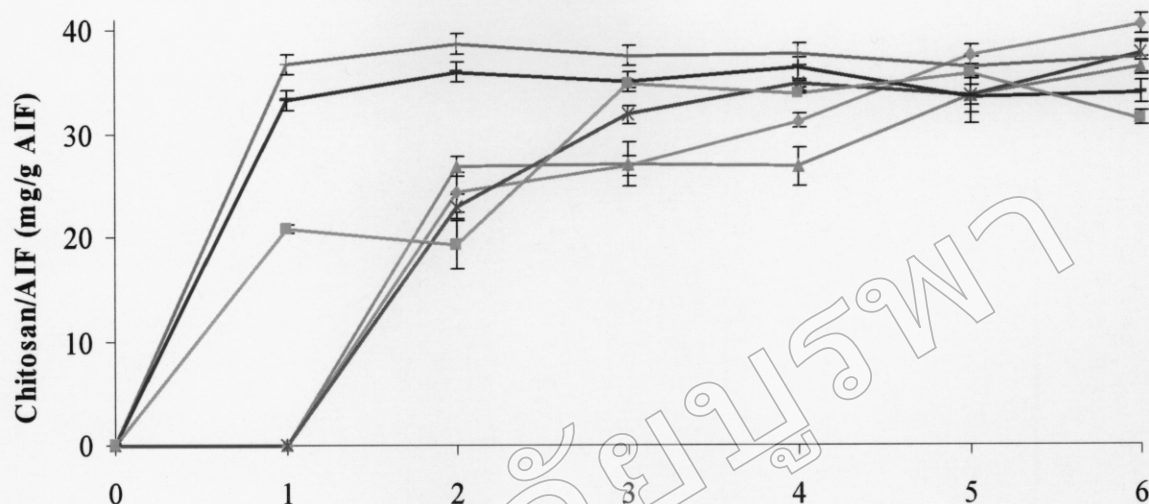
(B)



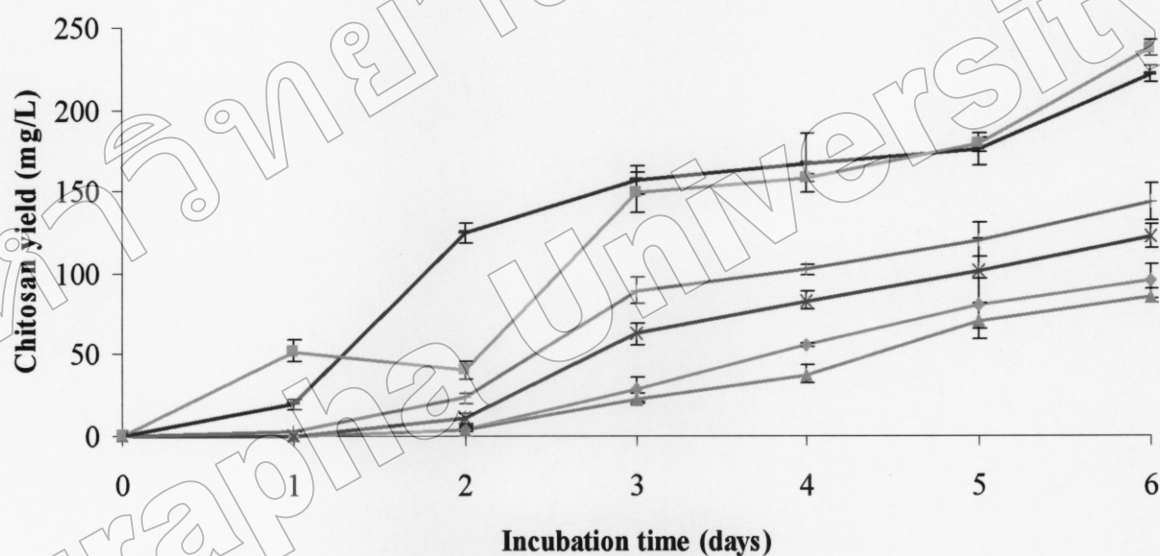
ภาพที่ 4-5 ปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคติน (B) ของ *A. oryzae* TISTR3018 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่แปรผันปริมาณแป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุมเป็นอาหาร Starch broth ที่มีแป้งความเข้มข้น 2.3 เปอร์เซ็นต์

(A)



(B)



—◆— Control —▲— 2% —*— 4% —+— 6% —— 8% —■— 10%

ภาพที่ 4-6 ปริมาณไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคโตซาน (B) ของ *A. oryzae* TISTR3018 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่แปรผันปริมาณ แป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุมเป็นอาหาร Starch broth ที่มีแป้งความเข้มข้น 2.3 เปอร์เซ็นต์

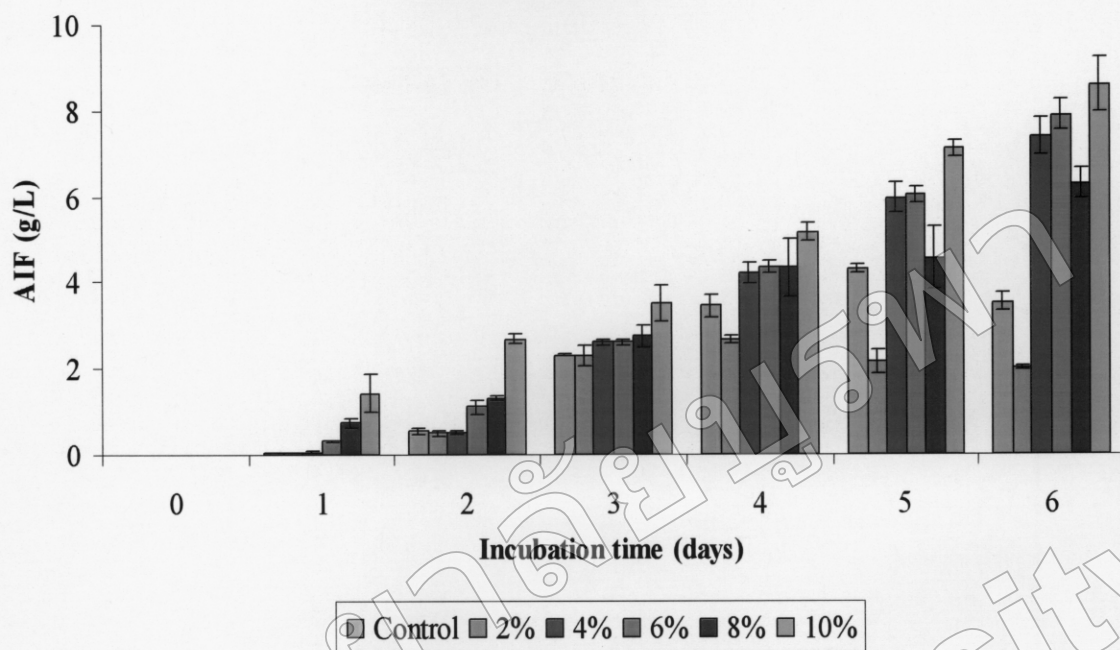
1.2 *A. niger* 5-82

การเจริญ *A. niger* 5-82 เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้งความเข้มข้นต่าง ๆ จะเห็นได้ว่าปริมาณ AIF ของเส้นใยราก่อนข้างสูงในอาหารที่มีแป้งความเข้มข้น 4, 6 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของราชนิดนี้ที่ความเข้มข้นของแป้ง 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามราไอโซเลท 5-82 มีการเจริญสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ในอาหาร Starch broth ที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณ AIF เท่ากับ 8.57 ± 0.63 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-7)

เมื่อพิจารณาในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้งความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่าองค์ประกอบที่เป็นไคตินที่มีอยู่ในผนังเซลล์มีปริมาณสูงสุดเป็น 1.12 ± 0.19 กรัมต่อกรัม AIF (ภาพที่ 4-8A) และพบว่าภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 วัน ปริมาณผลผลิตไคตินที่ได้จากราชนิดนี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน ผลผลิตไคตินที่ได้สูงสุดในอาหารที่มีแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 7.54 ± 0.31 กรัมต่อลิตร รองลงมาได้แก่ ผลผลิตไคติน 6.88 ± 0.46 กรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4-8B)

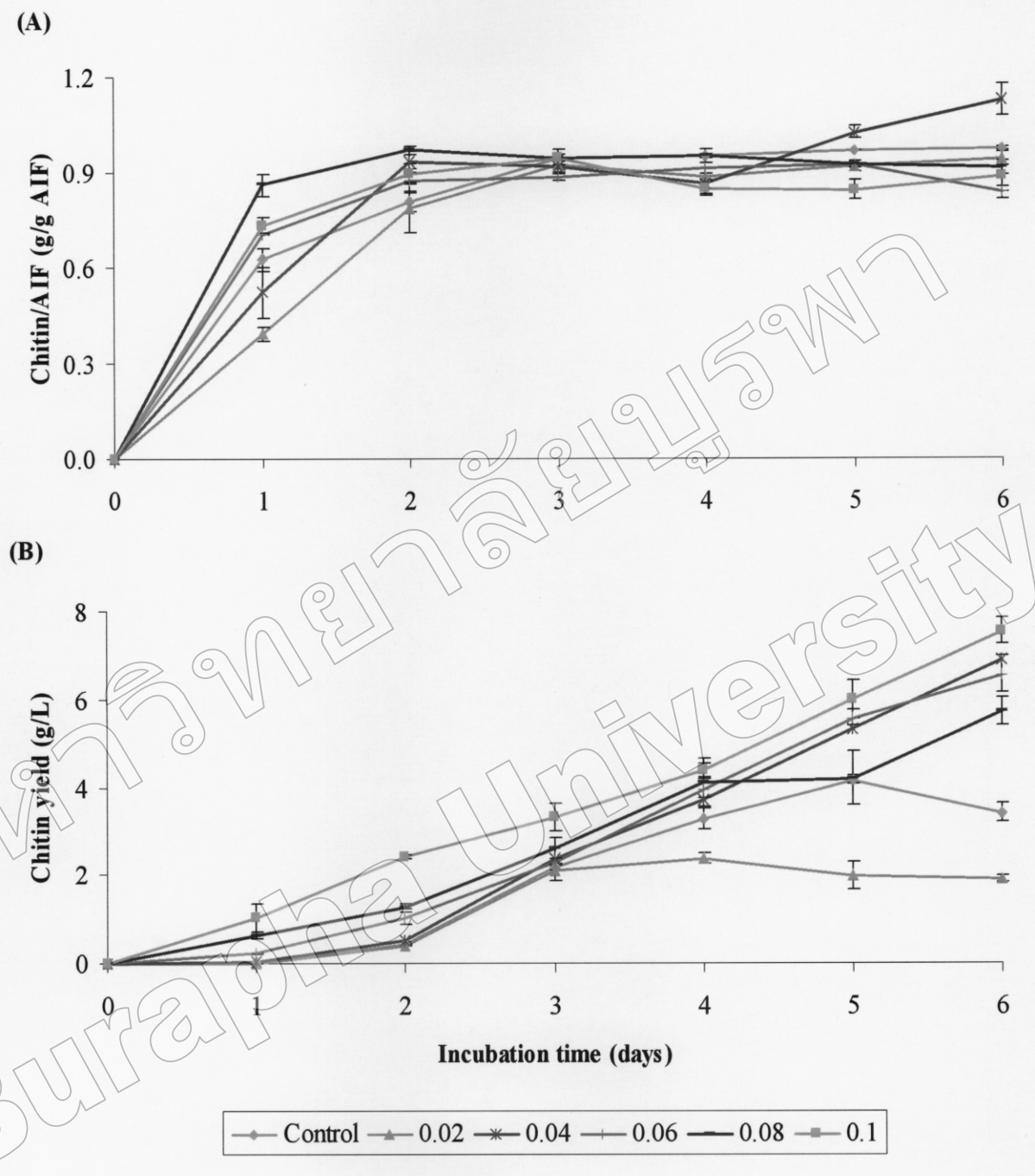
เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบที่เป็นไคโธซานที่ผนังเซลล์ *A. niger* 5-82 พบว่าในผนังเซลล์ที่สกัดจากเส้นใยรากที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้ง 2.3 (ชุดควบคุม), 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ มีไคโธซานเป็นองค์ประกอบเพิ่มขึ้นอย่างมากในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และเริ่มลดลงจนคงที่ มีค่าไม่แตกต่างกัน โดยให้องค์ประกอบที่เป็นไคโธซานสูงสุดเท่ากับ 20.43 ± 0.42 , 19.60 ± 0.84 และ 18.17 ± 1.43 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF ตามลำดับ (ภาพที่ 4-9A) ส่วนปริมาณผลผลิตไคโธซานสูงสุดที่ได้จากราชนิดนี้มีค่า 79.67 ± 11.12 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 6 วัน (ภาพที่ 4-9B)

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้น ได้เลือกใช้แป้งความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง *A. niger* 5-82 มีการเจริญและการผลิตไคตินและไคโธซานได้ดีในอาหาร Starch broth สำหรับนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 4-7 ปริมาณ AIF ของ *A. niger* 5-82 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่แปรผัน
ปริมาณแป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เช้าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุมเป็น
อาหาร Starch broth ที่มีแป้งความเข้มข้น 2.3 เปอร์เซ็นต์



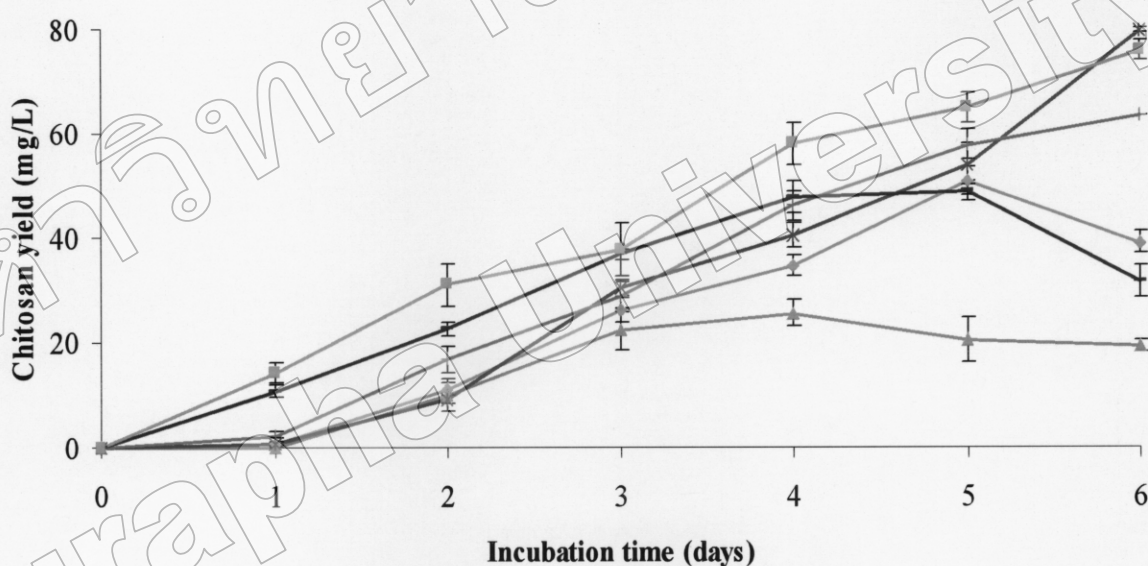
ภาพที่ 4-8 ปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคติน (B) ของ *A. niger* 5-82 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่แปรผันปริมาณแป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุมเป็นอาหาร Starch broth ที่มีแป้งความเข้มข้น 2.3 เปอร์เซ็นต์

(A)



(B)



— Control — 0.02 *— 0.04 — 0.06 — 0.08 — 0.1

ภาพที่ 4-9 ปริมาณไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคโตซาน (B) ของ *A. niger* 5-82 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่แปรผันปริมาณแป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุมเป็นอาหาร Starch broth ที่มีแป้งความเข้มข้น 2.3 เปอร์เซ็นต์

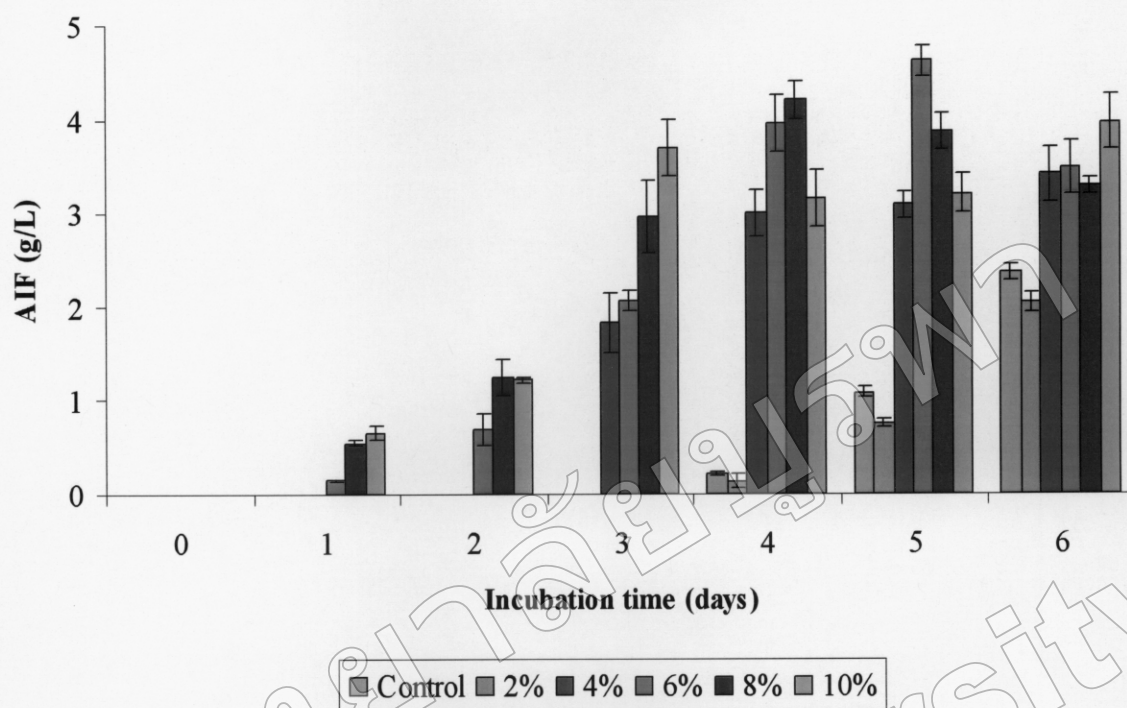
1.3 *S. monoceras* 10-85

จากการศึกษาพบว่า *S. monoceras* 10-85 มีการเจริญเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่ปริมาณแ่งความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ AIF พบว่ามีการเจริญสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแ่งเป็นองค์ประกอบ 6 เปอร์เซ็นต์ โดยมีปริมาณ AIF เท่ากับ 4.61 ± 0.16 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-10)

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบที่เป็นไคตินที่มีอยู่ในผนังเซลล์รา จะเห็นว่าวันที่ 1-2 ของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และในช่วงวันที่ 3-6 ของการเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแ่งความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในผนังเซลล์เริ่มคงที่หรือมีแนวโน้มลดลง โดยมีค่าสูงสุด 0.95 ± 0.01 กรัมต่อกรัม AIF ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในภาพที่ 4-11A ส่วนผลผลิตไคตินที่ได้เพิ่มขึ้นภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 วัน และให้ผลผลิตสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแ่ง 6 เปอร์เซ็นต์ กล่าวคือ 4.36 ± 0.08 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณผลผลิตไคตินเริ่มลดลง มีผลทำให้ปริมาณไคตินไม่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4-11B)

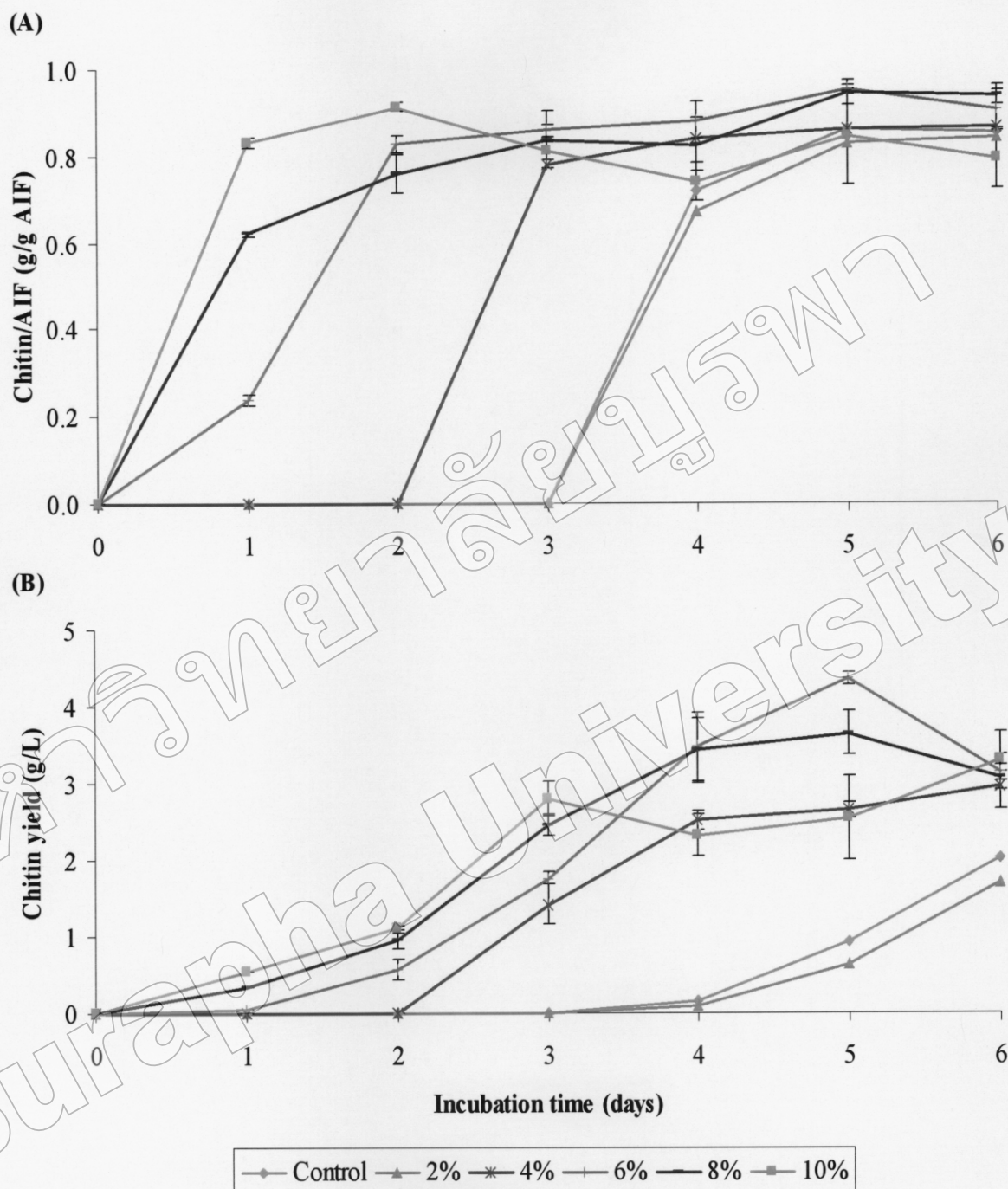
ในขณะเดียวกันในช่วงวันที่ 1-2 ของการเพาะเลี้ยง ราชนิดนี้มีองค์ประกอบที่เป็นไคโตซานที่ผนังเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลักจากนั้นค่อนข้างคงที่และมีแนวโน้มลดลง พบว่ามีค่าสูงสุดในช่วงวันที่ 4-6 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งปริมาณไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในผนังเซลล์ให้ค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าประมาณ 72-89 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF (ภาพที่ 4-12A) อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าปริมาณผลผลิตไคโตซานสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแ่ง 6 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 389.83 ± 1.89 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-12B)

จะเห็นได้ว่า *S. monoceras* 10-85 มีการเจริญ และการผลิตไคตินและไคโตซานได้ดีในอาหาร Starch broth ที่มีแ่งเป็นองค์ประกอบในความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแ่งดังกล่าวสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป และข้อดีของราชนิดนี้สามารถให้ผลผลิตไคโตซานได้ดีที่สุดถึงแม้ว่ามันจะผลิตชีวมวลได้ต่ำ



ภาพที่ 4-10 ปริมาณ AIF ของ *S. monoceras* 10-85 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่แปรผัน
ปริมาณแป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้นต่าง ๆ

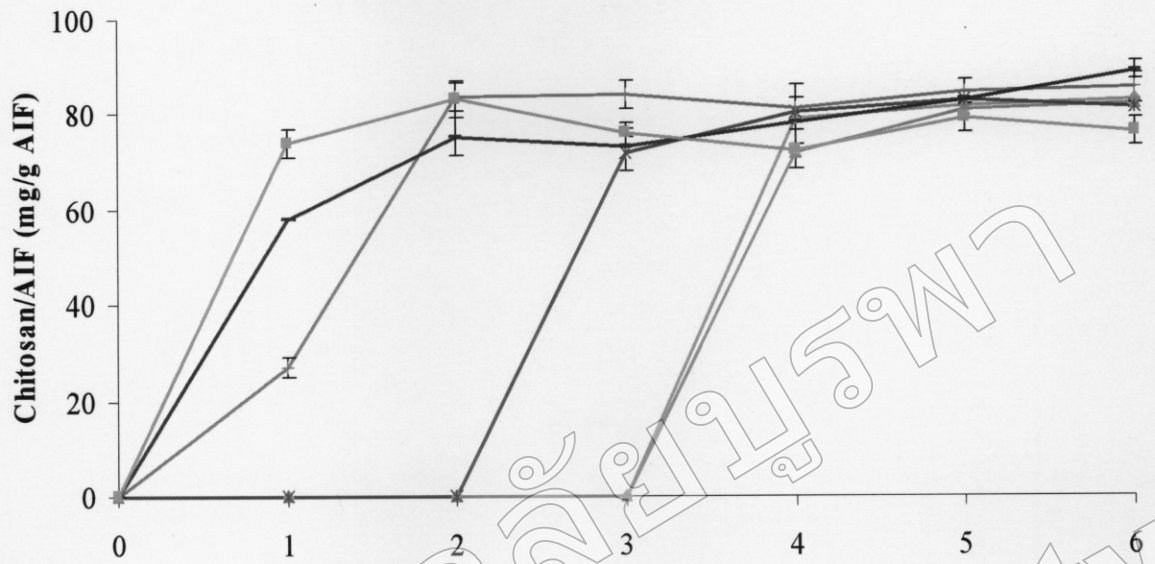
หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุมเป็น
อาหาร Starch broth ที่มีแป้งความเข้มข้น 2.3 เปอร์เซ็นต์



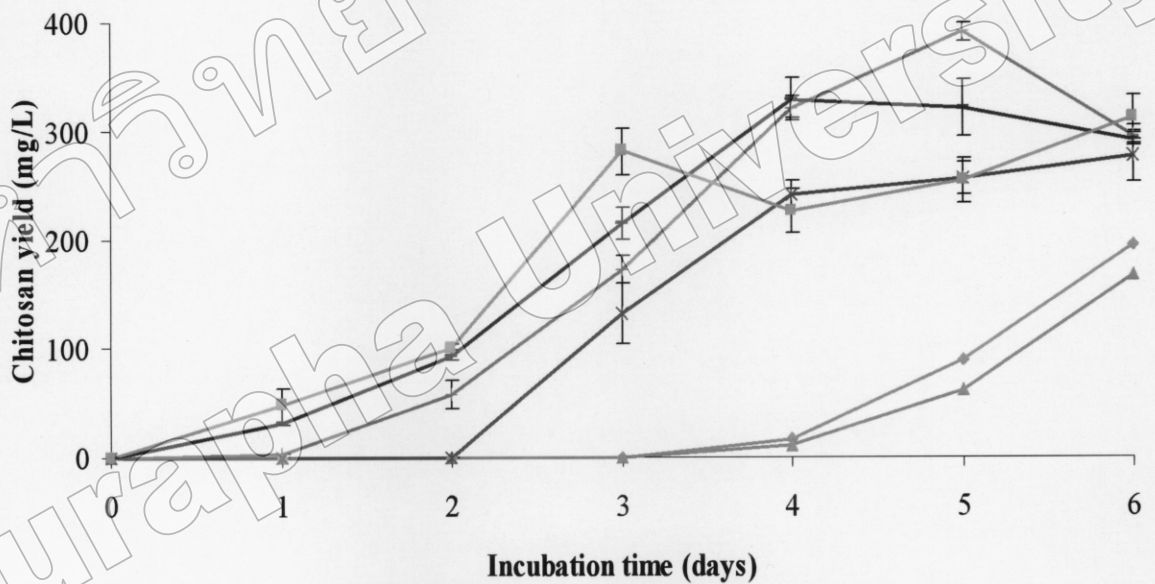
ภาพที่ 4-11 ปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคติน (B) ของ *S. monoceras* 10-85 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่แปรผันปริมาณ แป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุม เป็นอาหาร Starch broth ที่มีแป้งความเข้มข้น 2.3 เปอร์เซ็นต์

(A)



(B)



—◆— Control —▲— 2% —*— 4% —+— 6% ——— 8% —■— 10%

ภาพที่ 4-12 ปริมาณไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคโตซาน (B)

ของ *S. monoceras* 10-85 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่แปรผัน

ปริมาณแป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุม

เป็นอาหาร Starch broth ที่มีแป้งความเข้มข้น 2.3 เปอร์เซ็นต์

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่าราทั้งสามไอโซเลทมีความต้องการแป้งในปริมาณที่เหมาะสมแตกต่างกันไป สำหรับการเจริญและการผลิตโคตินและโคโตซานกล่าวคือ 8, 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ *A. oryzae* TISTR3018, *A. niger* 5-82 และ *S. monoceras* 10-85 ตามลำดับ จึงเลือกใช้แป้งในความเข้มข้นดังกล่าวสำหรับราแต่ละไอโซเลทในการศึกษาขั้นต่อไป

2. ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณโคตินและโคโตซาน

เมื่อแปรผันแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch broth เพื่อศึกษาถึงผลกระทบต่อการเจริญและปริมาณโคตินและโคโตซานของราทั้งสามไอโซเลท โดย *A. oryzae* TISTR3018 และ *A. niger* 5-82 ใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนได้แปรผันความเข้มข้นเป็น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ *S. monoceras* 10-85 ใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน (จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าราชนิดนี้เจริญได้ไม่ดีในอาหารที่มียูเรียเป็นองค์ประกอบ) โดยแปรผันความเข้มข้นเป็น 0.25, 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดควบคุมนั้นมีความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้แป้งในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 6.1 แล้วเติมสารอาหารอื่นตามสูตรอาหารควบคุม ใช้หัวเชื้อเริ่มต้นเป็นสปอร์ในปริมาณ 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จัดชุดการทดลองแบบ Batch โดยเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 วัน ได้ผลการศึกษาดังนี้

2.2 *A. oryzae* TISTR3018

จากการศึกษาการเจริญของ *A. oryzae* TISTR3018 พบว่าราชนิดนี้มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้งความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันปริมาณยูเรียความเข้มข้นต่าง ๆ โดยพบการเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ในอาหารที่มียูเรียเป็นองค์ประกอบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณ AIF เท่ากับ 7.75 ± 0.25 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-13)

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบที่เป็นโคตินที่มีอยู่ในผนังเซลล์รา พบว่าโคตินที่เป็นองค์ประกอบนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมากในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง และมีค่าสูงสุดในวันที่ 2-3 ของการเพาะเลี้ยง มีค่าอยู่ในช่วง 0.93-0.98 กรัมต่อกรัม AIF หลังจากนั้นปริมาณโคตินที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์มีค่าไม่เปลี่ยนแปลงในอาหารที่มียูเรียความเข้มข้นต่าง ๆ (0.96-0.98 กรัมต่อกรัม AIF) ดังแสดงในภาพที่ 4-14A สำหรับผลผลิตโคตินที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* TISTR3018 มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 วัน อย่างไรก็ตามในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง มีปริมาณผลผลิตโคตินสูงสุดในอาหารที่มียูเรียเป็นองค์ประกอบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ผลผลิตโคตินเท่ากับ 7.62 ± 0.23 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-14B)

จากปริมาณองค์ประกอบที่เป็นโคโตซานที่ผนังเซลล์ของ *A. oryzae* TISTR3018 โดยให้ค่าสูงสุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มียูเรียความเข้มข้น ชุดควบคุม 2, 0.2, 0.3, 0.4

เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) มีค่าอยู่ในช่วง 36-38 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF หลังจากนั้นปริมาณโคโคซานที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์มีแนวโน้มลดลงและเริ่มคงที่ ในขณะที่วันที่ 4-6 ของการเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มียูเรีย 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ของราชนิดนี้มีค่าไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการสะสมโคโคซานในผนังเซลล์ในอาหารที่มียูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุดกล่าวคือ 36.52 ± 0.94 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF (ภาพที่ 4-15A) สำหรับผลผลิตโคโคซานเพิ่มขึ้นอย่างมากหลังจาก 2-3 วัน ของการเพาะเลี้ยง และในวันที่ 4 มีค่าผลผลิตโคโคซานสูงสุดในอาหาร Starch broth ที่มียูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่าเท่ากับ 283.17 ± 15.61 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-15B)

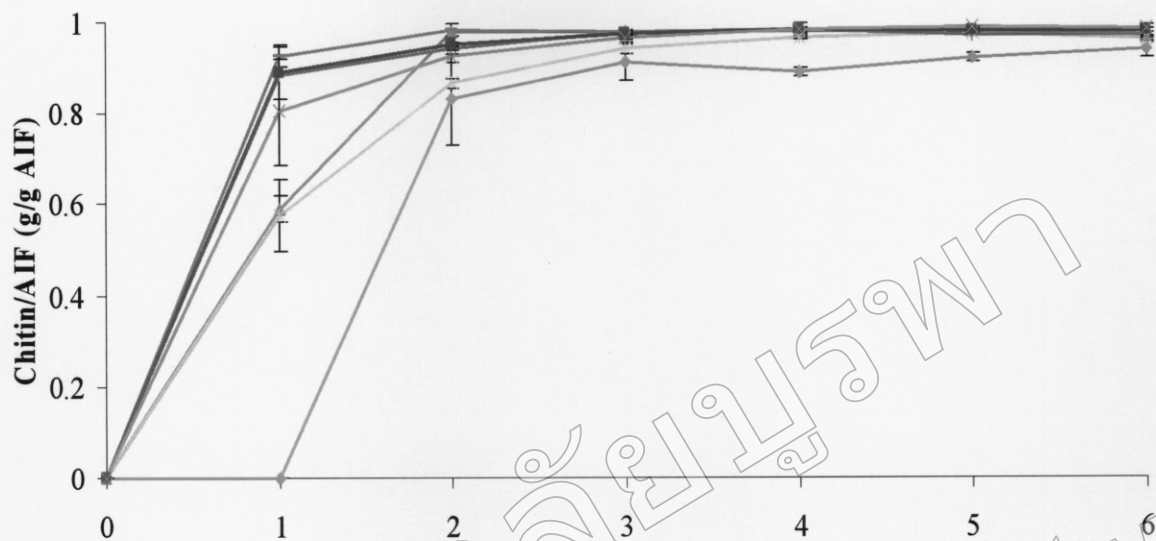
จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า *A. oryzae* TISTR3018 มีการเจริญ และมีการผลิตโคโคซานและโคโคซานได้ดีในอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแอมโมเนีย 8 เปอร์เซ็นต์ และยูเรียเป็นองค์ประกอบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



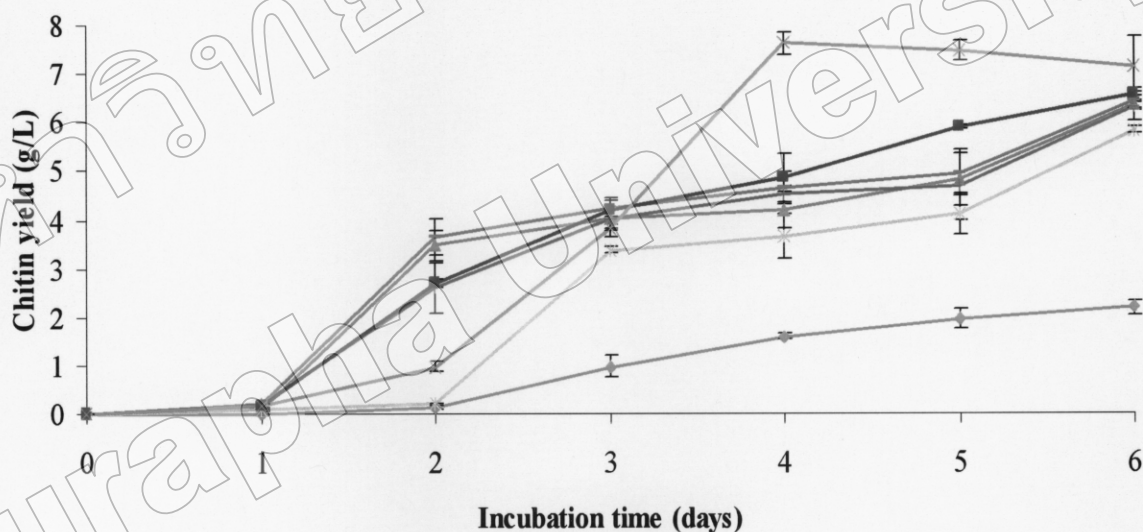
ภาพที่ 4-13 ปริมาณ AIF ของ *A. oryzae* TISTR3018 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันปริมาณยูเรีย ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุม 1 และ 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 2.3 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยใส่ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน

(A)



(B)

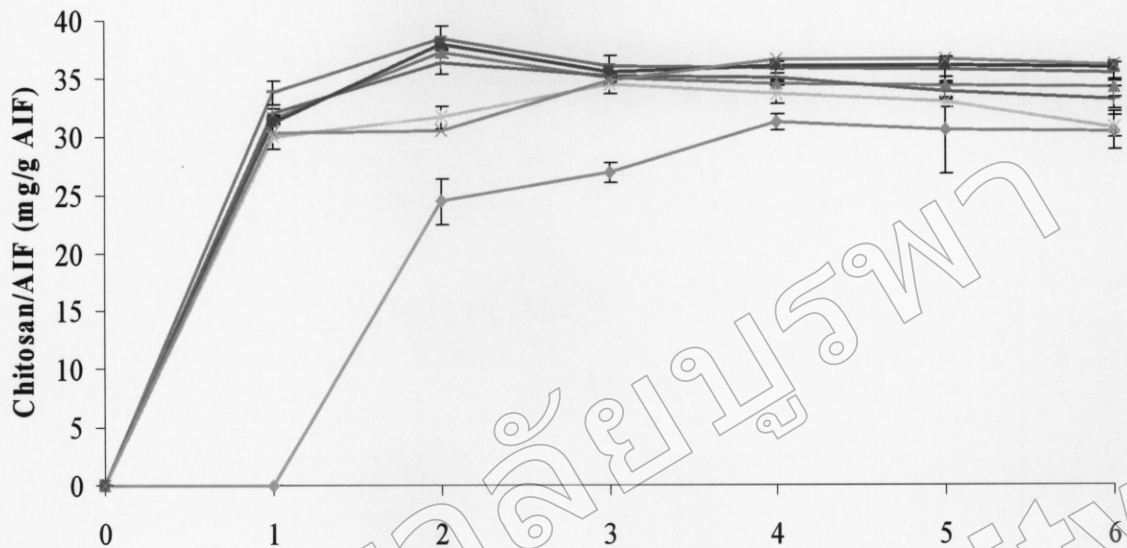


—●— Control1 —▲— Control2 —×— 0.1% —+— 0.2% —— 0.3% —■— 0.4% —x— 0.5%

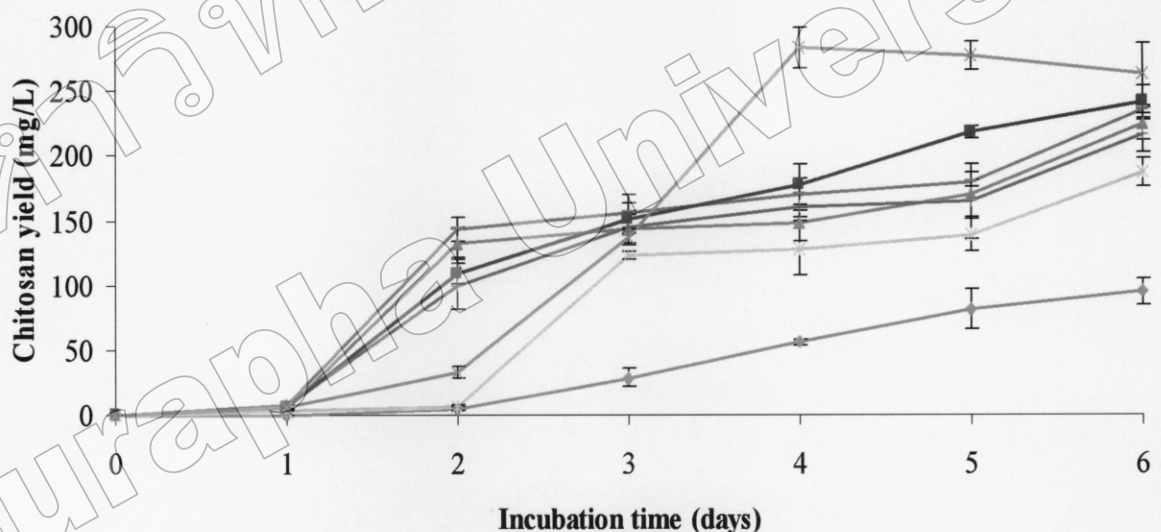
ภาพที่ 4-14 ปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคติน (B) ของ *A. oryzae* TISTR3018 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันปริมาณยูเรียความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุม 1 และ 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 2.3 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน

(A)



(B)



—●— Control1 —▲— Control2 —*— 0.1% —+— 0.2% —— 0.3% —■— 0.4% —x— 0.5%

ภาพที่ 4-15 ปริมาณไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคโตซาน (B)

ของ *A. oryzae* TISTR3018 เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันปริมาณยูเรียความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุม 1 และ 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 2.3 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน

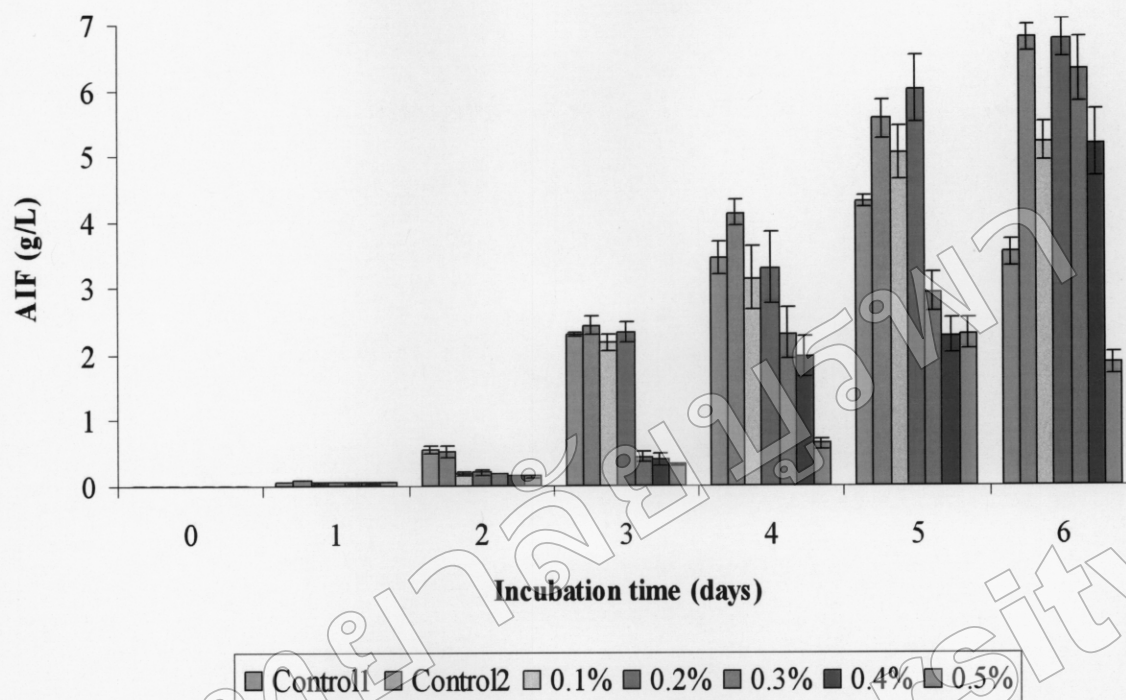
2.2 *A. niger* 5-82

จากการศึกษาการเจริญของ *A. niger* 5-82 ในอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้งที่เหมาะสมคือ 4 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันยูเรียความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ายูเรียที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม 2 มีการเจริญสูงที่สุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญแล้วความเข้มข้นทั้งสองระดับนี้มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามปริมาณยูเรียที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม 2 ให้ปริมาณ AIF สูงสุดเท่ากับ 6.76 ± 0.66 และ 6.78 ± 1.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-16)

ปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ในอาหารที่มียูเรียความเข้มข้นต่าง ๆ มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมากสำหรับการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยและคงที่จนถึงวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าไม่แตกต่างกันสำหรับการใช้ยูเรียแต่ละความเข้มข้น ($0.89-0.99$ กรัมต่อกรัม AIF) ดังแสดงในภาพที่ 4-17A และผลผลิตไคตินมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมากในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ในอาหารที่มียูเรีย 0.2 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม 2 โดยมีค่าไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และให้ผลผลิตไคตินสูงที่สุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง กล่าวคือ 6.57 ± 0.66 และ 6.63 ± 1.22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-17B)

และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ของ *A. niger* 5-82 พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นและสูงสุดในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงในชุดควบคุม 1 โดยมีปริมาณไคโตซานในผนังเซลล์มีค่าเท่ากับ 20.43 ± 0.43 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF และในวันที่ 4-6 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มียูเรียแต่ละความเข้มข้นมีค่าการสะสมไคโตซานในผนังเซลล์ไม่แตกต่างกัน หลังจากนั้นองค์ประกอบไคโตซานในผนังเซลล์แนวโน้มลดลงและเริ่มคงที่ ($9-11$ มิลลิกรัมต่อกรัม AIF) ดังแสดงในภาพที่ 4-18A สำหรับปริมาณผลผลิตไคโตซานสูงสุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง มีค่าไม่แตกต่างกันสำหรับในอาหารที่มียูเรีย 0.2 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม 2 ($p>0.05$) ให้ปริมาณไคโตซานเท่ากับ 71.67 ± 6.83 และ 72.50 ± 16.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-18B)

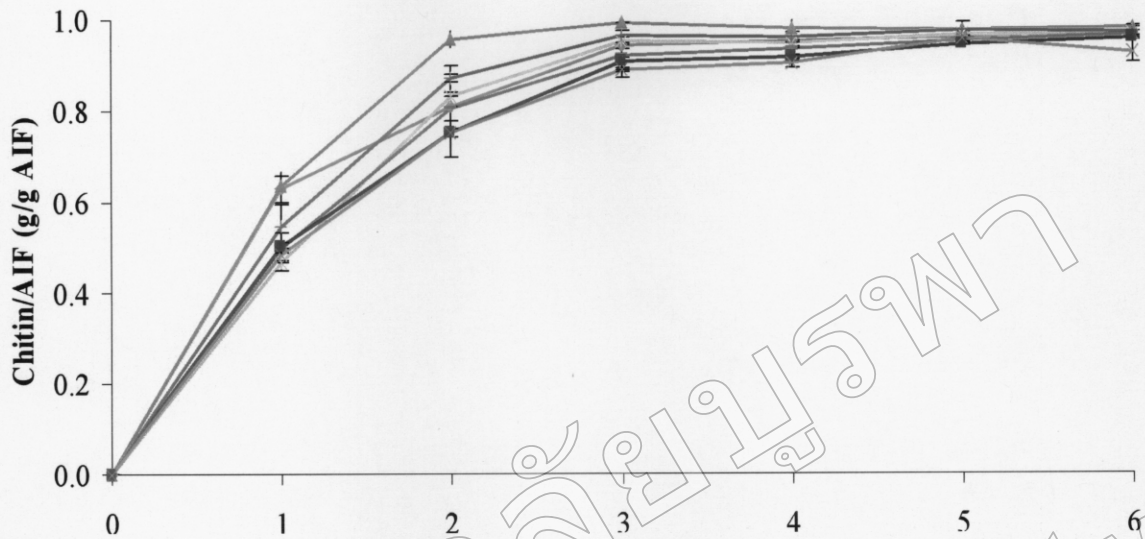
จะเห็นได้ว่า *A. niger* 5-82 มีการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานได้ดีในอาหารในอาหารที่มียูเรีย 0.2 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุม 2 โดยมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ดังนั้นราชินีสามารถใช้อาหารที่มีแป้ง 4 เปอร์เซ็นต์ และเลือกยูเรีย 0.2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการศึกษานี้ต่อไป



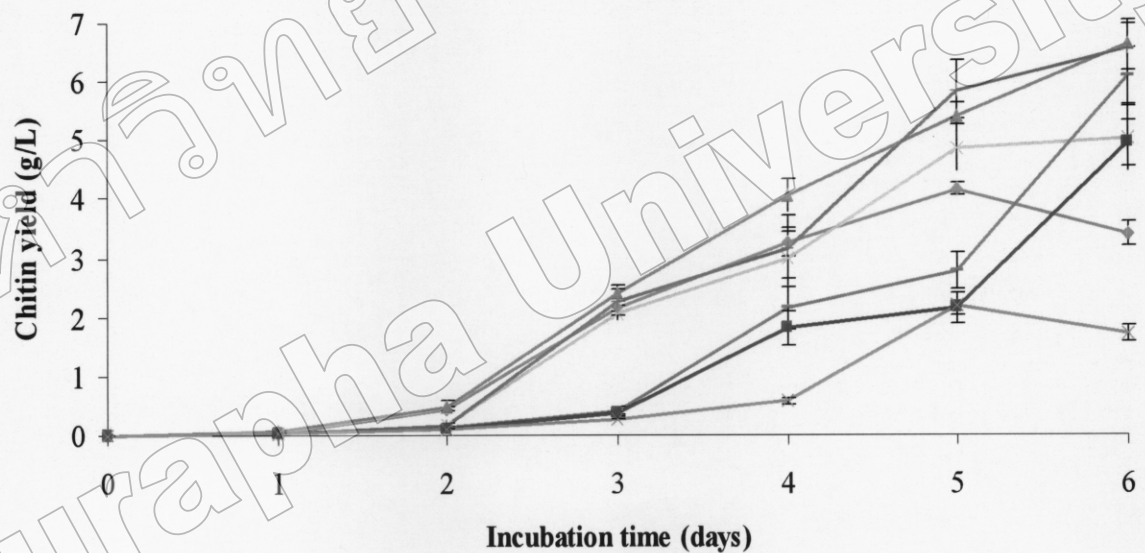
ภาพที่ 4-16 ปริมาณ AIF ของ *A. niger* 5-82 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันปริมาณยูเรียความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เช้าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุม 1 และ 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 2.3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน

(A)



(B)



—●— Control1 —▲— Control2 —×— 0.1% —+— 0.2% —— 0.3% —■— 0.4% —x— 0.5%

ภาพที่ 4-17 ปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคติน (B) ของ

A. niger 5-82 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้ง (Soluble starch)

ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันปริมาณยูเรียความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุม 1

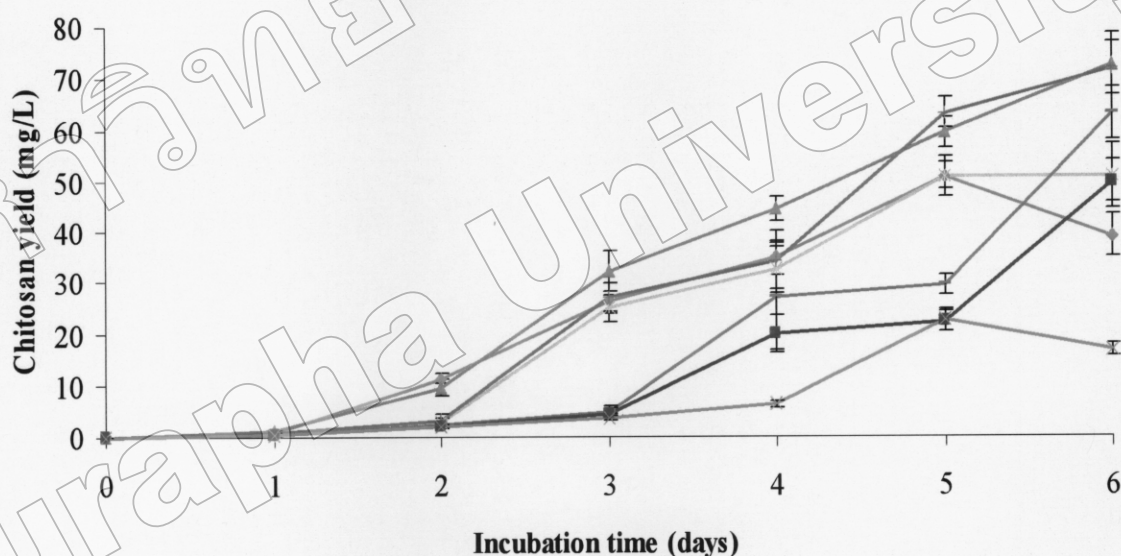
และ 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 2.3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

โดยใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน

(A)



(B)



—●— Control1 —▲— Control2 —*— 0.1% —+— 0.2% —— 0.3% —■— 0.4% —x— 0.5%

ภาพที่ 4-18 ปริมาณไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคโตซาน (B)

ของ *A. niger* 5-82 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้ง (Soluble starch)

ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันปริมาณยูเรียความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุม 1

และ 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 2.3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

โดยใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน

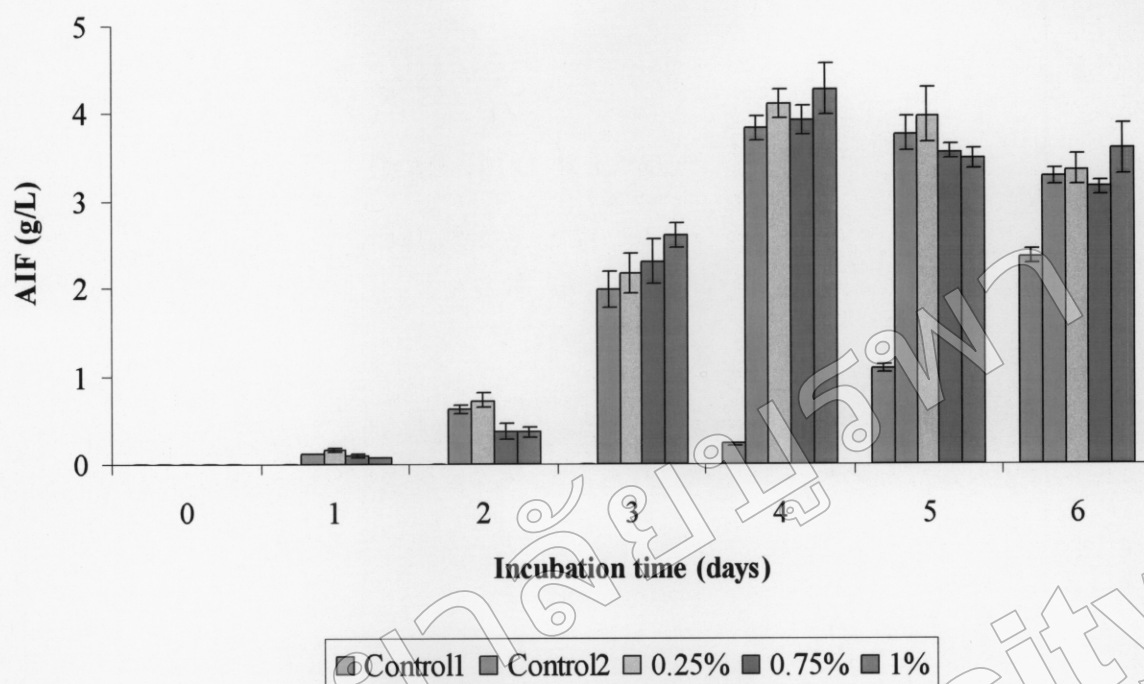
2.3 *S. monoceras* 10-85

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ AIF ของเส้นใย *S. monoceras* 10-85 ซึ่งราชชนิดนี้มีการเจริญได้ดีในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ในอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์ และใช้แหล่งไนโตรเจนเหมือนชุดควบคุม โดยแปรผันความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25, 0.75 และ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณ AIF สูงสุดมีค่าไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยให้ค่าเพิ่มขึ้นเป็น 4.10 ± 0.15 และ 4.27 ± 0.30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-19)

สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบที่มีไคตินอยู่ในผนังเซลล์ พบว่าภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 วัน ราชชนิดนี้ให้ปริมาณไคตินในผนังเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในอาหารที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้นต่าง ๆ และเริ่มมีปริมาณคงที่ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยไคตินที่เป็นองค์ประกอบมีปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยมีค่าประมาณ 0.88-0.93 กรัมต่อกรัม AIF (ภาพที่ 4-20A) ส่วนผลผลิตไคตินนั้นมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลผลิตไคตินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) กล่าวคือ 3.81 ± 0.14 และ 3.99 ± 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4-20B)

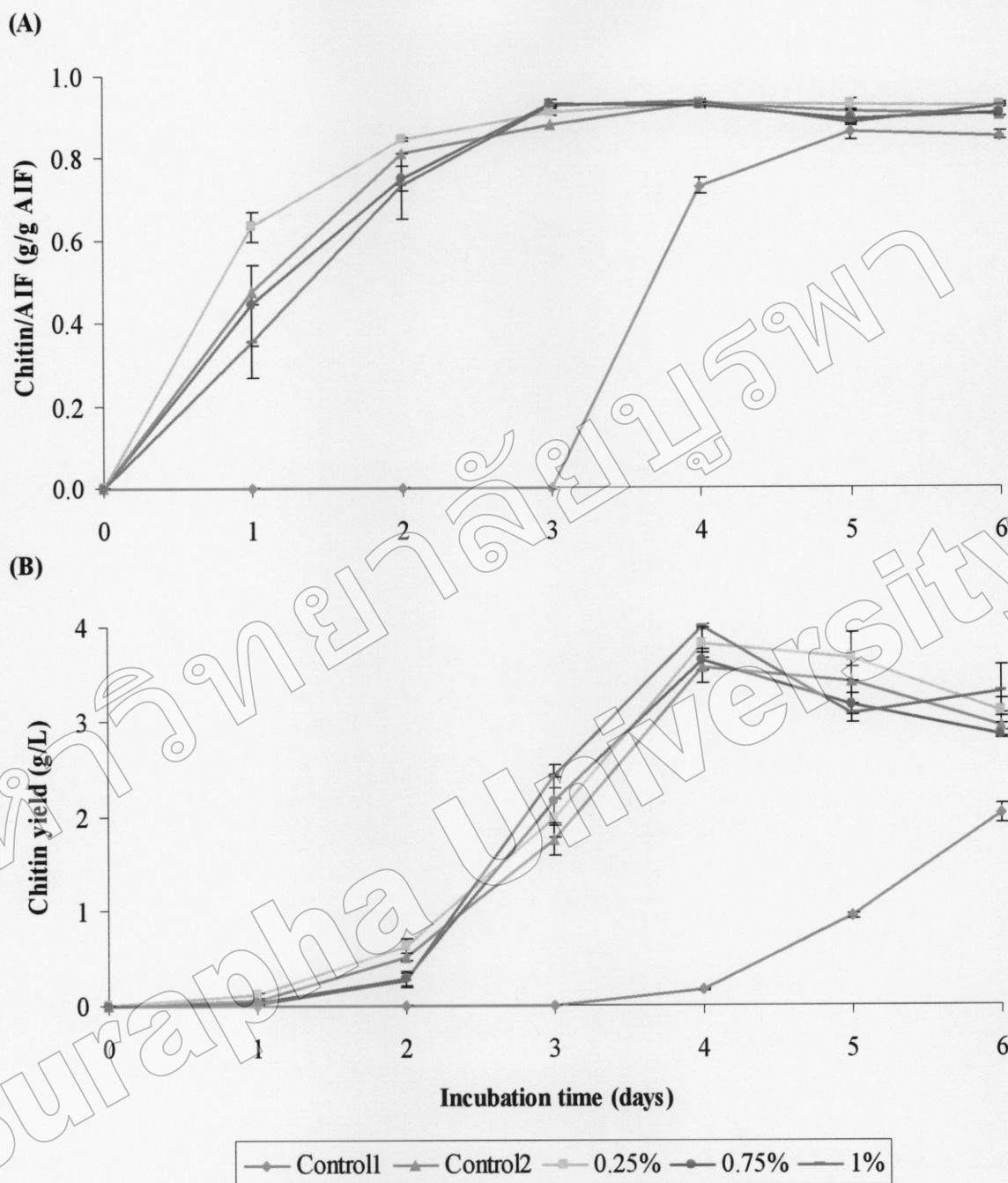
ในขณะเดียวกันเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบที่มีไคโตซานที่ผนังเซลล์ พบว่าในอาหารที่มียูเรียความเข้มข้นต่าง ๆ มีปริมาณไคโตซานในผนังเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 1-2 ของการเพาะเลี้ยง และหลังจากนั้นเริ่มคงที่ในวันที่ 3-6 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้นต่าง ๆ มีค่าไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยมีค่าประมาณ 93-97 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF ดังแสดงในภาพที่ 4-21A สำหรับผลผลิตไคโตซานสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 และ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าเท่ากับ 390.17 ± 13.43 และ 418.33 ± 28.51 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) (ภาพที่ 4-21B)

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า *S. monoceras* 10-85 มีการเจริญและการผลิตไคตินและไคโตซานได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารที่มี $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 และ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยค่าที่ได้ดังกล่าวนี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงเลือกใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป



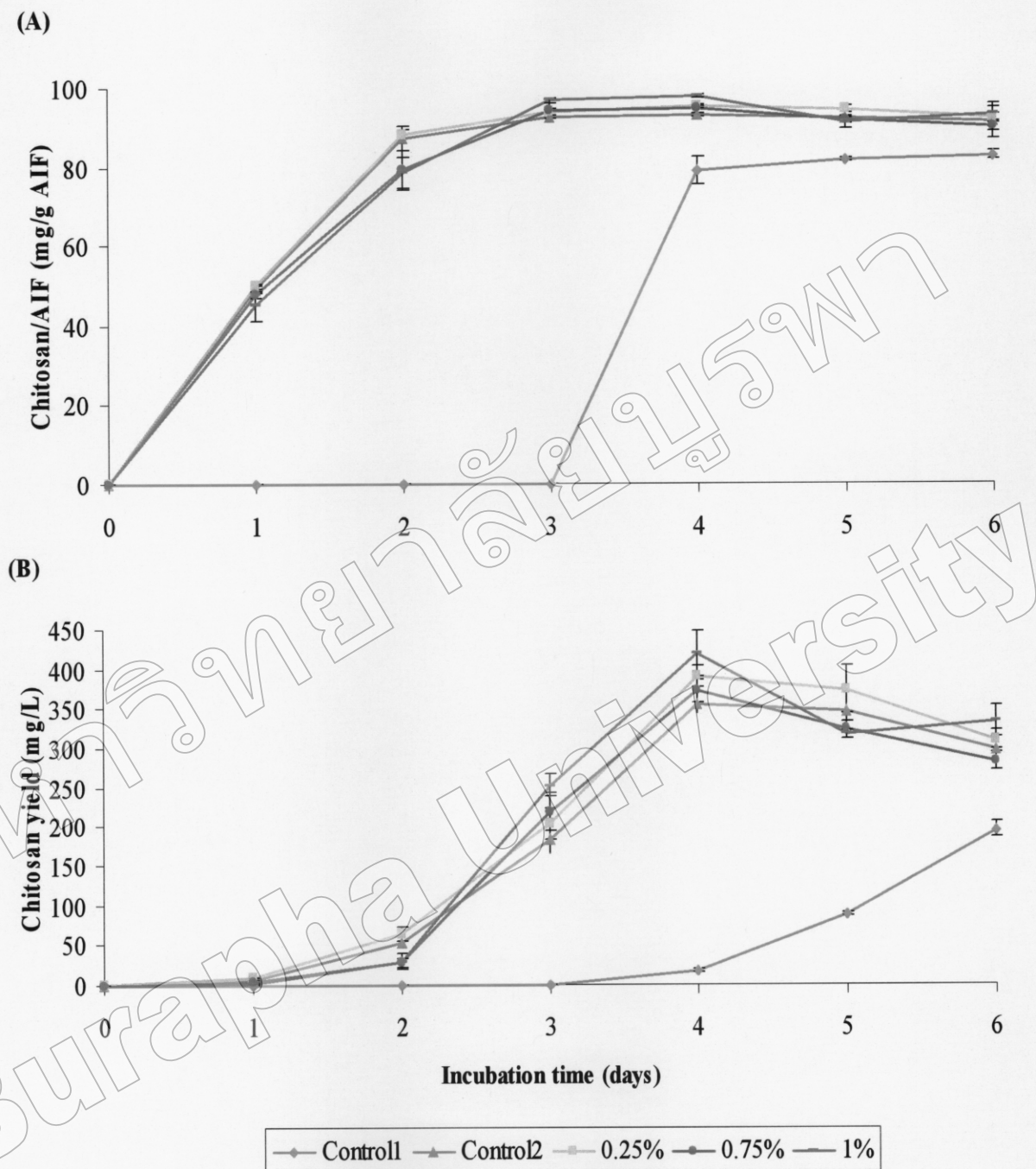
ภาพที่ 4-19 ปริมาณ AIF ของ *S. monoceras* 10-85 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เช้าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุม 1 และ 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 2.3 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 4-20 ปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคติน (B) ของ *S. monoceras* 10-85 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุม 1 และ 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 2.3 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน



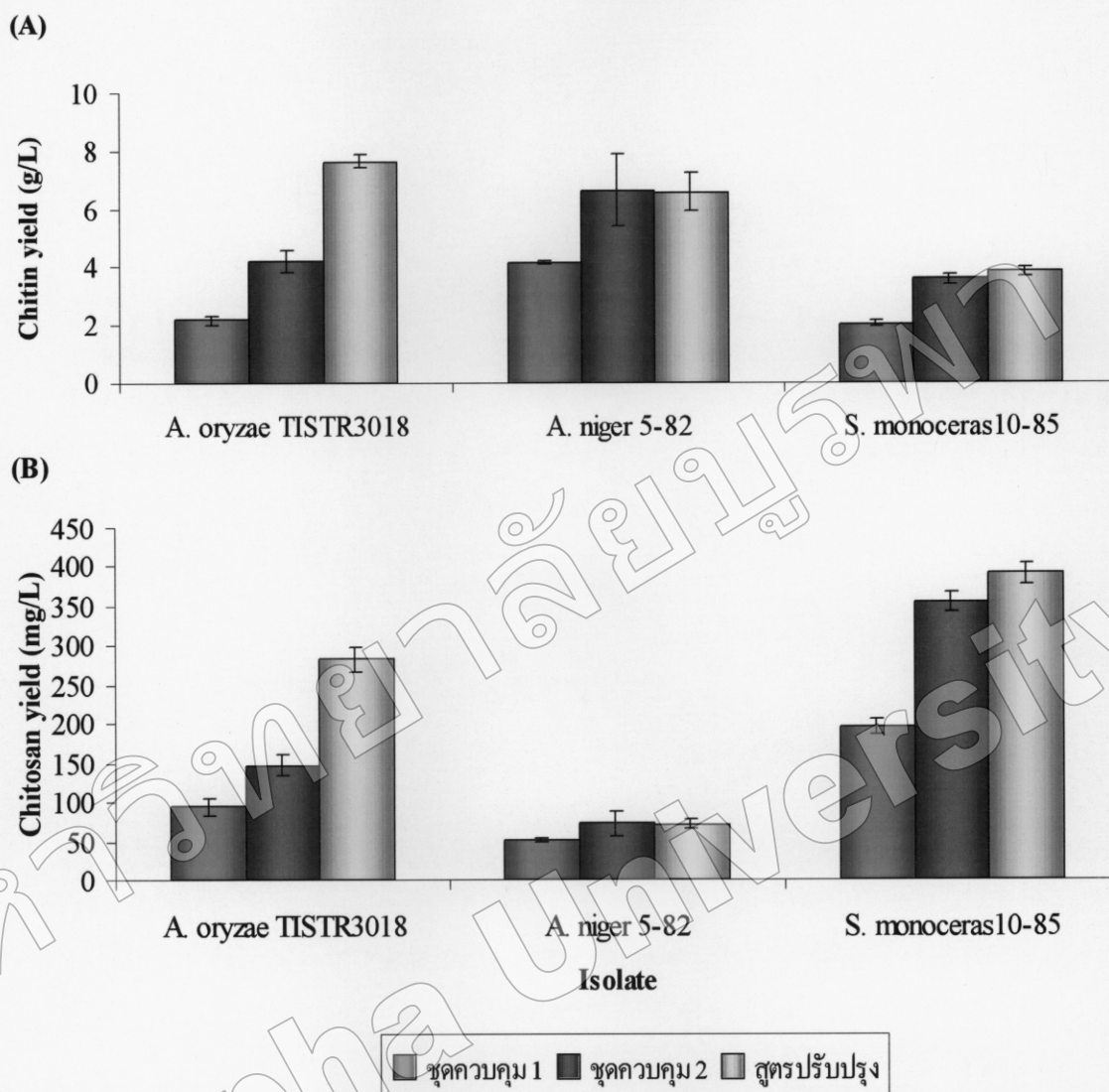
ภาพที่ 4-21 ปริมาณไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคโตซาน (B) ของ *S. monoceras* 10-85 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มีแป้ง (Soluble starch) ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ และแปรผันปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้นต่าง ๆ

หมายเหตุ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที ชุดควบคุม 1 และ 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 2.3 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน

เมื่อพิจารณาการเจริญและผลผลิตไคตินและไคโตซานของราทั้งสามไอโซเลท พบว่า ความเข้มข้นของยูเรียที่เหมาะสมสำหรับ *A. oryzae* TISTR3018 และ *A. niger* 5-82 คือ 0.5 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่เหมาะสมสำหรับ *S. monoceras* 10-85 คือ 0.25 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบของไคตินและไคโตซานในผนังเซลล์และความสามารถในการผลิตไคตินและไคโตซานของราทั้งสามไอโซเลทภายใต้สภาวะที่มีแป้งและแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสม พบว่า *A. oryzae* TISTR3018, *A. niger* 5-82 และ *S. monoceras* 10-85 มีการสะสมไคตินในผนังเซลล์ในปริมาณใกล้เคียงกันคือ 0.93-0.98 กรัมต่อกรัม AIF และผลผลิตไคตินสูงสุดได้จาก *A. oryzae* TISTR3018 กล่าวคือ 7.62 ± 0.23 กรัมต่อลิตร รองลงมาได้แก่ *A. niger* 5-82 (6.57 ± 0.66 กรัมต่อลิตร) และ *S. monoceras* 10-85 ให้ผลผลิตไคตินน้อยสุด (3.81 ± 0.14 กรัมต่อลิตร) ดังแสดงในภาพที่ 4-22A ในขณะที่เดียวกันพบว่า *S. monoceras* 10-85 มีความสามารถในการผลิตไคโตซานได้สูงที่สุดคือ 390.17 ± 13.43 มิลลิกรัมต่อลิตร รองลงมาได้แก่ *A. oryzae* TISTR3018 (283.17 ± 15.61 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่วน *A. niger* 5-82 ให้ผลผลิตไคโตซานน้อยที่สุด (71.67 ± 6.83 มิลลิกรัมต่อลิตร) ดังแสดงในภาพที่ 4-22B

ดังนั้นจึงเลือก *A. oryzae* TISTR3018 และ *S. monoceras* 10-85 ซึ่งให้ผลผลิตไคตินและไคโตซานสูงที่สุดตามลำดับ มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไปซึ่งเป็นการศึกษาถึงผลของธาตุอาหารรองบางชนิดต่อการผลิตไคตินและไคโตซาน ธาตุอาหารรองที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ ธาตุแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัส



ภาพที่ 4-22 ผลผลิตไคติน(A) และไคโตซาน (B) ของรา 3 ไอโซเลท ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth สูตรปรับปรุงที่ได้แปรผันปริมาณแป้งและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของแต่ละไอโซเลท บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที

หมายเหตุ ชุดควบคุม 1 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 2.3 เปอร์เซ็นต์ ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์

ชุดควบคุม 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้งที่เหมาะสมของแต่ละไอโซเลท ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และเติมสารอาหารอื่นตามชุดควบคุม 1

สูตรปรับปรุงเป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้งและแหล่งไนโตรเจน (ยูเรียหรือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ที่เหมาะสมของแต่ละไอโซเลท แล้วเติมสารอาหารอื่นตามชุดควบคุม 1

3. ผลของแมกนีเซียม แมงกานีส และเฟอร์รัสต่อปริมาณไคตินและไคโตซาน

จากผลการศึกษาได้นำ *A. oryzae* TISTR3018 และ *S. monoceras* 10-85 ซึ่งมีปริมาณไคตินและไคโตซานสูงที่สุด ตามลำดับ มาแปรผันธาตุอาหารรองได้แก่ ธาตุแมกนีเซียมได้แปรผันความเข้มข้นเป็น 0.01, 0.025 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแมงกานีสและเฟอร์รัสได้แปรผันความเข้มข้นเป็น 0.05, 0.15 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติมสารอาหารที่เหมาะสมโดย *A. oryzae* TISTR3018 ใช้เป็นแป้งความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ และใช้ยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ส่วนชุดควบคุม 1 และ 2 ใช้ปริมาณแป้ง 2:3 และ 8 เปอร์เซ็นต์ และใช้แหล่งไนโตรเจน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และแมกนีเซียมความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามสูตรปกติ ส่วน *S. monoceras* 10-85 ใช้แป้งความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ และใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ส่วนชุดควบคุม 1 และ 2 นั้นได้ใช้ปริมาณแป้ง 2:3 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และใช้แหล่งไนโตรเจนเป็น $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 และ 0.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และได้ใช้แมกนีเซียมความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามสูตรปกติ ได้ผลการทดลองดังนี้

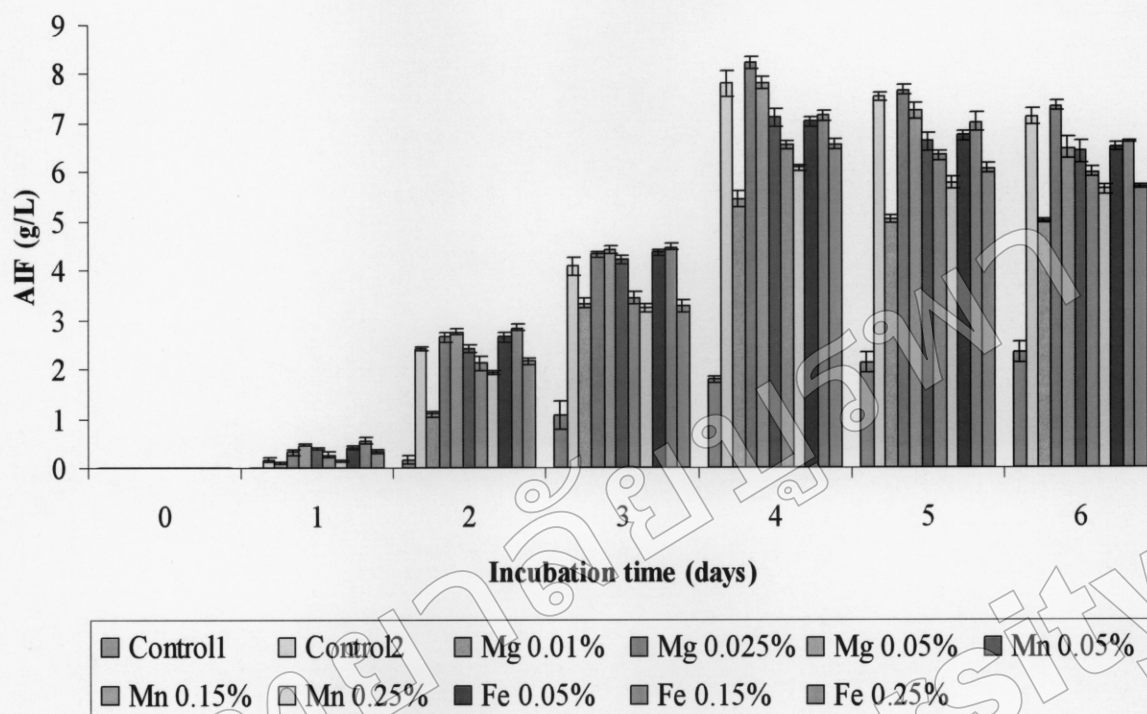
3.1 *A. oryzae* TISTR3018

เมื่อวิเคราะห์ปริมาณ AIF ของเส้นใย *A. oryzae* TISTR3018 ซึ่งมีการเจริญได้ค่อนข้างดีในช่วง 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025-0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลดังกล่าวนี้คล้ายคลึงกับที่พบในอาหารที่เติมแมงกานีสซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ หรือเฟอร์รัสซัลเฟต 0.05-0.15 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อพิจารณาจากค่า AIF ที่สกัดได้จากเส้นใยพบว่า มีค่าประมาณ 4.21-4.47 กรัมต่อลิตร โดยค่า AIF ที่ได้จากชุดทดลองดังกล่าวนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม 2 กล่าวคือ 4.08 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-23) อย่างไรก็ตามพบว่าราไคโซเลทนีเจริญได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่า AIF 8.22 ± 0.11 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นการเจริญค่อย ๆ ลดลงวันที่ 5 และ 6 ตามลำดับ การเจริญของราในชุดควบคุม 2 (อาหาร Starch broth ที่มีแป้ง (Soluble starch) 8 เปอร์เซ็นต์ และยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ) เป็นไปในทำนองเดียวกันแต่มีค่าการเจริญที่ต่ำกว่า โดยวิเคราะห์ปริมาณ AIF สูงสุดได้ 7.80 ± 0.26 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบที่เป็นไคตินที่มีอยู่ในผนังเซลล์ พบว่าเพิ่มขึ้นอย่างมากหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1-2 วัน หลังจากนั้นก็มีค่าค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง และมีการสะสมไคตินในผนังเซลล์ใกล้เคียงกันในอาหาร Starch broth ที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025-0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลดังกล่าวนี้คล้ายคลึงกับที่พบในอาหารที่เติมแมงกานีสซัลเฟต 0.05-

0.25 เปอร์เซ็นต์ หรือเฟอรัสซัลเฟต 0.05-0.25 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อพิจารณาจากปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในวันที่ 3-4 ของการเพาะเลี้ยงพบว่ามีความใกล้เคียงกัน 0.93-0.97 กรัมต่อกรัม AIF ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม 2 กล่าวคือ 0.92-0.94 กรัมต่อกรัม AIF โดยองค์ประกอบที่เป็นไคตินในผนังเซลล์ที่ได้จากชุดทดลองดังกล่าวนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) (ภาพที่ 4-24A) สำหรับผลผลิตไคตินที่ได้จาก *A. oryzae* TISTR3018 มีปริมาณผลผลิตไคตินได้ดีใน 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025-0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลดังกล่าวนี้คล้ายคลึงกับในอาหารที่เติมแมกนีเซียซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ หรือเฟอรัสซัลเฟต 0.05-0.15 เปอร์เซ็นต์ มีค่าประมาณ 3.97-4.20 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม ปริมาณผลผลิตไคตินสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 7.98 ± 0.15 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณผลผลิตไคตินค่อย ๆ ลดลงวันที่ 5 และ 6 ตามลำดับ ซึ่งผลผลิตไคตินของราในชุดควบคุม 2 เป็นไปในทำนองเดียวกันแต่มีปริมาณไคตินที่ต่ำกว่า โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 7.35 ± 0.21 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4-24B)

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบที่เป็นไคโตซานที่ผนังเซลล์ของ *A. oryzae* TISTR3018 พบว่าในวันแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นมีความค่อนข้างคงที่และเริ่มลดลงเล็กน้อย โดยให้ค่าไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ไม่แตกต่างกันมากนักในอาหาร Starch broth ที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.01-0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลดังกล่าวนี้คล้ายคลึงกับที่พบในอาหารที่เติมแมกนีเซียซัลเฟต 0.05-0.25 เปอร์เซ็นต์ หรือเฟอรัสซัลเฟต 0.05-0.25 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อพิจารณาจากปริมาณไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในวันที่ 3-4 พบว่ามีค่าประมาณใกล้เคียงกัน 30.29-38.07 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม 2 เล็กน้อยกล่าวคือ 35.26-36.05 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF โดยองค์ประกอบที่เป็นไคตินในผนังเซลล์ที่ได้จากชุดทดลองดังกล่าวนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) (ภาพที่ 4-25A) สำหรับผลผลิตไคโตซานพบว่ามีผลผลิตได้ดีใน 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยง ในอาหาร Starch broth ที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025-0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลดังกล่าวนี้คล้ายคลึงกับที่พบในอาหารที่เติมแมกนีเซียซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ หรือเฟอรัสซัลเฟต 0.05-0.15 เปอร์เซ็นต์ มีค่าประมาณ 143.85-166.72 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามปริมาณผลผลิตไคโตซานที่ได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 313.01 ± 12.77 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณผลผลิตไคโตซานค่อย ๆ ลดลงวันที่ 5 และ 6 ตามลำดับ ซึ่งผลผลิตไคโตซานของราในชุดควบคุม 2 เป็นไปในทำนองเดียวกันแต่มีปริมาณไคโตซานที่ต่ำกว่า โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 280.86 ± 3.25 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4-25B)



ภาพที่ 4-23 ปริมาณ AIF ของ *A. oryzae* TISTR3018 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่แปรผันปริมาณธาตุแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัส

หมายเหตุ ชุดควบคุม 1 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์

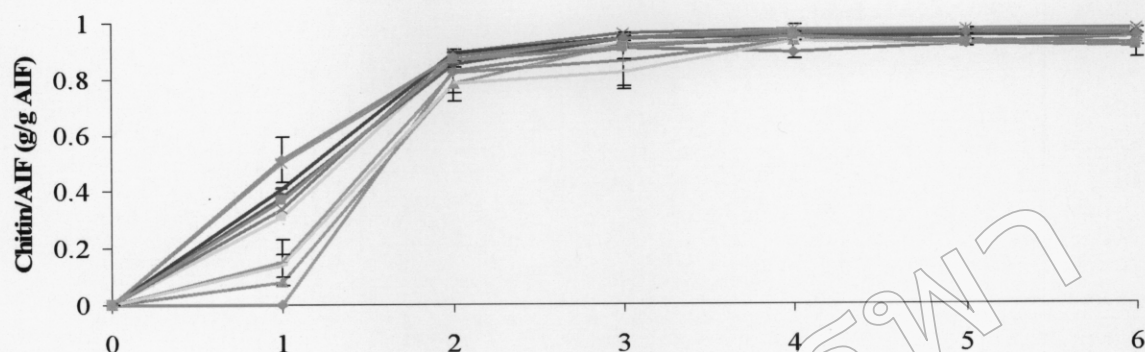
ชุดควบคุม 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 8 เปอร์เซ็นต์ และยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามสูตรปกติ แล้วเติมสารอาหารอื่นตามชุดควบคุม 1

สูตรปรับปรุงเป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 8 เปอร์เซ็นต์ และยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ และแปรผันปริมาณ

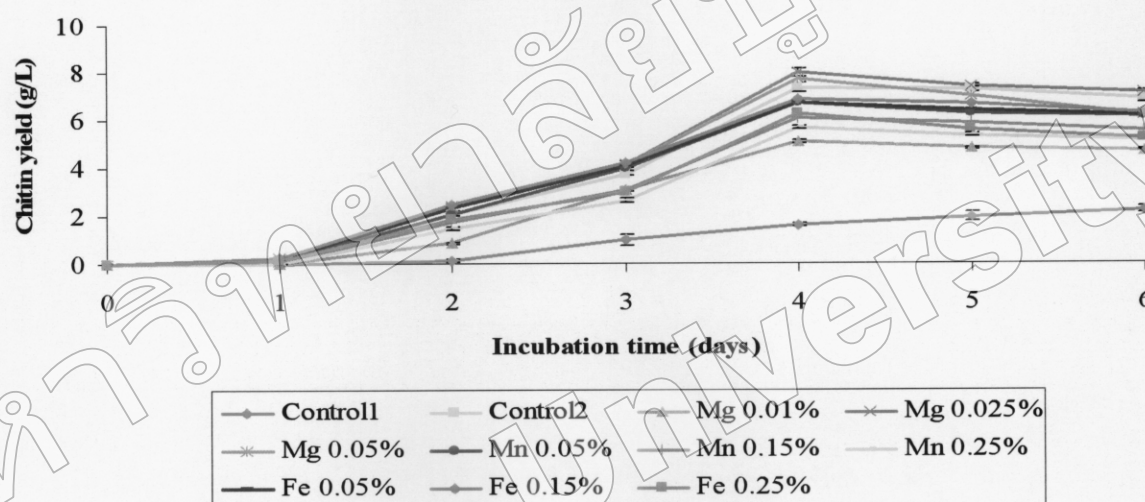
ธาตุแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัส แล้วเติมสารอาหารอื่นตามชุดควบคุม 1

บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที

(A)



(B)



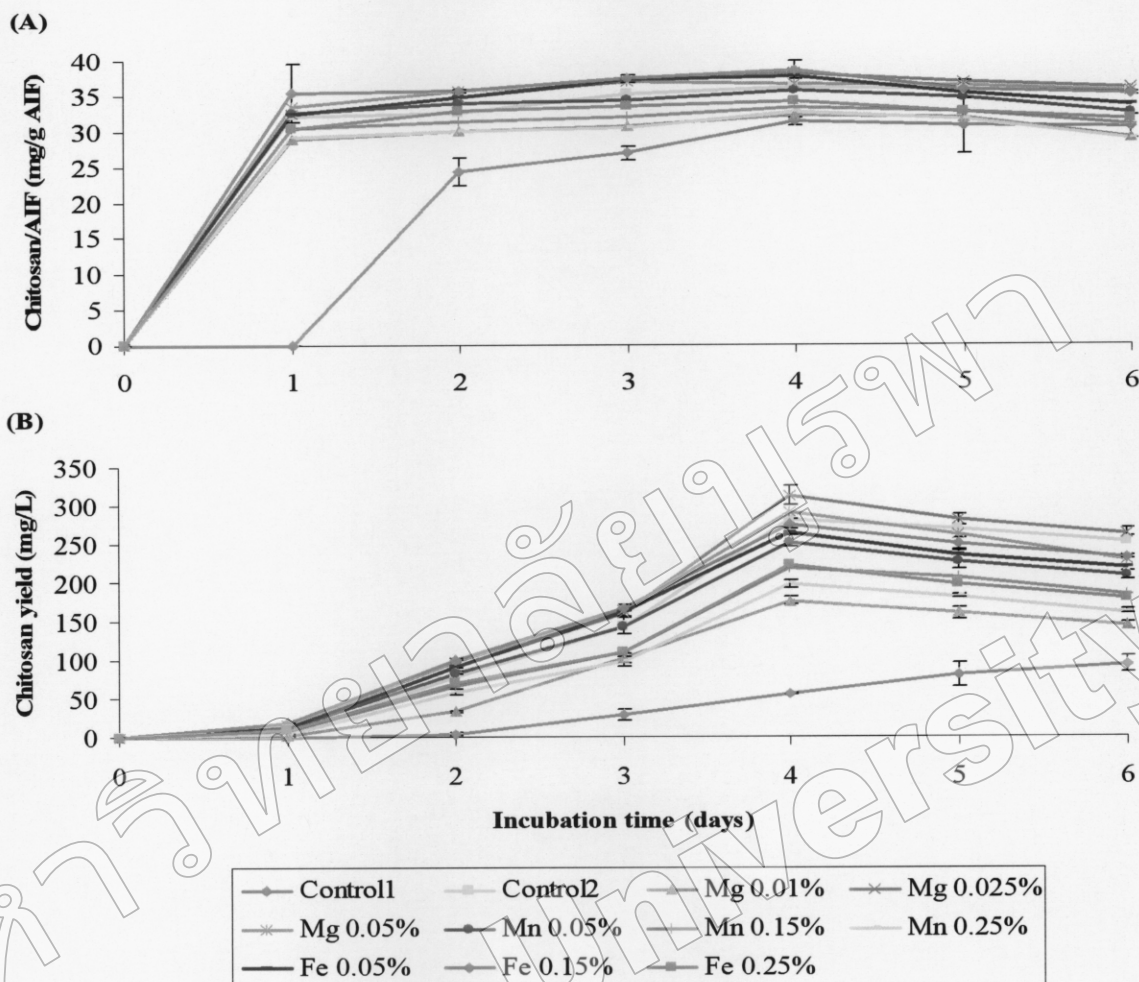
ภาพที่ 4-24 ปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคติน (B) ของ *A. oryzae* TISTR3018 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่แปรผันปริมาณธาตุแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัส

หมายเหตุ ชุดควบคุม 1 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 2.3 เปอร์เซ็นต์ และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์

ชุดควบคุม 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 8 เปอร์เซ็นต์ และยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามสูตรปกติ แล้วเติมสารอาหารอื่นตามชุดควบคุม 1

สูตรปรับปรุงเป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 8 เปอร์เซ็นต์ และยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ และแปรผันปริมาณ

ธาตุแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัส แล้วเติมสารอาหารอื่นตามชุดควบคุม 1 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที



ภาพที่ 4-25 ปริมาณไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคโตซาน (B) ของ *A. oryzae* TISTR3018 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่แปรผันปริมาณธาตุแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัส

หมายเหตุ ชุดควบคุม 1 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 2.3 เปอร์เซ็นต์ และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์

ชุดควบคุม 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 8 เปอร์เซ็นต์ และยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามสูตรปกติ แล้วเติมสารอาหารอื่นตามชุดควบคุม 1

สูตรปรับปรุงเป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแป้ง 8 เปอร์เซ็นต์ และยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ และแปรผันปริมาณ

ธาตุแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัส แล้วเติมสารอาหารอื่นตามชุดควบคุม 1

บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที

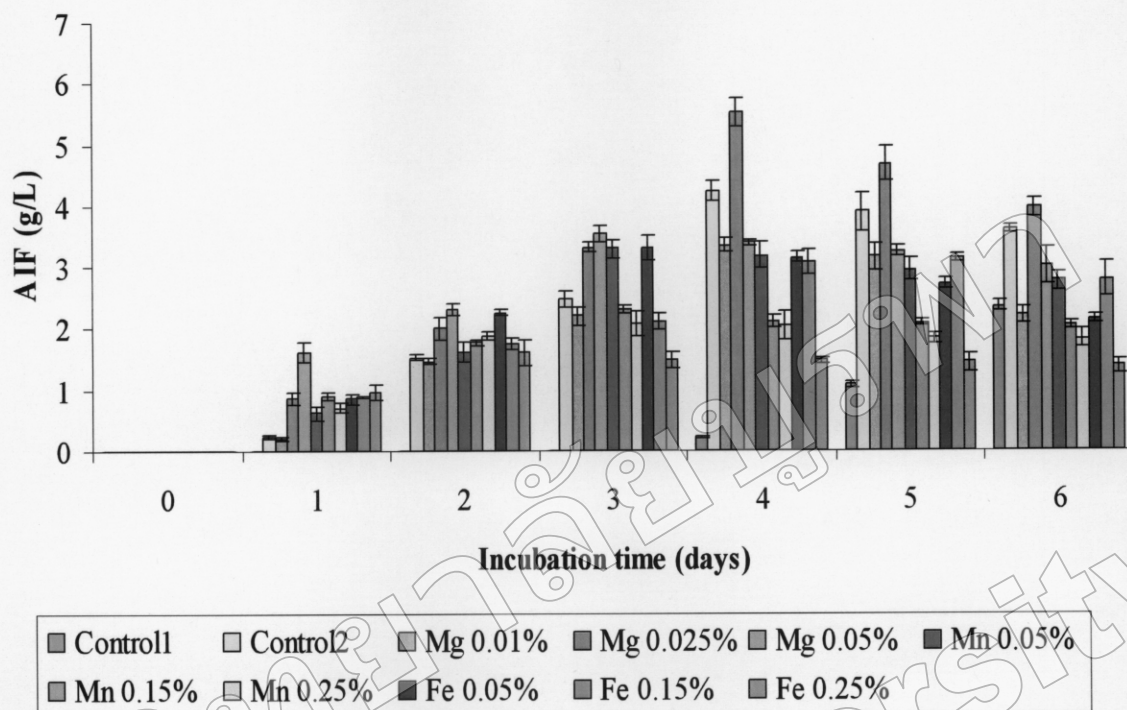
3.2 *S. monoceras* 10-85

ในช่วง 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยงพบว่า *S. monoceras* 10-85 มีการเจริญได้ค่อนข้างดีในอาหาร starch broth ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025-0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลดังกล่าวนี้คล้ายคลึงกับที่พบในอาหารที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ หรือเฟอร์รัสซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อพิจารณาจากค่า AIF ที่สกัดได้จากเส้นใยพบว่ามีความประมาณ 3.30-3.54 กรัมต่อลิตร โดยค่า AIF ที่ได้จากชุดทดลองดังกล่าวนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม 2 กล่าวคือ 2.48 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-26) อย่างไรก็ตามพบว่าราไอโซเลตนี้เจริญได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่า AIF 5.52 ± 0.23 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นการเจริญค่อย ๆ ลดลงวันที่ 5 และ 6 ตามลำดับ การเจริญของราในชุดควบคุม 2 (อาหาร Starch broth ที่มีแป้ง (Soluble starch) 6 เปอร์เซ็นต์ และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ) เป็นไปในทำนองเดียวกันแต่มีค่าการเจริญที่ต่ำกว่า โดยวิเคราะห์ปริมาณ AIF สูงสุดได้ 4.23 ± 0.16 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบที่เป็นไคตินที่มีอยู่ในผนังเซลล์ พบว่าในช่วงวันที่ 2-6 มีการสะสมไคตินในผนังเซลล์ใกล้เคียงกัน ในอาหาร Starch broth ที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025-0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลดังกล่าวนี้คล้ายคลึงกับที่พบในอาหารที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ หรือเฟอร์รัสซัลเฟต 0.05-0.15 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อพิจารณาจากปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในวันที่ 3-4 ของการเพาะเลี้ยงพบว่ามีความสูงที่สุดประมาณใกล้เคียงกัน 0.95-0.97 กรัมต่อกรัม AIF ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม 2 กล่าวคือ 0.92-0.95 กรัมต่อกรัม AIF โดยองค์ประกอบที่เป็นไคตินในผนังเซลล์ที่ได้จากชุดทดลองดังกล่าวนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 4-27A) สำหรับผลผลิตไคตินที่ได้จาก *S. monoceras* 10-85 มีปริมาณผลผลิตไคตินได้ดีใน 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025-0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลดังกล่าวนี้คล้ายคลึงกับที่พบในอาหารที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ หรือเฟอร์รัสซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีความประมาณ 3.10-3.42 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามปริมาณผลผลิตไคตินที่ได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ในอาหารที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 5.38 ± 0.24 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณผลผลิตไคตินค่อย ๆ ลดลงวันที่ 5 และ 6 ตามลำดับ ซึ่งผลผลิตไคตินของราในชุดควบคุม เป็นไปในทำนองเดียวกันแต่มีปริมาณไคตินที่ต่ำกว่า โดยมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 4.04 ± 0.18 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4-27B)

เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบที่เป็นไคโตซานที่ผนังเซลล์ของ *S. monoceras* 10-85 พบว่าในช่วง 2-4 วันแรกของการเพาะเลี้ยง ให้ค่าไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ไม่

แตกต่างกันมากในอาหาร Starch broth ที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025-0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลดังกล่าวนี้คล้ายคลึงกับที่พบในอาหารที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.05-0.25 เปอร์เซ็นต์ หรือ เฟอร์รัสซัลเฟต 0.05-0.25 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อพิจารณาจากปริมาณโคโคซานที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ในวันที่ 3-4 พบว่ามีค่าประมาณใกล้เคียงกัน 90-100 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม 2 กล่าวคือ 93-96 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF โดยองค์ประกอบที่เป็นโคโคซานในผนังเซลล์ที่ได้จากชุดทดลองดังกล่าวนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 4-28A) สำหรับผลผลิตโคโคซานพบว่ามีการผลิตได้ดีใน 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยง ในอาหาร Starch broth ที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025-0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลดังกล่าวนี้คล้ายคลึงกับที่พบในอาหารที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ หรือเฟอร์รัสซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีค่าประมาณ 313-343 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามปริมาณผลผลิตโคโคซานที่ได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 552.83 ± 12.50 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณผลผลิตโคโคซานค่อย ๆ ลดลงวันที่ 5 และ 6 ตามลำดับ ซึ่งผลผลิตโคโคซานของราในชุดควบคุม 2 เป็นไปในทำนองเดียวกันแต่มีปริมาณโคโคซานที่ต่ำกว่า โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 406.00 ± 10.97 มิลลิกรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4-28B)



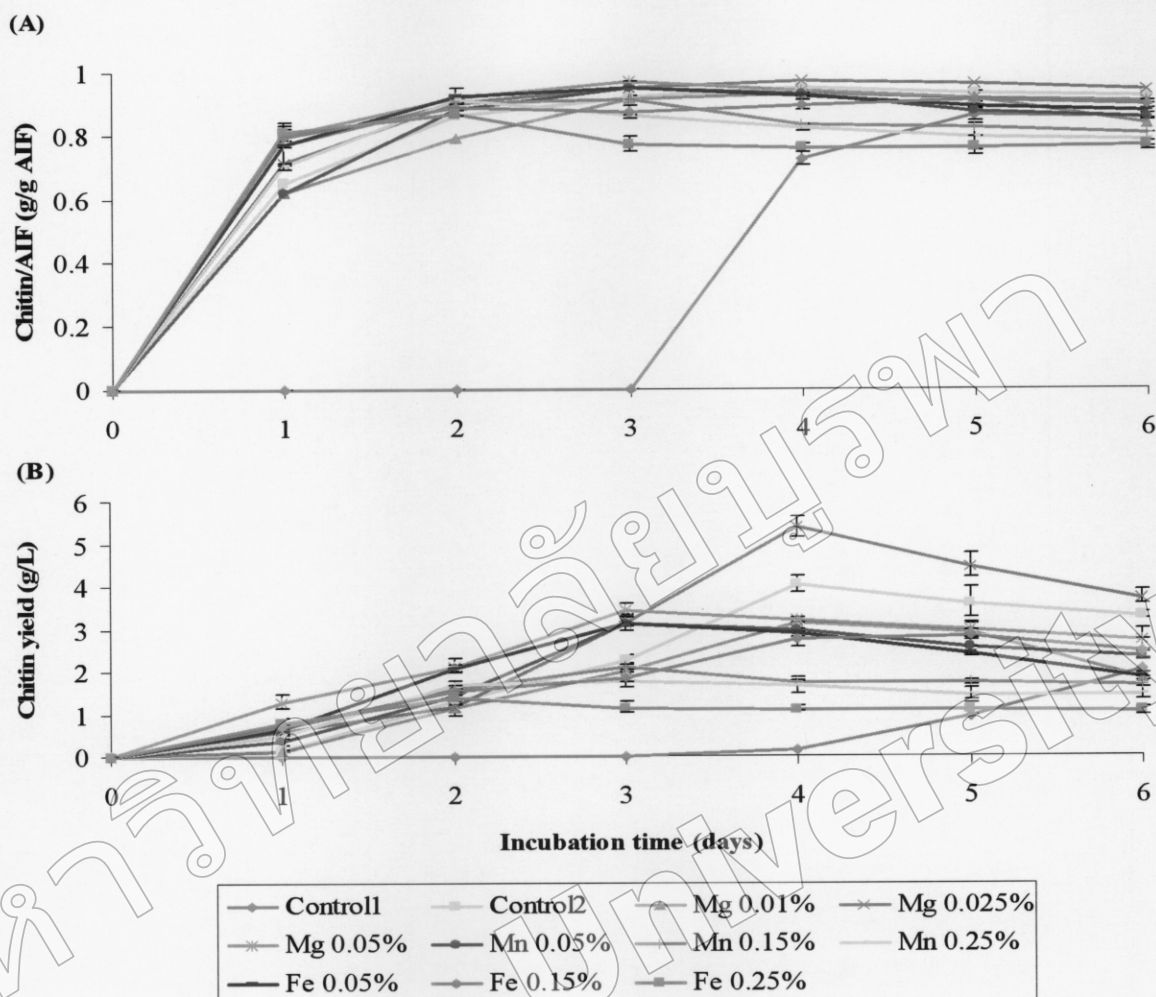
ภาพที่ 4-26 ปริมาณ AIF ของ *S. monoceras* 10-85 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่แปรผันปริมาณธาตุแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัส

หมายเหตุ

ชุดควบคุม 1 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแอมโมเนียม 2.3 เปอร์เซ็นต์ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์

ชุดควบคุม 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแอมโมเนียม 6 เปอร์เซ็นต์ และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามสูตรปกติ แล้วเติมสารอาหารอื่นตามชุดควบคุม 1

สูตรปรับปรุงเป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแอมโมเนียม 6 เปอร์เซ็นต์ และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ และแปรผันปริมาณธาตุแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัส แล้วเติมสารอาหารอื่นตามชุดควบคุม 1 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที

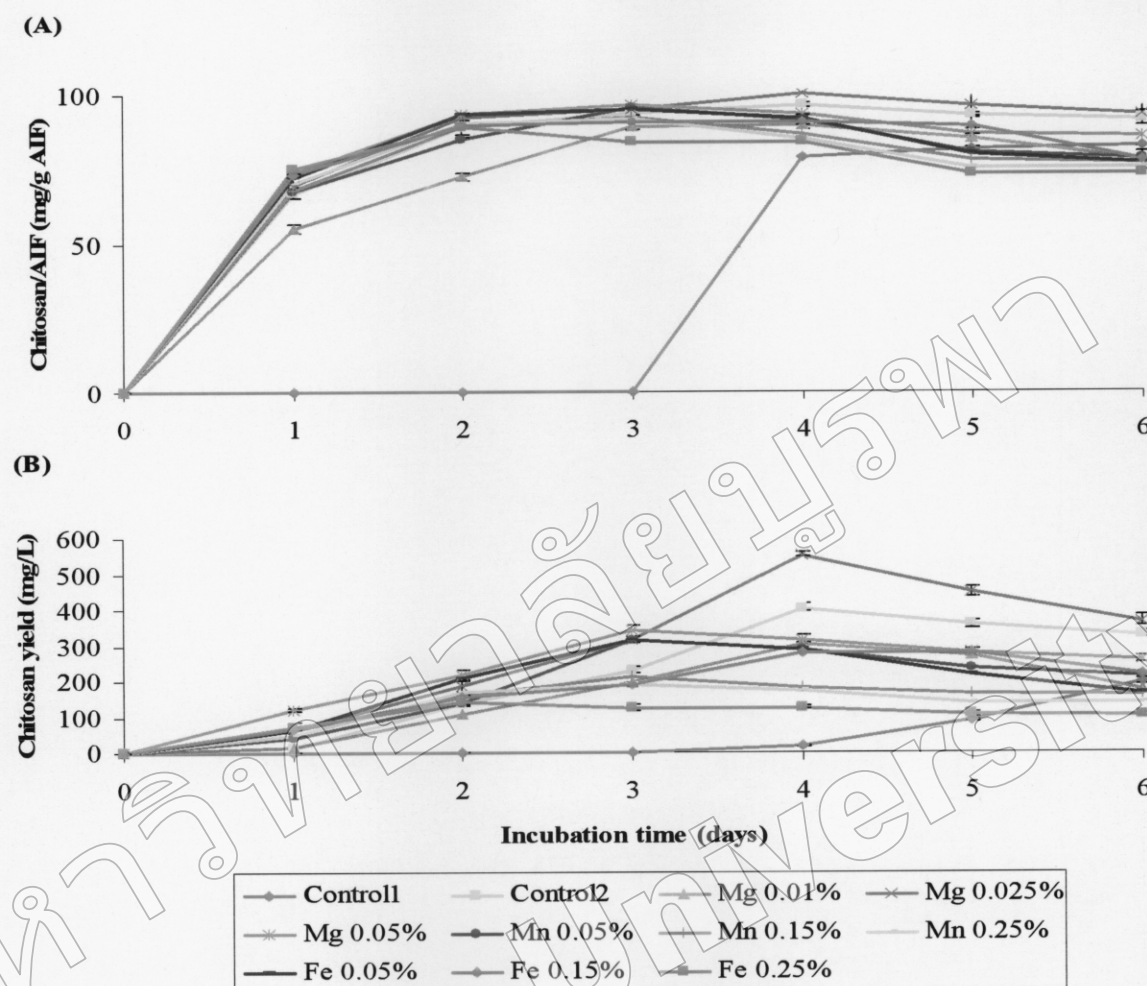


ภาพที่ 4-27 ปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคติน (B) ของ *S. monoceras* 10-85 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่แปรผันปริมาณธาตุแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัส

หมายเหตุ ชุดควบคุม 1 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์

ชุดควบคุม 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามสูตรปกติ แล้วเติมสารอาหารอื่นตามชุดควบคุม 1

สูตรปรับปรุงเป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ และแปรผันปริมาณธาตุแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัส แล้วเติมสารอาหารอื่นตามชุดควบคุม 1 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที



ภาพที่ 4-28 ปริมาณไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคโตซาน (B) ของ *S. monoceras* 10-85 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่แปรผันปริมาณธาตุแมกนีเซียม แมงกานีส และเฟอร์รัส

หมายเหตุ ชุดควบคุม 1 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแอม้ง 2.3 เปอร์เซ็นต์ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์

ชุดควบคุม 2 เป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแอม้ง 6 เปอร์เซ็นต์ และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามสูตรปกติ แล้วเติมสารอาหารอื่นตามชุดควบคุม 1

สูตรปรับปรุงเป็นอาหาร Starch broth ที่มีปริมาณแอม้ง 6 เปอร์เซ็นต์ และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.25 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ และแปรผันปริมาณธาตุแมกนีเซียม แมงกานีสและเฟอร์รัส แล้วเติมสารอาหารอื่นตามชุดควบคุม 1 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า *A. oryzae* TISTR3018 และ *S. monoceras* 10-85 มีการเจริญที่ดีกว่าและผลิตโคตินและไคโตซานได้สูงขึ้นเมื่อมีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.025 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร Starch broth ที่มีการปรับปรุงปริมาณแป้งโดยใช้ความเข้มข้น 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และปรับปรุงปริมาณยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4. การเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตโคตินและไคโตซานของ *A. oryzae* TISTR3018 และ *S. monoceras* 10-85 ในอาหาร Starch broth สูตรปรับปรุงและสูตรเดิม อาหาร Starch broth สูตรที่ปรับปรุงแล้ว แตกต่างจากสูตรดั้งเดิมในด้านปริมาณของแป้ง $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ยูเรียและมีการเสริมธาตุอาหารรองคือแมกนีเซียมซัลเฟตในความเข้มข้น 0.025 เปอร์เซ็นต์ รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 4-4

ตารางที่ 4-4 ความแตกต่างของสูตรอาหาร Starch broth ของ *A. oryzae* TISTR3018 และ *S. monoceras* 10-85

รายไอโซเลท	องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (%)		หมายเหตุ
		สูตรเดิม	สูตรปรับปรุง	
<i>A. oryzae</i> TISTR3018	แป้ง (Soluble starch)	2.3	8	ปรับเพิ่ม
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5	-	ไม่เติม
	Urea	-	0.5	ปรับเพิ่ม
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02	0.025	ปรับเพิ่ม
	KH_2PO_4	0.5	0.5	คงเดิม
	Yeast extract	0.4	0.4	คงเดิม
<i>S. monoceras</i> 10-85	แป้ง (Soluble starch)	2.3	6	ปรับเพิ่ม
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5	0.25	ปรับลดลง
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02	0.025	ปรับเพิ่ม
	KH_2PO_4	0.5	0.5	คงเดิม
	Yeast extract	0.4	0.4	คงเดิม

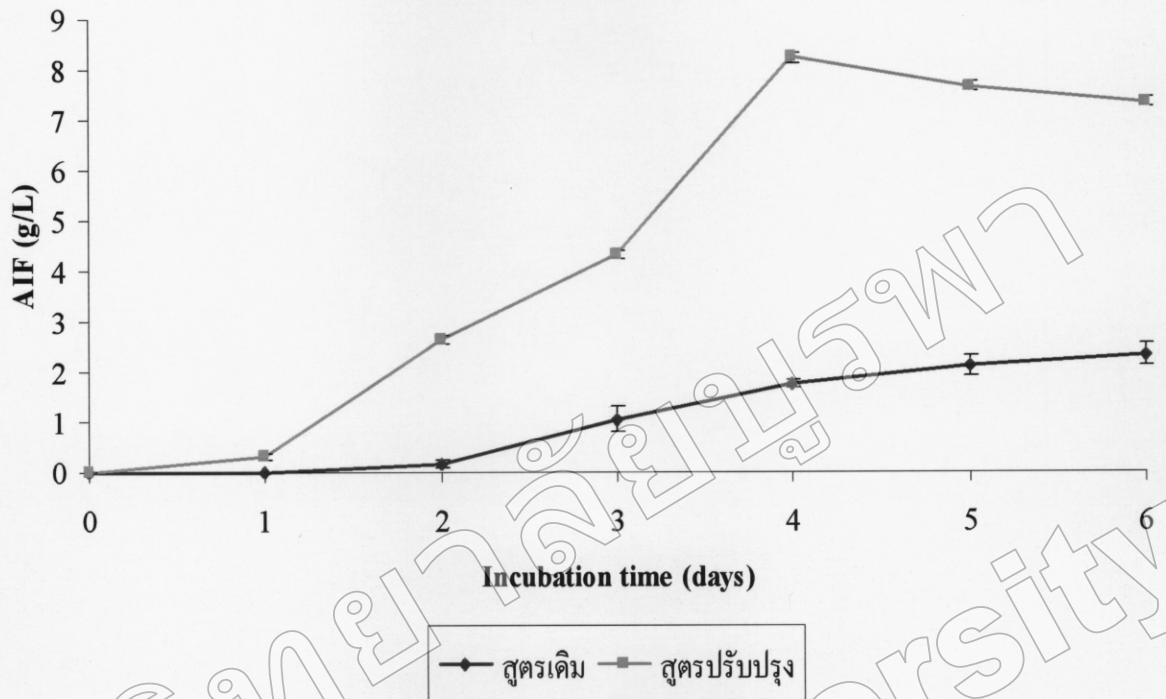
เมื่อศึกษาการเจริญและการผลิตโคตินและโคโคซานของ *A. oryzae* TISTR3018 และ *S. monoceras* 10-85 ซ้ำอีกครั้งโดยใช้อาหาร Starch broth สูตรปรับปรุงเป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดิม (ยูฟา ก่อเกียรติพันธ์, 2521) ให้ผลดังนี้

4.1 *A. oryzae* TISTR3018

จากการศึกษาพบว่า การเจริญและการผลิตโคตินและโคโคซานของ *A. oryzae* TISTR3018 ในอาหาร Starch broth สูตรปรับปรุงดีกว่าอาหารสูตรเดิม โดยในอาหารสูตรเดิมนั้น วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงไม่สามารถวิเคราะห์ได้เนื่องจากมีการเจริญน้อยจนเส้นใยไม่เพียงพอ สำหรับการวิเคราะห์ โดยราชนิคมเจริญได้สูงสุดในวันที่ 4 (ภาพที่ 4-29) ของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปรับปรุงมีค่าเท่ากับ 8.22 ± 0.11 กรัมต่อลิตร ซึ่งต่างจากในอาหารสูตรเดิมที่มีการเจริญสูงสุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง (2.34 ± 0.10 กรัมต่อลิตร)

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบโคตินที่มีในผนังเซลล์ของ *A. oryzae* TISTR3018 ในอาหารทั้งสองสูตร พบว่ามีการสะสมโคตินในผนังเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมากในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณการสะสมโคตินค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง พบว่ามีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปรับปรุง 0.97 ± 0.01 กรัมต่อกรัม AIF ต่างจากในอาหารสูตรเดิมที่มีการสะสมโคตินในผนังเซลล์สูงสุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง (0.94 ± 0.02 กรัมต่อกรัม AIF) ดังแสดงในภาพที่ 4-30A สำหรับผลผลิตโคตินพบว่ามีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปรับปรุงมีค่าเท่ากับ 7.98 ± 0.15 กรัมต่อลิตร และสูงกว่าอาหารสูตรเดิมซึ่งให้ผลผลิตโคตินสูงสุด (2.19 ± 0.15 กรัมต่อลิตร) ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4-30B)

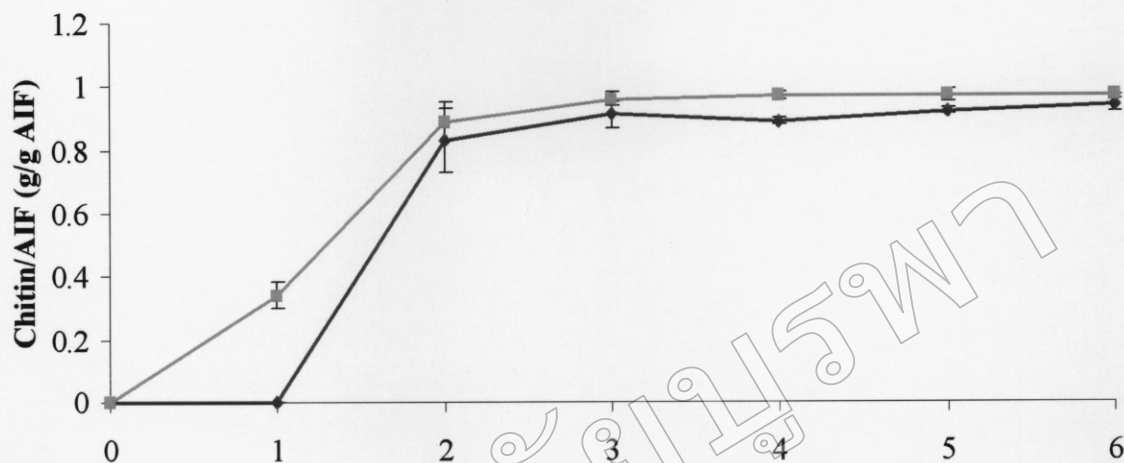
ในอาหารสูตรปรับปรุงมีองค์ประกอบของโคโคซานในผนังเซลล์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม โดยพบว่าที่ผนังเซลล์มีการสะสมโคโคซานเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงนานขึ้น ปริมาณโคโคซานที่ผนังเซลล์พบว่าในอาหารสูตรปรับปรุงมีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (38.07 ± 1.70 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF) หลังจากนั้นค่อนข้างคงที่และเริ่มลดลง ในขณะที่อาหารสูตรเดิมมีการสะสมโคโคซานสูงสุด (31.15 ± 0.65 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF) ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4-31A) สำหรับผลผลิตโคโคซานที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปรับปรุงสูงกว่าอาหารสูตรเดิม ซึ่งพบว่ามีปริมาณผลผลิตโคโคซานสูงสุด (313.01 ± 12.77 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในอาหารสูตรปรับปรุงเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ในขณะที่อาหารสูตรเดิมให้ผลผลิตโคโคซานสูงสุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง (94.33 ± 10.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ดังแสดงในภาพที่ 4-31B



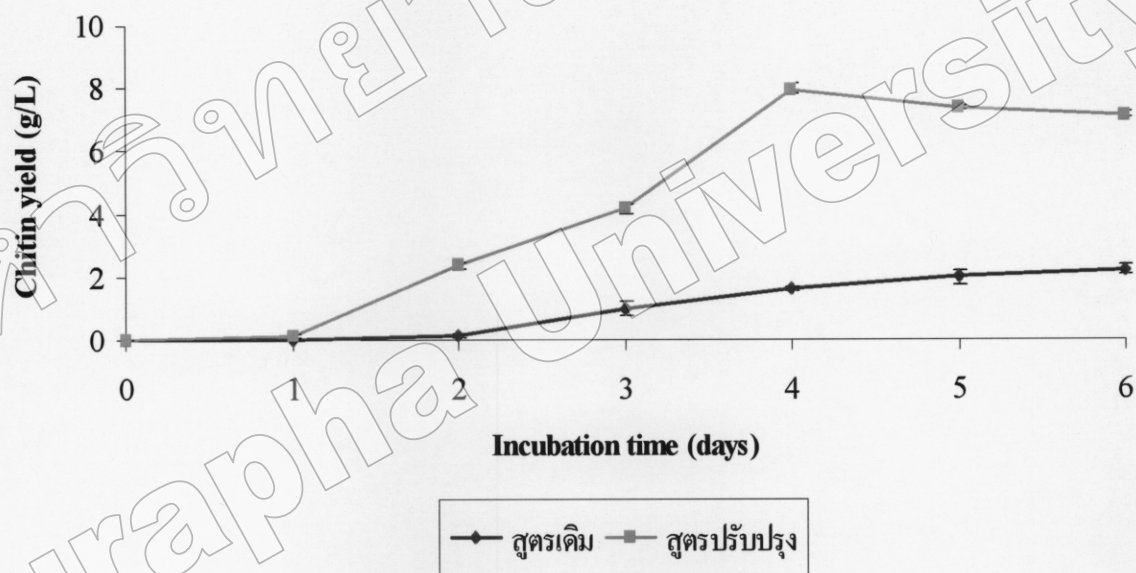
ภาพที่ 4-29 ปริมาณ AIF ของ *A. oryzae* TISTR3018 ที่เจริญในอาหาร Starch broth สูตรเดิมและสูตรปรับปรุง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที

หมายเหตุ อาหารสูตรเดิมประกอบด้วยแป้ง 2.3 เปอร์เซ็นต์ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์
อาหารสูตรปรับปรุงประกอบด้วยแป้ง 8 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติมสารอาหารอื่นตามสูตรเดิม

(A)



(B)

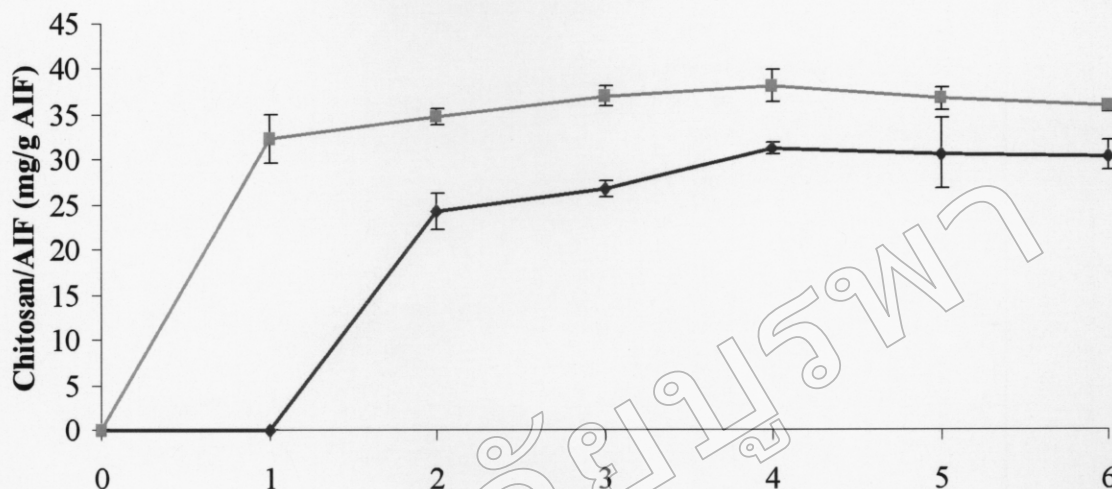


ภาพที่ 4-30 ปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคติน (B) ของ *A. oryzae* TISTR3018 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth สูตรเดิมและสูตรปรับปรุง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที

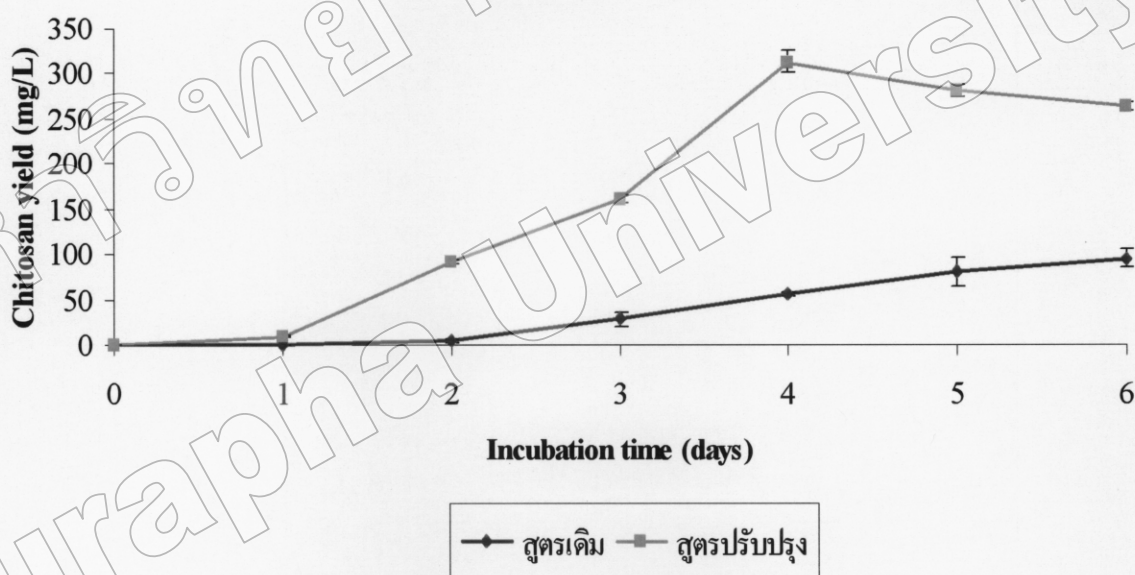
หมายเหตุ อาหารสูตรเดิมประกอบด้วยแป้ง 2.3 เปอร์เซ็นต์ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์

อาหารสูตรปรับปรุงประกอบด้วยแป้ง 8 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติมสารอื่นตามอาหารสูตรเดิม

(A)



(B)



ภาพที่ 4-31 ปริมาณไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคโตซาน (B) ของ *A. oryzae* TISTR3018 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth สูตรเดิมและสูตรปรับปรุง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที

หมายเหตุ อาหารสูตรเดิมประกอบด้วยแป้ง 2.3 เปอร์เซ็นต์ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์

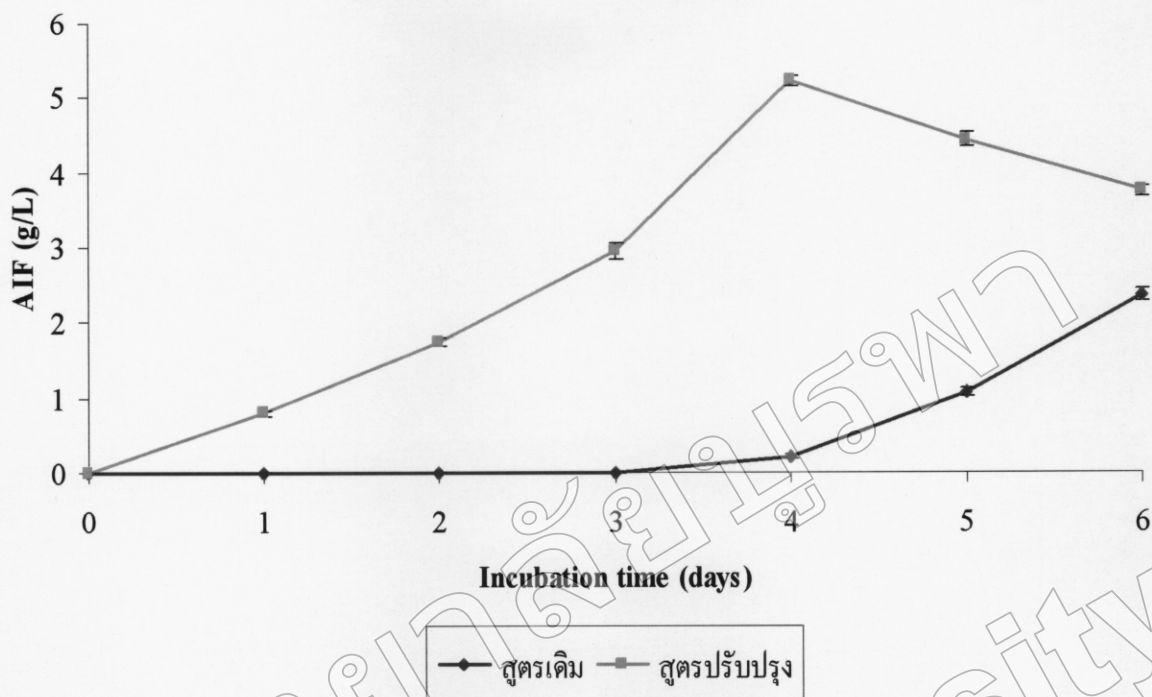
อาหารสูตรปรับปรุงประกอบด้วยแป้ง 8 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติมสารอื่นตามอาหารสูตรเดิม

4.2 *S. monoceras* 10-85

เมื่อศึกษาพบว่า *S. monoceras* 10-85 มีการเจริญและการผลิตโคตินและโคโตซานได้ดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth สูตรปรับปรุง ส่วนในอาหารสูตรเดิมนั้น ในวันที่ 1-3 ของการเพาะเลี้ยงไม่สามารถวิเคราะห์ได้เนื่องจากามีการเจริญน้อยจนเส้นใยไม่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ โดยราชานันท์เจริญได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปรับปรุง ซึ่งปริมาณ AIF ที่วิเคราะห์ได้จากเส้นใยที่เจริญในอาหารสูตรปรับปรุงมีค่าเท่ากับ 5.22 ± 0.07 กรัมต่อลิตร ซึ่งต่างจากการเลี้ยงในอาหารสูตรเดิมโดยมีการเจริญสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน (2.36 ± 0.08 กรัมต่อลิตร) (ภาพที่ 4-32)

เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร starch broth สูตรปรับปรุงพบว่า *S. monoceras* 10-85 มีการสะสมโคตินในผนังเซลล์สูงสุด (0.97 ± 0.00 กรัมต่อกรัม AIF) ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณการสะสมของโคตินค่อนข้างคงที่จนถึงวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง โดยการเจริญในอาหารสูตรเดิมซึ่งมีการสะสมโคตินที่ผนังเซลล์ในปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงและเริ่มค่อนข้างคงที่ โดยมีค่าสูงสุดในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง (0.85 ± 0.01 กรัมต่อกรัม AIF) ดังแสดงในภาพที่ 4-33A สำหรับผลผลิตโคตินพบว่ามีความสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรปรับปรุงโดยมีค่าเท่ากับ 5.08 ± 0.07 กรัมต่อลิตร และต่างจากในอาหารสูตรเดิมให้ค่าปริมาณโคตินสูงสุดคือ 2.02 ± 0.01 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน (ภาพที่ 4-33B)

S. monoceras 10-85 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth สูตรปรับปรุงมีองค์ประกอบของโคโตซานในผนังเซลล์ (106.93 ± 0.92 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF) มากกว่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตรเดิม (82.49 ± 1.07 มิลลิกรัมต่อกรัม AIF) ดังแสดงในภาพที่ 4-34A โดยพบว่าที่ผนังเซลล์มีการสะสมโคโตซานเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงนานขึ้น ปริมาณโคโตซานที่ผนังเซลล์พบว่ามีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นค่อนข้างคงที่ในเซลล์ที่เจริญอาหารสูตรเดิม ในขณะที่มีปริมาณลดลงในเซลล์ที่เจริญในอาหารสูตรปรับปรุง สำหรับผลผลิต โคโตซานที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *S. monoceras* 10-85 ในอาหาร Starch broth สูตรปรับปรุงสูงกว่าอาหารสูตรเดิมซึ่งพบว่าในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงโดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 557.75 ± 10.18 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดิมซึ่งให้ผลผลิตโคโตซานสูงสุดเท่ากับ 194.67 ± 9.75 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน (ภาพที่ 4-34B)

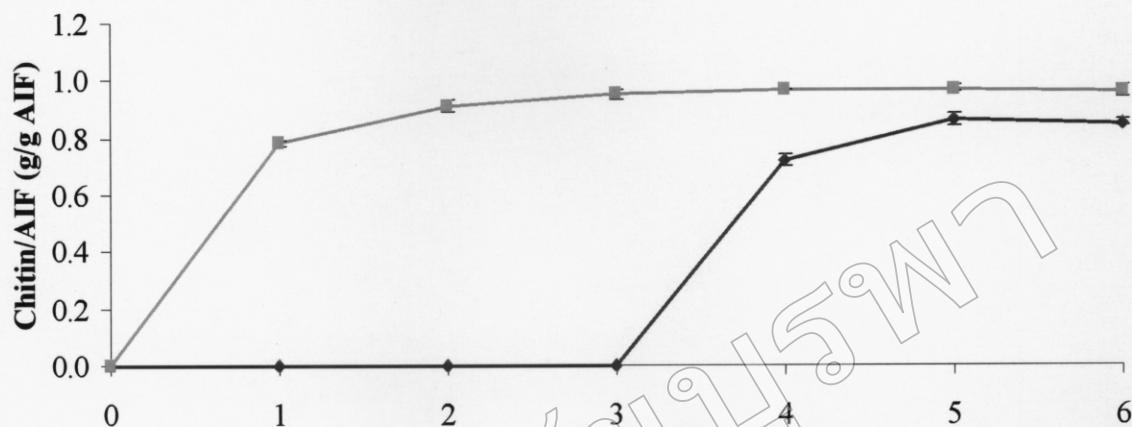


ภาพที่ 4-32 ปริมาณ AIF ของ *S. monoceras* 10-85 ที่เจริญในอาหาร Starch broth สูตรเดิมและสูตรปรับปรุง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที

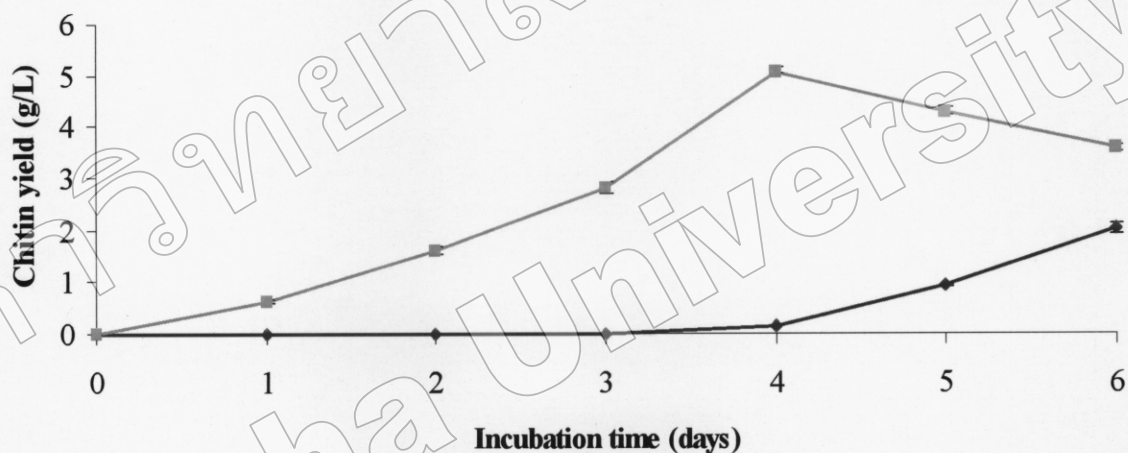
หมายเหตุ อาหารสูตรเดิมประกอบด้วยแป้ง 2.3 เปอร์เซ็นต์ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์

อาหารสูตรปรับปรุงประกอบด้วยแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติมสารอื่นตามอาหารสูตรเดิม

(A)



(B)



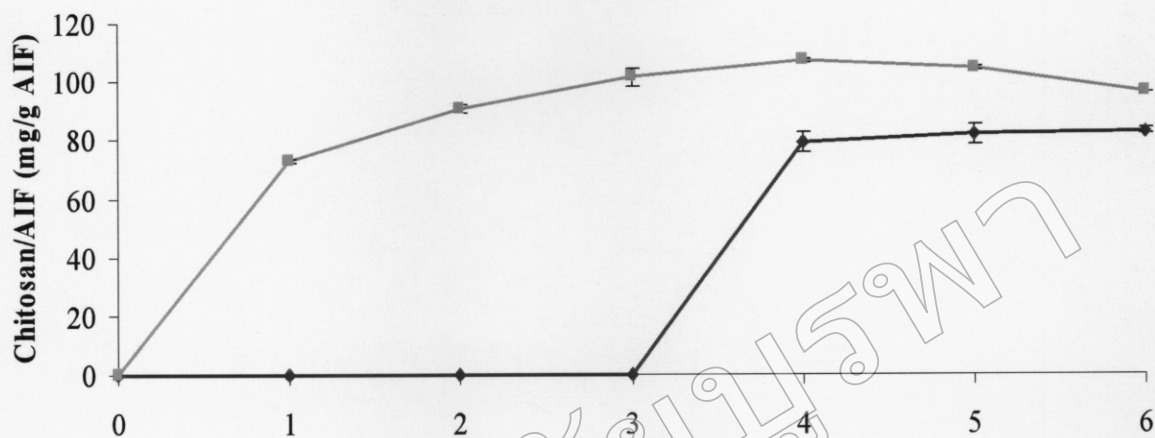
—●— สูตรเดิม —■— สูตรปรับปรุง

ภาพที่ 4-30 ปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคติน (B) ของ *S. monoceras* 10-85 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth สูตรเดิมและสูตรปรับปรุง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที

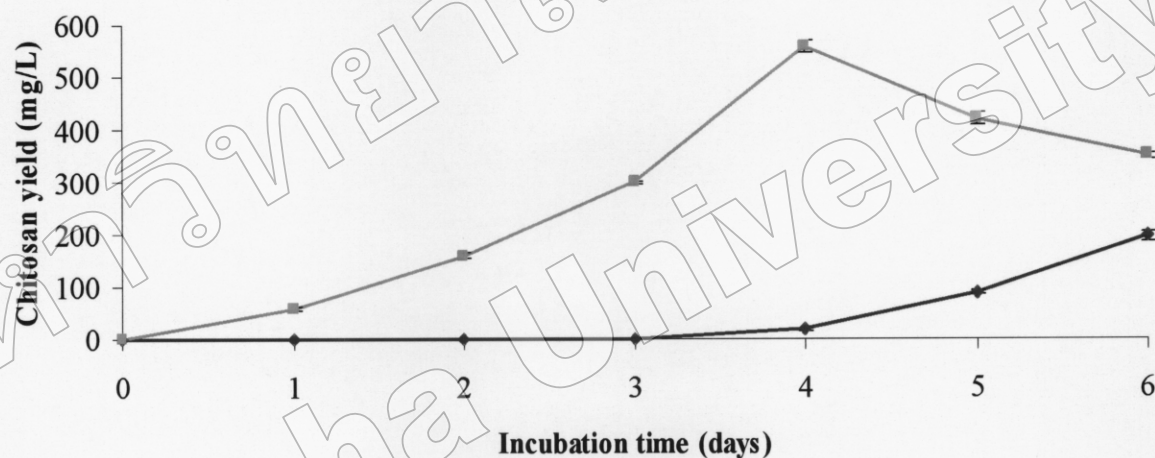
หมายเหตุ อาหารสูตรเดิมประกอบด้วยแป้ง 2.3 เปอร์เซ็นต์ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์

อาหารสูตรปรับปรุงประกอบด้วยแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติมสารอื่นตามอาหารสูตรเดิม

(A)



(B)



—●— สูตรเดิม —■— สูตรปรับปรุง

ภาพที่ 4-31 ปริมาณไคโตซานที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (A) และผลผลิตไคโตซาน (B)

ของ *S. monoceras* 10-85 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch broth สูตรเดิมและสูตรปรับปรุง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที

หมายเหตุ อาหารสูตรเดิมประกอบด้วยแป้ง 2.3 เปอร์เซ็นต์ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดจากยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์

อาหารสูตรปรับปรุงประกอบด้วยแป้ง 6 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025 เปอร์เซ็นต์ แล้วเติมสารอื่นตามอาหารสูตรเดิม

จากการศึกษาได้เปรียบเทียบการเจริญ องค์ประกอบที่เป็นไคตินและไคโตซานที่อยู่ใน
ผนังเซลล์ ปริมาณผลผลิตไคตินและไคโตซานที่ได้ปริมาณสูงที่สุดในอาหาร Starch broth สูตรเดิม
เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน และสูตรปรับปรุงเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน แสดงดังตารางที่ 4-5

ตารางที่ 4-5 เปรียบเทียบปริมาณผนังเซลล์และผลผลิตไคตินและไคโตซานที่ได้จากการเพาะเลี้ยง
A. oryzae TISTR3018 และ *S. monoceras* 10-85 ในอาหาร Starch broth สูตรเดิม
และสูตรปรับปรุง

ผลผลิต	<i>A. oryzae</i> TISTR3018		<i>S. monoceras</i> 10-85	
	สูตรเดิม ^๑	สูตรปรับปรุง ^๒	สูตรเดิม ^๑	สูตรปรับปรุง ^๒
AIF (g/L)	2.34±0.21	8.22±0.11	2.36±0.08	5.22±0.07
Chitin/AIF (g/g AIF)	0.94±0.02	0.97±0.01	0.85±0.01	0.97±0.00
	(94%)*	(97%)*	(85%)*	(97%)*
Chitin yield (g/L)	2.19±0.15	7.98±0.15	2.02±0.01	5.08±0.07
Chitosan/AIF (mg/g AIF)	31.15±0.65	38.07±1.70	82.49±1.07	106.93±0.92
	(3.1%)*	(3.8%)*	(8.3%)*	(10.7%)*
Chitosan yield (mg/L)	94.33±10.50	313.01±12.77	194.67±9.75	557.75±10.18

หมายเหตุ *ปริมาณองค์ประกอบของไคตินหรือไคโตซานในผนังเซลล์ (คำนวณเทียบจากน้ำหนัก
แห้งของผนังเซลล์ทั้งหมด)

^๑สูตรเดิมประกอบด้วยแป้ง (Soluble starch) 2.3 เปอร์เซ็นต์ (NH₄)₂SO₄ 0.5 เปอร์เซ็นต์
MgSO₄·7H₂O 0.02 เปอร์เซ็นต์ KH₂PO₄ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์

^๒สูตรปรับปรุงที่เพาะเลี้ยง *A. oryzae* TISTR3018 ประกอบด้วยแป้ง (Soluble starch)
8 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.5 เปอร์เซ็นต์ MgSO₄·7H₂O 0.025 เปอร์เซ็นต์ KH₂PO₄
0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์

^๓สูตรปรับปรุงที่เพาะเลี้ยง *S. monoceras* 10-85 ประกอบด้วยแป้ง (Soluble starch)
6 เปอร์เซ็นต์ (NH₄)₂SO₄ 0.25 เปอร์เซ็นต์ MgSO₄·7H₂O 0.025 เปอร์เซ็นต์
KH₂PO₄ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดยีสต์ 0.4 เปอร์เซ็นต์