รายงานการวิจัย

การปรับปรุงสายพันธุ์ *Aspergillus* sp. BR1 เพื่อผลิตกรดโคจิก

Strain improvement of *Aspergillus* sp. BR1 for kojic acid production

RCH
QR
53
น332ก
ฉ.1
เลขหมู่..........
เลขทะเบียน 121174
วัน, เดือน, ปี 25 ส.ค. 2555
b.12408175X
i..........

นางสาวนวลพรรณ ณ ระนอง

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องการปรับปรุงสายพันธุ์ *Aspergillus* sp. BR1 ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากงบประมาณเพื่อการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2552 ของคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ และนักวิทยาศาสตร์ ของสาขาวิชาชีววิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือจนงานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี

นางสาววลพรรณ ณ ระนอง
ผู้ทำวิจัย
พฤศจิกายน 2554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ **การปรับปรุงสายพันธุ์ *Aspergillus* sp. BR1 เพื่อผลิตกรดโคจิก**

Strain improvement of *Aspergillus* sp. BR1 for kojic acid production

แหล่งเงิน ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2552

จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 200,000 บาท

ระยะเวลาทำวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2551 ถึง 30 กันยายน 2552

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการวิจัย รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

E-mail : knnuanph@kmitl.ac.th

คำสำคัญ : *Aspergillus*, กรดโคจิก, NTG, การกลายพันธุ์

Keywords : *Aspergillus*, kojic acid, NTG, mutation

บทคัดย่อ

ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ *Aspergillus* sp. BR-1 เพื่อให้ได้เชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกสูงกว่าสายพันธุ์เดิม โดยนำสปอร์แขวนลอย ($1x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ผสมกับสารละลาย NTG 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่พีเอช 7.0 เป็นเวลา 30 นาที หลังจากทำให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ N-2062 ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด เท่ากับ 1.42 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหาร starch medium ศึกษาการผลิตกรดโคจิกของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 ในฟลาสก์แบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร ให้กรดโคจิกสูงสุด 15.42 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตกรดโคจิก 3.08 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดโคจิกโดยใช้ยีสต์สกัด เปปโทน ทริปโทน แอมโมเนียมซัลเฟต และโซเดียมไนเตรท 5 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ผลิตกรดโคจิกสูงสุด 15.70 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 3.14 กรัมต่อลิตร สูตรอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 เมื่อศึกษาการผลิตกรดโคจิกระหว่างเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 และสายพันธุ์เดิมในอาหารที่เหมาะสม พบว่ารากลายพันธุ์ N-2062 ให้ปริมาณกรดโคจิก 16.07 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์เดิมผลิตกรดโคจิกเพียง 2.32 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Improvement of *Aspergillus* sp. BR1 was studied to obtain a potential mutant which produced kojic acid higher than its parent strain. Spore suspension ($1x10^7$ spores/ml) was treated with 2 mg/ml NTG solution at pH 7.0 for 30 min. After mutagenesis, a mutant strain N-2062 was selected and the highest kojic acid production of 1.42 g/l was produced in starch medium. Kojic acid production of the mutant strain N-2062 was determined in shaking flasks with shaking speed of 180 rpm at room temperatue. Cassava starch was used as carbon source with the concentrations of 20, 40 and 60 g/l. When 60 g/l cassava starch was used in the medium, the maximum kojic acid concentration and productivity were 15.42 g/l and 3.08 g/ld, respectively. The effect of nitrogen sources on production of kojic acid was investigated using 5 g/l yeast extract, peptone, tryptone, ammomium sulfate and sodium nitrate. The highest kojic acid production of 15.70 g/l was obtained when yeast extract was used as nitrogen source with productivity of 3.14 g/ld. The optimum medium contained (g/l) : cassava starch, 60 ; yeast extract, 5 ; K_2HPO_4 1 ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5 with an initial pH of 4.0. The yields of kojic acid production in the optimized medium between mutant strain N-2062 and the parent strain were studied. From the results, kojic acid production by the mutant strain N-2062 was 16.07 g/l where as the parent strain produced only 2.32 g/l kojic acid.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ	ข
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาของการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
1. กรดโคจิก	3
2. การผลิตกรดโคจิก	5
3. ประโยชน์ของกรดโคจิก	7
4. การปรับปรุงพันธุ์ของรา	8
5. แป้งมันสำปะหลัง	10
วิธีการดำเนินการวิจัย	12
เชื้อจุลินทรีย์	12
อุปกรณ์และสารเคมี	12
วิธีการวิจัย	13
1 การเตรียมกล้าสปอร์	13
2 การชักนำให้กลายพันธุ์	13
3 การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์	14
4 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิก	15
5 เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรากลายพันธุ์และราสายพันธุ์เดิม	15
6 วิธีการวิเคราะห์	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
ผลการวิจัยและอภิปรายผล	17
1 ผลการชักนำให้กลายพันธุ์	17
2 ผลการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ในอาหารแข็งและอาหารเหลว	17
3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก	20
4 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก	22
5 ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก	26
6 ผลการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรากลายพันธุ์และราสายพันธุ์เดิม	28
สรุปผลการทดลอง	30
บรรณานุกรม	31
ภาคผนวก ก	34
ภาคผนวก ข	36

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลัง 10
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนสปอร์ที่รอดตายและอัตรารอดตายของรา *Aspergillus* sp. BR1 17
ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรากลายพันธุ์ในอาหารแข็ง starch medium 18
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตจากเชื้อรากลายพันธุ์ N-2019 และ N-2052 19
ตารางที่ 5 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 20 กรัมต่อลิตร 20
ตารางที่ 6 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 40 กรัมต่อลิตร 21
ตารางที่ 7 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร 21
ตารางที่ 8 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน 23
ตารางที่ 9 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้เปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน 24
ตารางที่ 10 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้ทริปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน 24
ตารางที่ 11 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน 25
ตารางที่ 12 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน 25
ตารางที่ 13 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีพีเอชเริ่มต้น 3.0 27
ตารางที่ 14 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.0 27
ตารางที่ 15 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.0 27
ตารางที่ 16 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสม 29
ตารางที่ 17 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์เดิมที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสม 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	โครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก	3
รูปที่ 2	แสดงวิถีการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแล็กโทน	4
รูปที่ 3	วิถีการสังเคราะห์กรดโคจิกของ *Aspergillus flavus*	5
รูปที่ ข1	กราฟมาตรฐานกรดโคจิก	37
รูปที่ ข2	กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาของการวิจัย

กรดโคจิก (5-hydroxy-2-hydroxymethyl-1,4-pyrone) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_6O_4$ เป็นสารทุติยภูมิที่ผลิตจากเชื้อราในสกุล *Aspergillus* หลายสายพันธุ์ กรดโคจิกนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย เช่น ใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรส (Le Blanch และ Akers, 1989) กรดโคจิกสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (anti-browning agent) ในอาหาร (Chen และคณะ,1991) ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์บำรุงผิวทำให้ผิวขาวและช่วยป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลต (Ohayama และ Mishima , 1990) นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนผสมในยาบรรเทาอาการปวดและป้องกันการอักเสบของแผล (Kayahara และ คณะ , 1990) จากการศึกษาการผลิตกรดโคจิกของราพบว่าสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น กลูโคส ซูโครส อะซิเตต เอทานอล อะราบิโนส และไซโลส (Kitada และ คณะ , 1967; Bassapa และ คณะ , 1970) โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดแต่มีราคาแพง ต่อมามีการคัดเลือกเชื้อราจากธรรมชาติ ที่สามารถผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาล ดังนี้ Rosfarizan และ คณะ (1998) ได้แยกเชื้อ *Aspergillus flavus* S33-2 จากไม้เถาชนิดหนึ่งสามารถผลิตกรดโคจิกได้ เมื่อใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ต่อมาในปี พ.ศ. 2547 คึกฤทธิ์ทำการศึกษาและคัดเลือกเชื้อรา *Aspergillus* จากลูกแป้งเหล้าจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบว่า *Aspergillus* รหัส UD1 NP1 RE3 และ BR1 เป็นราที่มีเอนไซม์ย่อยแป้งและผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

ดังนั้นถ้ามีการใช้แป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกและหาได้ง่ายมาใช้ผลิตกรดโคจิกโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1 ที่คัดเลือกจากลูกแป้งเหล้าในประเทศไทยเป็นการส่งเสริมให้มีการผลิตกรดโคจิกเพื่อใช้ในประเทศ และการนำเชื้อรามาปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ผลิตกรดโคจิกในปริมาณที่สูงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยลดต้นทุนการผลิตและสามารถพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในประเทศต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ปรับปรุงสายพันธุ์ *Aspergillus* sp. BR-1 โดยการใช้สารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์
2. คัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกในปริมาณที่สูง
3. หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวของเชื้อกลายพันธุ์โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอบเขตของการวิจัย

1. หาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *Aspergillus* sp. BR-1 โดยใช้สาร NTG
2. คัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ของราที่ผลิตกรดโคจิกสูงกว่าสายพันธุ์เดิมในอาหารแข็งและอาหารเหลว
3. หาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดโคจิกของเชื้อกลายพันธุ์ในระดับฟลาสก์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

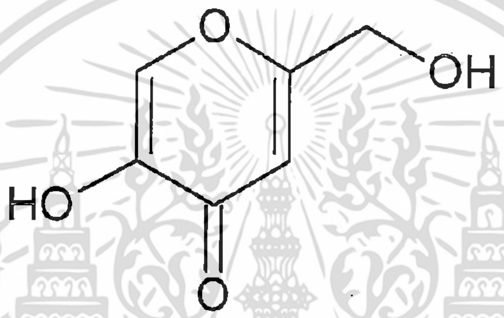
1. ได้เชื้อกลายพันธุ์ของราที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม
2. สามารถผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน
3. เป็นการเพิ่มมูลค่าของแป้งมันสำปะหลังและช่วยลดต้นทุนการผลิต
4. เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อพัฒนาการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. กรดโคจิก

กรดโคจิก (5- hydroxy-2-hydroxymethyl-1,4-pyrone) เป็นสารประกอบของไพโรน (pyrone) ที่ขาดกลุ่มคาร์บอกซิล (carboxyl) โมเลกุลของกรดโคจิกประกอบด้วย คาร์บอน 6 ตัว ไฮโดรเจน 6 ตัว และออกซิเจน 4 ตัว มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_6O_4$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 142.11 มีจุดหลอมเหลวอยู่ในช่วง 153-154 องศาเซลเซียส โครงสร้างกรดโคจิกแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก
ที่มา : Bajpai และคณะ (1982)

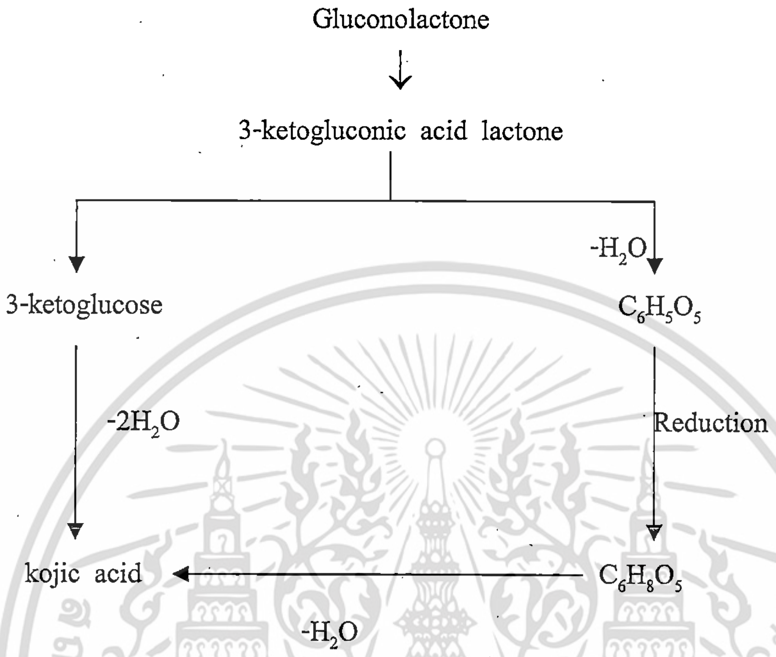
กรดโคจิกบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผลึกทรงปริซึมรูปเข็ม ไม่มีสี ละลายได้ในน้ำ เอทานอล และอะซีโตน ละลายได้เล็กน้อยในอีเทอร์ เอทิลอะซิเตต คลอโรฟอร์มและไพริดิน (Bajpai และคณะ , 1982; Budavari และคณะ , 1989)

กรดโคจิกผลิตจากเชื้อราในสกุล *Aspergillus* หลายสายพันธุ์ โดยใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อราต้องการอากาศในการเจริญ (Bentley , 1957) สายพันธุ์ราที่พบว่าผลิตกรดโคจิก คือ *Aspergillus oryzae A. flavus A. parasiticus A. effuses A. nidulans A. awanori A. albus A. nidulans A. tamarii A. wentii* และ *A. alliaceus* เป็นต้น (Bentley , 1957 ; Bajpai และ คณะ , 1982)

การสังเคราะห์กรดโคจิกเริ่มจากน้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคโนแล็กโทน (gluconolactone) จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็น 3 คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทน (3-ketogluconic acid lactone) ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นกรดโคจิกได้ 2 วิถี คือ วิถีที่ 1 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทน ถูกเปลี่ยนเป็น 3-คีโตกลูโคส (3-ketoglucose) จากนั้นมีการดึงน้ำออก 2 โมเลกุล ได้กรดโคจิก ส่วนวิถีที่ 2 3-คีโตกลูโคนิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอซิดแล็กโทนถูกจำกัดน้ำออกไป 1 โมเลกุลได้ $C_6H_5O_5$ แล้วจึงเปลี่ยนเป็น $C_6H_8O_5$ จากนั้นเกิดการกำจัดโมเลกุลของน้ำออกได้กรดโคจิก (Arnteins และ Bentley , 1953) ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงวิถีการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแล็กโทน

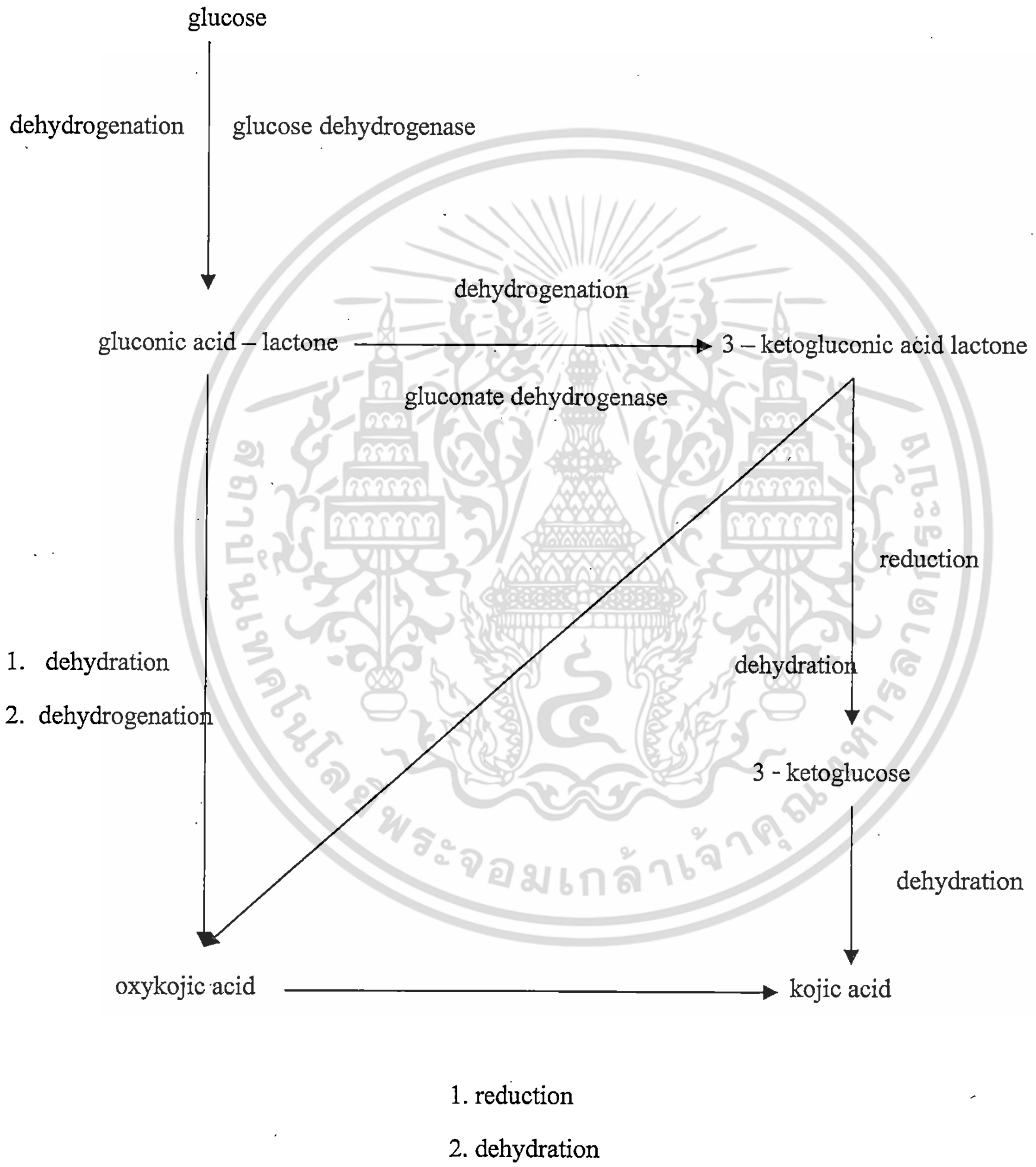
ที่มา : Arnteins และ Bentley (1953)

Bajpai และ คณะ (1981) ศึกษาวิถีการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นของ *Aspergillus flavus* สายพันธุ์บี พบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิตกรดโคจิก คือ เฮกโซไคเนส (hexokinase) กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 6-ฟอสเฟตกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส (6-phosphate gluconate dehydrogenase) กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) และกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส (gluconate dehydrogenase) โดยวิถีการสังเคราะห์กรดโคจิกแสดงในรูปที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การผลิตกรดโคจิก

มีการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากรา *Aspergillus* หลายสายพันธุ์โดยศึกษาถึงแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่าง ๆ กัน ดังนี้



รูปที่ 3 วิถีการสังเคราะห์กรดโคจิกของ *Aspergillus flavus*

ที่มา : Bajpai และคณะ (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bajpai และ คณะ (1981) ศึกษาเอนไซม์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* ในอาหาร YES (Yeast Extract Sucrose) ที่มีน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน

Tadera และ คณะ (1985) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากรา *Aspergillus* หลายสายพันธุ์ ได้แก่ *A. oryzae* สายพันธุ์ K *A. oryzae* IAM 2024 *A oryzae* IF05239 *A. flavusr* IAM 2001 และ *A. tamarii* IFO 4099 พบว่า *A. flavus* IAM 2001 ผลิตกรดโคจิกมากที่สุดเท่ากับ 17.7 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เปปโทน 6 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.01 กรัมต่อลิตร และไซคาซิน 2 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้น 4.5

Wei และ คณะ (1991) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus candidus* ATCC 44054 ในอาหารเหลว คือ อาหารสูตรดัดแปลง Czapek-Dox liquid medium มีน้ำตาลกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน โซเดียมไนเตรท 0.1 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับอาหาร Yeast Extract Sucrose มีน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัด 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และ อาหารเหลวตามสูตรของ Tadera และ คณะ (1985) ใช้น้ำตาลกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและ เปปโทน 6 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ ต่อนาที พบว่าเชื้อราผลิตกรดโคจิกสูงถึง 57-59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหาร Yeast Extract Sucrose เป็นเวลา 7-9 วัน และพบว่าไม่มีการผลิตสารอะฟลาทอกซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Kwak และ Rhee (1992) ทำการผลิตกรดโคจิกโดยการตรึงเส้นใยของ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตในอาหารที่ประกอบด้วน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และสารละลายเกลือแร่กรดไฮโดรคลอริก 30 เปอร์เซ็นต์ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.0 พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวันเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.275 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

Ogawa และ คณะ (1995) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจาก *Aspergillus oryzae* NRRL 484 บนเมมเบรน (membrane-surface liquid culture) ในอาหารเหลว 1 ลิตร ประกอบด้วย กลูโคส 100 กรัม ยีสต์สกัด 0.5-1.0 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.5 กรัม เฟอรัสฟอสเฟต 0.01 กรัม พีเอช 6.0 เชื้อราสามารถผลิตกรดโคจิกได้ 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกบนเมมเบรนโดยกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบแบตช์ แบบกึ่งแบตช์ และแบบกึ่งแบตช์ที่มีการเติมอาหาร พบว่าการหมักแบบกึ่งแบตช์ที่มีการเติมอาหารซ้ำให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 14.2 กรัมต่อลิตรต่อวัน

Rosfarizan และ คณะ (1998) คัดแยกรา *Asyergillue flavus* S33-2 จากดอกต้น morning glory ที่สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีแป้งข้าวโพด 75 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดโคจิกสูงสุด 19.2 กรัมต่อลิตร ผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้แป้งข้าวโพดและอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.256 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมแป้งข้าวโพดและ 0.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ

Kharchenko (1999) ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus flavus* link จำนวน 98 สายพันธุ์ พบว่ามีรา 14 สายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกปริมาณสูงสำหรับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ศึกษาการเจริญคือ น้ำตาลกลูโคส แซคคาโรส มอลโตส และกาแลกโตส เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งโดยใช้เมล็ดพืชพบว่ามีผลได้ของกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 8.5-9.5 กรัมกรดโคจิกต่อกิโลกรัมสับสเตรท

Rosfarizan และ Ariff (2000) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจาก *Aspergillus flavus* link 44-1 โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ คือ น้ำตาลกลูโคส ไซโลส ซูโครส ฟรักโตส มอลโตส แลกโตส และแป้งความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไทโอซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท ยีสต์สกัด และเปปโทน ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและมีสารอินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อราจะผลิตกรดโคจิกมากกว่าการใช้สารอนินทรีย์ไนโตรเจน

3. ประโยชน์ของกรดโคจิก

3.1 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

Wei และ คณะ (1991) พบว่ากรดโคจิกสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (Browning reaction) ในผักและผลไม้ที่เกิดจากการปอกเปลือก หั่น แช่แข็ง โดยเมื่อสัมผัสกับอากาศจะเกิดสีน้ำตาลเนื่องจากกลุ่มของเอนไซม์ฟีนอลเลส (phenolase) ในประเทศญี่ปุ่นใช้กรดโคจิก กรดแอสคอร์บิก และกรดซิตริกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) ในเห็ด มันฝรั่ง และแอปเปิ้ล (Chen และ คณะ, 1991) นอกจากนี้ยังใช้เสริมกลิ่นหอมของผลไม้ วานิลลา อาหาร เครื่องดื่มรสช็อคโกแลต และในของหวานด้วย (กล้าณรงค์ และจุนทนี, 2540)

3.2 ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง

Bajpai และ คณะ (1982) รายงานว่ากรดโคจิกมีคุณสมบัติคล้ายแทนนิน (tannin) เป็นสารที่พบทั่วไปในพืช ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นพวกไกลโคไซด์ (glycosides) พบมากในเปลือกต้นโอ๊กและฝาง มีประโยชน์ในการฟอกหนังสัตว์โดยทำหน้าที่ในการตกตะกอนโปรตีนและแอลคาลอยด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ใช้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง

มีการนำกรดโคจิกมาใช้เป็นส่วนผสมในยาขยายหลอดลม ยาที่ใช้รักษาโรคโลหะเป็นพิษ ยาสลบ ยาสีฟัน (Bajpai และ คณะ , 1982) นอกจากนี้ยังนำมาใช้เพื่อบรรเทาอาการปวดและป้องกันการอักเสบของแผลด้วย (Kayahara และ คณะ , 1990)

Ohyama และ Mishima (1990) รายงานว่ามีการใช้กรดโคจิกมาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง โดยกรดโคจิกทำหน้าที่ขัดผิว หรือทำให้ผิวขาวขึ้นและช่วยป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลตจากแสงแดดได้ Nakagawa และ Kawai (1995) มีการนำกรดโคจิกไปใช้ในผลิตภัณฑ์บำรุงผิว (skin care product) โดยใช้ในความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ทำหน้าที่เป็นตัวเปลี่ยนเม็ดสีผิวทำให้ผิวขาวขึ้น

3.4 ใช้เป็นสารปฏิชีวนะและยากำจัดแมลง

Kayahara และ คณะ (1990) พบว่ากรดโคจิกสามารถต้านกิจกรรมของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* 209 P และต้านการเจริญของรา *Pythium graminicola* *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* ที่ทำลายเมล็ดธัญพืช ถั่ว และ มะขามเทศ

Minami (1994) ใช้กรดโคจิกร่วมกับสารนิโคทีนในปริมาณดังนี้ นิโคทีนซัลเฟตไพโรไฟไลต์ 5 เปอร์เซ็นต์ นิโคทีนเบนโทไนต์ 5 เปอร์เซ็นต์ และกรดโคจิก 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถควบคุมศัตรูพืชได้โดยทำให้แมลงตายหรือเป็นโรค

4. การปรับปรุงพันธุ์ของรา

การปรับปรุงพันธุ์เชื้อราเพื่อให้ราผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น N-methyl –N′-nitro-N-nitroso-guanidine (NTG) ethyl methane sulfonate รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีแกมมา เป็นต้น นักวิจัยหลายกลุ่มมีการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์โดยการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ ดังนี้

Zinchenko และ คณะ (1993) ทำการปรับปรุงพันธุ์ยีสต์ *Lipomyces kononeukoae* ซึ่งผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนส โดยใช้สาร N-nitroso-N-methylurea (NMU) และคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ให้การผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสสูง พบว่า *L. kononenkoae* 2896-3 สามารถผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนเนสสูงกว่าสายพันธุ์เดิม 16 เท่า และมีสมบัติทนต่อการกดการสร้างเอนไซม์โดยน้ำตาล (catabotite repression) ได้ดี

Intraphan (1994) ทำการปรับปรุงพันธุ์รา *Hersutella thompsonii* โดยใช้สาร NTG พบว่าได้เชื้อกลายพันธุ์ M5 M22 M40 และ M63 ที่ผลิตเอนไซม์โคติเนสและเอนไซม์โปรติเอสสูงกว่าสายพันธุ์เดิม โดยผลิตเอนไซม์โคติเนสได้ 1.83 - 2.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์โปรติเอส 30.41 - 36.74 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร McCoy medium สำหรับสายพันธุ์เดิมผลิตเอนไซม์โคติเนสและโปรติเอสได้ 1.41 และ 20.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Boonprab และ คณะ (1997) ทำการปรับปรุงเชื้อรา *Monascus* sp. NP1 ให้มีสมบัติทนต่อการกดการสร้างสีโดยกลูโคส ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและคัดเลือกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง ได้เชื้อกลายพันธุ์ R8 และ R53 ที่สามารถสร้างสารสีแดงที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 500 นาโนเมตร โดยมีความเข้มสีสูงกว่าสายพันธุ์เดิมกว่า 2.54 และ 2.47 เท่า ตามลำดับ

Futamura และ คณะ (2001) ทำการปรับปรุงสายพันธุ์รา *Aspergillue oryzae* ATCC 22788 โดยใช้สารเคมี NTG คัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม พบว่า เชื้อสายพันธุ์กลาย *A. oryzae* MK 107-39 สามารถผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลิตกรดโคจิกได้ 28 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์เดิม 7.7 เท่า ผลได้กรดโคจิกต่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าสายพันธุ์เดิม 9.8 เท่า เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารประกอบด้วยกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร polypeptone 7 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 1 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร พีเอชอาหารเริ่มต้น 4.0 ที่อุณหภูมิ 30° ซ.

Wan และ คณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจาก *Aspergillue oryzae* ATCC 22788 โดยทำการปรับปรุงสายพันธุ์ราโดยใช้สาร NTG รังสีอัลตราไวโอเลต และ การรวมโปรโตพลาสต์ พบว่าเชื้อราสายพันธุ์กลาย *A. oryzae* M3 B9 ผลิตกรดโคจิก 41.1 กรัมต่อลิตร ผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเท่ากับ 0.41 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล และอัตราการผลิตดรดโคจิก 5.13 กรัมต่อลิตร ต่อวัน เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโคส 100 กรัมต่อลิตร และ รำข้าว 15 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 1 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 30° ซ. ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที

กฤษณะและคณะ (2551) ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *Aspergillus* sp. BR-1 เพื่อผลิตกรดโคจิกโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ UV9 UV10 และ UV11 ผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม โดยรากลายพันธุ์ UV11 ผลิตกรดโคจิกสูงสุด 4.01 กรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก พบว่าอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นของอาหาร 6.0 เชื้อรากลายพันธ์ UV11 ผลิตกรดโคจิกได้ 6.88 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงกว่าสายพันธุ์เดิม 2 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. แป้งมันสำปะหลัง

แป้งมันสำปะหลังผลิตจากส่วนรากที่มีลักษณะคล้ายหัวของต้นมันสำปะหลัง มีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot utilisisma* ในภาษาอังกฤษเรียกว่า Tapioca starch Cassava starch หรือ Manioc starch

แป้งประกอบด้วยโมเลกุลพอลิแซคคาไรด์ 2 ชนิด คือ อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) ทั้ง 2 โมเลกุลนี้เป็นโฮโมไกลแคน (homoglucan) ของดี-กลูโคส (D-glucose) โดยโมเลกุลของอะไมโลสเป็นสายตรงของกลูโคสโดยแต่ละหน่วยจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-(1-4)-glucosidic linkage สำหรับโมเลกุลของอะไมโลแพคตินมีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขา บริเวณแขนงเกิดจากการเชื่อมต่อโมเลกุลกลูโคส ด้วยพันธะ α-(1-6)- glucosidic linkage (Schoonhoven , 1974) โมเลกุลของแป้งมันสำปะหลังจะมีอะไมโลสและอะไมโลเพคตินในอัตราส่วน 17 ต่อ 83 (Lyon , 1974)

องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
ความชื้น	13.0
แป้ง	87.0
ไขมัน	0.1
โปรตีน	0.1
เถ้า	0.2
ฟอสฟอรัส	0.01
สารที่ให้กลิ่นรส	ต่ำมาก

ที่มา : Lyon (1974)

เม็ดแป้งมันสำปะหลังมีลักษณะคล้ายรูปถ้วยมีความยาวเส้นผ่าศูนย์กลาง 4-35 ไมครอน ภายในเม็ดแป้งประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพคติน มีการเรียงตัวเป็น 2 แบบ คือ แบบแรก สายพอลิเมอร์ของอะไมโลสเรียงตัวขนานกันอย่างเป็นระเบียบมีอะไมโลสบางส่วนเรียงขนานกับส่วนที่เป็นสายตรง ส่วนนอกของอะไมโลเพคตินและยึดติดกันด้วยพันธะไฮโดรเจนทำให้โมเลกุลบริเวณนี้จับกันอย่างหนาแน่นและมีแรงยึดเหนี่ยวสูง บริเวณนี้เรียกว่าส่วนผลึก (crystalline regions) ซึ่งมีความสามารถในการดูดน้ำและพองตัวต่ำมาก แบบที่สองโมเลกุลเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ มีแรงดึงดูดระหว่างสายพอลิเมอร์ของอะไมโลสกับอะไมโลเพคตินต่ำกว่าแบบแรก บริเวณที่มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลแบบนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรียกว่าส่วนอสัณฐาน (amorphous regions) เป็นส่วนที่ดูดน้ำได้ดีและพองตัวได้ง่าย (Shoonhoven, 1974)

แป้งมันสำปะหลังที่ผลิตในประเทศนำมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ ดังนี้ ใช้บริโภคภายในครัวเรือน ผลิตผลชูรส ผลิตสารให้ความหวาน ใช้ทำสาคู ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษและสิ่งทอ (กล้าณรงค์ และ เกื้อกูล , 2546) นอกจากนี้ยังมีการนำแป้งมันสำปะหลังมาเป็นอาหารและแหล่งคาร์บอนของจุลินทรีย์ต่าง ๆ ดังนี้

ฐิติมา (2543) ศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของเชื้อ *Aspergillue oryzae* NRRL 484 และ *A. oryzae* TISTR 3086 และทำการคัดเลือกเชื้อลูกผสมที่สามารถผลิตกรดโคจิกในอาหารแป้ง พบว่าราสายพันธุ์ 49 สามารถผลิตกรดโคจิกได้เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลิตกรดโคจิก 4.09 กรัมต่อลิตรเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 4 วัน

นวลพรรณ และ ดวงเดือน (2544) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก *Rhizopus oryzae* NRRL 395 โดยใช้แป้งมันสำปะหลังดิบที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก 3 N เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า อาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตร $(NH_4)_2SO_4$ 3 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 1.0 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.0 ให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุด 68.32 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวในฟลาสต์เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณภูมิ 30°ซ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบใบพัดกวนให้ผลผลิตกรดแลกติก 54.62 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน มีอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม

ศึกฤทธิ์ (2547) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา *Aspergillus* sp. RE 3 เป็นราที่คัดแยกจากลูกแป้งเหล้าของจังหวัดร้อยเอ็ด ในอาหาร Glucose-peptone ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 10 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกได้ 4.50 กรัมต่อลิตรและเชื้อราผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ 7.87 หน่วยต่อมิลลิลิตรในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการดำเนินการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้คือ *Aspergillus* sp. BR-1 ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีความสามารถผลิตกรดโคจิกและเอนไซม์ย่อยแป้ง (ศึกฤทธิ์, 2547) ทำการเลี้ยงเชื้อราในอาหารวุ้นเอียง PDA เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4° ซ ทำการถ่ายเชื้อใหม่ทุก ๆ 4 เดือน

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) ; TOMY
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ; Gallenkamp
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ; Shimadzu
เครื่องปั่นเหวี่ยงระบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) ; Sanyo
เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ; Satorius
เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ; Satorius
เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH meter) ; Denver Instrument
ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ; Memmert
ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ; Memmert
กล้องจุลทรรศน์ (microscope) ; Olympus
เครื่องเขย่าผสม (vortex) ; Vortex – Genie 2
ไมโครปิเปต (micropipette) ; Gilson
ชุดกรองสุญญากาศ (Millipore filter ; Whatman
หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 10 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร
แผ่นนับเม็ดเลือด (Haemocytometer) ; Boeco
โถดูดความชื้น
คิวเวทแก้ว
เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ
กระดาษกรองเบอร์ 1 ; Whatman

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สารเคมี

N-methyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ; Fulka

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4); J.B. Baker

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ; Merck

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ; Carlo Erba

โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ; Carlo Erba

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ; J.B Baker

โพแทสเซียมโซเดียมทราเทรต ($COOK(CHOH)_2COONa \cdot 4H_2O$) ; Carlo Erba

เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$); Merck

เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$) Carlo Erba

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ; Carlo Erba

กรดไดไนโตรซาลิไซลิก ; Sigma

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ; Ajax Finechem

ยีสต์สกัด ; Himedia

เปปโตน ; Himedia

ทริปโตน ; Himedia

กรดโคจิก ; Sigma

น้ำตาลกลูโคส ; Carlo Erba

วุ้นผง

แป้งมันสำปะหลังตราปลามังกร

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมกล้าสปอร์

เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp BR 1 บนอาหาร PDA ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรเป็นเวลา 7 วัน เติมน้ำกลั่นที่ผสมทวีน 80 (0.05 เปอร์เซ็นต์) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 40 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ ใช้ช้อนสแตนเลสขูดสปอร์ให้หลุดจากเส้นใย นำไปกรองผ่านสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อแยกเอาเส้นใยออก ตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วยแผ่นนับเม็ดเลือด (Haemocytometer)

2. การชักนำให้กลายพันธุ์

นำกล้าสปอร์จากข้อ 1. ใส่ลงในสารละลาย NTG (ละลาย NTG ใน 1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0) โดยปรับค่าความเข้มข้นของ NTG ในสารละลายเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และจำนวนสปอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่ากับ 1 x 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาทีในสภาวะไม่มีแสง เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่ให้อัตราการรอดตายของสปอร์เท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยเก็บตัวอย่างสปอร์ทุกๆ 15 นาที จนครบ 60 นาที ตรวจนับจำนวนสปอร์ที่รอดตายในแต่ละช่วงเวลาโดยเทคนิค spread plate บนอาหารแข็ง

เมื่อทราบเวลาที่ให้สปอร์รอดตาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ นำสารแขวนลอยของสปอร์ที่มีสารละลาย NTG บ่มตามระยะเวลาที่เหมาะสม จากนั้น นำสารแขวนลอยสปอร์ที่รอดตายไปปั่นเหวี่ยงในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบ เป็นเวลา 3 นาที ล้างสปอร์ 3 ครั้งด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำสปอร์ที่ได้มาทำความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-3} นำสารละลายแต่ละความเจือจางไปเลี้ยงบนอาหาร Czapek Dox สูตรดัดแปลง (ภาคผนวก ก1) ด้วยวิธีการ spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 4-5 วัน เลือกเก็บโคโลนีของราที่เจริญเร็ว มีโคโลนีใหญ่ มาทำให้บริสุทธิ์โดยการ cross streak ในอาหารชนิดเดียวกัน เก็บโคโลนีที่บริสุทธิ์ในอาหารวุ้นผิวเอียง Czapek Dox สูตรดัดแปลงเพื่อนำไปคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกต่อไป

3. การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์

3.1 การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์บนอาหารแข็ง

นำเชื้อกลายพันธุ์ที่คัดเลือกจากข้อ 2 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ใช้ cork borror เบอร์ 1 ตัดปลายเส้นใยรามาวางลงตรงกลางจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร starch medium (ภาคผนวก ก 3) ทำการทดสอบเชื้อละ 4 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นทดสอบการผลิตกรดโคจิกโดยราดสารละลายเฟอริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก4) ลงบนอาหารแข็งที่เชื้อเจริญอยู่ ถ้าเชื้อราผลิตกรดโคจิกจะเกิดสีแดงรอบๆ โคโลนี บันทึกผล เลือกเชื้อรากลายพันธุ์ที่ให้สีแดงเข้ม (โดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม) ไปศึกษาต่อไป

3.2 การคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ในอาหารเหลว

นำเชื้อกลายพันธุ์จากข้อ 3.1 มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ในจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ใช้ cork borror เบอร์ 1 ตัดปลายเส้นใยรามาวางลงในหลุมของ microtiter plates (ขนาด 24 หลุม) ที่มีอาหารเหลว starch medium 1 มิลลิลิตร ทำการทดลองเชื้อละ 4 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำเชื้อราออกจากหลุม นำ microtiter plates ไปอบจนอาหารแห้ง เติมน้ำร้อนปริมาตรเท่า ๆ กันลงในหลุมทุกหลุม หยดสารละลายเฟอริกคลอไรด์ลงในหลุมทุกหลุมนำไปวัดค่าความเข้มของสีแดงด้วยเครื่อง microtiter plate reader โดยใช้ตัวกรองแสง (filter) ที่ความยาว 492 นาโนเมตร เลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ให้สีแดงเข้มไปศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำอาหาร starch medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตรใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นเติมกล้าสปอร์ลงในอาหารแต่ละฟลาสก์ โดยให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น 1 x 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร ไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที แต่ละการทดลองนำ 3 ซ้ำ นำฟลาสก์ทั้งหมดที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อหาปริมาณกรดโคจิกที่เชื้อผลิตได้ เลือกเชื้อกลายพันธุ์ที่ให้กรดโคจิกสูงสุดไปศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดโคจิก

4. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิก

4.1 การศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ starch medium โดยแปรผันแหล่งคาร์บอนคือความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ นำอาหารแต่ละสูตรใส่ลงไปในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุดสำลีนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเย็นเติมกล้าสปอร์ของเชื้อกลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 โดยปรับให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น 1 x 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 5 วัน บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุกวัน เพื่อวิเคราะห์หาค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้ง กรดโคจิกและน้ำตาลรีดิวซ์

4.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ starch medium โดยใช้สูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมที่สุดจากข้อ 4.1 ใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ ได้แก่ เปปโทน ทริปโทน โซเดียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร ทำการเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนเดิม คือยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1 เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์ค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้งกรดโคจิก และน้ำตาลรีดิวซ์

4.3 การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

การเพาะเลี้ยงเชื้อกลายพันธุ์ของราที่คัดเลือกไว้ในอาหาร starch medium ที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง และชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 4.2 โดยทำการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3 4 และ 5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 N ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1 เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาค่าพีเอช น้ำหนักเซลล์แห้งกรดโคจิก และน้ำตาลรีดิวซ์

5. เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรากลายพันธุ์และราสายพันธุ์เดิม

เตรียมอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกที่ได้จากข้อ 4 ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเมื่ออาหารเย็น เติมกล้าสปอร์ของเชื้อรากลายพันธ์และรา *Aspergillus* sp. BR 1 โดยปรับให้มีสปอร์เริ่มต้น 1 x 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร นำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟลาสก์ทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาค่าพีเอช น้ำตาลรีดิวซ์ กรดโคจิก และ น้ำหนักเซลล์แห้ง

6. วิธีการวิเคราะห์

6.1 ค่าพีเอช

นำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อมาวัดค่าพีเอช โดยเครื่องวัดพีเอช Denver Instrument รุ่น 215

6.2 การวิเคราะห์กรดโคจิก (ภาคผนวก ข 1)

6.3 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข 2)

6.4 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข 3)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ผลการชักนำให้กลายพันธุ์

เมื่อนำสปอร์รา *Aspergillus* sp BR 1 ใส่ลงในสารละลาย NTG โดยให้มีจำนวนสปอร์ 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรและความเข้มข้นของสาร NTG เท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า เก็บตัวอย่างทุก ๆ 15 นาทีจนครบ 60 นาที เพื่อตรวจนับจำนวนสปอร์ที่รอดตายแต่ละช่วงเวลา เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมที่ให้อัตราการรอดตายของสปอร์เท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อบ่มเป็นเวลา 15 นาที มีอัตราการรอดตายของสปอร์ 2.1 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มต่อเป็นเวลา 30 นาที มีอัตราการรอดตายของสปอร์ 0.11 เปอร์เซ็นต์ดังแสดงในตารางที่ 2

จากนั้นคัดเลือกเชื้อรากลายพันธุ์ในอาหารแข็ง Czapek Dox สูตรดัดแปลงเลือกเก็บโคโลนีของรากลายพันธุ์ที่เจริญเร็ว (มีโคโลนีใหญ่) ได้เชื้อรากลายพันธุ์ทั้งหมด 180 สายพันธุ์

2. ผลการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ในอาหารแข็งและอาหารเหลว

นำเชื้อรากลายพันธุ์ 180 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง starch medium เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม หลังจากบ่มครบ 4 วัน นำสารละลายเฟอริกคลอไรด์ราดลงบนอาหารแข็งที่เชื้อราเจริญทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที ถ้ามีการผลิตกรดโคจิกจะเกิดสีแดงขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของรากลายพันธุ์ พบว่ามีเชื้อรากลายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกสูงกว่าสายพันธุ์เดิม 22 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3)

นำเชื้อรากลายพันธุ์ 22 สายพันธุ์ไปคัดเลือกในอาหารเหลว starch medium ใน microtiter plates ตรวจสอบการผลิตกรดโคจิกโดยเติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์พบว่ามีเชื้อรากลายพันธุ์ 2 สายพันธุ์คือ N-2019 และ N-2062 ที่ให้สารละลายสีแดงเข้มมากกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนสปอร์ที่รอดตายและอัตรารอดตายของรา *Aspergillus* sp. BR 1

เวลา (นาที)	จำนวนสปอร์ที่รอดตาย (CFU/มล)	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
0	1.8×10^7	100
15	3.8×10^5	2.1
30	2.1×10^4	0.11
45	1.5×10^2	น้อยกว่า 0.01
60	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

121174

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรากลายพันธุ์ในอาหารแข็ง starch medium

รหัสเชื้อกลายพันธุ์	การผลิตกรดโคจิก
N-1007	+
N-1014	++
N-1022	+
N-2010	+
N-2016	+
N-2018	+
N-2019	++
N-2024	+
N-2025	++
N-2024	+
N-2048	+
N-2055	+
N-2062	++
N-2067	+
N-2073	++
N-2096	++
N-2101	+
N-2120	+
N-2125	+
N-2131	+
N-2137	+
N-2140	++

++ มีการผลิตกรดโคจิกมาก (สีแดงเข้ม) + ผลิตกรดโคจิกปานกลาง (สีแดงอ่อน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำเชื้อรากลายพันธุ์ N-2019 และ N-2062 มาเลี้ยงในอาหารเหลว starch medium บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30° ซ เป็นเวลา 5 วัน วิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกทุกวัน ผลการศึกษาพบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ N-2019 เริ่มผลิตกรดโคจิกในวันที่ 1 และการผลิตกรดโคจิกจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น และให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 1.16 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณกรดโคจิกลดลง (ตารางที่ 4) สำหรับเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 ราเริ่มผลิตกรดโคจิกในวันที่ 1 มีค่า 0.16 กรัมต่อลิตร การผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นและให้ผลผลิตสูงสุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากับ 1.42 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4

ดังนั้นจึงเลือกเชื้อรากลายพันธุ์ N-2062 ไปศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดโคจิกต่อไป

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตจากเชื้อรากลายพันธุ์ N-2019 และ N-2062

รหัสเชื้อ	เวลา (วัน)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
N-2019	1	0.1
	2	0.72
	3	0.84
	4	1.16
	5	0.70
N-2062	1	0.16
	2	0.82
	3	1.02
	4	1.42
	5	0.88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 ในอาหาร starch medium ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 20 40 และ 60 กรัม/ ลิตร ในฟลาสก์แบบเขย่าโดยบ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ ที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ผลการศึกษามีดังนี้

อาหารเหลว starch medium ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 20 กรัมต่อลิตร พบว่าในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงมีน้ำตาลรีดิวซ์ 8.08 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นน้ำตาลมีค่าลดลงและในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงมีน้ำตาลเหลืออยู่ 0.10 กรัมต่อลิตรน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าในวันที่ 1 ของการเจริญมีค่าเท่ากับ 3.07 กรัมต่อลิตร จากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 7.10 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 5) หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งมีลดลง สำหรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าอยู่ระหว่าง 4.1-5.3 เมื่อคำนวณหาค่าอัตราการผลิตกรด โคจิกมีค่า 0.46 กรัม กรด โคจิกต่อลิตรต่อวัน

สำหรับอาหารเหลว starch medium ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 40 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงมีค่าเท่ากับ 11.36 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นจะมีค่าลดลงและในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเหลืออยู่ 0.90 กรัมต่อลิตร สำหรับน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 4.60 กรัมต่อลิตรในวันที่ 1 ของการเจริญ จากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งจะมีค่าเพิ่มขึ้น และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 7.20 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าอยู่ระหว่าง 3.4-4.0 สำหรับปริมาณกรดโคจิกพบว่าในวันแรกของการเจริญมีค่า 0.12 กรัมต่อลิตร จากนั้นการสร้างกรดโคจิกเพิ่มขึ้นและสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือ 6.11 กรัมต่อลิตรดังแสดงในตารางที่ 6 เมื่อคำนวณหาค่าอัตราการผลิตกรดโคจิกมีค่า 2.03 กรัม กรดโคจิกต่อลิตร ต่อวัน

ตารางที่ 5 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 20 กรัมต่อลิตร

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	4.1	0.11	8.08	3.07
2	4.2	0.76	3.31	7.10
3	5.3	1.40	0.95	5.60
4	5.1	0.97	0.16	5.40
5	5.1	0.70	0.10	5.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 40 กรัมต่อลิตร

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	4.0	0.12	11.36	4.60
2	3.8	3.82	6.03	4.30
3	3.7	6.11	1.18	6.70
4	3.6	5.88	1.80	5.80
5	3.4	3.30	0.90	7.20

ตารางที่ 7 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	4.2	0.18	18.70	4.60
2	4.1	1.86	18.40	6.70
3	3.9	8.15	13.60	7.02
4	3.3	12.65	7.80	10.00
5	3.4	15.42	4.70	9.78

สำหรับอาหารเหลว starch medium ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร พบว่าในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง มีน้ำตาลรีดิวซ์ 18.70 กรัมต่อลิตร จากนั้นน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลงและในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ 4.70 กรัมต่อลิตร สำหรับน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงมีค่า 4.60 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเพิ่มขึ้นและสูงสุดเท่ากับ 10.00 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลงเมื่อพิจารณาการผลิตกรดโคจิกพบว่าในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงมีกรดโคจิก 0.18 กรัมต่อลิตร จากนั้นการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดเท่ากับ 15.42 กรัมต่อลิตรในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในตารางที่ 7 ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าอยู่ระหว่าง 3.3-4.2 เมื่อคำนวณหาค่าอัตราการผลิตกรดโคจิกมีค่า 3.08 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการศึกษาพบว่าถ้าเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง การผลิตกรดโคจิกจะเพิ่มขึ้น โดยอาหารเหลว starch medium ที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 15.42 กรัมต่อลิตร มากกว่าอาหารที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 40 กรัมต่อลิตร ถึง 2.52 เท่า เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตกรดโคจิกพบว่าอาหารที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร ให้อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงกว่าอาหารที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 40 กรัมต่อลิตร 1.52 เท่า แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณแป้งมันสำปะหลังเข้มข้นขึ้นทำให้เชื้อรามีแหล่งคาร์บอนที่จะนำไปใช้ในการเจริญมากขึ้น โดยเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 มีเอนไซม์ในการย่อยแป้งในอาหารไปเป็นน้ำตาลได้มากขึ้น โดยดูจากปริมาณเซลล์แห้ง และกรดโคจิกที่มากขึ้น ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษา สิงหลกะ และคณะ (2551) โดยทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากแป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเพื่อผลิตกรดโคจิก พบว่าแป้งข้าวโพดเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร สามารถให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดคือ 2.78 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. BR- 1 สำหรับการศึกษาของกฤษณะ และ คณะ ในปี 2551 ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ *Aspergillus* sp. BR-1 ด้วยรังสียูวี เพื่อให้ได้เชื้อกลายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่าสายพันธุ์เดิม เมื่อแปรผันความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเป็น 40 60 และ 80 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ UV 11 ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 6.88 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังสูงขึ้นพบว่าอาหารมีความหนืดสูง เชื้อราไม่สามารถเจริญได้ การผลิตกรดโคจิกจะลดลง นอกจากนี้มีรายงานวิจัยของ Rosfarizan และคณะ (1998) ศึกษาความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อรา *Aspergillus flaves* S33-2 พบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวโพด 75 กรัมต่อลิตรให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดคือ 19.2 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราสายพันธุ์ N-2062 มากที่สุดคือ การใช้แป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรโดยให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 15.42 กรัมต่อลิตร

4. ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

ผลการศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโทน ทริปโทน โซเดียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต ในอาหาร starch medium ที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร โดยมีผลการทดลองดังนี้

เมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร starch medium พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5.80 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 13.20 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง น้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 1 มีค่าเท่ากับ 14.81 กรัมต่อลิตร จากนั้นเชื้อมีการใช้น้ำตาลและมีค่าต่ำสุดเท่ากับ 2.80 กรัมต่อลิตร การผลิตกรดโคจิกในวันแรกมีค่า 0.20 กรัมต่อลิตร และมีค่าเพิ่มขึ้นและสูงที่สุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงมีค่าเท่ากับ 15.70 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 8) โดยมีค่าอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 3.14 กรัม กรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน ส่วนค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่าง 3.2-4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการใช้เปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 วัน มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 4.32 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 15.72 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 4 วัน สำหรับน้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงมีค่า 23.75 กรัมต่อลิตร จากนั้นจะมีค่าลดลงและมีค่าต่ำสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 2.14 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาการผลิตกรดโคจิกพบว่าในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงมีค่าเท่ากับ 0.90 จากนั้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดเท่ากับ 13.50 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 9 มีค่าอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 2.7 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน สำหรับค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.3-4.1

เมื่อใช้ทริปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าเชื้อรามีการเจริญเพิ่มจำนวนเท่ากับ 3.30 กรัมต่อลิตร มีเซลล์แห้งสูงสุด 8.80 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับน้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง มีค่า 17.58 กรัมต่อลิตรและมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง พบว่ามีน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 3.53 กรัมต่อลิตรในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง การผลิตกรดโคจิกพบว่ามีการเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและมีค่าสูงสุด 12.46 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในตารางที่ 10 จากนั้นการผลิตกรดโคจิกเริ่มลดลง พบว่ามีค่าอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 3.12 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 4.2-5.0

เมื่อพิจารณาแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์พบว่าเมื่อใช้เดียมไนเตรทแทนสารไนโตรเจนอินทรีย์พบว่าผลิตกรดโคจิกเพียง 1.48 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง จำนวนน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณไม่แตกต่างกันในแต่ละวัน โดยมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 28.43 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 11 น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 15.44 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.7-5.5 มีอัตราการผลิตกรดโคจิกมีค่า 0.29 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวันในขณะที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนให้การ

ตารางที่ 8 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ที่ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	4.2	0.20	14.81	5.80
2	3.5	1.00	13.80	9.60
3	3.7	8.40	10.60	10.70
4	3.3	11.30	5.20	13.20
5	3.2	15.70	2.80	12.20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตกรดโคจิกน้อยมีค่า 0.50 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 12) มีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.12 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน และมีน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยที่สุดคือ 3.7 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 9 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ที่ใช้เปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	4.1	0.90	23.75	4.32
2	3.4	4.80	18.10	5.48
3	3.4	12.20	11.81	10.66
4	3.3	12.40	2.54	15.78
5	3.4	13.50	2.14	14.78

ตารางที่ 10 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ที่ใช้ทริปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	4.4	0.11	17.58	3.30
2	4.5	0.93	20.33	5.40
3	5.0	4.83	14.96	7.60
4	4.3	12.46	21.10	8.80
5	4.2	11.78	3.53	8.60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ที่ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	5.1	0.10	24.45	4.90
2	5.5	0.40	27.94	8.96
3	4.9	0.90	31.47	15.44
4	4.8	1.02	32.40	11.95
5	4.7	1.48	28.43	10.57

ตารางที่ 12 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	3.7	0.04	11.58	1.56
2	2.9	0.11	15.90	1.92
3	2.4	0.26	10.98	3.30
4	2.2	0.50	11.80	3.70
5	2.2	0.32	13.30	2.80

จากผลการทดลองพบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์คือ ยีสต์สกัด เปปโทน และ ทริปโทน เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกและการเจริญของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 พบว่ายีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด คือให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดเท่ากับ 15.70 กรัมต่อลิตร มีอัตราการผลิตกรดโคจิก 3.14 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน รองลงมาคือเปปโทนให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 13.50 กรัมต่อลิตรมีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 2.7 กรัม กรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน และทริปโทนให้การผลิตกรดโคจิก 12.46 กรัมต่อลิตร และให้การผลิตกรดโคจิกสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ทั้งนี้เนื่องมาจากยีสต์สกัด มีโปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดโคจิก ผลการทดลองสอดคล้องกับ Rosfarizan และ Ariff (2000) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aspergillus flavus ในอาหารเหลวที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ และ อนินทรีย์ ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโทน แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต พบว่ายีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกที่สุดรองลงมาคือ เปปโทน ให้ผลผลิตกรดโคจิก 39.50 กรัมต่อลิตร และ 36.40 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สำหรับแอมโมเนียมซัลเฟตให้ผลผลิตกรดโคจิกน้อยที่สุดมีค่า 0.05 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรากลายพันธุ์ N-2062 ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร จึงนำสูตรอาหารนี้ไปศึกษาหาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดโคจิกต่อไป

5. ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

การศึกษาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหาร starch medium ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 3 4 และ 5 ผลที่ได้จากการศึกษามีดังนี้

เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเริ่มต้น 3.0 มีผลการเจริญและการผลิตกรดโคจิกดังแสดงในตารางที่ 13 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.50 กรัมต่อลิตรในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 15.30 กรัมต่อลิตร การผลิตกรดโคจิกในวันที่ 1 มีค่า 0.10 กรัมต่อลิตร และมีค่าสูงสุดในวันที่ 4-5 มีค่า 7.30 และ 7.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 13) ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 2.4-3.0

อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.0 น้ำหนักเซลล์แห้งในวันที่ 1 เท่ากับ 5.61 กรัมต่อลิตร และมีค่าสูงสุด 12.52 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 การผลิตกรดโคจิกในวันที่ 1 มีค่า 0.18 กรัมต่อลิตร จากนั้นมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีค่าสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 15.98 กรัมต่อลิตร น้ำตาลรีดิวซ์ในวันที่ 1 มีค่า 14.80 กรัมต่อลิตร จากนั้นน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงในขณะที่การผลิตกรดโคจิกมีค่าเพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 14 สำหรับค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.4-4.1

สำหรับอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 5.0 น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 6.00 กรัมต่อลิตรในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงและมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นมีการเจริญคงที่ตั้งแต่วันที่ 3 การผลิตกรดโคจิกในวันที่ 1 มีค่า 0.50 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 มีค่า 12.80 กรัมต่อลิตร ดังสแสดงในตารางที่ 15 ค่า พีเอชอยู่ในช่วง 4.0-5.1

เมื่อพิจารณาค่าอัตราการผลิตกรดโคจิกพบว่าอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.0 มีค่า 3.20 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน รองลงมาคือที่พีเอช 5.0 มีค่าอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 2.56 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน จากผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 3.0

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	3.0	0.10	15.10	3.50
2	2.6	1.22	14.80	5.60
3	2.5	4.08	11.30	13.60
4	2.4	7.30	10.80	13.24
5	2.6	7.60	5.70	15.30

ตารางที่ 14 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.0

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	4.1	0.18	14.80	5.61
2	3.7	1.04	18.20	8.65
3	3.6	8.06	10.90	11.61
4	3.5	12.50	8.40	12.52
5	3.4	15.98	2.16	10.90

ตารางที่ 15 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2060 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.0

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	5.1	0.50	12.28	6.00
2	4.8	1.60	20.30	11.70
3	4.4	8.40	15.70	12.50
4	4.3	9.40	10.20	12.45
5	4.0	12.80	8.4	12.33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะเห็นได้ว่าที่พีเอชเริ่มต้น 4.0 เชื้อรากลายพันธุ์ N-2062 สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและการผลิตกรดโคจิกได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.0 และ 3.0 ผลการศึกษานี้แตกต่างจาก Kitada (และคณะ 1967) พบว่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกอยู่ในช่วง 2-3 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส หรือซูโครส และใช้เปปโทนหรือยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับ Basappa และคณะ (1970) รายงานว่าช่วงพีเอชที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิกของ *Aspergillus flavus* อยู่ในช่วง 6.0-7.0 เมื่อใช้แอซิเตตเป็นแหล่งคาร์บอน

6. ผลการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรากลายพันธุ์และราสายพันธุ์เดิม

เมื่อนำเชื้อรากลายพันธุ์ N-2062 และเชื้อราสายพันธุ์เดิม *Aspergillus* sp. BR 1 ในอาหาร starch medium โดยมีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ N-2060 มีการเจริญดีกว่าโดยในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.94 กรัมต่อลิตร จากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นและเข้าสู่ระยะคงที่ ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในวันที่ 4 มีค่าเท่ากับ 12.78 กรัมต่อลิตร เชื้อรากลายพันธุ์ผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 16.07 กรัมต่อลิตรในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 16) สำหรับเชื้อสายพันธุ์เดิม *Aspergillus* sp. BR 1 นั้นมีการเจริญช้ากว่า โดยในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.45 กรัมต่อลิตร จากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นและมีค่าคงที่ในวันที่ 3-5 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 7.94 กรัมต่อลิตร เชื้อราผลิตกรดโคจิกสูงสุด 2.32 กรัมต่อลิตรในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในตารางที่ 17 จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ N-2062 ผลิตกรดโคจิก 16.07 กรัมต่อลิตร มีอัตราการผลิตกรดโคจิก 3.21 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน สำหรับราสายพันธุ์เดิมผลิตกรดโคจิก 2.32 กรัมต่อลิตร มีอัตราการผลิตกรดโคจิก 0.46 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน เชื้อรากลายพันธุ์ N-2060 มีการผลิตกรดโคจิกสูงกว่าสายพันธุ์เดิม 6.9 เท่า เนื่องจากเชื้อรากลายพันธุ์ *Aspergillus* sp. N-2062 ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นน้ำตาลได้มากกว่า ทำให้เชื้อรานำน้ำตาลไปใช้สร้างเซลล์ และผลิตกรดโคจิกสูงกว่าสายพันธุ์เดิม ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Futamure และ คณะ (2001) ที่ทำการปรับปรุงพันธุ์ *Aspergillus oryzae* ด้วยรังสียูวี ได้เชื้อสายพันธุ์กลาย MK107-39 สามารถผลิตกรดโคจิกสูงถึง 28.0 กรัมต่อลิตรในขณะที่เชื้อสายพันธุ์เดิมผลิตกรดโคจิกเพียง 3.7 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และโพลีเปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน

ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้สาร NTG มีประสิทธิภาพได้เชื้อกลายพันธุ์ *Aspergillus* sp N-2062 ที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้มากกว่าสายพันธุ์เดิม อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 16 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสม

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	4.0	0.20	14.80	3.94
2	3.8	1.14	13.83	7.00
3	3.7	8.90	10.66	11.70
4	3.5	14.00	5.02	12.78
5	3.2	16.07	2.80	11.80

ตารางที่ 17 แสดงค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อสายพันธุ์เดิม ที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสม

วันที่	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
1	4.1	0.04	5.54	3.45
2	3.9	0.86	2.84	5.60
3	3.7	1.54	1.40	7.20
4	3.7	1.98	1.26	7.94
5	3.6	2.32	1.14	7.52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

การปรับปรุงเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR 1 โดยใช้สารเคมี N-metheyl-N′-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) ได้เชื้อรากลายพันธุ์ 180 สายพันธุ์ เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อกลายพันธุ์ด้วยอาหาร starch medium ในอาหารแข็งและอาหารเหลวได้เชื้อกลายพันธุ์ N-2019 และ N-2062 ผลิตกรดโคจิกได้ 1.16 และ 1.42 กรัมต่อลิตร ตามลำดับนำเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 มาศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกในอาหาร starch medium โดยศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร พบว่า อาหาร starch medium ที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรให้กรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 15.42 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง มีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 3.08 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน รองลงมาคืออาหารที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 40 กรัมต่อลิตร ในการผลิตกรดโคจิก 6.11 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโทน ทริปโทน โซเดียมไนเตรท และแอมโมเนียมไนเตรท พบว่าไนโตรเจนอินทรีย์ให้ผลการผลิตกรดโคจิกสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ เมื่อใช้ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ในการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด เท่ากับ 15.70 กรัมต่อลิตรในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง มีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 3.14 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน รองลงมาคือการใช้เปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ผลการผลิตกรดโคจิก 13.50 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการผลิตกรดโคจิก 2.7 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวันเมื่อศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก พบว่าเมื่อใช้พีเอชเริ่มต้น 4.0 ให้การผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดเท่ากับ 15.98 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือที่พีเอชเริ่มต้น 5.0 ให้ผลผลิตกรดโคจิก 12.80 กรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อกลายพันธุ์ N-2062 ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0 เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกของเชื้อกลายพันธุ์ *Aspergillus* sp. N-2062 กับเชื้อสายพันธุ์เดิม พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ N-2062 ผลิตกรดโคจิกได้ 16.07 กรัมต่อลิตร สำหรับสายพันธุ์เดิมผลิตกรดโคจิกได้ 2.32 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กล้าณรงค์ ศรีรอต และจุนทนี จิตต์รำพึง. 2540. พจนานุกรม FOOD ADDITIVE วารสารจาร์พา. 4(33) : 57-59.

กฤษณะ ธิติมูล ณัฐวุฒิ กองทอง และสุนธรณ์ วิจิตรอักษรกุล. 2551. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Aspergillus* sp. BR 1 เพื่อผลิตกรดโคจิก โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

คึกฤทธิ์ ศิลาลาย. 2547. การศึกษาคุณลักษณะบางประการของเชื้อราสกุล *Aspergillus* spp. จากลูกแป้งเหล้า วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ฐิติมา ศรีสกุณี. 2543. การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่าง *Aspergillus* oryzae NRRL 484 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 เพื่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารแป้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สิงหลกะ สืบท้าว ปิยภัทร พงษ์ไพโรจน์ และ เมธินี สันติสุธีรวุฒิ. 2551. การผลิตกรดโคจิกจากแป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR 1. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Arnteins , H.R.V. and Bentley, R. 1953. The biosynthesis of kojic acid. J. Biochem. 54 : 493-508.

Bajpai , P. , Agrawala , P.K. and Vishwanathan, L. 1981. Enzymes relevant to kojic acid biosynthesis in *Aspergillus flavus*. J. Gen. Microbiol. 127 : 131-136.

Bajpai , P. , Agrawala, P.K. and Vishwanathan, L. 1982. Kojic acid : synthesis and properties. J. Sci. Ind. Res. 41:185-194.

Bassapa, S.C., Screenivasamurthy, V. and Parpai , H.A.B. 1970. Aflatoxin and kojic acid production by resting cells of *Aspergillus oryzae* Link. J. Gen. Microbiol. 61 : 81-86.

Bentley, R. 1957. Perparation and analysic of kojic acid. Method Enzymol. 3 : 238-241.

Boonprab, K., Suwanarit, P. and Lotong, N. 1997. Selection of glucose depression mutants for the improvement of ang-kak production and regulation of pigmentation. Kasetsart J. (Nat.Sci.) 31 : 317-326.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Budavari , S., O'Neil, M.J., Smith , A. and Helkelman , P.E. (Eds). 1989. The Merck Index. 11^{th} ed Merck & Co., Inc., Rahway, NJ.

Chen, J.S., Wei, C. and Marshall, M.R. 1991. Inhibit mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase J. Agric. Food Chem. 39 : 1897-1901.

Futamura, T., Okabe, M., Tamura, T, Toda, K. , Matsunoka, T. and Park , Y.S. 2001. Improvement of production of kojic acid by a mutant strain *Aspergillus oryzae* MK107-39. J. Biosci. Bioeng. 91(3) : 272-276.

Intraphan , D. 1994. Strain improvement of *Hersutella thompsonii* for contral of citrus rust mite. M.S. thesis, Kasetsart University.

Kayahara, H., Shibata, N., Tadasa , K. , Maeda , H. , Kotani , T. and Ichimoto , I. 1990. Amino acid and peptide derivatives of kojic acid and their antifungal properties. Agric. Biol. Chem. 54(9) : 2441-2442.

Kharchenko, S.N. 1999. The biosynthesis of kojic acid by *Aspergillus flarus* Link strains isolated from feed. Microbiol. Zh. (Ukrainian). 61 : 15-21.

Kitada, M., Ueyama, H., Suzuki , E. and Fukumbara, T. 1967. Stndies on kojic acid fermentation. I. cultural condition in submerged culture. J. Ferment. Technol. 45 : 1101-1107.

Kwak , M.Y. and Rhee, J.S. 1992. Controlled Mycelial growth for kojic acid production using Ca-alginate immobilized fungal cells. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36 : 578-583.

Le Blanch, D.T. and Akers, H.A. 1989. Maltol and ethyl maltol from larch tree to successful additive. Food Technol. 26 : 78-87.

Lyon , W.E. 1974 A green cassava mite recently found in Africa. FAQ Plant Protection Bulletin 22(1) : 11-13.

Miller, G.L. 1959 Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31(5) : 707-428.

Minami, K. 1994. Clinical effect of a kojic acid containing cream on hyperpigmentation of the skin . Skin Res. 36(5) : 707-709.

Nakagawa, M. and Kawai, K. 1995 Contact allergy to kojic acid in skin care products. Skin Res. 32(1) : 9-13.

Ogawa, A.Y. , Wakisaka , T., Tanaka, T., Sakiyama , T. and Nakanishi, K. 1995. Production of kojic acid by membrane-suface liquid culture of *Aspergillus orypae* NRRL 484. J. Ferment. Bioeng. 80(1) : 41-45.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ohayama, Y. and Mishina, Y. 1990. Melanosis- inhibitory effect of kojic acid and its action mechanism. Fragrance. J. 6:53-58.

Rosfarizan, M. and Ariff, A.B. 2000. Kinetic of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 25 : 20-24.

Rosfarizan, M., Madihah, S. and Ariff, A.B. 1998 Isolation of a kojic acid producing fungus capable of using starch as a carbon source. Lett. Appl. Microbiol. 26 : 27-30.

Schoonhoven , A.V. 1974 Resistance to thrips damage in cassava. J. Eco. Entomol. 67(6):428-430

Tadera , K., Yahi , F. and Kobayashi , A. 1985. Effects of cycasin on kojic acid producing moulds Agri. Biol. Chem. 40(1) : 203-205.

Wan, H.M., Chen, C.C. , Chang T.S. , Giridhar , R.N. and Wu , W.T. 2004. Combining induced mutation and protoplasting for strain improvement of *Aspergillus oryzae* for kojic acid production. Biotechnol. Lett. 26 : 1163-1766.

Wei , C.I. , Huang , T. S., Chen , J. S. , Marshall , M. R. and Chung , K.T. 1991. Production of kojic acid by *Aspergillus candidus* in three culture media J. Food Prot. 54:546-548.

Zinckenko , O.N., Krivosheeva , O.V. and Lobanok , A.G. 1993. Selection of a mutant strain of *Lipomyces kononenkoae* with dextranase synthesis reistant to catalolite repression. World J. Microbiol. Biotechnol. 9 : 153-155.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Czapek Dox สูตรดัดแปลง

$NaNO_3$	3.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
KCl	0.5	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม
แป้งมันสำปะหลัง	20.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

2. Potato dextrose agar

มันฝรั่ง	200.0	กรัม
เด็กซ์โทรส (dextrose)	20.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

3. Starch medium (ดัดแปลงจากสูตรของ Rosfarizan และคณะ, 1998)

ยีสต์สกัด	5.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	กรัม
แป้งมันสำปะหลัง	20.0	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สารละลายเฟอริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) 1 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 นอร์มอล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

5. สารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก

ชั่งกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid , DNS) 1 กรัม ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2 นอร์มอล ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต 300 กรัม ละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บในขวดสีชา

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กรดโคจิก (Bentley , 1957)

สารเคมี

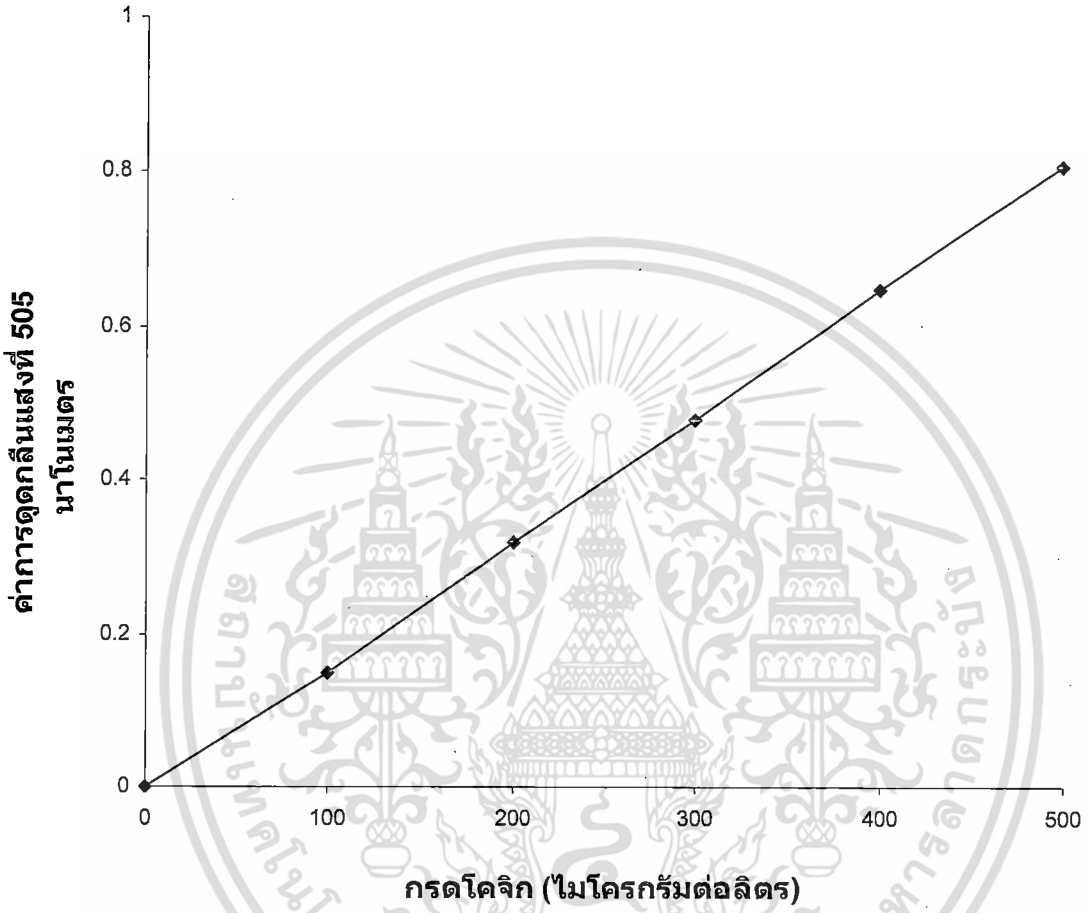
1. สารละลายเฟอริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก4)
2. สารละลายมาตรฐานกรดโคจิก

วิธีการ

1. ดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ทำแบลงค์ควบคู่กันไปโดยใช้น้ำกลั่น
2. เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม (vortex mixer)
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับแบลงค์ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร (A_{505}) ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
4. ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดโคจิกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 100 200 300 400 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1-3 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดโคจิก ดังแสดงในรูปที่ ข1
5. นำค่าการดูดกลืนแสง (A_{505}) ที่วัดได้จากตัวอย่างมาคำนวณหาปริมาณกรดโคจิกจากสูตร

$$\text{ปริมาณกรดโคจิก (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{A_{505} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข 1 กราฟมาตรฐานกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (Miller , 1959)

สารเคมี

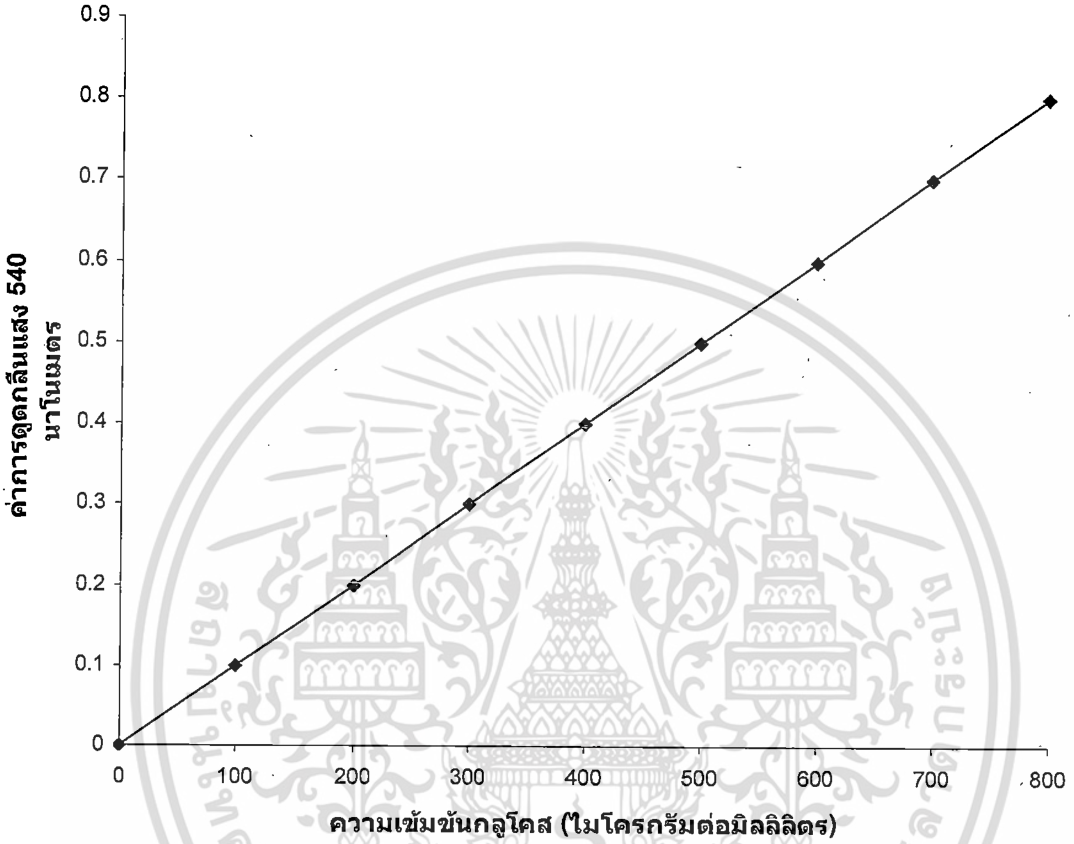
1. สารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ก 5)
2. สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

วิธีการ

1. ดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ทำแบลงค์ควบคู่กันไปโดยใช้น้ำกลั่น
2. เติมสารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม
3. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำเย็น
4. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร (A_{540})
6. ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 100 200 300 400 500 600 700 และ 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1-5 เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ดังแสดงในรูปที่ ข2
7. นำค่าการดูดกลืนแสง (A_{540}) ที่วัดได้จากตัวอย่างมาคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากสูตร

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)} = \frac{A_{540} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข 2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

วิธีการ

1. กรองตัวอย่างที่ทราบปริมาตรแน่นอนผ่านกระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 1 ที่ผ่านการอบแห้งและหาน้ำหนักแล้ว
2. นำไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 103° ซ จนน้ำหนักคงที่ทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์
3. นำไปชั่งน้ำหนักโดยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) จากสูตร

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)} = \frac{(\text{น้ำหนักเซลล์กับกระดาษกรอง} - \text{น้ำหนักกระดาษกรอง}) \times 1000}{\text{ปริมาตรที่ใช้}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้