ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ บัจจัยบางประการที่มีผลต่อการฟอกสีสารสกัดจากหญ้าหวาน (Stevia rebaudiana Bertoni) โดยจุลินทรีย์

ชื่อผู้เขียน นางสาวอุรัตน์ พิมลศรี

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ มรกต สุกโชติรัตน์ ประธานกรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ด้วง พุธศุกร์ กรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร.อัมพวัน อภิสริยะกุล กรรมการ

บทคัดย่อ

สตีเวียไซด์ (stevioside) เป็นผลิตภัณฑ์สารหวานจากธรรมชาติ สกัดได้จากหญ้าหวาน (Stevia rebaudiana Bertoni) นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและทางด้านการแพทย์ แต่สารสกัดดิบที่ได้มีสีเขียวคล้ำอมดำ การสกัดสตีเวียไซด์จะต้องนำไปทำการฟอกสีก่อน ดังนั้นการวิจัยนี้มุ่งที่จะศึกษาบัจจัยบางประการที่มีผลต่อการฟอกสีสารสกัดจากหญ้าหวาน โดยได้ทำการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของสารสกัดจากหญ้าหวาน พบว่าสารสกัดจากหญ้าหวานมีสภาพเป็นกรดอ่อนมี pH 5.3-5.5 มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 420 nm ความเข้มของสี 21.5 หน่วย ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 2,105 กรัมต่อลิตร แล้วนำจุลินทรีย์ที่ได้จากการศึกษาเบื้องต้นแล้วพบว่ามีความสามารถฟอกสีสารสกัดจากหญ้าหวานได้คือ แบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Micrococcus sp., M. luteus และ Klebsiella sp และเชื้อราอีก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Penicillium sp. Aspergillus niger และ Fusarium sp. (wheat) มาทดลองเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ ที่มีส่วนประกอบของสารสกัดจากหญ้าหวานพบว่า Micrococcus sp. และ Fusarium sp. (wheat) ไม่สามารถฟอกสีได้ในอาหารชนิดใดเลย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

M. luteus ฟอกสีได้ดีในอาหาร nutrient stevia extract broth 27.3% Klebsiella sp. ฟอกสีได้ดีในอาหาร M stevia extract broth 35.4% ส่วนเชื้อรา Penicillium sp. ฟอกสีได้ดีในอาหาร S stevia extract broth (SSB) 20.5% A. niger ฟอกสีได้ดีในอาหาร SSB 57.3% เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ผสมกัน พบว่าบางสายพันธุ์เมื่ออยู่ร่วมกันแล้ว ทำให้มีการฟอกสีสารสกัดได้ดีขึ้น และบางสายพันธุ์เมื่ออยู่ร่วมกันแล้วทำให้การฟอกสีสารสกัดจากหญ้าหวานลดลง

ได้เลือกเชื้อ A. niger ซึ่งสามารถฟอกสีได้ดีที่สุด มาเลี้ยงในอาหารเหลวเพื่อศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการฟอกสีสารสกัดจากหญ้าหวานดังนี้ ปริมาณกลูโคส ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ปริมาณ KH_2PO_4 ปริมาณ $MgSO_4.7H_2O$ pHของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ระยะเวลาในการฟอกสี อายุของเชื้อตั้งต้น และปริมาณเชื้อตั้งต้น พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการฟอกสีคือ ปริมาณกลูโคส 1.5% ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนคือ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1% ปริมาณ KH_2PO_4 0.1% ปริมาณ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05% (w/v) pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6 อุณหภูมิในการฟอกสีที่ 28±2 °C ระยะเวลาในการฟอกสี 5 วัน อายุของเชื้อตั้งต้น 5 วัน และปริมาณเชื้อตั้งต้น $4x10^7$ สปอร์ ต่อ 100 มล.อาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำ A. niger มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับปรุงและสภาวะที่เหมาะสมแล้ว พบว่ามีอัตราการฟอกสีสูงถึง 85.7%

ผลของอาหารเสริมที่เติมลงไปในสารสกัดจากหญ้าหวานต่อการฟอกสี พบว่า อาหารเสริมทุกชนิดที่เติมลงไป มีผลช่วยให้การฟอกสีสารสกัดจากหญ้าหวานดีขึ้นกว่าไม่เติมอาหารเสริม คือ ถ้าไม่เติมชนิดใดชนิดหนึ่งเช่น กลูโคส $(NH_4)_2SO_4$ KH_2PO_4 และ $MgSO_4.7H_2O$ จะได้ผลการฟอกสีสารสกัดจากหญ้าหวาน ดังนี้ 38.9%, 53.6%, 66.5%, และ 50.1% ตามลำดับ แต่ถ้าไม่เติมอาหารเสริมใดเลย สามารถฟอกสีสารสกัดจากหญ้าหวานได้เพียง 35.2% เท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การพอกสีสารสกัดจากหญ้าหวานแบบกึ่งต่อเนื่อง ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดย A. niger พบว่าได้ผลดีพอสมควร กล่าวคือ การพอกสีสารสกัดจากหญ้าหวานครั้งที่ 1 สามารถพอกสีได้ 62.3% ปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้น 0.113 กรัม/100 มล. ในเวลา 5 วัน ครั้งที่ 2 หลังจากเทอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าออกครึ่งหนึ่ง และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่แทน สามารถพอกสีสารสกัดจากหญ้าหวานได้ 56.8% ปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้น 0.173 กรัม/100 มล. ในเวลา 1 วัน ครั้งที่ 3 หลังจากเทอาหารเลี้ยงเชื้อเก่าออกครึ่งหนึ่งและเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่แทน สามารถพอกสีได้ 54.5% ปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้น 0.201 กรัม/100 มล. ในเวลา 1 วัน

นอกจากนี้ได้วิเคราะห์ปริมาณสตีเวียไซด์ โดยวิธี HPLC พบว่าปริมาณสตีเวียไซด์ในสารสกัดจากหญ้าหวาน ก่อนและหลังการพอกสีไม่มีการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Some Factors Affecting the Decolorization of Stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) Extract by Microorganism

Author Ms. Urat Pimolsri

M.S. Biology

Examining Committee :

Assist.Prof. Morakot Sukchotiratana Chairman

Assoc.Prof. Dr.Duang Buddhasukh Member

Assoc.Prof. Dr.Ampawan Apisariyakul Member

Abstract

Stevioside a natural sweetener extracted from stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) has been used in food industry and medicine. However, the crude extract of stevia is greenish-black. Therefore decolorization has to be done prior to extraction. This research was aimed to determine some factors affecting the decolorization of stevia extract. Preliminary study of stevia extract revealed that it is weakly acidic with pH 5.3-5.5, maximum absorption wavelength 420 nm, colour intensity 21.5 unit and the amount of reducing sugar 2.105 gram/litre. The microorganisms which were found from a previous study to be able to decolorize stevia extract, i.e 3 strains of bacteria : Micrococcus sp., M. luteus and Klebsiella sp. and 3 strains of fungi : Penicillium sp., Aspergillus niger and Fusarium sp. (wheat) were then

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

grown in liquid media containing the stevia extract. It was found that Micrococcus sp. and Fusarium sp. (wheat) was not able to decolorize stevia extract in any of the media used. A 27.3% decolorization by M. luteus was observed in nutrient stevia extract broth. A 35.4% decolorization by Klebsiella sp. occurred in M stevia extract broth. A 20.5% decolorization by Penicillium sp. and a 57.3% by A. niger were observed in S stevia extract broth. When two strains of microorganisms were used together, decolorization was better with certain strain combination. However, other combinations produced less percentage of decolorization.

A. niger, the best decolorizing microorganism among the organisms tested, was cultivated in liquid medium to study various factors affecting decolorization, i.e. glucose content, kind and amount of nitrogen sources, amount of KH_2PO_4, $MgSO_4.7H_2O$, pH of media, temperature and duration of decolorization including age and amount of inoculum. Optimum conditions for decolorization were found to be the following : 1.5% glucose, 0.1% $(NH_4)_2SO_4$ as nitrogen source, 0.1% KH_2PO_4, 0.05% (w/v) $MgSO_4.7H_2O$, pH of medium 6, temperature $28\pm2^{\circ}C$ for 5 days, age of inoculum 5 days and the amount of inoculum $4x10^7$ spores per 100 ml of the medium. When A. niger was grown in the modified medium at various optimal conditions, up to 85% decolorization was obtained.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

The effect of supplement nutrients on decolorization indicated that decolorization was improved when these supplements were added. If any one of the supplements was omitted, eg. glucose, $(NH_4)_2SO_4$, KH_2PO_4 or $MgSO_4.7H_2O$, decolorization were 38.9%, 53.6%, 66.5% and 50.1% respectively. However if none of the supplements were added decolorization was only 35.2%

Decolorization by semi-continuous cultivation of A. niger in a 2 litre fermenter provided a reasonable result. A 62.3% decolorization was obtained in the initial batch of cultivation with a cell mass of 0.113 gram/100 ml in 5 days. When half of the medium was replaced by the freshly prepared lot, a 56.8% decolorization occurred with a cell mass of 0.173 gram/100 ml in one day. When half of the medium was then replaced for the second time, a 54.5% decolorization was observed with a cell mass of 0.210 gram/litre in one day.

Stevioside content was also analysed by HPLC. No significant change of stevioside content before and after decolorization was apparent.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved