การผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 จากน้ำมะพร้าว

PRODUCTION OF KOJIC ACID BY *Aspergillus oryzae* NRRL 484 FROM COCONUT JUICE

นางสาวสุกัญญา สายธิ

MISS SUKANYA SAITHI

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2541

ISBN 974-589-606-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF KOJIC ACID BY *Aspergillus oryzae* NRRL 484 FROM COCONUT JUICE

SUKANYA SAITHI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
1998

ISBN 974-589-606-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 จากน้ำมะพร้าว

PRODUCTION OF KOJIC ACID BY *Aspergillus oryzae* NRRL 484 FROM COCONUT JUICE

ชื่อนักศึกษา นางสาวสุกัญญา สายธิ **รหัสประจำตัว** 37064305

หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต **สาขาวิชา** เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม	
รศ.ดร.ดุษฎี ธนะบริพัฒน์	
ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง	
ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	

ค่าระดับคะแนนที่ผ่านเป็นเอกฉันท์จากคณะกรรมการสอบ PASS

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 7 เมษายน 2541 เวลา 10.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ. ห้อง 424 อาคารจุฬาภรณวลัยลักษณ์ 1

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.มนัส สังวรศิลป์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 28 **เดือน** เมษายน **พ.ศ.** 2541

หมายเหตุ การวัดผลวิทยานิพนธ์ให้ใช้ค่าระดับคะแนนดังนี้

ค่าระดับคะแนน	ผลการศึกษา
O	Outstanding (ดีเยี่ยม)
G	Good (ดี)
P	Pass (ผ่าน)
F	Fail (ไม่ผ่าน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 จากน้ำมะพร้าว
นักศึกษา	นางสาวสุกัญญา สายธิ
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง
ระดับการศึกษา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.	2541

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในน้ำมะพร้าวโดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก โดยหาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ยีสต์สกัด K_2HPO_4 และ $MgSO_4.7H_2O$ จากผลการศึกษาพบว่าอาหารสูตรดัดแปลงที่เหมาะสมที่สุดประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 175 กรัม แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) 2 กรัม ยีสต์สกัด (yeast extract) 1 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 1 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.25 กรัม และน้ำมะพร้าว 1 ลิตร ทำการเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่าให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 34 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 และทำการศึกษาในถังหมักแบบแบชให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 37 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 เมื่อทำการเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีสภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.5 วีวีเอ็ม จากนั้นทำการแยกกรดโคจิกจากน้ำหมักพบว่าผลิตผลที่ได้หลังจากการสกัดคิดเป็นร้อยละ 60.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Production of kojic acid by *Aspergillus oryzae* NRRL 484 from coconut juice´
Student	Miss Sukanya Saithi
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Nuanphan Naranong
Level of Study	Master of Science in Biotecnology
	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Year	1998

Abstract

Production of kojic acid by *Aspergillus oryzae* NRRL 484 from coconut juice, with sucrose as carbon source, was studied. Various concentrations of sucrose, inorganic nitrogen sources, yeast extract, K_2HPO_4 and $MgSO_4.7H_2O$ were tested for maximum production of kojic acid. From the experimental results, the optimization of modified medium containing : 175 g of sucrose, 2 g of NH_4NO_3, 1 g of yeast extract, 1 g of K_2HPO_4, 1 g of $MgSO_4.7H_2O$, 0.25 g of KH_2PO_4 and 1 litre of coconut juice was obtained. The maximum production of kojic acid was 34 g/l on day 14 in shake flask culture. In batch culture, the optimum condition for the maximum kojic acid production was 37 g/l on day 14 in 2 litres fermenter (1 litre of working volume) at agitation speed of 500 rpm and aeration rate of 1.5 vvm. The recovery yield of kojic acid after extraction was 60.2 %.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเพราะได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาซึ่งได้ให้คำปรึกษาและแนะนำผู้วิจัยตลอดมาผู้วิจัยรู้สึกทราบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ และดร. บุญเทียม พันธุ์เพ็งที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางรวมทั้งให้ความคิดเห็นและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์จึงกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตรวจสอบสารพิษอะฟลาทอกซิน บัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนในการทำวิทยานิพนธ์ เจ้าหน้าที่ธุรการ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชีวิทยาประยุกต์ที่ช่วยจัดการและอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์และสารเคมี และคุณเตือน วงษ์กสิกรที่ให้น้ำมะพร้าวมาใช้ในงานวิจัย รวมทั้งท่านผู้มีอุปการคุณที่มิอาจกล่าวนามได้ครบถ้วน ณ ที่นี้ที่ได้ช่วยเหลือเป็นกำลังใจกำลังความคิดตลอดจนให้ความร่วมมือในเรื่องต่างๆเป็นอย่างดี และละเลยมิได้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดาที่ได้สนับสนุนทุนการศึกษาและให้กำลังใจตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ บิดา มารดา และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุกัญญา สายธิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

กิตติกรรมประกาศ.....III

สารบัญ.....IV

สารบัญตาราง.....VI

สารบัญภาพ.....VIII

บทที่

1. บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....1

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....2

2. หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 กรดโคจิก.....3

2.2 การผลิตกรดโคจิก.....5

2.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดโคจิก.....8

2.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก.....11

2.5 ประโยชน์ของกรดโคจิก.....18

2.6 ความเป็นพิษของกรดโคจิก.....21

2.7 น้ำมะพร้าว.....22

2.8 การใช้ประโยชน์ของน้ำมะพร้าว.....26

3. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย.....32

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี.....32

3.2 วิธีการวิจัย.....34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่

4. ผลการวิจัยและวิจารณ์.....40

4.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก.....40

4.2 การผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่า.....61

4.3 การผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบช (batch fermentation).....63

4.4 การแยกกรดโคจิก.....78

5. สรุปผลการวิจัย.....81

บรรณานุกรม.....82

ภาคผนวก.....87

ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ.....88

ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์.....89

ประวัติผู้เขียน.....96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1. แสดงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิก....12
2. ความเข้มข้นของแร่ธาตุชนิดต่างๆที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ....17
3. แสดงองค์ประกอบของน้ำมะพร้าว....23
4. เปรียบเทียบน้ำตาลในน้ำมะพร้าวจากผลมะพร้าวระยะต่างๆ....24
5. แสดงองค์ประกอบของมะพร้าว....25
6. แสดงองค์ประกอบของมะพร้าวแก่ 100 มิลลิลิตร....26
7. แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีปริมาณน้ำมะพร้าวความเข้มข้นระดับต่างกัน....42
8. แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นระดับต่างกัน....43
9. แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน....45
10. แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเทรตความเข้มข้นระดับต่างกัน....49
11. แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มียีสต์สกัดความเข้มข้นระดับต่างกัน....52
12. แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีไดโพแทสเซียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นระดับต่างกัน....54
13. แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นระดับต่างกัน....57
14. แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีพีเอชต่างกัน....59
15. แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีอัตราการให้อากาศ 1 วีวีเอ็ม และใช้ความเร็วรอบในการกวนต่างกัน....66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่

16. แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศต่างกัน.....70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

1. โครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก....3
2. การสังเคราะห์กรดโคจิกจากกลูโคส....4
3. การสังเคราะห์กรดโคจิกจากฟรักโทส....5
4. แสดงแผนภาพกระบวนการผลิตกรดโคจิก....6
5. แสดงแผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus flavus*....7
6. การผลิตกรดโคจิกในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบแบช....39
7. การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีปริมาณน้ำมะพร้าวความเข้มข้นระดับต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน....41
8. การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นระดับต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน....44
9. การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน....46
10. ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน....48
11. การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเทรตความเข้มข้นระดับต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน....50
12. การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มียีสต์สกัดความเข้มข้นระดับต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน....53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

13. การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นระดับต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน.....55
14. การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นระดับต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน.....58
15. การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีพีเอชต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน.....60
16. การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่เหมาะสม โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน.....62
17. การผลิตกรดโคจิกที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีอัตราการให้อากาศ 1 วีวีเอ็ม และใช้ความเร็วรอบในการกวนต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิห้อง.....64
18. น้ำหนักเซลล์แห้งของอาหารที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีอัตราการให้อากาศ 1 วีวีเอ็ม และใช้ความเร็วรอบในการกวนต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิห้อง.....67
19. น้ำตาลทั้งหมดของอาหารที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีอัตราการให้อากาศ 1 วีวีเอ็ม และใช้ความเร็วรอบในการกวนต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิห้อง.....68
20. ค่าพีเอชของอาหารที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีอัตราการให้อากาศ 1 วีวีเอ็ม และใช้ความเร็วรอบในการกวนต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิห้อง.....69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

21. การผลิตกรดโคจิกที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 17 วัน ที่อุณหภูมิห้อง....71
22. น้ำตาลทั้งหมดของอาหารที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 17 วัน ที่อุณหภูมิห้อง....73
23. ค่าพีเอชของอาหารที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 17 วัน ที่อุณหภูมิห้อง....74
24. น้ำหนักเซลล์แห้งของอาหารที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 17 วัน ที่อุณหภูมิห้อง....75
25. การผลิตกรดโคจิกที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 17 วัน ที่อุณหภูมิห้อง....77
26. แสดงกระบวนการแยกกรดโคจิก....79
27. ลักษณะผลึกของกรดโคจิกที่แยกได้หลังจากการสกัดที่กำลังขยาย 100 เท่า....80
28. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดโคจิก....90
29. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด....92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันมีการนำกรดโคจิก (kojic acid) มาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะประเทศญี่ปุ่นมีการผลิตกรดโคจิกใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารและใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง สำหรับประเทศไทยยังไม่มีการผลิตกรดโคจิกขึ้นเองภายในประเทศส่วนใหญ่ต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ หากมีการส่งเสริมให้ผลิตขึ้นภายในประเทศสามารถลดเงินตราของประเทศได้ประกอบกับประเทศไทยเป็นประเทศที่มีเศรษฐกิจขึ้นกับการเกษตรกรรม น้ำมะพร้าวแก่จึงเป็นทางเลือกใหม่ในการผลิตกรดโคจิกส่วนมากน้ำมะพร้าวถูกปล่อยทิ้งเป็นของเสียลงตามท่อระบายน้ำและแม่น้ำลำคลองก่อให้เกิดปัญหาน้ำเสียขึ้นภายหลังเพราะยังไม่มีการใช้ประโยชน์จากน้ำมะพร้าวอย่างจริงจังและต้องทิ้งไปเนื่องจากไม่มีราคาในการซื้อขายนับเป็นการสูญเสียโดยเปล่าประโยชน์ นอกจากนี้ยังหาได้ง่ายเพราะเป็นวัตถุเหลือทิ้งทางการเกษตร น้ำมะพร้าวประกอบด้วยธาตุอาหารที่มีประโยชน์หลายชนิดและมีคุณค่าทางอาหารเหมาะแก่การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิธีการผลิตและใช้วัตถุที่เหลือใช้ทางการเกษตรที่เหมาะสมเพื่อลดต้นทุนการผลิตในห้องปฏิบัติการและขยายกำลังการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากอาหารน้ำมะพร้าว

1.2.2 เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

1.2.3 เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่ากับถังหมักแบบแบช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาถึงสูตรอาหารที่เหมาะต่อการผลิตกรดโคจิก โดยใช้ประโยชน์จากน้ำมะพร้าวซึ่งเป็นวัตถุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ประกอบด้วยธาตุอาหารที่มีประโยชน์และหาได้ง่าย สามารถลดต้นทุนการผลิตได้มาเป็นส่วนประกอบของสูตรอาหารในการเลี้ยงเชื้อ รวมทั้งขยายกำลังการผลิตกรดโคจิกจากฟลาสก์แบบเขย่าเป็นการผลิตในถังหมักแบบแบช

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1.4.1 สามารถนำน้ำมะพร้าวที่เหลือใช้ทางการเกษตรกลับมาใช้ประโยชน์

1.4.2 เป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิต

1.4.3 เพื่อขยายกำลังการผลิตกรดโคจิกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดโคจิก

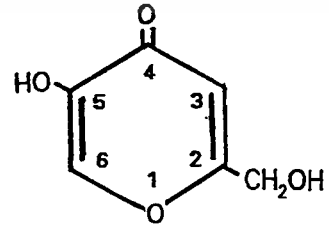
2.1.1 คุณสมบัติของกรดโคจิก

กรดโคจิก (kojic acid : 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-1,4-pyrone) เป็นกรดอินทรีย์ที่ได้จากจุลินทรีย์และเป็นสารประกอบพวกไพโรน (pyrone) ที่ขาดกลุ่มคาร์บอกซิล ดังนั้นความเป็นกรดจึงเกิดจากกลุ่มอิโนลิกไฮดรอกซิล มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 142.11 และจุดหลอมเหลว 153-154 องศาเซลเซียส กรดโคจิกบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีขาว สามารถละลายได้ในน้ำ (3.95 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 20 องศาเซลเซียส) เอทานอล และอะซิโตน (Bentley , 1957)

2.1.2 โครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก

โมเลกุลของกรดโคจิกประกอบขึ้นด้วยคาร์บอน 6 ตัว, ไฮโดรเจน 6 ตัว และออกซิเจน 4 ตัว ดังนั้นจึงมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_6O_4$ ดังแสดงในภาพที่ 1

ภาพที่ 1



โครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก

ที่มา : Bajpai และคณะ (1982)

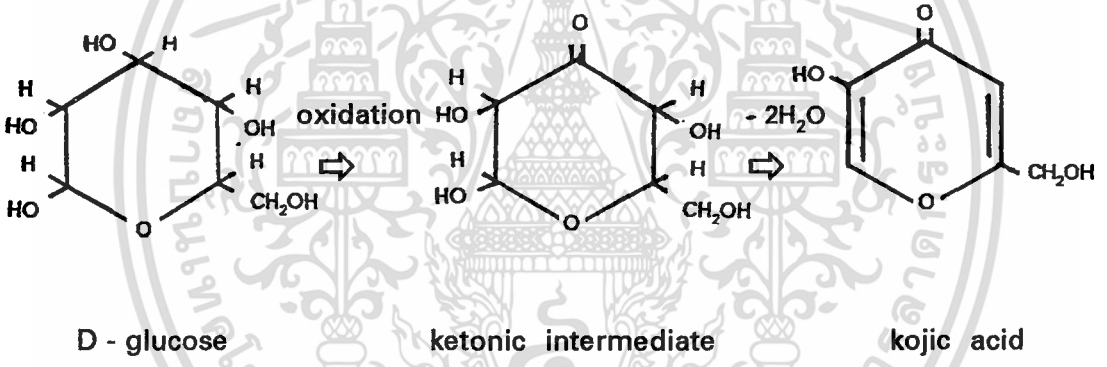
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 การสังเคราะห์กรดโคจิก

2.1.3.1 การสังเคราะห์กรดโคจิกจากกลูโคส

กรดโคจิกมีโครงสร้างคล้ายกับพวกโมโนแซ็กคาไรด์เพราะถูกสังเคราะห์ขึ้นมาจากน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) การสังเคราะห์เริ่มจากกลูโคสถูกออกซิเดชันเป็นคีโตนิกอิเทอร์มิเนต จากนั้นจึงถูกเปลี่ยนเป็นกรดโคจิกโดยเกิดการขจัดน้ำ 2 โมเลกุล ดังแสดงในภาพที่ 2

ภาพที่ 2



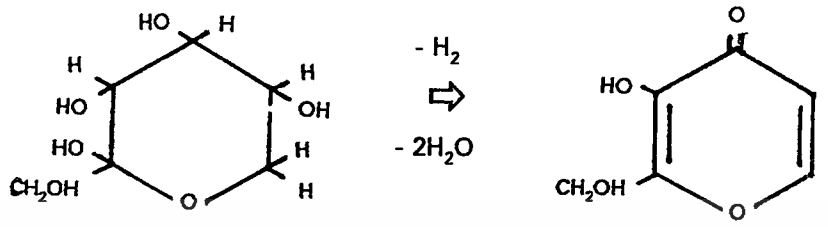
การสังเคราะห์กรดโคจิกจากกลูโคส
ที่มา : Bajpai และคณะ (1982)

2.1.3.2 การสังเคราะห์กรดโคจิกจากฟรักโทส

การสังเคราะห์เริ่มจาก ดี-ฟรักโทสถูกดึงไฮโดรเจนออก 2 อะตอม และเกิดการขจัดน้ำอีก 2 โมเลกุล เกิดเป็นไอโซเมอร์ของกรดโคจิก ดังแสดงในภาพที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 3



D - fructose Isomer of kojic acid

การสังเคราะห์กรดโคจิกจากฟรักโทส

ที่มา : Bajpai และคณะ (1982)

2.2 การผลิตกรดโคจิก

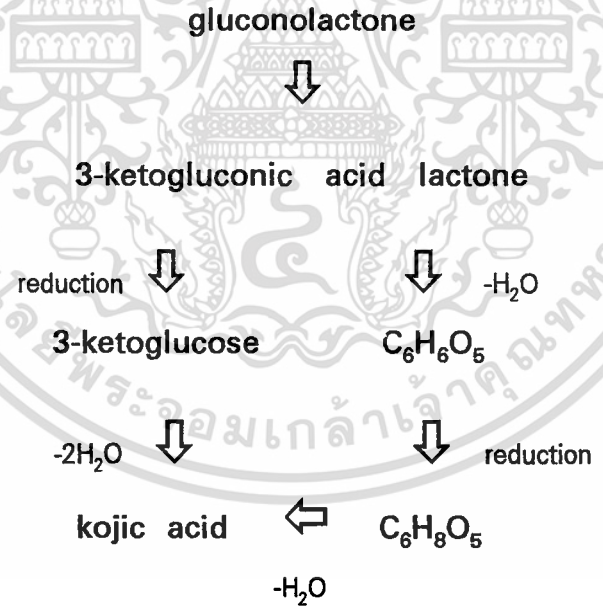
การผลิตกรดโคจิกพบครั้งแรกในปีค.ศ. 1907 โดย Saito จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเจริญของเส้นใยเชื้อ *Aspergillus oryzae* บนข้าวนึ่งซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (solid - state fermentation) Yabuta (1913) ได้ทำการตั้งชื่อกรดที่ Saito ค้นพบโดยให้ชื่อว่า "กรดโคจิก" (kojic acid) ต่อมามีการศึกษาค้นพบโครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิกขึ้นซึ่งมีชื่อทางเคมีคือ 5-ไฮดรอกซิล-2-ไฮดรอกซิลเมทิล-แกมมา-ไพโรน (5-hydroxy-2-hydroxymethyl-γ-pyrone) และมีการสังเคราะห์ทางเคมีของกรดโคจิกจากน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) แนวความคิดดังกล่าวทำให้มีการศึกษาค้นคว้าการผลิตกรดโคจิกต่อไป (Bajpai และคณะ, 1982)

กรดโคจิกสามารถผลิตจากเชื้อราดังนี้คือ *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus tamarii* เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง สำหรับเลี้ยงในอาหารเหลวอาจเป็นไปได้แต่ยังไม่แพร่หลายและในระดับการค้ายังไม่มีการผลิตโดยวิธีนี้ เชื้อจะสร้างกรดระหว่างที่เชื้อมีการเจริญในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) เกลือแร่อื่นๆกลูโคส ซูโครสและไซโลส และการเติมเอทิลีนคลอโรไฮดริน (ethylene chlorohydrin) ปริมาณเพียงเล็กน้อยลงในอาหารจะช่วยเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกและต้องระวังไม่ให้มีเหล็ก (Fe) ในอาหารที่เลี้ยงเพราะเหล็กจะทำปฏิกิริยากับกรดโคจิกเกิดเป็นสารสีแดงเข้มถึงแม้จะมีเหล็กในรูปเฟอริก (Fe^{+3}) ในปริมาณที่เล็กน้อยเพียง 0.1 พีพีเอ็ม (ppm) ก็ทำให้เกิดสารสีแดงเนื่องจากในโมเลกุลของกรดชนิดนี้มีกลุ่มที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยาจึงสามารถนำกรดชนิดนี้ไปใช้ทางด้านต่างๆ เช่น เป็นตัวให้รส (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปีค.ศ.1953 Arnteins และBentley รายงานว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นสารเริ่มต้นในกระบวนการผลิตกรดโคจิก จากการเปลี่ยนกลูโคสเป็น 3-คีโตกลูโคส (3-ketoglucose) โดยเกิดออกซิเดชัน (oxidation) จากนั้น 3-คีโตกลูโคสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดโคจิกโดยเกิดการขจัดน้ำ (dehydration) 2 โมเลกุล นอกจากนั้นยังพบกลูโคโนแล็กโทน (gluconolactone) เป็นสารเริ่มต้นในกระบวนการผลิตกรดโคจิกโดยการเปลี่ยนเป็น 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทน (3-ketogluconic acid lactone) ดังแสดงในภาพที่ 4 จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นกรดโคจิกได้ 2 กระบวนการคือ กระบวนการแรกเปลี่ยนเป็น 3-คีโตกลูโคสก่อนเป็นกรดโคจิก กระบวนการที่สองถูกเปลี่ยนเป็นกรดโคจิกโดยการขจัดน้ำ 1 โมเลกุล เกิดรีดักชัน และการขจัดน้ำอีก 1 โมเลกุล ตามลำดับ

ภาพที่ 4



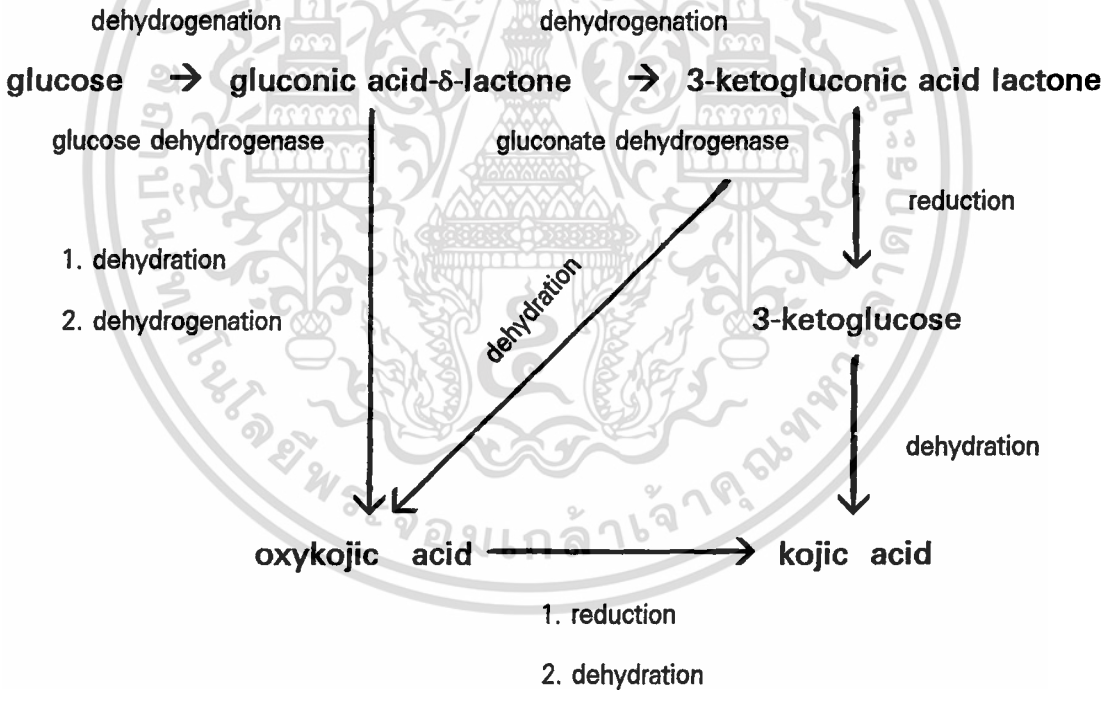
แสดงแผนภาพกระบวนการผลิตกรดโคจิก

ที่มา : Arnteins และBentley (1953)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี ค. ศ. 1981 Bajpai และคณะ ได้ทำการศึกษาแผนภาพ (pathway) การสังเคราะห์กรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus flavus* สายพันธุ์บี (B) ซึ่งพบเอนไซม์ที่สำคัญเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตคือ กลูโคสดีไฮโดรจิเนส (glucose dehydrogenase) และกลูโคเนตดีไฮโดรจิเนส (gluconate dehydrogenase) ย่อยสลายกลูโคส เอนไซม์ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์และเกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิกโดยมีกลูโคสเป็นสารเริ่มต้น ดังแสดงในภาพที่ 5

ภาพที่ 5



แสดงแผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus flavus*

ที่มา : Bajpai และคณะ (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดโคจิก

กรดโคจิกเริ่มผลิตครั้งแรกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* ต่อมาได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้เชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ต่างๆดังนี้คือ *Aspergillus oryzae, A. gymnosardae, A. flavus, A. awamori, A. candidus, A. clavatus, A. fumigatus, A. giganteus, A. albus, A. glaucus, A. nidulans, A. parasiticus, A. effusus, A. tamarii, A. luteovirescens, A. lutescens, A. wentii* และ *A. alliaceus* มาทำการเลี้ยงเพื่อผลิตกรดโคจิก และได้มีการค้นพบการผลิตกรดโคจิกจากแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ นอกจากนั้นยังค้นพบสารปฏิชีวนะเกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตกรดโคจิก (Bajpai และคณะ, 1982)

ในปี ค.ศ.1940 Prescott และ Dunn รายงายว่ามีการผลิตกรดโคจิกจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังนี้คือ *Aspergillus glaucus, A. oryzae, A. flavus, A. gymnosardae, A. awamori, A. candidus, A. clavatus, A. fumigatus, A. giganteus, A. albus, A. effusus, A. nidulans, A. parasiticus, Penicillium dalae* และสายพันธุ์ *Acetobacter*

Morton และคณะ (1945) ได้ทำการศึกษาสารพิษและสารปฏิชีวนะของกรดโคจิกที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus luteovirescens* โดยทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8-10 วัน ที่ 28 องศาเซลเซียส ต่อมา Bentley (1957) รายงานว่ากรดโคจิกที่ผลิตขึ้นมาส่วนมากได้จากเชื้อราโดยใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนและเชื้อต้องการอากาศในการเจริญ โดยเฉพาะสกุล *Aspergillus* ได้แก่ สายพันธุ์ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus oryzae* เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek - Dox liquid medium

ในปี ค.ศ. 1966 Parrish ทำการศึกษาการผลิตอะฟลาทอกซินและกรดโคจิกจากเชื้อราสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* จากการศึกษา *Aspergillus* สายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้คือ *Aspergillus clavatus, A. effusus, A. flavus, A. fumigatus, A. nidulans, A. oryzae, A. parasiticus, A. tamarii, A. ustus* และใช้ *A. flavus* ร่วมกับ *A. oryzae* พบว่าสามารถผลิตอะฟลาทอกซินได้ 2 สายพันธุ์ คือ *A. flavus* และ *A. parasiticus* นอกจากนั้นยังพบว่าทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดโคจิกได้ จากการศึกษา *Penicillium* ทั้ง 4 สายพันธุ์คือ *Penicillium citrinum, Penicillium griseofulvum, Penicillium purpurogenum* และ *Penicillium rubrum* พบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ และไม่พบสายพันธุ์ใดที่ผลิตอะฟลาทอกซิน จากการศึกษาโดยพิจารณาปริมาณกรดโคจิกและปริมาณอะฟลาทอกซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เกิดขึ้นดังนี้คือ กรดโคจิกที่เกิดขึ้นปริมาณตั้งแต่ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ และผลิตสารอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง (B_1) บีสอง (B_2) จีหนึ่ง (G_1) และจีสอง (G_2) เพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่ง จากอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร มีปริมาณอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง 3.0 ไมโครกรัม อะฟลาทอกซินบีสอง 0.36 ไมโครกรัม อะฟลาทอกซินจีหนึ่ง 0.72 ไมโครกรัม และอะฟลาทอกซินจีสอง 0.22 ไมโครกรัม

ในปี ค.ศ. 1982 Bajpai และคณะ ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากการนำเส้นใยของ *Aspergillus flavus* ที่ทำการเลี้ยงแล้วนำกลับมาเลี้ยงอีกครั้ง ซึ่งครั้งแรกเลี้ยงเส้นใยของเชื้อ *Aspergillus flavus* ในอาหาร YES (Yeast Extract Sucrose) พบว่ากรดโคจิกที่เกิดขึ้นมีปริมาณ 81.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากเลี้ยงในอาหาร YES แล้วจากนั้นนำเส้นใยมาเลี้ยงอีกครั้งในอาหารแตกต่างกัน 4 สูตรคือ เลี้ยงในอาหาร YES ที่มีพีเอช 6.5 อาหารที่มีส่วนประกอบของ 0.2 โมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.5) อาหารที่มีส่วนประกอบของ 0.2 โมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และกลูโคสร้อยละ 20 และอาหารที่มีส่วนประกอบของ 0.2 โมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และซูโครสร้อยละ 20 ตามลำดับ จากการเลี้ยงเป็นเวลา 11 วัน พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร YES มีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 20 เชื้อราผลิตกรดโคจิกมากที่สุดคือ 80.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และอาหารที่มีส่วนประกอบของ 0.2 โมลาร์ สารละลายฟอสเฟต-บัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียวไม่พบกรดโคจิกเกิดขึ้น จากการทดลองยังพบว่าเส้นใยที่สมบูรณ์ให้ปริมาณกรดโคจิกมากกว่าเส้นใยที่ถูกทำลายหรือฉีกขาด

ในปี ค.ศ. 1985 Tadera และคณะ ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อราสกุล *Aspergillus* จากสายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* K. , *Aspergillus oryzae* IAM 2024, *Aspergillus oryzae* IFO 5239, *Aspergillus flavus* IAM 2001 และ*Aspergillus tamarii* IFO 4099 พบว่า *Aspergillus oryzae* IAM 2024 สามารถผลิตกรดโคจิกได้มากสุดคือ 17.7 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคสร้อยละ 5 เปปโทนร้อยละ 0.6 โพแทสเซียมได-ไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.1 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 แคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0.001 เฟอริกคลอไรด์ร้อยละ 0.001 และไซคาซินร้อยละ 0.2 ปรับพีเอชเท่ากับ 4.5

ในปี ค.ศ. 1991 Wei และคณะ ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus candidus* ATCC 44054 ในอาหารเหลวที่แตกต่างกัน 3 ชนิดคือ อาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek - Dox liquid medium ประกอบด้วย โซเดียมไนเทรตร้อยละ 0.2 ไดโพแทสเซียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.1 โพแทสเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0.05 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.05 เฟอรัสซัลเฟตร้อยละ 0.001 ยีสต์สกัดร้อยละ 0.1 และกลูโคสร้อยละ 10 อาหารของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tadera ประกอบด้วย เปปโทนร้อยละ 0.6 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.1 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 แคลเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0.001 เฟอริกคลอไรด์ร้อยละ 0.001 และกลูโคสร้อยละ 5 และอาหาร Yeast Extract Sucrose (YES) ประกอบด้วย ยีสต์สกัดร้อยละ 2 และซูโครสร้อยละ 20 จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที พบว่ากรดโคจิกผลิตมากที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร YES อาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek - Dox liquid medium และอาหารของ Tadera ตามลำดับ จากการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus candidus* ในอาหาร YES ซึ่งให้กรดโคจิกมากที่สุดคือ 57 - 59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการหมักเป็นเวลา 9 - 12 วัน และไม่พบสารพิษอะฟลาทอกซินเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก

ในปี ค.ศ.1992 Kwak และRhee ได้ทำการปรับปรุงการผลิตกรดโคจิกโดยการตรึงเส้นใยของ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเจล ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 30 แมงกานีสซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 2 เฟอรัสซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 2 ซิงก์ซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 3 อย่างละ 1 มิลลิลิตร ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 6.0 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน

ต่อมามีการศึกษาการตรึงสปอร์ของ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ด้วยแคลเซียม-อัลจิเนตเจลเปรียบเทียบกับการใช้เส้นใยเลี้ยงโดยตรงในอาหารเหลวของ Kwak และRhee (1992) พบว่าการเพาะเลี้ยงเส้นใยที่ผ่านการตรึงเซลล์ และการใช้เส้นใยเลี้ยงโดยตรงสามารถผลิตกรดโคจิกสูงสุด 80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 22 วัน และ 25 กรัมต่อลิตรเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน ตามลำดับ (Kwak และRhee, 1992)

ในปี ค.ศ. 1995 Ogawa และคณะ ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยเลี้ยงบนเมมเบรน (Membrane - Surface Liquid Culture : MSLC) ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วยกลูโคส 100 กรัม ยีสต์สกัด 0.5-1.0 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.5 กรัม และเฟอรัสซัลเฟต 0.01 กรัม ที่พีเอช 6.0 จากการทดลองเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยเลี้ยงบนเมมเบรนกับการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า พบว่าการเลี้ยงบนเมมเบรนผลิตกรดโคจิกมากกว่าการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า โดยเลี้ยงบนเมมเบรนพบกรดโคจิกสูงสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าพบกรดโคจิกสูงสุด 20.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเลี้ยงบนเมมเบรนที่มีกระบวนการหมักแตกต่างกัน 3 แบบคือ การหมักแบบแบช (Batch MSLC) การหมักแบบเฟดแบชซึ่งมีการเติมสารอาหารลงไปโดยไม่มีการถ่ายออก (Fed batch MSLC) และการหมักแบบมีการหมักโดยมีการเติมสารอาหารบ่อยขึ้น (Repeated fed batch) และเลี้ยงบนเครื่องเขย่า พบว่าการหมักแบบมีการเติมสารอาหารบ่อยขึ้น (Repeated fed batch) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 14.2 กรัมต่อลิตรต่อวัน และการเลี้ยงแบบเขย่าให้ปริมาณกรดโคจิกน้อยสุดคือ 1.6 กรัมต่อลิตรต่อวัน

ในประเทศจีนและญี่ปุ่นมีการค้นพบเชื้อ *Aspergillus oryzae* ซึ่งแยกได้จากดินและพืช เชื้อราที่ได้มีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวในระยะแรกต่อมาเมื่ออายุมากขึ้นจะมีสีเหลืองปนเขียว เส้นใยที่ใช้สืบพันธุ์จะชูอยู่ในอากาศและต้องการอากาศในการเจริญ สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 32 - 36 องศาเซลเซียส ต่อมามีการนำเชื้อ *Aspergillus oryzae* มาใช้ในการหมักข้าวและถั่วเหลืองเพื่อการเตรียมโคจิ (koji) โดยเชื้อราจะสร้างเอนไซม์ในธัญพืชเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อหรือหัวเชื้อในการผลิตอาหารหมักต่างๆ เช่น ซีอิ๊ว มิโส (miso) ซึ่งเป็นอาหารหมักที่มีโปรตีนสูงและกลิ่นรสคล้ายเนื้อทำจากถั่วเหลืองหรือถั่วเหลืองผสมกับข้าวหรือข้าวบาร์เลย์ และเหล้าสาเก (sake) ของญี่ปุ่นทำจากข้าว เอนไซม์ที่ได้จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* เป็นที่ยอมรับขององค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO : Food and Agriculture Organisation of United Nations) และไม่ก่อให้เกิดโรค (Barbesgard และคณะ, 1992)

2.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก

2.4.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะไม่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 10 ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50 - 55 ในการสังเคราะห์เซลล์ กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนและต้องเลือกใช้แหล่งคาร์บอนให้เหมาะสม (Stanbury และคณะ, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1
แสดงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิก

จำนวนคาร์บอน (อะตอม)	แหล่งคาร์บอน
2	เอทานอล, ไกลซีน, โซเดียมแอซีเตต
3	1, 3-ไดไฮดรอกซิล-2-โพรพานอล
	กลีเซอรอลดีไฮด์
	กลีเซอรอล
	โซเดียมแล็กเตต
	โซเดียมไพรูเวต
4	กรดทาร์ทาริก
5	ลิบิทอล, อะราบิโนส, ไซโลส
6	2- ดีออกซีกลูโคส
	กาแล็กโทส
	กรดกลูโคนิก
	กลูโคส
	กลูโคโนแล็กโทน
	อินโนซิทอล
	แมนนิทอล
	ฟรักโทส, แมนโนส
	ซอร์บิทอล, ซอร์โบส
7	กรดคิวนิก, กรดชิคิมิก
12	กรดแล็กโทไบโอนิก
	ทริทาโลส, ซูโครส
	แล็กโทส, มอลโทส
18	ราฟฟิโนส, เดกซ์ทริน
	อินซูลิน, เพกทิน, แป้ง

ที่มา : Bajpai และคณะ (1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตกรดโคจิกมีขึ้นครั้งแรกโดยใช้ข้าวนึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน ต่อมามีรายงานว่า Traetta ได้นำน้ำตาลชนิดต่างๆได้แก่ ซูโครส ลิวูโลส เดกซ์โทรส และกลีเซอรอลมาใช้ในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus glaucus* จากนั้น Tamiya ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเลือกใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และต่อมามีการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยมีน้ำตาลเพนโทสและเฮกโซสเป็นแหล่งคาร์บอน (May และคณะ, 1931)

Challenger และคณะ (1929) ได้ทำการศึกษาการใช้น้ำตาล 3 ชนิดคือ อะราบิโนส ไซโลส และกลูโคสในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* โดยใช้ปริมาณร้อยละ 10 เป็นส่วนประกอบในอาหารเค (Kinoshita's basal salt medium : K medium) ประกอบด้วย โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเทรต 0.4 กรัมต่อลิตร ต่อมาได้มีการพัฒนาใช้น้ำตาลเดกซ์โทรส เพนโทสและเฮกโซสเป็นแหล่งคาร์บอน หลังจากนั้นได้มีการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้ไดไฮดรอกซี-แอซีโตน (dihydroxyacetone) และกลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Challenger และคณะ, 1931)

May และคณะ (1931) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากการใช้น้ำตาลเดกซ์โทรสความเข้มข้นระดับต่างๆดังนี้คือร้อยละ 10, 15, 20, 22.2, 33.3 และ 44.4 ในอาหารที่ประกอบด้วย แมกนีเซียม-ซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร ไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเทรต 1.125 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลเดกซ์โทรสร้อยละ 20 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดร้อยละ 48.2 จากนั้นทำการศึกษาอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* ในอาหารที่มีเดกซ์โทรสร้อยละ 15 โดยทำการศึกษาอุณหภูมิต่างกันคือ 22, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดร้อยละ 45 และ 45.5 ตามลำดับ

Barnard และ Challenger (1949) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* ในอาหารเค (K : Kinoshita' s basal salt medium) ซึ่งมีกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร เป็นส่วนประกอบในอาหาร โดยทำการศึกษา 2 การทดลองคือ การทดลองที่ 1 ใช้เส้นใยของเชื้อ *Aspergillus oryzae* เลี้ยงโดยตรงในอาหารเคที่เสริมแหล่งคาร์บอนคือ เอทิลแอลกอฮอล์ ร้อยละ 1.3 ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 11 วัน หลังจากนั้นทำการแยกกรดโคจิกด้วยเกลือคอปเปอร์ (copper salt) ได้กรดโคจิก 0.49 กรัม การทดลองที่ 2 ใช้สปอร์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงในอาหารเคเสริมเอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 2 ระดับคือร้อยละ 1.3 และ 2.1 ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 18 และ 21 วัน ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการแยกกรดโคจิกด้วยเกลือคอปเปอร์พบว่าเมื่อใช้เอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 1.3 ให้กรดโคจิก 0.5 กรัม และใช้เอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 2.1 ให้กรดโคจิก 1.1 กรัม

ในปีค.ศ. 1957 Bentley ได้มีการนำอาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek - Dox liquid medium มาเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก โดยมีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกรดโคจิกเกิดขึ้น 7-10 กรัมต่อลิตร

ในปีค.ศ. 1981 Bajpai และคณะ ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* ในอาหาร YES (Yeast Extract Sucrose) โดยมีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 20 เป็นแหล่งคาร์บอน ต่อมาในปี 1982 ได้ค้นพบว่าข้าวและเมล็ดธัญพืชบางชนิดสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตกรดโคจิกและต่อมาในปีเดียวกันนี้สามารถค้นพบแหล่งคาร์บอนแหล่งใหม่ เช่น เอทานอล น้ำตาลฟรักโทส น้ำตาลกลูโคสและแป้ง ต่อมา Tadera และคณะ (1985) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเลี้ยงในอาหารของ Tadera ที่มีส่วนประกอบของกลูโคสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอน ให้ปริมาณกรดโคจิก 17.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ในปีค.ศ.1991 Wei และคณะ ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิดที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันดังนี้คือ อาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek - Dox liquid medium มีแหล่งคาร์บอนคือ กลูโคสร้อยละ 10 อาหารของ Tadera มีส่วนประกอบของน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 และอาหาร Yeast Extract Sucrose (YES) มีส่วนประกอบของน้ำตาลซูโครสร้อยละ 20 พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร YES ให้ปริมาณกรดโคจิกมากที่สุด 57- 59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นมีการผลิตกรดโคจิกโดยเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 เป็นแหล่งคาร์บอน (Kwak และRhee, 1992 และ Ogawa และคณะ, 1995)

มีรายงานว่าได้มีการใช้แป้ง (starch) เป็นแหล่งคาร์บอน ปรากฏว่าไม่พบกรดโคจิกเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก (Kitada และคณะ, 1967) ต่อมา Rosfarizan และคณะ (1998) ได้มีการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยแป้งจากแหล่งต่างๆดังนี้คือ ดอกไม้ (flower) อาหารหมัก ผลไม้ น้ำพุร้อน และดิน พบว่าเชื้อที่แยกจากดอกไม้ (morning glory flower ซึ่งเป็นไม้เถาชนิดหนึ่งตระกูลผักบุ้ง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Bixa orellana*) สามารถย่อยแป้งได้ดีที่สุด เมื่อทำการจัดจำแนกพบว่าเชื้อราหมายเลข S33-2 มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *Aspergillus flavus* จากนั้นนำมาเลี้ยงบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในอาหารที่ประกอบด้วยยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียม-ซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆกันคือ แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าวโพด แป้งสาคู และน้ำตาลกลูโคส พบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวโพด (75 กรัมต่อลิตร) ให้กรดโคจิกสูงสุด 12.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 20 รองลงมาคือ กลูโคส (50 กรัมต่อลิตร) ให้กรดโคจิก 12.1 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 16 และแป้งสาคู (50 กรัมต่อลิตร) ให้กรดโคจิกต่ำสุดเท่ากับ 0.3 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนเลี้ยงเชื้อ *A. flavus* S33-2 สามารถผลิตกรดโคจิกได้เนื่องจากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป

2.4.2 แหล่งไนโตรเจน

ในการผลิตกรดโคจิกแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมาจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ได้แก่ เปปโทน ยีสต์สกัด และทริปโทน ส่วนแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ได้แก่ เกลือแอมโมเนียมและไนเทรต เช่น แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเทรต เป็นต้น เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มีราคาสูง ดังนั้นจึงมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแทน จากการผลิตกรดโคจิกส่วนมากใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนหรืออาจมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์อื่น ในการผลิตกรดโคจิกจากอาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek - Dox liquid medium ซึ่งมีส่วนประกอบของยีสต์สกัดร้อยละ 0.1 และแอมโมเนียมไนเทรตร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งไนโตรเจน (Bentley, 1957)

การศึกษาแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) และโซเดียมไนเทรต ($NaNO_3$) ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.75 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเทรต 0.7 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากันคือร้อยละ 18.6 จากนั้นทำการศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเทรต 7 ระดับคือ 0.142, 0.281, 0.563, 0.75, 1.125, 2.250 และ 4.5 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเทรตเข้มข้น 0.563 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดร้อยละ 30.2 (May และคณะ, 1931)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี ค.ศ.1991 Wei และคณะ ใช้อาหาร 3 ชนิดที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันคือ อาหารที่ดัดแปลงจากอาหาร Czapek - Dox liquid medium มีส่วนประกอบของโซเดียมไนเทรต ($NaNO_3$) ร้อยละ 0.1 และยีสต์สกัดร้อยละ 0.1 เป็นแหล่งไนโตรเจน อาหารของ Tadera มีส่วนประกอบของเปปโทนร้อยละ 0.6 เป็นแหล่งไนโตรเจน และอาหาร Yeast Extract Sucrose (YES) มีส่วนประกอบของยีสต์สกัดร้อยละ 2 เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าอาหาร YES ให้ปริมาณกรดโคจิกมากสุด 57-59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Kwak และ Rhee (1992) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยการควบคุมการเจริญเติบโตของเส้นใยที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเจลโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ยีสต์สกัด (yeast extract) 1.0 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆกันคือ 0.137, 0.183, 0.275, 0.367 และ 0.55 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.275 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดคือ 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน

ในปี ค.ศ.1995 Ogawa และคณะ ได้ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยเลี้ยงเชื้อราบนเมมเบรนหรือวิธี MSLC เปรียบเทียบกับการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า เมื่อใช้ยีสต์สกัดที่มีความเข้มข้นต่างกันดังนี้คือ ร้อยละ 0.05 , 0.10 , 0.25 , 0.5 และ 0.1 เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเลี้ยงเชื้อราบนเบมเบรนให้กรดโคจิกสูงสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 10 จากการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 0.05 - 1.0 พบว่าในอาหารที่มียีสต์สกัดร้อยละ 1.0 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 20.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 12 และใช้ยีสต์สกัดร้อยละ 0.25 ให้กรดโคจิกสูงสุด 20.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 9

2.4.3 แหล่งแร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีความสำคัญที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่แมกนีเซียม (Mg) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) ซัลเฟอร์ (S) แคลเซียม (Ca) และคลอรีน (Cl) นอกจากนี้ยังมีโคบอล (Co) คอปเปอร์ (Cu) เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) โมลิบดีนัม (Mo) และสังกะสี (Zn) แร่ธาตุที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในรูปสารอนินทรีย์ ดังแสดงในตารางที่ 2 (Stanbury และคณะ, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2
ความเข้มข้นของแร่ธาตุชนิดต่างๆที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

แร่ธาตุ	ปริมาณที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)
KH_2PO_4	1.0 - 4.0
$MgSO_4.7H_2O$	0.25 - 3.0
KCl	0.5 - 12.0
$CaCO_3$	5.0 - 17.0
$FeSO_4.4H_2O$	0.01 - 0.1
$ZnSO_4.8H_2O$	0.1 - 1.0
$MnSO_4.H_2O$	0.01 - 0.1
$CuSO_4.5H_2O$	0.003 - 0.01
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.01 - 0.1

ที่มา : Stanbury และคณะ (1995)

Challenger และคณะ (1929) ได้ค้นพบอาหารเคซึ่งมีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) เป็นส่วนประกอบ ต่อมามีการค้นพบอาหารที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกคืออาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek - Dox liquid medium ที่มีการเสริมแหล่งอาหารคือ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ลงในอาหารเหลว (Bentley, 1957)

May และคณะ (1931) มีการใช้แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดร้อยละ 48.2 ต่อมา Tadera และคณะ(1985)ได้ศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวที่มีการเสริมแร่ธาตุคือโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) และเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 17.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปี ค.ศ.1991 Wei และคณะ ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus candidus* ในอาหารเหลว 3 ชนิด คือ อาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek - Dox liquid medium อาหารของ Tadera เสริมแร่ธาตุพวกโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมคลอไรด์และเฟอริกคลอไรด์ และอาหาร Yeast Extract Sucrose (YES) ไม่มีแร่ธาตุเป็นส่วนประกอบในอาหารเหลว จากการใช้อาหารทั้ง 3 ชนิดเลี้ยงเชื้อพบว่าอาหาร YES ให้กรดโคจิกสูงสุด 57 - 59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ในปี ค.ศ. 1992 Kwak และ Rhee ได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการเสริมแร่ธาตุพวกไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.7H_2O$) และซิงก์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) พบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกสูงสุด 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน ต่อมาในปีเดียวกันนี้ได้มีการพัฒนาการผลิตกรดโคจิกขึ้นโดยการตรึงสปอร์ของ *Aspergillus oryzae* ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเจล จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของแร่ธาตุเหมือนสูตรเดิมพบว่ากรดโคจิกที่เกิดสูงสุด 80 กรัมต่อลิตร ต่อมาได้ทำการผลิตกรดโคจิกจากการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเสริมแร่ธาตุพวกไดโพแทสเซียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) พบว่าได้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Ogawa และคณะ, 1995)

2.5 ประโยชน์ของกรดโคจิก

2.5.1 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

2.5.1.1 ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล การเกิดสีน้ำตาลเกิดจากปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เกี่ยวข้อง เช่น เมื่อมีผักและผลไม้มีรอยตำหนิเสียหายซึ่งเกิดจากรอยช้ำ รอยปอก หั่นแช่แข็งหรือเป็นโรค ส่วนของเนื้อเยื่อที่มีตำหนิมีเอนไซม์อยู่เมื่อถูกอากาศจะเกิดเป็นสีน้ำตาลขึ้น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลในผักผลไม้เป็นกลุ่มของเอนไซม์ซึ่งเรียกชื่อรวมว่า ฟีนอลเลส (phenolase) ดังนั้นกรดโคจิกจึงช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล ในประเทศญี่ปุ่นมีการใช้กรดโคจิก กรดแอสคอร์บิก และกรดซิตริกเพื่อยับยั้งเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase : PPO) ในเห็ด มันฝรั่ง และแอปเปิ้ล (Wei และคณะ, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Uchino และคณะ (1988) รายงานว่ากรดโคจิกสามารถป้องกันรอยด่างได้โดยทดสอบกับแป้งสาลีซึ่งแป้งสาลีจะเกิดการเปลี่ยนสีขึ้นระหว่างการเก็บรักษาก่อนที่จะนำไปผลิตเส้นบะหมี่ ซึ่งสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นเรียกว่า รอยด่าง (speck)

2.5.1.2 เพิ่มกลิ่นรสพวกมอลทอล (maltal : $C_6H_6O_3$) และเอทิลมอลทอล (ethyl maltal) ซึ่งมอลทอล (3 - hydroxy - 2 - methyl - 1,4 - pyrone) เป็นสารเสริมกลิ่นรสตัวหนึ่ง โดยใช้เป็นสารให้กลิ่นรสสังเคราะห์การทำงานจะสัมพันธ์กับเอทิลมอลทอล มีตามธรรมชาติในโกโก้ กาแฟและธัญพืช ไม่เสริมกลิ่นรสตัวเองแต่จะปรับสภาพกลิ่นรสอาหารให้ดีขึ้น ใช้เสริมกลิ่นหอมของผลไม้ วานิลลา อาหาร เครื่องดื่มรสช็อกโกแลต ยังใช้ในเครื่องดื่มและของหวาน (กล้าณรงค์ ศรีรอต และจุนทนี จิตต์รำพึง, 2540)

2.5.2 ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

โดยใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ซึ่งทำหน้าที่ขัดผิวหรือทำให้ผิวขาวขึ้น (whitening) และสามารถป้องกันแสงอัลตราไวโอเลตจากแสงแดด (Ohyama และ Mishima, 1990) ต่อมาได้มีการศึกษาการใช้กรดโคจิกในผลิตภัณฑ์รักษาผิว (skin care products) โดยใช้กรดโคจิกร้อยละ 1 เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ ทำหน้าที่เป็นตัวเปลี่ยนเม็ดสีผิว (skin-depigmenting) ทำให้ผิวขาวขึ้น ในทางการค้ามีการนำกรดโคจิกมาใช้ในผลิตภัณฑ์รักษาผิวตั้งแต่ปี ค.ศ. 1988 เป็นต้นมา (Nakagawa และ Kawai, 1995)

ในปี ค.ศ. 1994 Minami ได้ทำการศึกษาผลของกรดโคจิกที่ผสมในครีมรักษาผิวโดยใช้ครีมที่มีส่วนผสมของกรดโคจิกร้อยละ 1 ทดสอบกับผู้หญิง 54 คนที่มีสภาพผิวแตกต่างกัน อายุระหว่าง 18-47 ปี ทาครีมวันละ 2 ครั้ง พบว่าสีผิวเปลี่ยนไปทำให้ผิวขาวขึ้นภายในเวลา 4 เดือนโดยประมาณ

2.5.3 ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง

กรดโคจิกมีคุณสมบัติคล้ายแทนนิน (tannin) ซึ่งมีอยู่ทั่วไปในพืชและส่วนใหญ่เป็นพวกไกลโคไซด์ (glycosides) มีมากในเปลือกต้นโอ๊กและฝาง มีความสามารถในการฟอกหนังสัตว์ได้ โดยทำหน้าที่ในการตกตะกอนโปรตีนและแอลคาลอยด์ (Bajpai และคณะ, 1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.4 มีคุณสมบัติเป็นเรซินสังเคราะห์

ช่วยให้ไวน์คงรูปโดยป้องกันการเกิดสีน้ำตาลของไวน์ขาวและป้องกันไม่ให้เบียร์ขุ่น (Bajpai และคณะ, 1982)

2.5.5 เป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

ในปี ค.ศ. 1990 Kayahara และคณะ มีรายงานว่ากรดโคจิกสามารถต้านกิจกรรมของแบคทีเรียพวก *Staphylococcus aureus* 209 P. ต่อมาพบว่ากรดโคจิกต้านการเจริญของเชื้อราพวก *Pythium graminicola, Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำลายเมล็ดธัญพืช ถั่ว และฝักมะขามเทศ

2.5.6 เป็นสารปฏิชีวนะ

ในปี ค.ศ.1913 Yabuta รายงานว่ากรดโคจิกปริมาณร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้

ในปี ค.ศ. 1945 Mortonและคณะ ได้ทำการศึกษาการใช้กรดโคจิกความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบแบคทีเรีย 166 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์ เช่น *Bacillus mycoides, Chromobacterium indicum, Clostridium novyi, Micrococcus roseus, Salmonella enteritidis* และ *Serratia marcescens* ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อใช้กรดโคจิกเข้มข้นในอัตราส่วน 1 ใน 500 ส่วน ยังพบว่า *Leptospira canicola* ไม่ทนกรดจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อมีกรดโคจิกเพียง 1 ใน 1 ล้านส่วน เป็นต้น ต่อมามีรายงานว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งแบคทีเรียโดยพบว่ากรดโคจิกยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบเพราะแบคทีเรียแกรมบวกจะไวต่อโซเดียมโคเจต (sodium kojate) มากกว่าแกรมลบ (Bajpai และคณะ, 1982)

ในปี ค.ศ. 1947 Mayer และคณะ ทำการศึกษาการใช้กรดโคจิกเป็นส่วนผสมในสารทำลายแมลงพวกนิโคไทด์ (nicotine insecticides) โดยทำการทดสอบกับหนอน 2 ชนิดคือ พวก *Diaphania hyalinata* L. และ *Prodenia eridania* Cram. โดยกรดโคจิกไม่เป็นสารพิษและไม่เป็นอันตรายต่อพืช ในการทดลองจะใช้ร่วมกับสารพิษนิโคไทด์โดยใช้ นิโคไทด์ซัลเฟตไพโรไฟไลด์ (nicotine sulphatepyrophyllite) ร้อยละ 5 นิโคไทด์เบนโทไนด์ (nicotine-bentonite) ร้อยละ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และกรดโคจิกร้อยละ 5 จากการศึกษาพบว่าสารทำลายแมลงสามารถควบคุมแมลงที่เป็นศัตรูพืชให้น้อยลง โดยทำให้แมลงตายหรือเป็นโรค

มีรายงานว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน(amino acids) โดยทำการทดสอบกับตับและไตหนู จากการทดลองกรดโคจิกไปยับยั้งเอนไซม์จากตับและไตหนูจึงทำให้โปรตีนที่หนูรับประทานเข้าไปไม่สามารถย่อยสลายไปเป็นกรดอะมิโนและไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เพราะโปรตีนจะถูกย่อยสลายได้ต้องอาศัยเอนไซม์ที่สร้างขึ้นจากกระเพาะและตับอ่อนจึงสามารถย่อยสลายให้เป็นกรดอะมิโนได้ ต่อมามีการค้นพบว่ากรดโคจิกสามารถต้านการเกิดเป็นปุ่มหรือตุ่มของโรควัณโรค (Tubercle) โดยทำการทดสอบกับแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ที่ทำให้เกิดวัณโรค โดยใช้กรดโคจิก 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร ต่อมาได้มีการค้นพบว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งการสังเคราะห์กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) หรือวิตามินซีในสัตว์ทดลอง ทำให้หลอดเลือดเปราะและเกิดโรคลักปิดลักเปิด (scurvy) เพราะไม่มีเอนไซม์กลูโคโนแล็กโทนออกซิเดส (L - gulonolactone oxidase) ที่ใช้ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแอสคอร์บิก (Bajpai และคณะ, 1982)

2.5.7 ใช้เป็นส่วนผสมในยา ยาสลบและสีย้อม

ได้มีการนำกรดโคจิกมาใช้บรรเทาอาการปวดและป้องกันการอักเสบของแผล (Kayahara และคณะ, 1990)

2.6 ความเป็นพิษของกรดโคจิก

ในปีค.ศ. 1934 Friedemann ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของกรดโคจิกโดยใช้สุนัขเป็นสัตว์ทดลอง ทำการฉีดกรดโคจิกปริมาณ 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้สุนัขมีอาการน้ำลายฟูมปาก อาเจียน ความดันเลือดสูง เกิดการง่วงนอนตลอดเวลาและอาจเกิดความพิการหรือผิดปรกติ ต่อมามีรายงานว่ามีการใช้เม็ดเลือดขาว (leucocytes) ทดลองโดยฉีดสารละลายโซเดียมโคเจต (sodium kojate) เข้มข้นร้อยละ 1 พีเอช 6.8 พบว่าเม็ดเลือดขาวถูกฆ่าภายในเวลา 3 ชั่วโมง ต่อมามีการการทดลองกับเอ็มบริโอลูกไก่อายุ 12 วัน โดยฉีดกรดโคจิกปริมาณ 12 มิลลิลิตรต่อ 100 กรัมของน้ำหนักไข่ พบว่าทำให้เอ็มบริโอลูกไก่อ่อนแอลง (Bajpai และคณะ, 1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Morton และคณะ (1945) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของกรดโคจิกโดยใช้หนูเป็นสัตว์ทดลองทำการฉีดสารละลายกรดโคจิก (กรดโคจิกร้อยละ 5 เตรียมโดยละลายกรดโคจิก 5 กรัม ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0.85 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ปริมาณ 30 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักหนู 17 กรัม พบว่าทำให้เยื่อกระเพาะหนูเกิดการอักเสบ

2.7 น้ำมะพร้าว

น้ำจากมะพร้าวอ่อนหรือเอนโดสเปิร์มส่วนที่เป็นของเหลว เป็นเครื่องดื่มที่สะอาดบริสุทธิ์ มีคุณค่าทางโภชนาการและป้องกันการไหม้ของผิวหนังเนื่องจากแสงอาทิตย์สำหรับเด็กที่อยู่ในเขตร้อน น้ำมะพร้าวทำให้ร่างกายเย็นช่วยป้องกันโรคผดผื่นคันและลดความร้อนของผิวหนังลงได้ นอกจากนี้ช่วยบรรเทาผื่นคันซึ่งเกิดจากโรคฝีดาษและโรคหัด ต่อมามีการศึกษาองค์ประกอบของน้ำมะพร้าว (ดังแสดงในตารางที่ 3) และพบว่าน้ำมะพร้าวมีน้ำตาลอยู่ประมาณร้อยละ 5 ส่วนแร่ธาตุต่างๆ กรดอะมิโน และวิตามินซีมีอยู่ 2.2 - 3.7 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ให้พลังงาน 17.4 แคลอรีต่อ 100 กรัม (สมชาย ประภาวัต, 2532)

อัจฉรา มีวาสนา (2510) ได้ทำการวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมะพร้าวอ่อนเปรียบเทียบกับน้ำมะพร้าวแก่ พบว่าในน้ำมะพร้าวอ่อน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วยน้ำ 91.9 กรัม โปรตีน 0.1 กรัม คาร์โบไฮเดรต 7.4 กรัม เถ้า 0.6 กรัม วิตามินซี 1.6 กรัม ฟอสฟอรัส 6.6 กรัม เหล็ก 0.2 กรัม ไม่พบวิตามินบีรวม ไขมันและกาก ส่วนน้ำมะพร้าวแก่ประกอบด้วย น้ำ 94.6 กรัม โปรตีน 1.0 กรัม คาร์โบไฮเดรต 2.1 กรัม เถ้า 0.5 กรัม แคลเซียม 20.7 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 25.4 มิลลิกรัม เหล็ก 0.4 กรัม วิตามินซี 1.4 มิลลิกรัม และวิตามินบีรวมแต่ไม่พบไขมันและกาก

ในปี ค.ศ. 1945 Verderbelt ได้ทำการวิเคราะห์น้ำมะพร้าวพบว่าใน 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย วิตามินบีรวมดังนี้คือกรดนิโคตินิก (nicotinic acid) 0.64 ไมโครกรัม ไบโอทิน (biotin) 0.02 ไมโครกรัม กรดแพนโททรินิก (pantothenic acid) 0.52 ไมโครกรัม ไรโบฟลาวิน (riboflavin) 0.01 ไมโครกรัม และกรดโฟลิก (folic acid) 0.003 ไมโครกรัม นอกจากนั้นยังพบวิตามินซี 0.7-3.7 มิลลิกรัม และมีส่วนที่เป็นสารอนินทรีย์ซึ่งได้แก่โพแทสเซียมเป็นส่วนใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3
แสดงองค์ประกอบของน้ำมะพร้าว

องค์ประกอบ	ปริมาณ
น้ำ	ร้อยละ 95.5
ไนโตรเจน	ร้อยละ 0.10
กรดฟอสฟอริก	ร้อยละ 0.60
โพแทสเซียม	ร้อยละ 6.60
แคลเซียมออกไซด์	ร้อยละ 0.70
แมกนีเซียมออกไซด์	ร้อยละ 0.60
เหล็ก	0.5 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม
ของแข็งทั้งหมด	4.7 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม
น้ำตาลรีดิวซ์	0.8 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม
น้ำตาลทั้งหมด	2.9 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม
เถ้า	0.6 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม

ที่มา : สมชาย ประภาวัต (2532)

น้ำมะพร้าวประกอบด้วยแซ็กคาโรสซึ่งเปลี่ยนเป็นน้ำตาลแปร (inverted sugar) เมื่อมะพร้าวแก่เต็มที่ น้ำมะพร้าวอ่อนประกอบด้วยน้ำตาลร้อยละ 4.0 - 5.5 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) แต่น้ำตาลในน้ำมะพร้าวแก่ส่วนใหญ่เป็น non-reducing sugar ซึ่งมีประมาณร้อยละ 2 ต่อมามีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลในน้ำมะพร้าวจากระยะซึ่งเป็นมะพร้าวอ่อนจนเมื่อมะพร้าวแก่ (ตารางที่ 4) แสดงว่าเมื่อผลมะพร้าวอ่อนเจริญเป็นมะพร้าวแก่ปริมาณและชนิดน้ำตาลจะเปลี่ยนไปโดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะค่อยๆเพิ่มขึ้นจนถึงระยะหนึ่งจะลดลง จากการศึกษายังพบว่าน้ำมะพร้าวมีปริมาณของแข็งทั้งหมดร้อยละ 2.5 และค่อยๆเพิ่มขึ้นในขณะที่ผลมะพร้าวเริ่มแก่จนมีปริมาณของแข็งทั้งหมดมากที่สุดร้อยละ 6 และค่อยๆลดลงระหว่างการงอกของต้นอ่อนจนเหลือของแข็งทั้งหมดประมาณร้อยละ 2 จากนั้นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการวิเคราะห์น้ำมะพร้าวแก่ พบว่าใน 100 มิลลิลิตรมีส่วนประกอบโดยเฉลี่ยดังนี้คือ ปริมาณของแข็งทั้งหมด 4.71 กรัม น้ำตาลทั้งหมด 2.08 กรัม กรดอินทรีย์ที่ยังไม่ทราบชนิด 2.01 กรัม และเถ้า 0.62 กรัม ต่อมาได้มีการแยกน้ำตาลจากน้ำมะพร้าวได้ 3 ชนิดคือ เดกซ์โทรส ลิวูโลส และซูโครสแต่ไม่พบราฟฟิโนสซึ่งมีอยู่ในเอนโดสเปิร์ม และมีรายงานว่าในน้ำมะพร้าวมีแมนนิทอลพบว่าแมนนิทอลที่พบนั้นเกิดจากการรีดิวซ์ของน้ำตาลเดกซ์โทรสโดยแบคทีเรีย (Child และ Nathanael, 1950)

ตารางที่ 4
เปรียบเทียบน้ำตาลในน้ำมะพร้าวจากผลมะพร้าวระยะต่างๆ

ลักษณะผลมะพร้าว	น้ำตาลในน้ำมะพร้าว (ร้อยละ)		
	น้ำตาลรีดิวซ์	ซูโครส	น้ำตาลทั้งหมด
ผลอ่อนที่สุด เปลือกสีเขียว ไม่มีเนื้อมะพร้าว	1.88	0	1.88
ผลอ่อน เปลือกสีเขียว ไม่มีเนื้อมะพร้าว	2.38	0	2.38
ผลอ่อน ไม่มีเนื้อมะพร้าว	2.63	0	2.63
ผลสีเขียว เนื้อมะพร้าวมีลักษณะเป็นน้ำ	3.24	0	3.24
ผลสีเขียว มีเนื้อมะพร้าว	3.14	0.08	3.22
ผลสีเขียว มีเนื้อมะพร้าว	2.52	0.57	3.09
ผลแก่ที่สุด เปลือกสีน้ำตาล	1.45	0.58	2.03

ที่มา : Child และ Nathanael (1950)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5

แสดงองค์ประกอบของมะพร้าว

ส่วนประกอบ	เนื้อมะพร้าวสด	เนื้อมะพร้าวแห้ง	กะทิ	น้ำมะพร้าว
น้ำ (ร้อยละ)	50.9	3.5	65.7	94.2
พลังงาน (แคลอรี)	346	662	252	22
กรัมต่อ100 กรัม				
โปรตีน	3.5	7.2	3.2	0.3
ไขมัน	35.3	64.9	24.9	0.2
คาร์โบไฮเดรต	9.4	23.0	5.2	4.7
เส้นใย (fiber)	4.0	3.9	-	น้อยมาก
เถ้า	0.9	1.4	1.0	0.6
มิลลิกรัมต่อ 100กรัม				
แคลเซียม	13	26	16	20
ฟอสฟอรัส	95	18.7	100	13
เหล็ก	1.7	3.3	1.6	0.3
โซเดียม	23	-	-	25
โพแทสเซียม	256	588	-	147
ไทอะมีน	0.05	0.06	0.03	น้อยมาก
ไรโบฟลาวิน	0.02	0.04	-	น้อยมาก
ไนอะซิน	0.5	0.6	0.8	0.1
วิตามินซี	3	-	2	2

ที่มา : Douglas และคณะ (1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6
แสดงองค์ประกอบของน้ำมะพร้าวแก่ 100 มิลลิลิตร

องค์ประกอบ	ปริมาณ
น้ำ	94.6 กรัม
น้ำตาลซูโครส	1.14 กรัม
น้ำตาลกลูโคส	0.12 กรัม
น้ำตาลฟรักโทส	0.83 กรัม
น้ำตาลทั้งหมด	3.09 กรัม
โปรตีน	1.00 กรัม
คาร์โบไฮเดรต	1.00 กรัม
แคลเซียม	20.7 มิลลิกรัม
ฟอสฟอรัส	25.4 มิลลิกรัม
เหล็ก	0.40 มิลลิกรัม
วิตามิน	0.7 - 3.7 มิลลิกรัม

ที่มา : สมศรี ลิปิพัฒนวิทย์ (2531)

2.8 การใช้ประโยชน์ของน้ำมะพร้าว

2.8.1 น้ำมะพร้าวอ่อนใช้เป็นเครื่องดื่ม

น้ำมะพร้าวอ่อนจะมีรสชาติดีและเป็นที่ยอมรับในการบริโภคมากที่สุดเมื่อผลมะพร้าวมีอายุได้ประมาณ 7 เดือนภายหลังจากที่มีการผสมเกษรและเริ่มเกิดเป็นผลมะพร้าว น้ำมะพร้าวมีปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solids) ประมาณร้อยละ 5 ถ้าใช้ผลมะพร้าวที่มีอายุอ่อนกว่านี้จะได้น้ำมะพร้าวที่ขาดความหวานและรสชาติซึ่งจำเป็นต้องทิ้งไป แต่ถ้าผลมะพร้าวที่แก่เกินไปกว่านี้จะได้น้ำมะพร้าวที่มีรสชาติเปลี่ยนไปไม่ตรงกับรสชาติที่ต้องการซึ่งรสชาติที่ต้องการคือหวานและมีรสเฝื่อนเล็กน้อย นอกจากนั้นมีคุณสมบัติในการบำบัดโรคภัยไข้เจ็บต่างๆ และเป็นยาช่วยในการระบายเช่น ฆ่าพยาธิในลำไส้ การที่มีเกลือและอัลบูมมินอยู่ด้วยจะทำให้เป็นเครื่องดื่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ดีสำหรับผู้ที่เป็นโรคอหิวาต์ แก้การคลื่นไส้อาเจียรและถ้าใช้ล้างผิวหนังเป็นประจำจะทำให้ผิวหนังไม่เหี่ยวย่นและเต่งตึงอยู่เสมอ โปรตีนในน้ำมะพร้าวมีอะลานีน อาร์จินีน ซิสทริน และเซอร์รีนสูงกว่าโปรตีนในนมวัว นอกจากนี้น้ำมะพร้าวสามารถใช้ผสมกับนมวัวเพื่อใช้เป็นเครื่องดื่มและยังใช้ผสมในน้ำมันละหุ่งเพื่อใช้ในการล้างเครื่องมือให้สะอาดเป็นมันวาวได้ (สมชาย ประภาวัต, 2532)

2.8.2 ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ในน้ำมะพร้าวมีฮอร์โมนที่สำคัญสามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์, การขยายขนาดของเซลล์, การเจริญของกิ่งใบและเร่งการแตกตาข้างของพืช ฮอร์โมนชนิดนี้มีชื่อว่า ไซโตไคนิน (cytokinin) ซึ่งเป็นฮอร์โมนพืชที่พบครั้งแรกจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยวิธีปลอดเชื้อ ต่อมามีรายงานว่าในน้ำมะพร้าวมีฮอร์โมนไซโตไคนินและฮอร์โมนอื่นควบคุมการเจริญในระหว่างที่เมล็ดกำลังงอกและเมื่อทำการเลี้ยงเนื้อเยื่อของรากแครอทในอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่เติมน้ำมะพร้าวพบว่าเซลล์ของรากแครอทเพิ่มเป็น 80 เท่า นอกจากนี้ไซโตไคนินทำงานร่วมกับออกซินเร่งการแบ่งตัวของเซลล์ทำให้รากแครอทเจริญเพิ่มมากขึ้น (Leopold และ Kriedemann , 1964)

Van Overbeek และคณะ (1941) ได้ทำการทดลองใช้น้ำมะพร้าวเลี้ยงต้นกล้าของต้นลำโพง (*Datura stromoium*) พบว่าต้นกล้าสามารถแบ่งเซลล์และมีการเจริญเติบโตแสดงว่าในน้ำมะพร้าวมีฮอร์โมนสำคัญที่สามารถกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของเนื้อเยื่อ ต่อมาได้ทำการสกัดสารที่มีอยู่ในน้ำมะพร้าวออกมา ได้แก่ ไมโออินออซิทอล (myo - inositol) 1, 3 - ไดฟีนิลยูเรีย (1, 3 diphenylurea) และเลียวโคแอนโทไซยานิน (leucoanthocyanin) สารเหล่านี้มีความสามารถในการแบ่งเซลล์

Shantz และ Steward (1955) สามารถสกัดสารเร่งการเจริญคือ 1, 3 ไดฟีนิลยูเรียจากน้ำมะพร้าวและใช้น้ำมะพร้าวเลี้ยงเนื้อเยื่อของหัวมันฝรั่งทำให้เกิดการแบ่งเซลล์และเกิดแคลลัสดีขึ้น ต่อมา Miller และคณะ (1955) รายงานว่าในน้ำมะพร้าวมีฮอร์โมนไคนิตินช่วยเร่งการแบ่งเซลล์ และทำการทดลองใช้น้ำมะพร้าวอ่อนเลี้ยงเนื้อเยื่อของยาสูบพบว่าน้ำหนักสดของยาสูบเพิ่มขึ้น

Nickell (1950) ทำการศึกษาผลของน้ำมะพร้าวที่มีผลต่อการเจริญของเนื้อเยื่อที่เกิดจากไวรัส พบว่าน้ำมะพร้าวที่ผ่านความร้อนโดยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอจะกระตุ้นการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญได้ดีกว่าการทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองซึ่งคาดว่าสารเร่งการเจริญเป็นสารพวกทนความร้อน นอกจากนั้น Mauney (1960) พบว่าเมื่อเติมน้ำมะพร้าวในสูตรอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อฝ้ายทำให้อัตราการเจริญของต้นอ่อนเพิ่มเป็นสองเท่าเมื่อเทียบกับในสูตรอาหารที่ไม่ได้เติมน้ำมะพร้าวและส่งเสริมให้มีการเจริญต่อไปอย่างปรกติได้และพบว่าน้ำมะพร้าวที่ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองสามารถเร่งการเจริญมากกว่าที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ

Carew และ Schwarting (1958) ได้ทดลองเลี้ยงเอ็มบริโอของข้าวไรน์ (*Secale cereale*) โดยใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 15 พบว่าสามารถเจริญเติบโตทำให้น้ำหนักสดเพิ่มถึงร้อยละ 95.3 ของน้ำหนักเริ่มต้น ต่อมา Rao และ Avadhani (1963) ได้ทำการทดลองใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในสูตรอาหารเลี้ยงกล้วยไม้ พบว่าเมล็ดของกล้วยไม้สกุลแวนด้า (*Vanda spp.*) งอกเป็นต้นได้ดีกว่าอาหารชนิดอื่นและทำให้น้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ100 ของน้ำหนักเริ่มต้น นอกจากนั้นยังมีการใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในอาหารสำหรับการเลี้ยงต้นอ่อนของกล้วยไม้ในขวด

2.8.3 ใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์

2.8.3.1 ใช้ในการรักษาโรคอหิวาต์ ทำลายพวกพยาธิในลำไส้และใช้บรรเทาอาการปวดท้องเนื่องจากน้ำมะพร้าวมีปริมาณเกลือและอัลบูมินสูงตามธรรมชาติ (Wodroof, 1970)

2.8.3.2 ใช้ในการผสมเทียม โดยนำน้ำมะพร้าวจากมะพร้าวอ่อนมาผสมกับไข่แดงเพื่อทำให้น้ำเชื้อ (semen) หมูตัวผู้เจือจางลงประมาณร้อยละ 30 จากนั้นทำการทดลองเจือจางน้ำเชื้อ 3 ระดับคือ ระดับที่ 1 ใช้น้ำมะพร้าวอ่อนบริสุทธิ์ร้อยละ 100 ระดับที่ 2 น้ำมะพร้าวอ่อนร้อยละ 1 และระดับที่ 3 น้ำมะพร้าวอ่อนร้อยละ 5 ในการทดลองนี้ไม่มีความแตกต่างในเรื่องการตายของสเปอร์ม พบว่าประสิทธิภาพในการผสมติดสูงในสารละลายเจือจางระดับที่ 1 ประมาณร้อยละ 50 รองลงมาคือ ระดับที่ 2 ประมาณร้อยละ 44.4 และระดับที่ 3 ประมาณร้อยละ 31.6 ตามลำดับ โดยจะเก็บน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาฟาเรนไฮต์ เป็นเวลาประมาณ 8 วันเป็นอย่างสูง และใช้เวลาเก็บเพียง 2 - 3 วัน เพื่อให้น้ำเชื้อมีประสิทธิภาพตามผลการทดลองข้างต้น (Clamohoy และคณะ, 1962)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.3.3 ใช้ในงานวิจัยทางชีววิทยา พบว่าน้ำมะพร้าวสามารถเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* ซึ่งเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตบนผิวของสารที่ใช้เพาะเชื้อ แต่เมื่อใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในอาหารมาตรฐาน (standard culture media) โดยทำการเจือจางประมาณ 10,000 เท่าจะลดเวลาในการเจริญเติบโตเต็มที่ของเชื้อลงเหลือเพียง 12 วัน ซึ่งตามปรกติแล้วจะใช้เวลาประมาณ 20 วันในการที่จะให้เชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ในอาหารมาตรฐาน ถ้าใช้น้ำมะพร้าวเพียงอย่างเดียวจะไม่ได้ผลแต่เมื่อใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในอาหารมาตรฐาน ทำให้ส่งเสริมในการเจริญเติบโตของเชื้อนี้เนื่องจากมีสารพวกพอลิแซ็กคาไรด์ (Anonymous, 1957)

2.8.3.4 ใช้น้ำมะพร้าวฉีดเข้าเส้นเลือดดำเพื่อเป็นการให้อาหารคนไข้ ซึ่งการทดลองนี้ได้กระทำที่โรงพยาบาลเซ็นต์หลุยส์ (กรุงเทพมหานคร) แสดงถึงความเป็นไปได้ในการที่จะใช้น้ำมะพร้าวฉีดเข้าเส้นเลือดดำให้แก่คนไข้ 21 คน พบว่าไม่เกิดปฏิกิริยารุนแรงแต่อย่างใด (สมชาย ประภาวัต, 2532)

2.8.3.5 ใช้น้ำมะพร้าวในผู้ป่วยที่อยู่ท้องถิ่นทุรกันดารที่ห่างไกลหรือในกรณีฉุกเฉินทางทหาร เมื่อการขนส่งน้ำตาลและน้ำเกลือที่ใช้สำหรับฉีดเข้าเส้นเลือดหยุดชะงักไปเพราะมีอุปสรรคเกิดขึ้นสามารถใช้น้ำมะพร้าวแทนได้เพราะในน้ำมะพร้าวมีโพแทสเซียมคลอไรด์ ฟอสเฟต น้ำตาล แมกนีเซียม แคลเซียม และโปรตีนในน้ำมะพร้าวตามธรรมชาติ (สมชาย ประภาวัต, 2532)

2.8.4 ใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ

อโณทัย คมเศวต (2519) ได้ทำการศึกษาการเจริญของยีสต์อาหารสัตว์โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ ซึ่งทดลองเลี้ยงยีสต์ 3 ชนิดคือ *Saccharomyces cerevisiae* , *Candida utilis* และ *Candida tropicalis* ในอาหารที่มีน้ำมะพร้าวแก่เป็นส่วนประกอบ พบว่ายีสต์ทั้ง 3 ชนิดสามารถเจริญได้ดีในน้ำมะพร้าวซึ่งไม่ได้เติมสารใดๆได้ดีเท่ากับอาหารเหลว Malt - Yeast extract ซึ่งอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย มอลท์สกัด (malt extract) 3.0 กรัม ยีสต์สกัด 0.1 กรัม เปปโทน 5.0 กรัม และกลูโคส 10 กรัม นอกจากนั้นพบว่าเจริญดีกว่าเมื่อเติมเปปโทน ยีสต์สกัด และแอมโมเนียมซัลเฟต จากการทดลองสภาวะที่เหมาะสมคือการเจริญของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Candida utilis ในน้ำมะพร้าวที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 12.02 กรัมต่อลิตร โปรตีนร้อยละ 49.03 ของน้ำหนักแห้ง คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 28.88 ของน้ำหนักแห้ง และกรดนิวคลีอิกร้อยละ 8.07 ของน้ำหนักแห้ง

สายชล ชิวปรีชา (2520) ได้ทำการศึกษาใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก 11 สายพันธุ์และเชื้อที่แยกได้จากอาหารชนิดต่างๆที่ยังไม่ได้จำแนกสายพันธุ์อีก 13 เชื้อ พบว่าในอาหารน้ำมะพร้าวที่มีเปปโทนร้อยละ 1 ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5 โซเดียมแอซีเตตร้อยละ 0.5 แอมโมเนียมซีเตตร้อยละ 0.2 และทวีน 80 ร้อยละ 0.1 ให้อัตราการเจริญพอๆกับเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS (DeMan, Rogosa, Sharpe Agar) ซึ่งอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย กลูโคส 20 กรัม เปปโทน 10 กรัม เนื้อสกัด (beef extract) 8 กรัม ไตรแอมโมเนียมซีเตต (Triammonium citrate) 2 กรัม โซเดียมแอซีเตต 5 กรัม ยีสต์สกัด 4 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัม แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัม และซอร์บิแทน (sorbitan) 1 กรัม นอกจากนี้ยังใช้อาหารน้ำมะพร้าวสูตรเดียวกันนี้ตรวจนับแบคทีเรียที่สร้างกรดจากอาหารประเภทต่างๆและสามารถเก็บเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกบางชนิดในลักษณะเชื้อสดซึ่งให้ผลเป็นอย่างดี

วิเชียร กิจปรีชาวนิช (2521) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ *Bacillus megaterium* ATCC 13639 ในน้ำมะพร้าว โดยศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 จากนั้นทำการเลี้ยงในถังหมักใช้อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 16.55 กรัมต่อลิตร และปริมาณวิตามินบี 12 237.5 มิลลิลิตรต่อลิตร

สมศรี ลิปิพัฒนวิทย์ (2531) ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับทำวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าวแก่ โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* TISTR 86 พบว่าการทำวุ้นสวรรค์ในอาหารที่ประกอบด้วย น้ำตาลทราย 50 กรัมต่อลิตร เอทิลแอลกอฮอล์ 60 มิลลิลิตร แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.3 กรัมต่อลิตร และน้ำมะพร้าวแก่ 1 ลิตร ทำการหมักเป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าได้แผ่นวุ้นหนา 2.5 เซ็นติเมตร จากนั้นทำการเปรียบเทียบการฟอกสีโดยใช้สารละลาย 3 ชนิดคือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 2 และโซเดียม-ไทโอซัลเฟตร้อยละ 0.5 พบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 2 จะได้แผ่นวุ้นที่มีสีขาวเนื้อสัมผัสนุ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัชรีศิริชาติ ช่วยเกลี้ยง และศราวดี อยู่แสง (2532) ได้ศึกษาการผลิตเซลล์ยีสต์ขนมปังจากอาหารน้ำมะพร้าว โดยใช้ยีสต์สกุล *Saccharomyces cerevisiae* หาสูตรอาหารที่เหมาะสม ประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.2 ไดโพแทสเซียมฟอสเฟตร้อยละ 0.5 แมกนีเซียม-ซัลเฟตร้อยละ 0.05 และซูโครสร้อยละ 10 พบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดคือ 7.375 กรัมต่อลิตร

มยุรี พิชญวรกุล และคณะ (2536) ศึกษาการผลิตเห็ดวุ้นมะพร้าวในเชิงพาณิชย์จากเชื้อ *Acetobacter xylinum* ในน้ำมะพร้าวแก่ โดยศึกษาสภาวะต่างๆและสูตรอาหารที่เหมาะสม จากการใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตร ยีสต์สกัด 0.05 กรัม เพื่อเป็นหัวเชื้อ จากนั้นนำหัวเชื้อปริมาณร้อยละ 10 ใส่ลงในอาหารที่ประกอบด้วยแอมโมเนียม-ซัลเฟต 9.0 กรัม น้ำตาลทราย 60 กรัม น้ำส้มสายชู 300 มิลลิลิตร และน้ำมะพร้าว 1 ลิตร นำไปหมักในถาดเป็นเวลา 14 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าได้แผ่นวุ้นหนา 1.5 - 2.5 เซ็นติเมตร จากนั้นนำไปฟอกสีด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ร้อยละ 2 เป็นเวลา 15 นาที จะได้แผ่นวุ้นที่มีลักษณะสีขาวและใส เมื่อทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาคือ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิก ได้รับความอนุเคราะห์จาก Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois , ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงมาจากสูตรของ Kwak และ Rhee (1992) โดยอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

ยีสต์สกัด (yeast extract)	0.50	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	1.00	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.25	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.25	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.25	กรัม
น้ำตาลซูโครส	50.00	กรัม
น้ำมะพร้าว	1000.00	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชเท่ากับ 6.0		

3.1.3 สารเคมี

- กรดโคจิก (kojic acid) ของ Sigma

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ซูโครส (sucose) ของ Merck
- ซูโครส (น้ำตาลทราย) ของ บริษัทน้ำตาลมิตรผล จำกัด
- ทวีน 80 (tween 80) ของ Fluka
- ยีสต์สกัด (yeast extract) ของ Difco
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของ Merck
- ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของ J.B. Baker
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของ Merck
- แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ของ Merck
- แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) ของ Fluka
- โพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) ของ Merck
- โซเดียมไนเทรต ($NaNO_3$) ของ Merck
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของ Merck
- สารเคมีที่ใช้ในการแยกกรดโคจิก
- สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิก
- สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด
- สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์อะฟลาทอกซิน

3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องเขย่า (Gallenkamp รุ่น SGM 300)
- เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (ULTRAVIOLET spectrophotometor รุ่น UNICAM 8620)
- ถังหมัก (LH - Fermentor มีเครื่องเติมกวน รุ่น 502D และเครื่องเติมอากาศ รุ่น 504) ปริมาตร 2 ลิตร
- เครื่องชั่งละเอียด (sartorius รุ่น 2842)
- เครื่องชั่งหยาบ (sartorius รุ่น B-3100S)
- เครื่องวัดพีเอช (TOA pH meter รุ่น HM - 7E)
- เครื่องELISA ของ BIO-TEK ประกอบด้วย Micro ELISA Reader รุ่น EL 311
- เครื่องระเหยแบบลดความดัน (BUCHI รุ่น B 461 ใช้ปั๊มน้ำของ EYELA รุ่น A-35)
- หม้อนึ่งความดัน (HIRAYAMA MANUFACTURING CORPORATION รุ่น HA - 3D)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ตู้เขี่ยเชื้อ (FASTER รุ่น Bio 48)
- ตู้อบ (WTB binder รุ่น FD53)
- กล้องจุลทรรศน์ (Nikon รุ่น YS2 - H)
- ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)
- ชุดกรอง (millipore bedford รุ่น MA 01730)
- เครื่องผสมหลอดทดลอง (VORTEX GENIE 2 รุ่น G -560E)
- เดซิกเคเตอร์ (desiccator)
- กระดาษวัทแมนเบอร์ 1(whatman filter paper no. 1)
- ฟลาสก์หลุม (baffled flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ของPYREX
- ตู้เย็นเก็บสารเคมี
- เครื่องแก้วต่างๆ ของ PYREX
- ไมโครปิเปตต์ : ขนาด 5-40 ไมโครลิตร (Labsystems รุ่น A 76326), ขนาด 40-200 ไมโครลิตร (Labsystems รุ่น C 69006), ขนาด 200-1000 (Nichiryo รุ่น 5000) และขนาด 1-5 มิลลิลิตร (Labsystems รุ่น A 85810)

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การเตรียมกล้าสปอร์ของเชื้อ

เขี่ยเชื้อราอายุ 7 วันลงใน PDA (ดังแสดงในภาคผนวก ก.) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อสร้างสปอร์ ทำสารละลายของสปอร์โดยเติมน้ำกลั่นที่มีร้อยละ 0.05 ทวีน 80 (1 หยด ต่อ 100 มิลลิลิตร) ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 40 มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ใช้เข็มเขี่ยสปอร์ให้หลุดจากเส้นใย นำไปกรองเส้นใยออกโดยผ่านสำลีที่วางบนกรวยแก้วผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำสารละลายสปอร์มาตรวจนับจำนวนโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ ปรับปริมาตรสปอร์ให้อยู่ระหว่าง 1-3 x10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะใช้เป็นกล้าสปอร์ในการศึกษาต่อไป

3.2.2 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.1 ศึกษาปริมาณน้ำมะพร้าวที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงจากสูตรของKwak และRhee(1992) ที่มีน้ำมะพร้าวปริมาตรดังนี้คือ ร้อยละ 0, 50, 75 และ 100 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมะพร้าวแต่ละความเข้มข้นใส่ลงในฟลาสก์หลุมขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 65 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นเติมกล้าสปอร์จำนวน 2 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 วัน เพื่อวิเคราะห์หาค่าพีเอช, กรดโคจิก, น้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.2.2.2 ศึกษาปริมาณน้ำตาลซูโครส

นำสูตรอาหารที่ให้กรดโคจิกสูงสุดจากข้อ 3.2.2.1 มาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลซูโครสดังนี้คือ 50, 100, 150, 175 และ 200 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1 เพื่อหาปริมาณกรดโคจิกสูงสุด

3.2.2.3 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน

นำสูตรอาหารที่ให้กรดโคจิกสูงสุดจากข้อ 3.2.2.2 เติมแหล่งไนโตรเจนต่างๆดังนี้คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) โพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) และโซเดียมไนเทรต ($NaNO_3$) ชนิดละ 1.0 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1 เพื่อหาปริมาณกรดโคจิกสูงสุด

3.2.2.4 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

นำสูตรอาหารที่ให้กรดโคจิกสูงสุดจากข้อ 3.2.2.3 มาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนดังนี้คือ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1 เพื่อหาปริมาณกรดโคจิกสูงสุด

3.2.2.5 ศึกษาความเข้มข้นของยีสต์สกัด

นำสูตรอาหารที่ให้กรดโคจิกสูงสุดจากข้อ 3.2.2.4 มาศึกษาความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิก โดยใช้ความเข้มข้นต่างๆกันคือ 0, 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1 เพื่อหาปริมาณกรดโคจิกสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.6 ศึกษาความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

นำสูตรอาหารที่ให้กรดโคจิกสูงสุดจากข้อ 3.2.2.5 มาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ดังนี้คือ 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1 เพื่อหาปริมาณกรดโคจิกสูงสุด

3.2.2.7 ศึกษาความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)

นำสูตรอาหารที่ให้กรดโคจิกสูงสุดจากข้อ 3.2.2.6 มาศึกษาความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต ดังนี้ 0.25, 0.50, 0.70 และ 1.0 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1 เพื่อหาปริมาณกรดโคจิกสูงสุด

3.2.2.8 ศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช) ที่เหมาะสม

นำสูตรอาหารที่ให้กรดโคจิกสูงสุดจากข้อ 3.2.2.7 มาศึกษาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก ดังนี้คือ 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 ตามลำดับ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2.1 เพื่อหาปริมาณกรดโคจิกสูงสุด

3.2.3 การศึกษาการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่า

นำสูตรอาหารที่ผลิตกรดโคจิกสูงสุดจากการทดลองใน ข้อ 3.2.2 มาทำการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* โดยเติมกล้าเชื้อที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 1-3 x 10^8 สปอร์ต่อฟลาสก์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 20 วัน เพื่อวิเคราะห์หาค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำหนักเซลล์แห้ง และอะฟลาทอกซิน

3.2.4 การศึกษาการผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบช (batch fermentation)

3.2.4.1 การศึกษาหาความเร็วในการกวนที่เหมาะสม

นำสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผลิตกรดโคจิกสูงสุดจากการทดลองในข้อ 3.2.2 ปริมาตร 1 ลิตร ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใส่สารกำจัดฟองโดยใช้น้ำมันพืชตราองุ่น 1 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมกล้าเชื้อที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 1-3 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 15 มิลลิลิตรต่อลิตร นำมาศึกษาความเร็วใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การกวนระดับต่างๆ ดังนี้คือ 300, 500 และ 700 รอบต่อนาทีตามลำดับ โดยมีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม (วีวีเอ็ม(vvm) หมายถึง ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที) ทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 วันหลังจากวันที่ 10 เก็บผลทุกวัน เป็นเวลา 20 วัน เพื่อวิเคราะห์หาค่าพีเอช กรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำหนักเซลล์แห้ง และอะฟลาทอกซิน

3.2.4.2 การศึกษาหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

จากข้อ 3.4.2.1 ทราบความเร็วในการกวนที่ให้กรดโคจิกสูงสุด มาศึกษาอัตราการให้อากาศที่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 วีวีเอ็ม ตามลำดับ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4.1 เพื่อหาปริมาณกรดโคจิกสูงสุด

3.2.4.3 การศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโคจิกในถังหมัก

จากข้อ 3.2.4.2 ทราบความเร็วในการกวนและอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม มาศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโคจิก ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4.1 เพื่อหาปริมาณกรดโคจิกสูงสุด

3.2.5 การแยกกรดโคจิก

การแยกกรดโคจิกโดยการดัดแปลงจากวิธีของ Barnard และ Challenger (1949) ดังนี้คือ

3.2.5.1 นำน้ำหมักที่ผ่านการกรองมา 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร นำไประเหยภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส จนเหลือปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3.2.5.2 เติมกรดแอซีติก 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.2.5.3 เติมสารละลายคูพริกแอซีเตต (cupric acetate) เข้มข้น 0.2 โมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

3.2.5.4 นำไปกรองผ่านกระดาษวัทแมนเบอร์ 1 ที่วางบนกรวยแก้ว จากนั้นทำการล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง

3.2.5.5 นำตะกอนที่กรองได้มาเติมสารละลายไทโอแอเซทาไมด์ (thioacetamide) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5.6 กรองด้วยกระดาษวัทแมนเบอร์ 1 นำสารละลายที่ได้ใส่ขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการอบแห้งชั่งน้ำหนักแล้วนำไประเหยภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส

3.2.5.7 ละลายผลึกอีกครั้งด้วยสารละลายเมทานอลกับเอทิลแอซีเตตในอัตราส่วน 1 : 1 จำนวน 10 มิลลิลิตร

3.2.5.8 นำไประเหยภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนได้ผลึกของกรดโคจิก

3.2.5.9 นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิกเคเตอร์ จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.2.5.10 คำนวณผลิตผลที่ได้หลังจากการสกัดคิดเป็นร้อยละ (percentage recovery yield)

จากสูตรดังนี้คือ ผลิตผลที่ได้หลังจากการสกัด $= \frac{B}{A} \times 100$

A คือ ปริมาณกรดโคจิกก่อนการแยก (กรัมต่อลิตร)

B คือ ผลึกของกรดโคจิกที่แยกได้ (กรัมต่อลิตร)

3.2.6 การวิเคราะห์ (ดังแสดงในภาคผนวก ข.)

3.2.6.1 การวิเคราะห์ค่าพีเอช

3.2.6.2 การวิเคราะห์กรดโคจิก

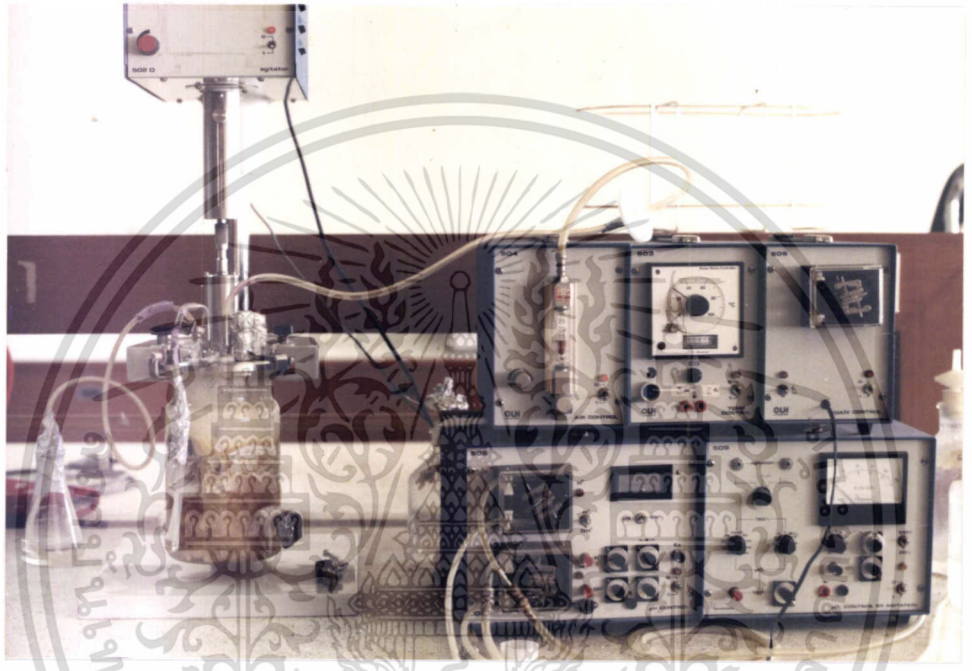
3.2.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

3.2.6.4 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.2.6.5 การวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 6



การผลิตกรดโคจิกในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบแบช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

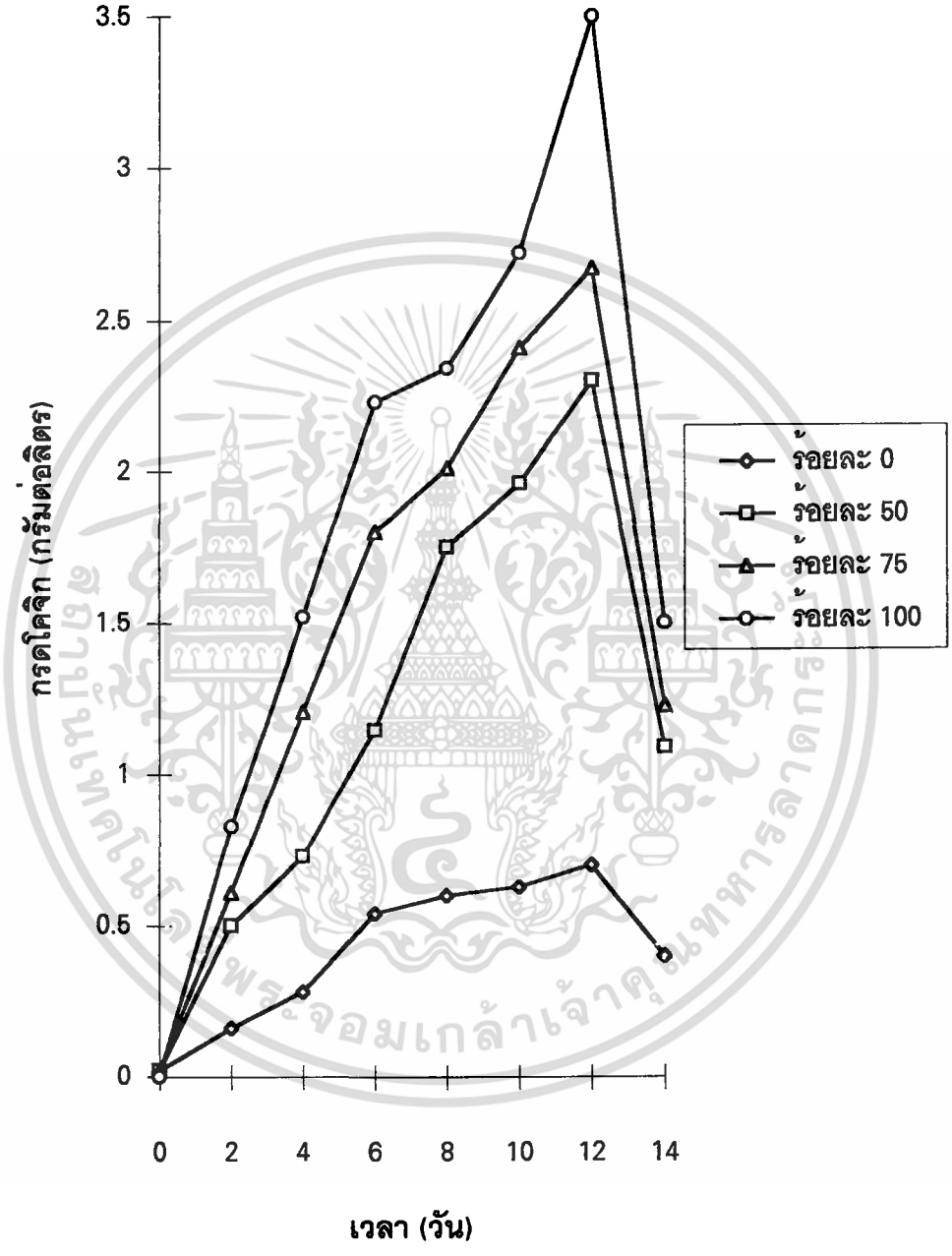
4.1.1 ปริมาณน้ำมะพร้าวที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

การศึกษาครั้งนี้ใช้สูตรอาหารดังแสดงในภาคผนวก ก. จากการดัดแปลงสูตรอาหารของ Kwak และRhee (1992) และเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอนโดยใช้น้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทราย) 50 กรัม แทนน้ำตาลกลูโคส 100 กรัม และใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้น้ำมะพร้าวปริมาตรแตกต่างกันในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ ร้อยละ 0, 50, 75 และ 100 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำมะพร้าวร้อยละ 100 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 3.5 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12 และใช้น้ำกลั่นแทนน้ำมะพร้าว ให้ปริมาณกรดโคจิกน้อยสุดคือ 0.7 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 7 ให้ผลการผลิตกรดโคจิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในตารางที่ 7

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าอาหารที่เติมน้ำมะพร้าวให้กรดโคจิกสูงกว่าอาจเนื่องมาจากน้ำมะพร้าวที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมีธาตุอาหารพวกโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต วิตามินซี วิตามินบีรวม แร่ธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียม และเหล็ก (อัจฉรา มีวาสนา, 2510) นอกจากนี้ในน้ำมะพร้าวยังพบสารเร่งการเจริญเติบโตและฮอร์โมน เช่น อินโดลแอซีติกแอซิด (indoleacetic acid : IAA) ไคนิติน (kinetin) และไซโตไคนิน (cytokinin) โดยเฉพาะไซโตไคนินเป็นสารกระตุ้นการแบ่งเซลล์และการขยายขนาดของเซลล์ (Van Overbeek และคณะ, 1941) มีรายงานว่าได้มีการใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการทดลองเลี้ยงยีสต์ที่ใช้เป็นอาหารสัตว์และการผลิตยีสต์ขนมปัง (อโณทัย คมเศวต, 2519 และ วัชรีศิริชาติ ช่วยเกลี้ยงและศราวดี อยู่แสง, 2532) ต่อมามีการผลิตเห็ดวุ้นมะพร้าวจากเชื้อ *Acetobacter xylinum* ในอาหารที่มีน้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบ (มยุรี พิชญวรกุล, 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 7



การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีปริมาณน้ำมะพร้าวความเข้มข้นระดับต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำมะพร้าวมีคุณค่าทางอาหารเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา ดังนั้นจึงเป็นทางเลือกใหม่ในการผลิตกรดโคจิกเนื่องจากเป็นแหล่งวัตถุที่เหลือใช้ทางการเกษตรที่หาง่าย และราคาถูก

ตารางที่ 7

แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีปริมาณน้ำมะพร้าวความเข้มข้นระดับต่างกัน

น้ำมะพร้าว (ร้อยละ)	0	50	75	100
ค่าเฉลี่ยสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	0.70[d]	2.30[c]	2.67[b]	3.50[a]

หมายเหตุ - ใช้ DMRT (Duncan' s Multiple Range Test) ตรวจสอบกรดโคจิกเฉลี่ยในอาหารที่มีปริมาณน้ำมะพร้าวความเข้มข้นต่างกัน

- ค่าเฉลี่ยของกรดโคจิกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.1.2 ปริมาณของน้ำตาลซูโครสต่อการผลิตกรดโคจิก

ผลการศึกษาใช้น้ำตาลซูโครส 50, 100, 150, 175 และ 200 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมน้ำตาลซูโครส 175 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดคือ 34 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 รองลงมาคือ ซูโครส 200 กรัมต่อลิตร ให้กรดโคจิก 33.64 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 8 ให้ผลการผลิตกรดโคจิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 8 ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Bajpai และคณะ (1982) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากอาหาร YES ที่มีซูโครสร้อยละ 20 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเลี้ยงสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus flavus* ให้กรดโคจิก 81.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 10 จากนั้นมีการนำเส้นใยของเชื้อ *Aspergillus flavus* ที่ผ่านการเลี้ยงครั้งแรกมาเลี้ยงใหม่ในอาหาร 4 สูตร โดยแต่ละสูตรใช้น้ำตาลซูโครสและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับไม่ได้เติมน้ำตาล พบว่าอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสและกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 20 ให้ผลผลิตกรดโคจิกอยู่ระหว่าง 70 - 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และอาหารที่ไม่ได้เติมน้ำตาลไม่พบกรดโคจิกเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก ต่อมา Wei และคณะ (1991) ทำการศึกษาโดยใช้เชื้อ *Aspergillus candidus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ATCC 44054 ในอาหารชนิดต่างๆ พบว่าอาหาร YES ที่มีซูโครส 200 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงกว่าอาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek - Dox liquid medium ที่มีกลูโคส 100 กรัม และอาหารของ Tadera ที่มีกลูโคส 50 กรัม ให้ปริมาณกรดโคจิก 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ Rapee และ Kannika (1996) ได้ทำการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* K-13 จากการดัดแปลงสูตรอาหาร YES พบว่าอาหาร YES II ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัดเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 29.39 กรัมต่อลิตร Kwak และ Rhee (1992) ได้เคยรายงานว่าเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 ให้ผลผลิตกรดโคจิกเพียง 25 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษาใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดโคจิก พบว่าซูโครสและกลูโคสแตกต่างกันที่กลูโคสเป็นโมโนแซ็กคาไรด์ส่วนซูโครสเป็นไดแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วยโมโนแซ็กคาไรด์ 2 โมเลกุลเชื่อมต่อกันคือ แอลฟา-ดี-กลูโคส เชื่อมต่อกับ บีต้า-ดี-ฟรักโทส โดยพันธะระหว่างกลูโคสและฟรักโทสอยู่ในรูปไกลโคไซด์ ถ้าทำการย่อยสลายซูโครสด้วยกรดหรือเอนไซม์ทำให้ได้น้ำตาลแปร (invert sugar) จำนวนโมลาร์เท่ากัน

ตารางที่ 8

แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นระดับต่างกัน

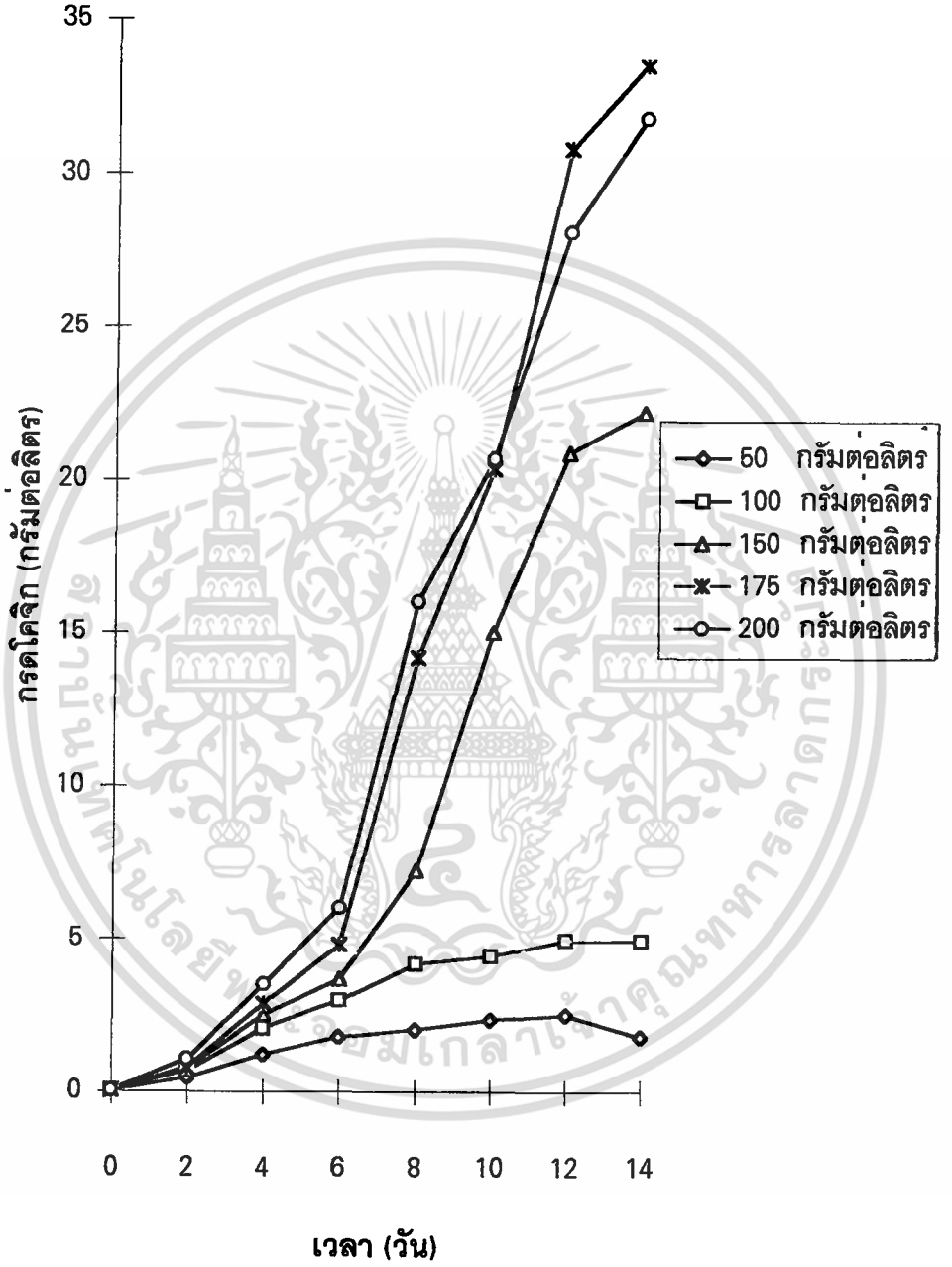
น้ำตาลซูโครส(กรัมต่อลิตร)	50	100	150	175	200
ค่าเฉลี่ยสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	1.80[e]	4.94[d]	22.70[c]	34.09[a]	33.64[b]

หมายเหตุ - ใช้ DMRT (Duncan' s Multiple Range Test) ตรวจสอบกรดโคจิกเฉลี่ยในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างกัน

- ค่าเฉลี่ยของกรดโคจิกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 8



การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นระดับต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

ผลการศึกษาใช้แหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดคือ แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 33 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ให้กรดโคจิก 31 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ให้กรดโคจิก 30 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเทรต ($NaNO_3$) ให้กรดโคจิก 28 กรัมต่อลิตร และ โพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) ให้กรดโคจิก 19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ให้ผลดังแสดงในภาพที่ 9 ให้ผลการผลิตกรดโคจิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในตารางที่ 9 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ May และคณะ (1931) ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ต่างกันคือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) แอมโมเนียมไนเทรต และโซเดียมไนเทรต อย่างละ 2 ความเข้มข้นคือ 0.7 กรัมต่อลิตร และ 1.75 กรัมต่อลิตร โดยเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ในอาหารที่มีน้ำตาลเดกซ์โทรส์ร้อยละ 15 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเทรต 0.7 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.75 กรัมต่อลิตร ให้กรดโคจิกสูงสุด ปริมาณเท่ากันคือ ร้อยละ 18.6

ตารางที่ 9

แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน

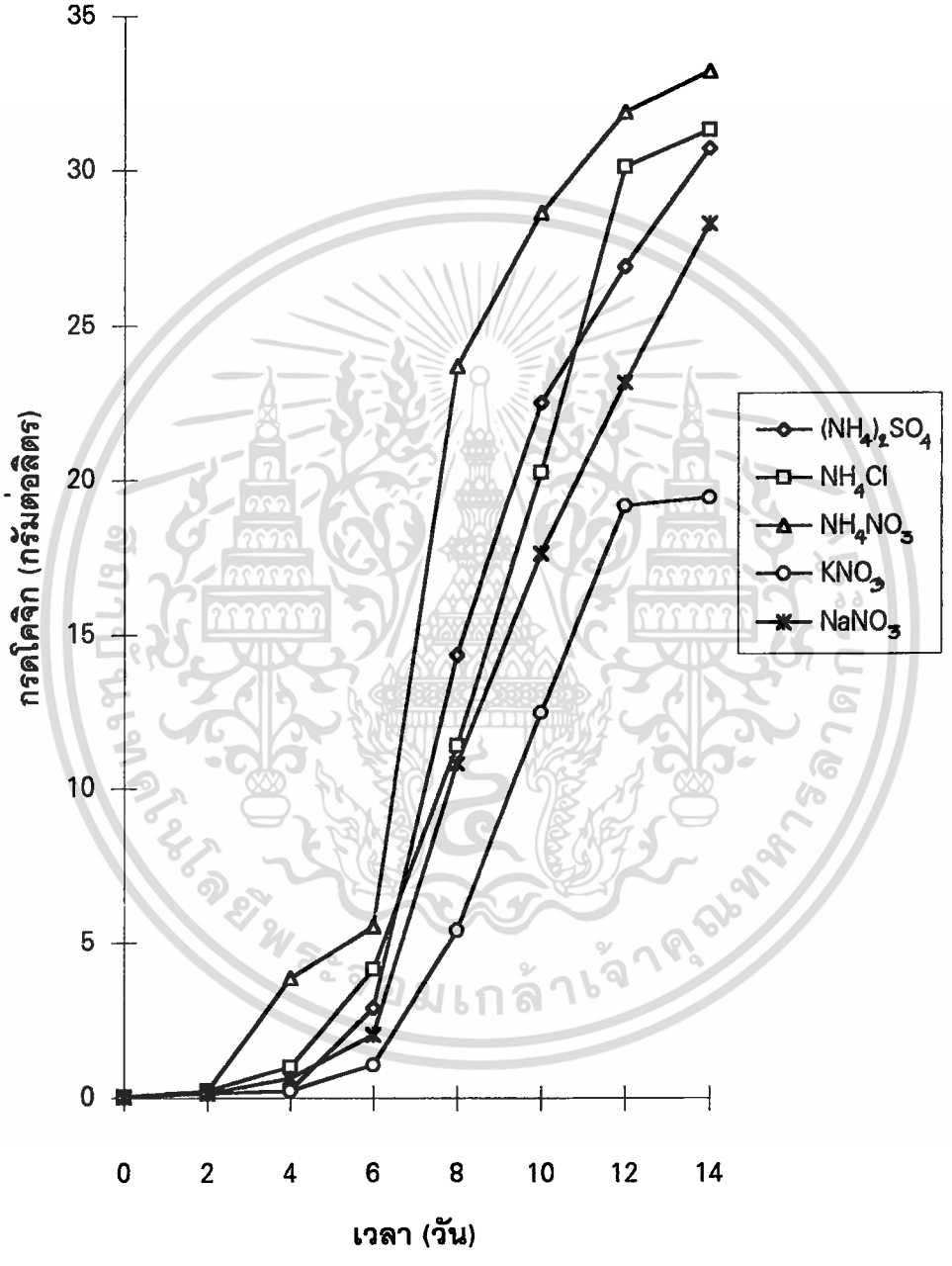
แหล่งไนโตรเจน	$(NH_4)_2SO_4$	NH_4Cl	NH_4NO_3	KNO_3	$NaNO_3$
ค่าเฉลี่ยสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	30.70^{c}	31.30^{b}	33.20^{a}	19.42^{e}	28.25^{d}

หมายเหตุ - ใช้ DMRT ตรวจสอบกรดโคจิกเฉลี่ยในอาหารที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน

- ค่าเฉลี่ยของกรดโคจิกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 9



การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

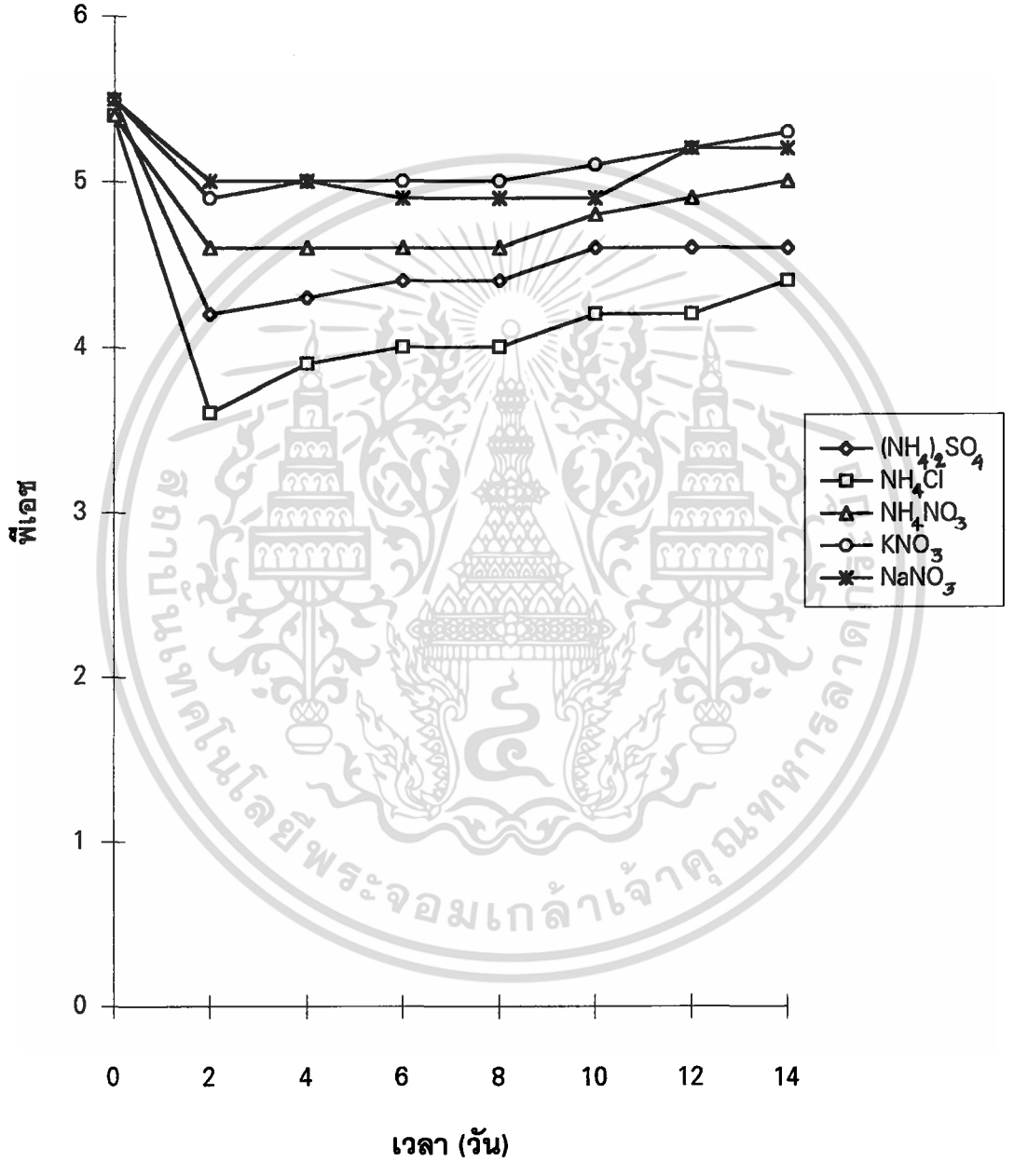
ต่อมา Wei และคณะ (1991) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus candidus* ATCC 44054 ในอาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek - Dox liquid medium ซึ่งมีแอมโมเนียมไนเทรตร้อยละ 0.2 (2 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ปริมาณกรดโคจิก 39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 15 และจากการศึกษาการตรึงเส้นใยของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต-เจลทำการเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.275 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิก 23 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ต่อมามีการพัฒนาการตรึงเส้นใยเชื้อราเป็นการตรึงสปอร์ด้วยแคลเซียม-อัลจิเนตเจลและดัดแปลงสูตรอาหารโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.75 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้กรดโคจิกสูงสุด 80 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 22 และเมื่อเลี้ยงเซลล์อิสระให้กรดโคจิกสูงสุด 25 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 (Kwak และRhee, 1992)

แหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ใช้อยู่ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) หรือสารประกอบอินทรีย์ (organic nitrogen) ซึ่งสารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียเกลือแอมโมเนียมและเกลือไนเทรต สำหรับเกลือแอมโมเนียม เช่น แอมโมเนียมซัลเฟตทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดสภาวะเป็นกรดมากขึ้นเนื่องจากแอมโมเนียม (NH_4^+) ถูกใช้ไปทำให้เกิดซัลเฟต (SO_4^{-2}) ขึ้น ในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้แอมโมเนียและไนเทรตเมื่อเกิดการย่อยสลายทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเกิดสภาวะเป็นด่างทำให้พีเอชสูงขึ้น (Stanbury และคณะ, 1995) จากการทดลองเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมไนเทรต ในช่วงแรกที่มีการใช้แอมโมเนียมจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาวะเป็นกรดมากขึ้น โดยพีเอชจะลดลงจากพีเอช 5.5 เป็นพีเอชประมาณ 4 ส่วนอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเทรตเป็นแหล่งไนโตรเจนหลังจากนั้นมีการใช้ไนเทรตจึงทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชสูงขึ้นในเวลาต่อมา (พีเอชเท่ากับ 5) ดังแสดงในภาพที่ 10

การที่เกลือแอมโมเนียมไนเทรตในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงกว่าเกลืออื่นๆ อาจเนื่องจากเกลือนี้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีของเชื้อ ดังนั้นจึงเลือกใช้แอมโมเนียมไนเทรตสำหรับการศึกษาครั้งต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 10



ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก จากการใช้แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) ความเข้มข้นต่างๆ 4 ระดับคือ 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเทรตที่เหมาะสมคือ 2 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 34 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ 1.0 กรัมต่อลิตร ให้กรดโคจิก 31 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 11 ให้ผลการผลิตกรดโคจิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 10 การทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ May และคณะ (1931) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด พบว่า แอมโมเนียมไนเทรต 0.563 - 0.750 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดประมาณร้อยละ 29.8 - 30.2 หลังจากนั้นมีการเสริมแร่ธาตุและเพิ่มความเข้มข้นของเดกซ์โทรสเป็นร้อยละ 20 และใช้แอมโมเนียมไนเทรตเข้มข้น 3 ระดับคือ 0.28, 0.75 และ 2.25 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเทรต 2.25 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดร้อยละ 44.7 เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 10

แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเทรตความเข้มข้นระดับต่างกัน

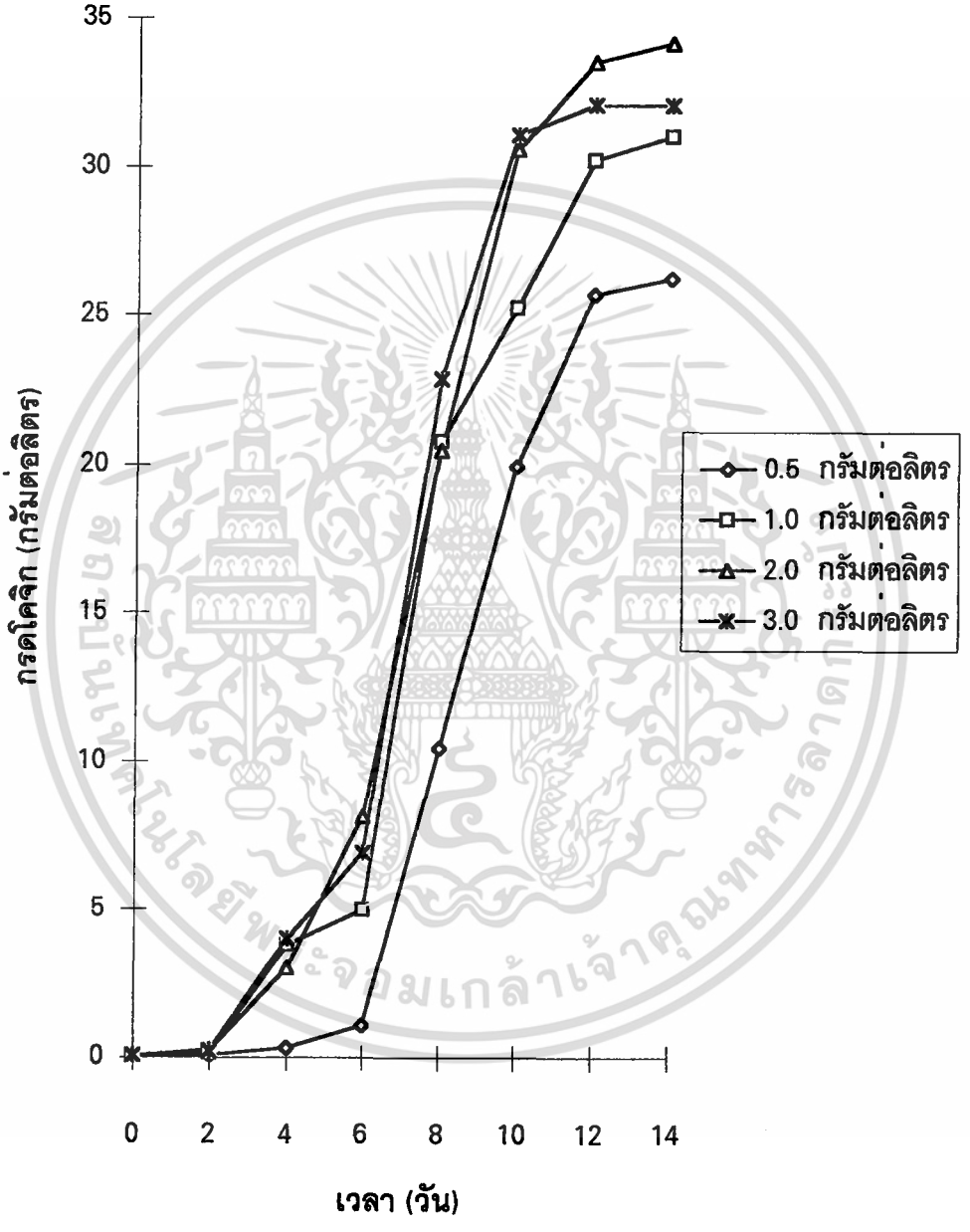
แอมโมเนียมไนเทรต (กรัมต่อลิตร)	0.5	1.0	2.0	3.0
ค่าเฉลี่ยสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	26.23[d]	31.05[c]	34.20[a]	32.10[b]

หมายเหตุ - ใช้ DMRT ตรวจสอบกรดโคจิกเฉลี่ยในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเทรตความเข้มข้นระดับต่างกัน

- ค่าเฉลี่ยของกรดโคจิกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 11



การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเทรตความเข้มข้นระดับต่างกันโดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.5 ความเข้มข้นของยีสต์สกัด

ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของยีสต์สกัดที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ เมื่อใช้ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดคือ 34.6 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ยีสต์สกัด 2.0 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิก 33 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 12 ให้ผลการผลิตกรดโคจิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 11 ซึ่งสอดคล้องกับ Kwak และRhee (1992) ที่พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 จากการตรึงเส้นใยด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเจลโดยใช้ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร เป็นส่วนประกอบในอาหาร ให้กรดโคจิกสูงสุด 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน ต่อมาได้มีการศึกษาการตรึงสปอร์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเจลโดยใช้ยีสต์สกัด 0.5 กรัมต่อลิตร เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้กรดโคจิกสูงสุด 80 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 22 และเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์อิสระ ให้กรดโคจิกสูงสุด 25 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 ต่อมา Ogawa และคณะ (1995) ทำการศึกษายีสต์สกัดที่ความเข้มข้นต่างๆกัน คือ ร้อยละ 0.05, 0.10, 0.25, 0.5 และ1.0 โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 บนเครื่องเขย่าเปรียบเทียบกับเลี้ยงบนเมมเบรนแบบแบช (batch MSLC) พบว่าเมื่อเลี้ยงบนเครื่องเขย่าโดยใช้ยีสต์สกัดร้อยละ 0.25 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดคือ 20.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 9 และเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อบนเมมเบรนแบบแบชโดยใช้ยีสต์สกัดร้อยละ 0.25 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดคือ 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 10 ซึ่งผลการทดลองคล้ายกับที่ Bajpai และคณะ (1982) ได้เคยรายงานว่าเชื้อ *Aspergillus flavus* ที่เลี้ยงในอาหาร YES ที่มียีสต์สกัดร้อยละ 2 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 81.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 10 ต่อมา Wei และคณะ (1991) ทำการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus candidus* ATCC 44054 ในอาหาร 3 สูตรคือ อาหาร YES มียีสต์สกัดเข้มข้นร้อยละ 2 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 12 รองลงมาคืออาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek - Dox liquid medium ซึ่งมียีสต์สกัดร้อยละ 0.1 เป็นส่วนประกอบในอาหาร ให้กรดโคจิก 39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 15 ในขณะที่อาหารของ Tadera ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์คือ เปปโทนร้อยละ 0.6 ให้ปริมาณกรดโคจิกต่ำสุดคือ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 9 จะเห็นได้ว่ายีสต์สกัดที่เติมลงในอาหารเพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราสำหรับการผลิตกรดโคจิกมีผลให้การสร้างกรดโคจิกสูงขึ้นและความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในระหว่างที่ร้อยละ 0.1 - 0.25 อาจเป็นเพราะยีสต์สกัดเป็นแหล่งที่มีวิตามินและเกลือแร่ที่เหมาะต่อการเร่งการเจริญและการผลิตกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนมักอยู่ในรูปของกรดอะมิโน โปรตีนและยูเรีย เชื้อส่วนมากเมื่อใช้อินทรีย์ไนโตรเจนจะเจริญเร็วกว่าเมื่อใช้อนินทรีย์ไนโตรเจน ส่วนการใช้กรดอะมิโนเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมักอยู่ในรูปสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งมีสารประกอบไนโตรเจนหลายชนิดรวมกันและเป็นสารที่มีราคาถูก แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักได้แก่ เคซีน (casein) และยีสต์สกัด นอกจากนั้นยังได้จากผลผลิตการเกษตรและของเหลือใช้จากการเกษตรที่ราคาถูก เช่น ถั่วเหลือง กากถั่วเหลืองและกากถั่วลิสง การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อว่าสามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดไหนได้ดี เชื้อราจะใช้เกลือแอมโมเนียมได้ดีกว่ากรดอะมิโนแต่แบคทีเรียจะใช้กรดอะมิโนได้ดีกว่าเกลือแอมโมเนียม ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนหลายชนิดเชื้อจะใช้แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ง่ายที่สุดก่อนเมื่อสารนั้นหมดแล้วจึงจะใช้สารประกอบตัวอื่นต่อไป (Stanbury และคณะ, 1995)

ตารางที่ 11

แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มียีสต์สกัดความเข้มข้นระดับต่างกัน

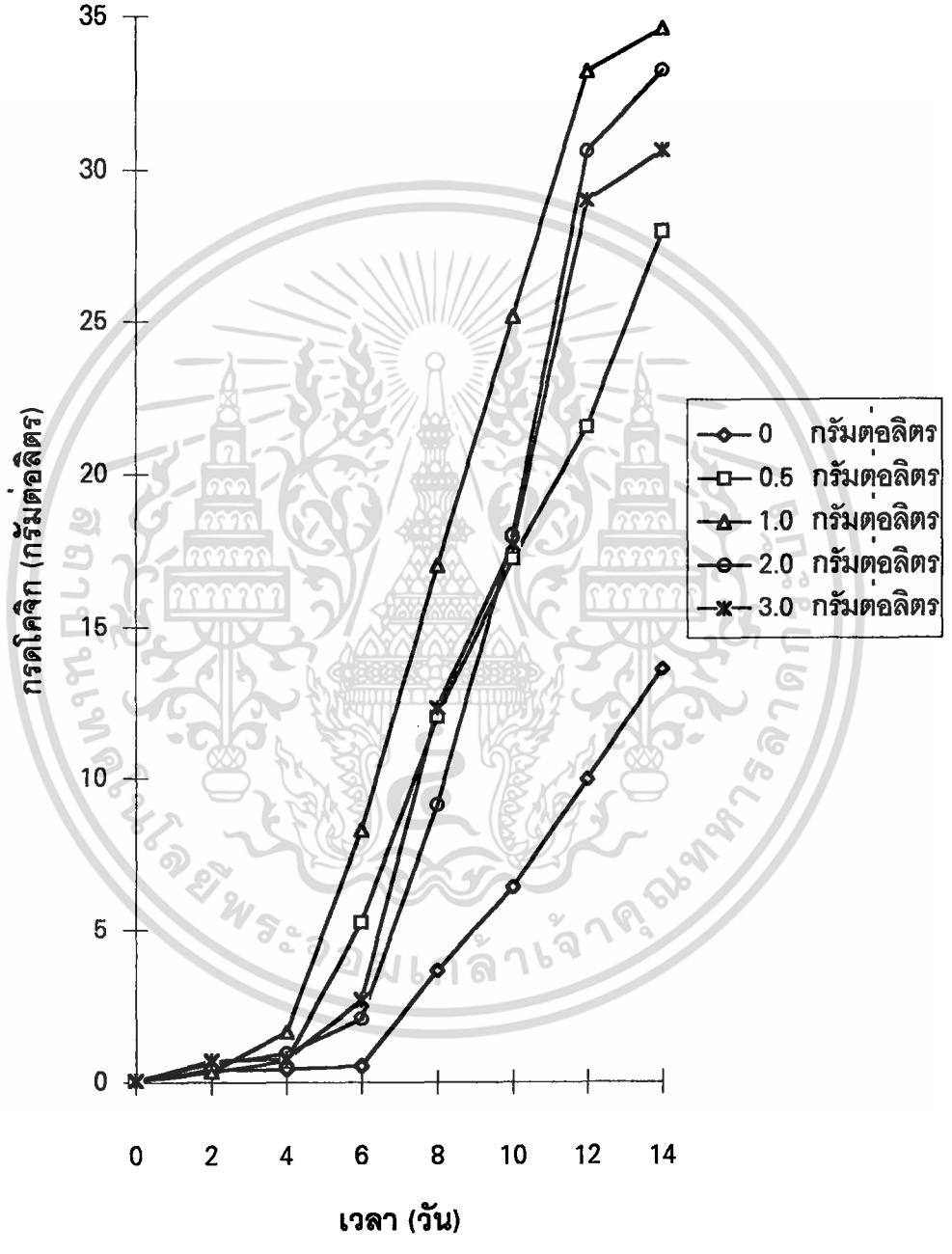
ยีสต์สกัด (กรัมต่อลิตร)	0	0.5	1.0	2.0	3.0
ค่าเฉลี่ยสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	13.58[e]	27.95[d]	34.60[a]	33.22[b]	30.62[c]

หมายเหตุ - ใช้ DMRT ตรวจสอบกรดโคจิกเฉลี่ยในอาหารที่มียีสต์สกัดความเข้มข้นระดับต่างกัน

- ค่าเฉลี่ยของกรดโคจิกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 12



การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มียีสต์สกัดความเข้มข้นระดับต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.6 ความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

ผลการศึกษาความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 4 ระดับคือ 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหารที่เติมไดโพแทสเซียมเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 33 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ความเข้มข้น 2.0 กรัมต่อลิตร ให้กรดโคจิก 31.8 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 13 ให้ผลการผลิตกรดโคจิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 12 Kwak และRhee (1992) รายงานว่ามีการเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อและมีการเติมแร่ธาตุพวก กรดไฮโดรคลอริก แมงกานีสซัลเฟต เฟอรัสซัลเฟต และซิงก์ซัลเฟต จากการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ที่ตรึงเส้นใยพบว่าให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ต่อมามีการเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีการเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 18 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ในขณะที่ Ogawa และคณะ (1995) พบว่าในอาหารเลี้ยงที่มีไดโพแทสเซียมเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร และเติมแร่ธาตุพวกโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.5 กรัมต่อลิตร และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) 0.01 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 20 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 12

ตารางที่ 12

แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้นระดับต่างกัน

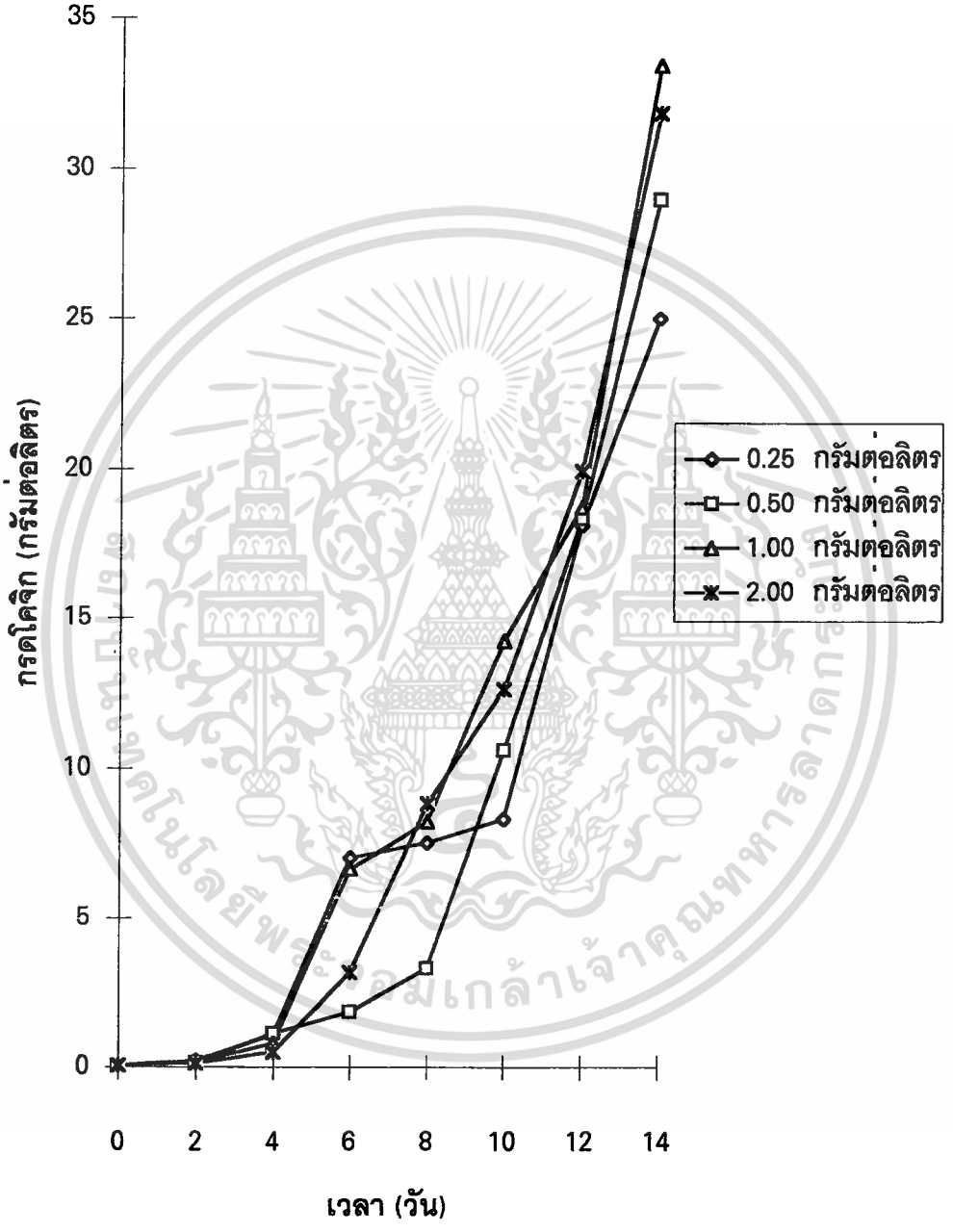
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรัมต่อลิตร)	0.25	0.5	1.0	2.0
ค่าเฉลี่ยสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	25.00[d]	28.96[c]	33.43[a]	31.84[b]

หมายเหตุ - ใช้ DMRT ตรวจสอบกรดโคจิกเฉลี่ยในอาหารที่มีไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้นระดับต่างกัน

- ค่าเฉลี่ยของกรดโคจิกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 13



การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นระดับต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แร่ธาตุที่มีความสำคัญที่ใช้เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ซัลเฟอร์ แคลเซียมและคลอไรด์ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ ถ้าสารอาหารที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีแร่ธาตุต่างๆ เหล่านี้ไม่เพียงพออาจเสริมพวกเหล็ก แมงกานีส คอปเปอร์ และสังกะสีลงในอาหารในรูปสารประกอบที่เหมาะสมส่วนใหญ่ใช้ในรูปเกลือแต่ใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการผลิตสารที่ได้จากกระบวนการสร้างและสลายทุติยภูมิโดยทั่วไปได้แก่ เหล็ก แมงกานีส และสังกะสี (Stanbury และคณะ, 1995) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ May และคณะ (1931) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus flavus* ในอาหารที่ประกอบด้วยเดกซ์โทรสร้อยละ 20 มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันคือ แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) และโซเดียมไนเทรต ($NaNO_3$) ที่ความเข้มข้นอย่างละ 3 ระดับคือ 0.62, 1.66 และ 5.0 กรัมต่อลิตร มีการเสริมแร่ธาตุแตกต่างกัน 2 กลุ่มคือ สารละลายกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.1 กรัมต่อลิตร ไตรไฮโดรเจนฟอสเฟต (H_3PO_4) 0.054 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.5 กรัมต่อลิตร สารละลายกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (KH_2PO_4) 0.1 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 2.0 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 วัน พบว่าอาหารที่มีโซเดียมไนเทรต 1.66 กรัมต่อลิตรและสารละลายกลุ่มที่ 2 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดร้อยละ 23.7 รองลงมาคือ โซเดียมไนเทรต 5.0 กรัมต่อลิตรและสารละลายกลุ่มที่ 2 ให้กรดโคจิกสูงสุดร้อยละ 20.5 ส่วนอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเทรต 2.25 กรัมต่อลิตรและสารละลายกลุ่มที่ 1 ให้กรดโคจิกสูงสุดที่ร้อยละ 44.7 รองลงมาคือ แอมโมเนียมไนเทรต 2.25 กรัมต่อลิตรและสารละลายกลุ่มที่ 2 ให้กรดโคจิกสูงสุดร้อยละ 43.7

4.1.7 ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)

ผลการศึกษาแมกนีเซียมที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ คือ 0.25, 0.50, 0.70 และ 1.00 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหารที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 35.3 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ความเข้มข้น 0.7 กรัมต่อลิตร ให้กรดโคจิก 33 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 14 ให้ผลการผลิตกรดโคจิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 13 จากการศึกษาของ Tadera และคณะ (1985) มีการเติมแร่ธาตุพวกแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ร้อยละ 0.1 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (KH_2PO_4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 0.1 แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ร้อยละ 0.001 และเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ร้อยละ 0.001 เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* IAM 2024 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 17.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 14 จากผลการศึกษาความเข้มข้นของไดโพแทสเซียม-ไฮโดรเจนฟอสเฟตในข้อ4.1.6 มีรายงานว่ามีการเติมแร่ธาตุโดยเฉพาะแมกนีเซียมลงในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อราในการผลิตกรดโคจิกโดยเติมแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อลิตร (Kwak และRhee, 1992 และ Ogawa และคณะ, 1995) ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 0.25 - 3.0 กรัมต่อลิตร (Stanbury และคณะ, 1995) ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้อยู่ในช่วงที่กำหนดสอดคล้องกับผลของการศึกษาดังที่กล่าวข้นต้น

จากผลการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยดัดแปลงตามสูตรอาหารของ Kwak และRhee (1992) จากการศึกษาไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุพวกแมงกานีส เหล็ก และสังกะสีซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการสร้างและสลายฑุติยภูมิเพราะแร่ธาตุเหล่านี้มีความจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์เพียงเล็กน้อย การศึกษาครั้งนี้จึงใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเพราะในน้ำมะพร้าวมีสารพวกแคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก โซเดียม และโพแทสเซียมเป็นส่วนประกอบ (Douglas และคณะ, 1982) ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเติมสารพวก เหล็ก และ โพแทสเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้ออีก

ตารางที่ 13

แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นระดับต่างกัน

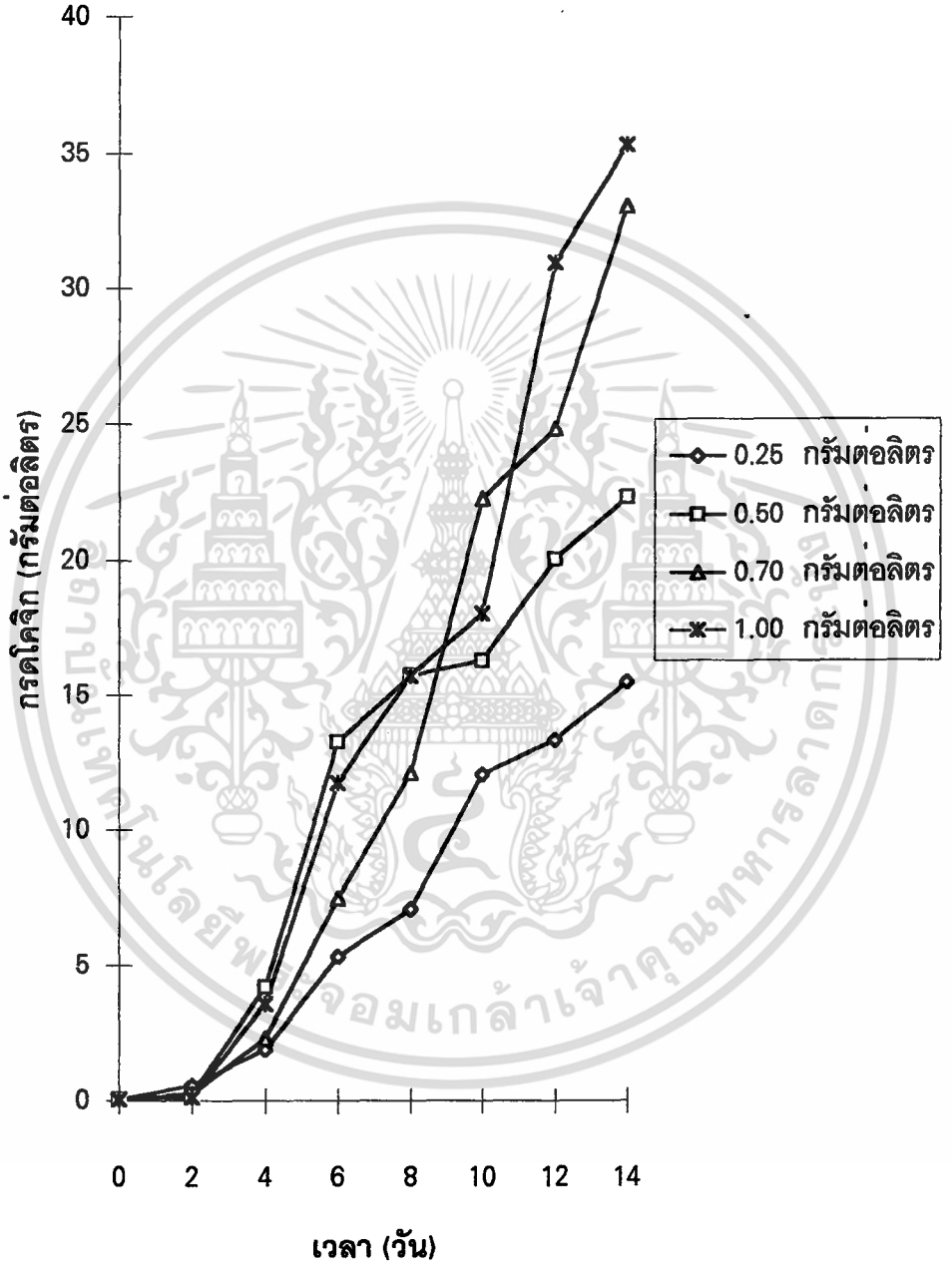
แมกนีเซียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	0.25	0.5	0.7	1.0
ค่าเฉลี่ยสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	15.48^{d}	22.32^{c}	33.02^{b}	35.30^{a}

หมายเหตุ - ใช้ DMRT ตรวจสอบกรดโคจิกเฉลี่ยในอาหารที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นระดับต่างกัน

- ค่าเฉลี่ยของกรดโคจิกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 14



การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่มีแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้นระดับต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.8 ความเป็นกรด-ด่าง (พีเอช) ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

ผลการศึกษาหาความเป็นกรด-ด่างที่ระดับต่างๆ กันคือ 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกอยู่ในช่วงพีเอช 6.0 - 7.0 ซึ่งให้ปริมาณกรดโคจิกใกล้เคียงกันคือ อาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 6.0 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 33.5 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 และอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 7.0 ให้ปริมาณกรดโคจิก 33.0 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ อาหารที่มีพีเอช 4.0 และ 5.0 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 15 ให้ผลการผลิตกรดโคจิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 14 ซึ่งผลการทดลองคล้ายกับ Kwak และ Rhee (1992) และ Ogawa และคณะ (1995) เคยรายงานไว้ว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวคือ 6.0 ดังนั้นจึงเลือกใช้พีเอช 6.0 เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาครั้งต่อไป เนื่องจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบทำให้อาหารเริ่มต้นมีพีเอชประมาณ 6.0 ไม่จำเป็นต้องปรับพีเอชอีกจึงสะดวกและประหยัดเวลาในการเตรียมอาหาร

ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกของ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 175 กรัม แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) 2 กรัม ยีสต์สกัด (yeast extract) 1 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 1 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.25 กรัม และน้ำมะพร้าว 1 ลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 6.0 ซึ่งให้ผลผลิตกรดโคจิก 33 กรัมต่อลิตร สูงกว่าสูตรอาหารเดิม 9.4 เท่า (อาหารสูตรเดิมมีกรดโคจิก 3.5 กรัมต่อลิตร)

ตารางที่ 14

แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีพีเอชต่างกัน

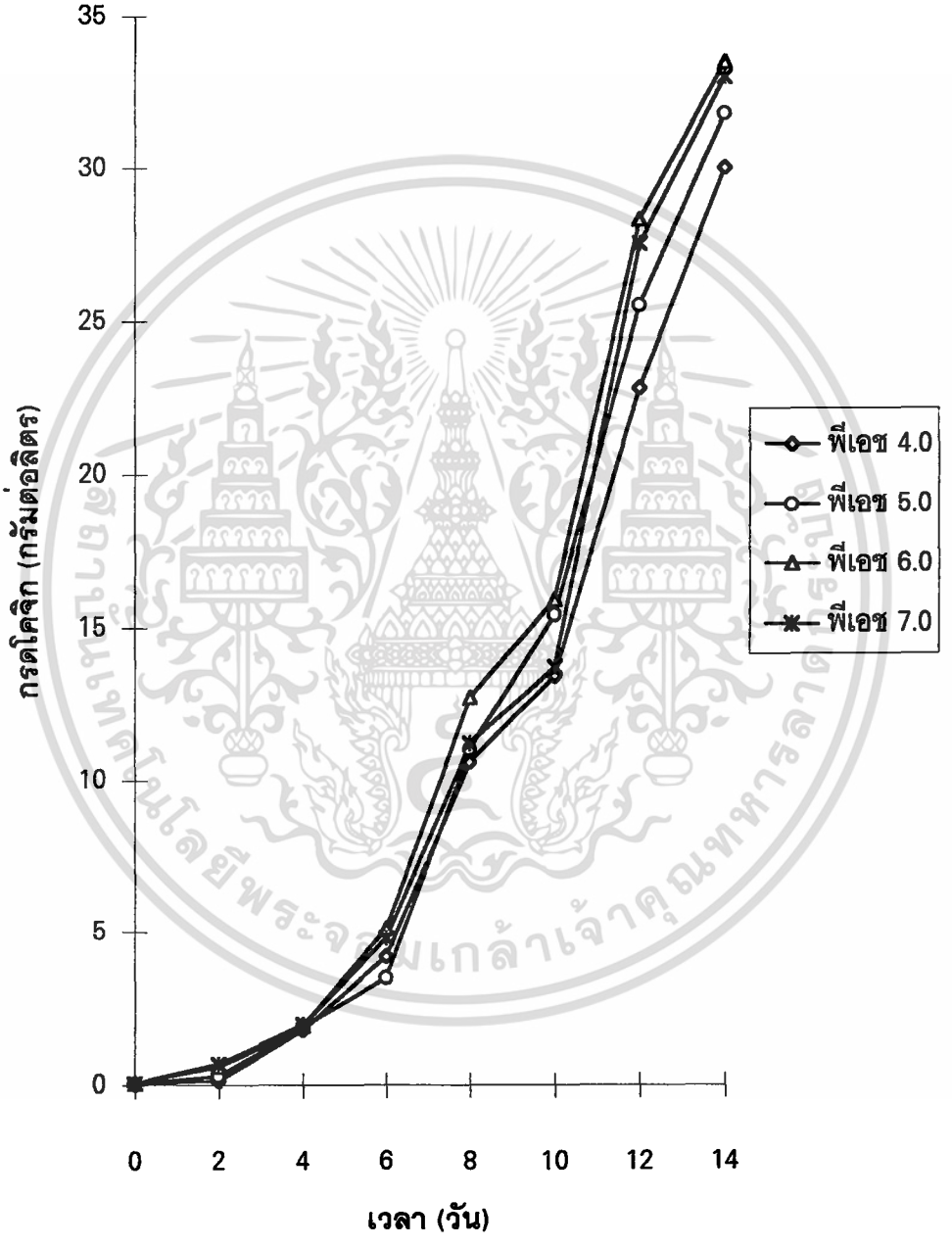
พีเอช	4.0	5.0	6.0	7.0
ค่าเฉลี่ยสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	30.00[d]	31.80[c]	33.50[a]	33.00[b]

หมายเหตุ - ใช้ DMRT ตรวจสอบกรดโคจิกเฉลี่ยในอาหารที่มีพีเอชต่างกัน

- ค่าเฉลี่ยของกรดโคจิกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 15



การผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชต่างกัน โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่า

จากการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวที่เหมาะสมจากข้อ 4.1 โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในอาหาร ทำการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในอาหารที่เหมาะสมบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 34 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 ดังแสดงในภาพที่ 16 จากอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 355 กรัมต่อลิตร และให้กรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 14 เหลือปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 157 กรัมต่อลิตร ดังนั้นผลิตผลที่ได้ (yield) เท่ากับ 0.45 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาลซูโครส (ได้มาจาก 34/ (175 - (355-157)/2)) = 0.45) จากการทดลองของ Kwak และ Rhee (1992) โดยเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสภาวะในการเลี้ยงเชื้อเหมือนที่ใช้ในการทดลองแต่แตกต่างกันที่สูตรอาหารเพราะไม่มีน้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในสูตรอาหารให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 25 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 13

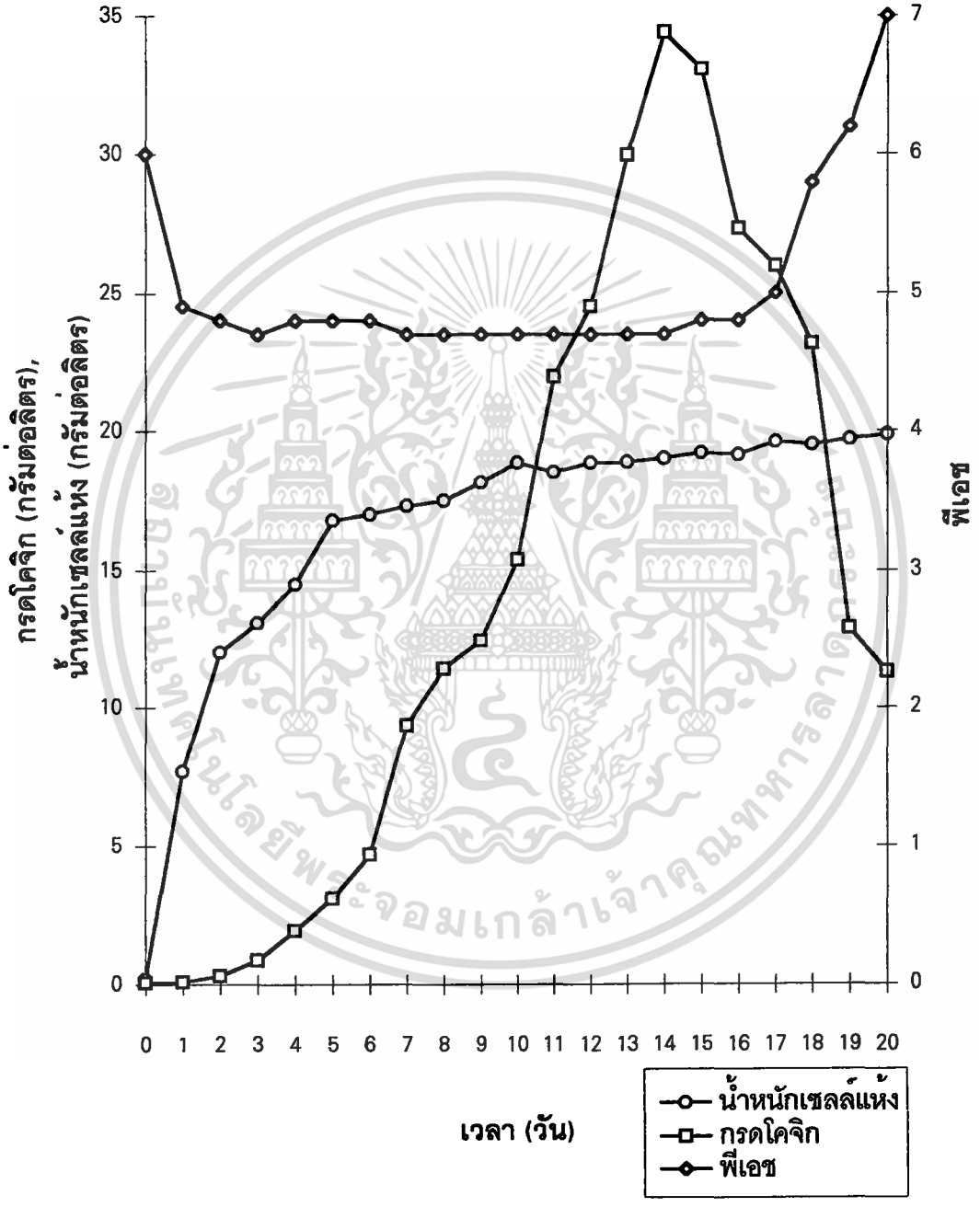
ผลการวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA (ELISA Test Kit.) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 เป็นเวลา 20 วัน จากผลของการวิเคราะห์พบว่าไม่พบสารพิษอะฟลาทอกซินเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก

ในการผลิตกรดโคจิกพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 และพีเอชของอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็วโดยลดลงจากพีเอช 6.0 เป็น พีเอช 4.9 ภายในเวลา 1 วัน หลังจากนั้นพีเอชจะค่อยๆลดลงจนคงที่ (พีเอชประมาณ 4.0) ที่พีเอช 4.7 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด จากนั้นพีเอชจะค่อยๆเพิ่มขึ้นตามลำดับ (ดังในภาพที่ 16)

ปริมาณเซลล์ของเชื้อราที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร เชื้อจะมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลา 2 วัน และค่อยๆเพิ่มปริมาณขึ้นจนปริมาณเซลล์สูงสุด 19 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 หลังจากนั้นปริมาณเซลล์ค่อนข้างจะคงที่เนื่องจากอัตราการเจริญของเชื้อเท่ากับอัตราการตายเนื่องจากปริมาณสารอาหารลดน้อยลง ในระหว่างการหมักเชื้อจะผลิตกรดโคจิกออกมาสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ปริมาณเซลล์ค่อยๆเพิ่มขึ้นควบคู่กับปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นทำให้มีปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 34 กรัมต่อลิตรในวันที่ 14 (พีเอช 4.7) หลังจากนั้นปริมาณกรดโคจิกจะค่อยๆลดลงอาจเนื่องมาจากอาหารเริ่มหมดประกอบกับค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงมีผลต่อปริมาณกรดโคจิกเมื่อพีเอชสูงขึ้นทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นด่างมากขึ้นการผลิตกรดโคจิกจะลดลงตามไปด้วยจนเหลือกรดโคจิก 11 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 16



การผลิตกรดโคจิกในอาหารที่เหมาะสม โดยเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อลิตร ในวันที่ 20 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wei และคณะ (1991) โดยศึกษาการผลิตกรดโคจิกเป็นเวลา 30 วัน พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร YES ให้ปริมาณกรกโคจิกสูงสุด 59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 12 (พีเอช 5.5) หลังจากนั้นกรดโคจิกจะค่อยๆ ลดลงจนแทบไม่เหลือกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบกับพีเอชที่เพิ่มขึ้นพีเอชเท่ากับ 8.0 ในวันที่ 30

4.3 การผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบช (batch fermentation)

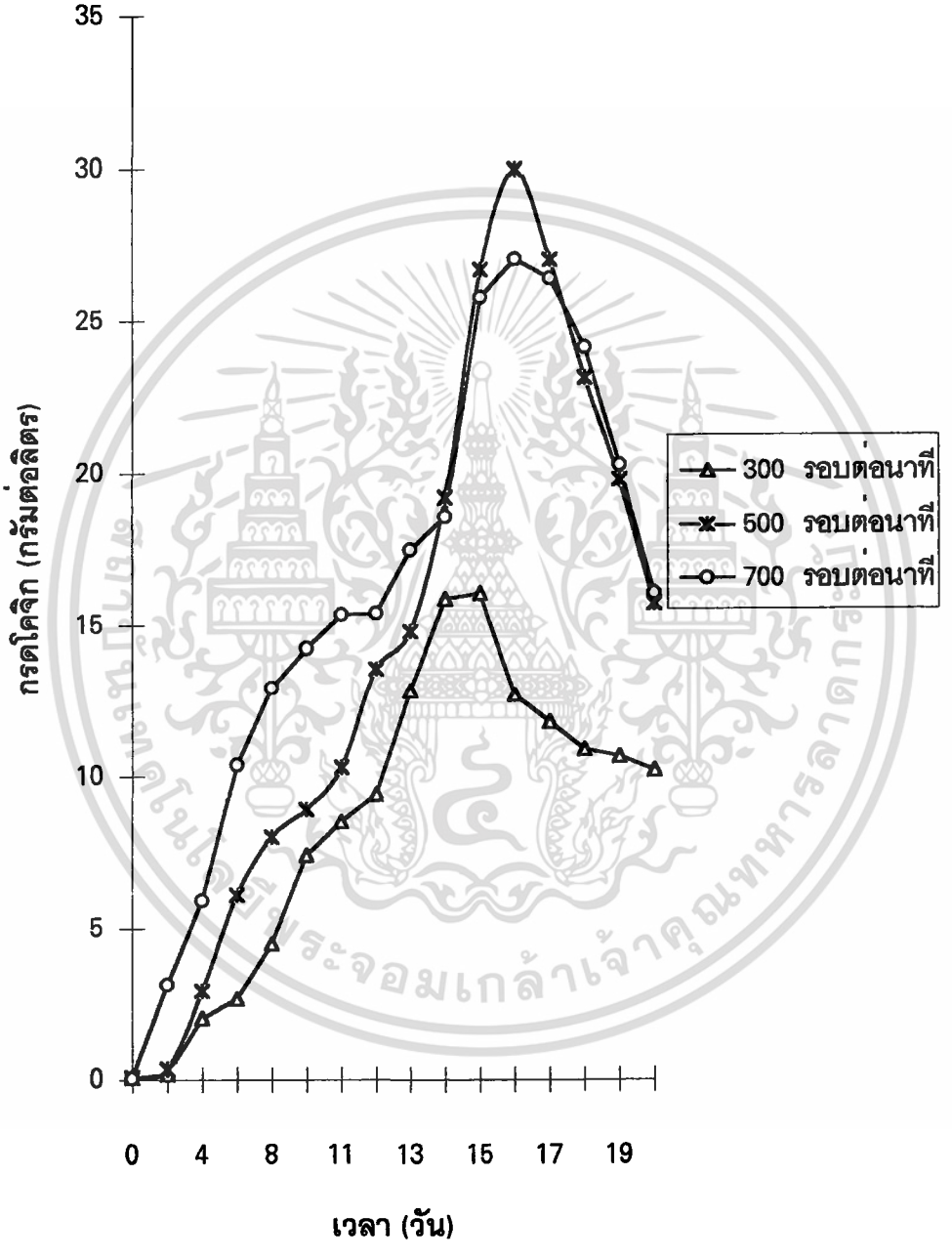
4.3.1 ความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

ถังหมักที่มีการกวนให้อากาศแก่เชื้อจะประกอบด้วยเครื่องกวนซึ่งมีใบพัดติดอยู่บนแกนหมุนกลางถังหมักโดยใช้ไฟฟ้าควบคุมมอเตอร์เพื่อหมุนใบพัด ในการกวนมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เซลล์จุลินทรีย์และสารอาหารในถังหมักกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอและช่วยตีฟองอากาศให้แตกเป็นฟองเล็กๆเพิ่มประสิทธิภาพในการแลกเปลี่ยนแก๊ส นอกจากนี้กระบวนการหมักที่ใช้เชื้อรามีลักษณะการเจริญเป็นเส้นใยทำให้อาหารมีความหนืดจึงจำเป็นต้องใช้เครื่องกวนช่วยในการกวนผสม (Stanbury และคณะ, 1995) จากการทดลองใช้ใบพัดแบบ disc turbine สามารถทำให้อากาศเป็นฟองขนาดเล็กลงได้โดยไม่มีปัญหาฟองท่วมใบพัดทำให้พื้นที่ผิวในการส่งผ่านออกซิเจนเพิ่มขึ้น

ผลจากการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในถังหมักโดยใช้ความเร็วในการกวนต่างกันคือ 300, 500 และ 700 รอบต่อนาที ตามลำดับ และมีอัตราการให้อากาศที่ 1.0 วีวีเอ็ม พบว่าที่ความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 30 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 16 รองลงมาคือ 700 รอบต่อนาที ให้กรดโคจิกสูงสุด 27.4 กรัมต่อลิตรในวันที่ 16 และที่ 300 รอบต่อนาที ให้กรดโคจิกสูงสุด 16 กรัมต่อลิตรในวันที่ 15 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 17 ให้ผลการผลิตกรดโคจิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 15 จากการใช้ความเร็วรอบในการกวน 700 รอบต่อนาที ให้ปริมาณกรดโคจิกต่ำกว่าเมื่อใช้ความเร็วรอบในการกวนที่ 500 รอบต่อนาที อาจเนื่องมาจากในขณะที่มีการกวนด้วยความเร็วที่สูงทำให้ปลายใบพัดตัดเส้นใยเชื้อราทำให้เส้นใยฉีกขาดเป็นผลให้เชื้อเจริญไม่เต็มที่และทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อฟุ้งกระจายทั่วถังหมักเชื้อเจริญติดฝาด้านบนภายในถังหมักทำให้เชื้อได้รับอาหารไม่เพียงพอ ความเร็วในการกวนสูงเชื้อไม่สามารถเจริญได้ส่งผลให้ออกซิเจนภายในมากเกินไปทำให้มีปัญหาการเกิดฟองล้นออกมาเป็นสาเหตุให้เกิดการปนเปื้อนตามมา ซึ่งใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 17



การผลิตกรดโคจิกที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีอัตราการให้อากาศ 1 วีวีเอ็ม และใช้ความเร็วรอบในการกวนต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับโรงงานอุตสาหกรรมในการหมักไม่นิยมให้ความเร็วในการกวนสูงเพราะเป็นการสิ้นเปลืองพลังงานทำให้ต้นทุนการผลิตสูงและทำให้อายุการใช้งานของเครื่องน้อยลงด้วย และที่ความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาที ให้ปริมาณกรดโคจิกต่ำสุดคือ 16 กรัมต่อลิตร อาจเป็นเพราะการกวนเป็นไปอย่างช้าๆทำให้ออกซิเจนจากฟองอากาศละลายในอาหารได้น้อย เชื้อราเกาะกันเป็นกลุ่มทำให้เชื้อราที่อยู่ในกลุ่มได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอ (ปราโมทย์ ศิริโรจน์, 2521) ทำให้การผลิตกรดโคจิกได้น้อยลง ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที สำหรับการทดลองครั้งต่อไป

สำหรับการผลิตกรดโคจิกและน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Aspergillus oryzae* ผลจากการศึกษาการหมักเชื้อราเป็นเวลา 20 วัน จะเห็นได้ว่าเมื่อน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นการผลิตกรดโคจิกก็จะสูงขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งของเส้นใยเชื้อรากับการผลิตกรดโคจิกจึงสัมพันธ์กัน จากการศึกษาพบว่าอัตราการให้อากาศที่ 1.0 วีวีเอ็ม และใช้ความเร็วในการกวนต่างๆกันคือ 300, 500 และ 700 รอบต่อนาที พบว่าที่ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าใช้ความเร็วรอบในการกวน 700 และ 300 รอบต่อนาที ตามลำดับ มีผลให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดตามไปด้วย ซึ่งผลการศึกษาพบว่าการผลิตกรดโคจิกสูงสุดที่ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 16 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 20.80 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ความเร็วในการกวน 700 รอบต่อนาที ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 16 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 19.20 กรัมต่อลิตร และความเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 15 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 18.02 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 18

จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะค่อยๆลดลงเนื่องจากเชื้อมีการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ ที่ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาทีและมีอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 351 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 16 วันให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด และเหลือปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 39 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 19 และที่ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาทีค่าพีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.9 พีเอชของอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 หลังจากนั้นค่าพีเอชเริ่มคงที่จนกระทั่งมีพีเอชเท่ากับ 4.8 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด และพีเอชจะค่อยๆสูงขึ้นตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA (ELISA Test Kit.) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในถังหมักที่ใช้ความเร็วในการกวนต่างกันคือ 300, 500 และ 700 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 วัน จากผลของการวิเคราะห์พบว่าไม่พบสารพิษอะฟลาทอกซินเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก

จากการทดลองในระหว่างการหมักเชื้อ *Aspergillus oryzae* พบว่าเชื้อเกาะเป็นกลุ่มติดรอบๆถังหมักด้านบนของอาหารเลี้ยงเชื้อและติดรอบแผ่นเหล็กกั้น (baffle) ทำให้เชื้อที่เกาะเป็นกลุ่มได้รับออกซิเจนน้อยจึงมีอัตราการเจริญไม่เต็มที่ ดังนั้นถังหมักที่ดีแผ่นเหล็กกั้นต้องมีระยะห่างจากผนังของถังหมักพอสมควร ถังหมักที่มีเครื่องกวนจะมีแผ่นเหล็กกั้นเพื่อป้องกันการเกิดน้ำวนและช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการให้อากาศ

ตารางที่ 15

แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีอัตราการให้อากาศ 1 วีวีเอ็ม และใช้ความเร็วรอบในการกวนต่างกัน

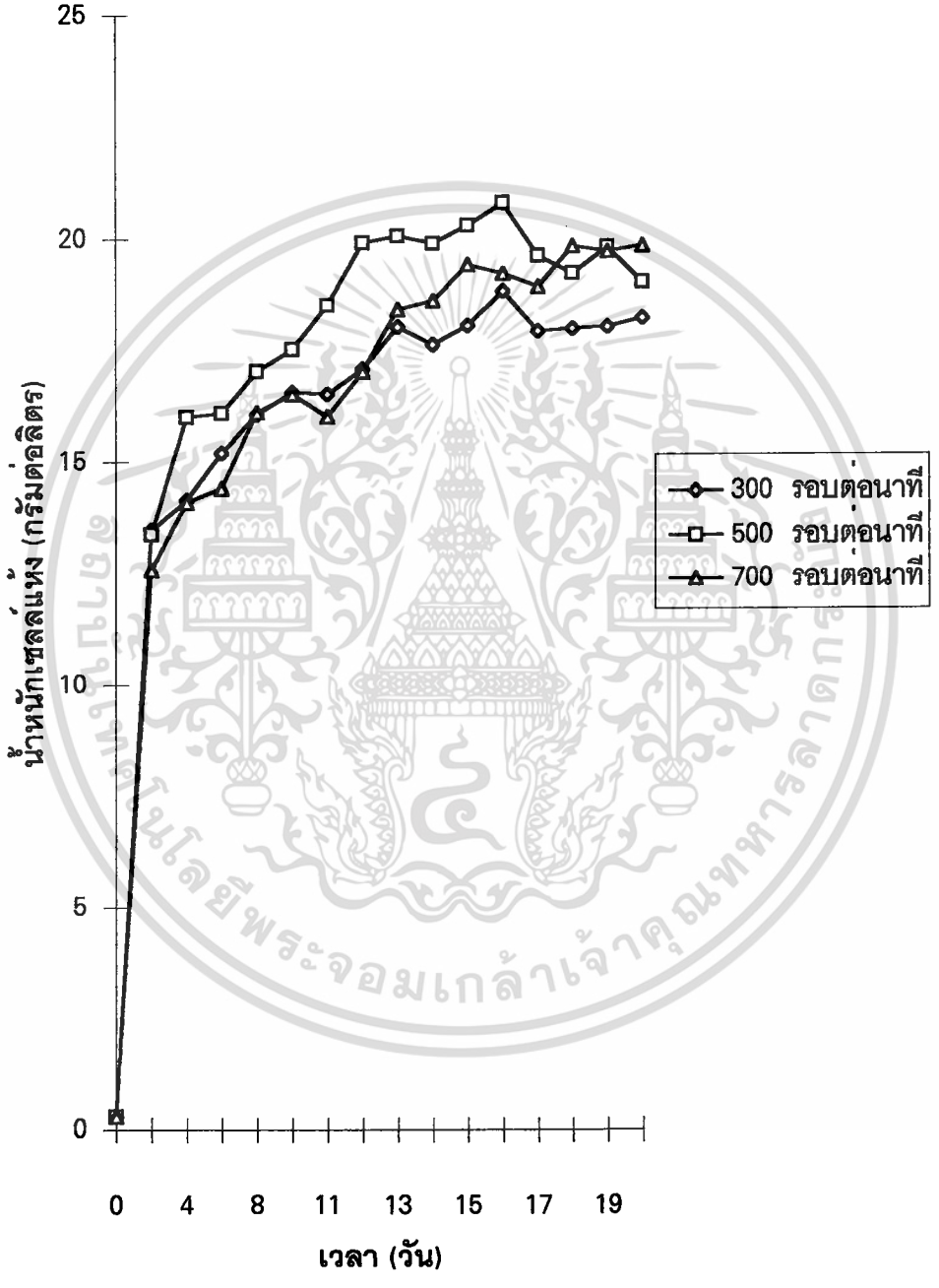
ความเร็วในการกวน (รอบต่อนาที)	300	500	700
ค่าเฉลี่ยสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	16.06[c]	29.98[a]	27.06[b]

หมายเหตุ - ใช้ DMRT ตรวจสอบกรดโคจิกเฉลี่ยในอาหารที่มีอัตราการให้อากาศ 1 วีวีเอ็ม และใช้ความเร็วในการกวนต่างกัน

- ค่าเฉลี่ยของกรดโคจิกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

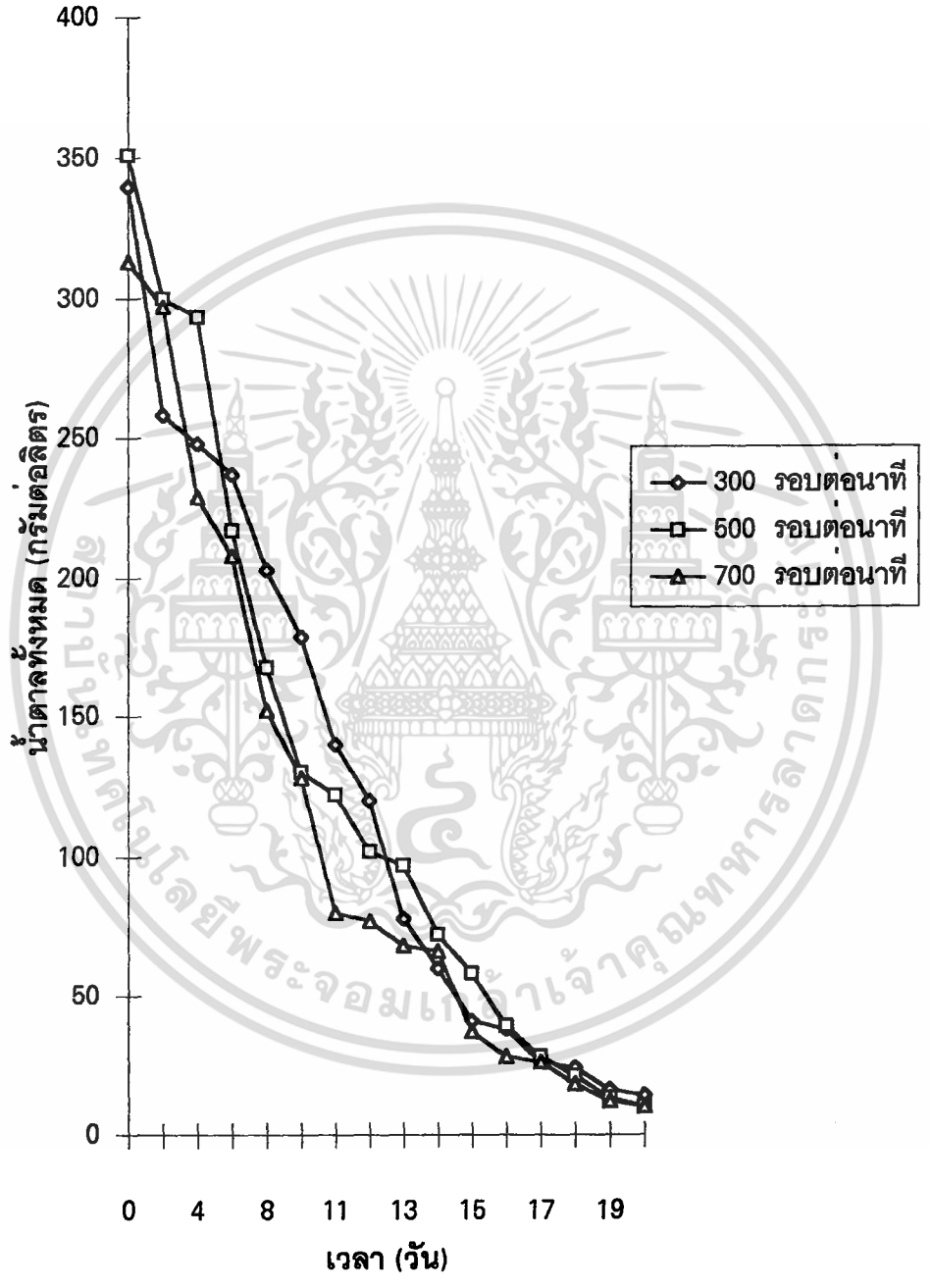
ภาพที่ 18



น้ำหนักเซลล์แห้งของอาหารที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีอัตราการให้อากาศ 1 วีวีเอ็ม และใช้ความเร็วรอบในการกวนต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

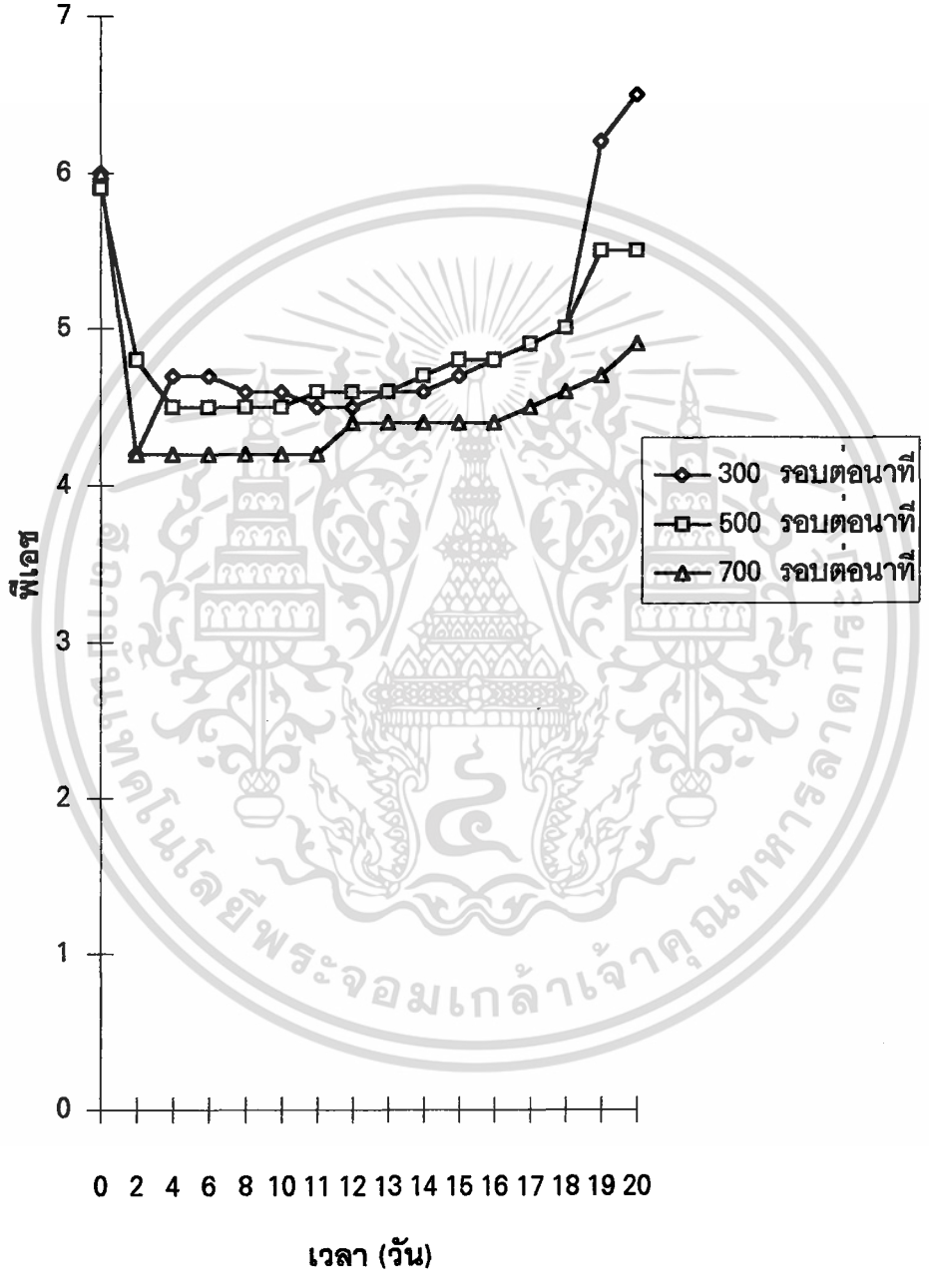
ภาพที่ 19



น้ำตาลทั้งหมดของอาหารที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีอัตราการให้อากาศ 1 วีวีเอ็ม และใช้ความเร็วรอบในการกวนต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 20



ค่าพีเอชของอาหารที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร มีอัตราการให้อากาศ 1 วีวีเอ็ม และใช้ความเร็วรอบในการกวนต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

การให้อากาศมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ ถังหมักที่ใช้ในการศึกษามีระบบการให้อากาศประกอบด้วยส่วนประกอบที่สำคัญคือ เครื่องสูบอากาศ เครื่องกรองอากาศและหัวจ่าย ซึ่งหัวจ่ายอากาศที่ใช้เป็นท่อปลายเปิดขนาดเล็กเป็นจุด (nozzle sparger)

ผลจากการศึกษาความเร็วรอบในการกวนพบว่าความเร็วในการกวนที่เหมาะสมคือ 500 รอบต่อนาที จากนั้นทำการศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกพบว่า อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 36.60 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 รองลงมาคือ อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดโคจิก 30 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 16 อัตราการให้อากาศ 2.0 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดโคจิก 29 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 และอัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดโคจิก 25 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 16 ตามลำดับ (ดังภาพที่ 21) ให้ผลการผลิตกรดโคจิกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16

แสดงค่าเฉลี่ยของกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) สูงสุดในอาหารที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศต่างกัน

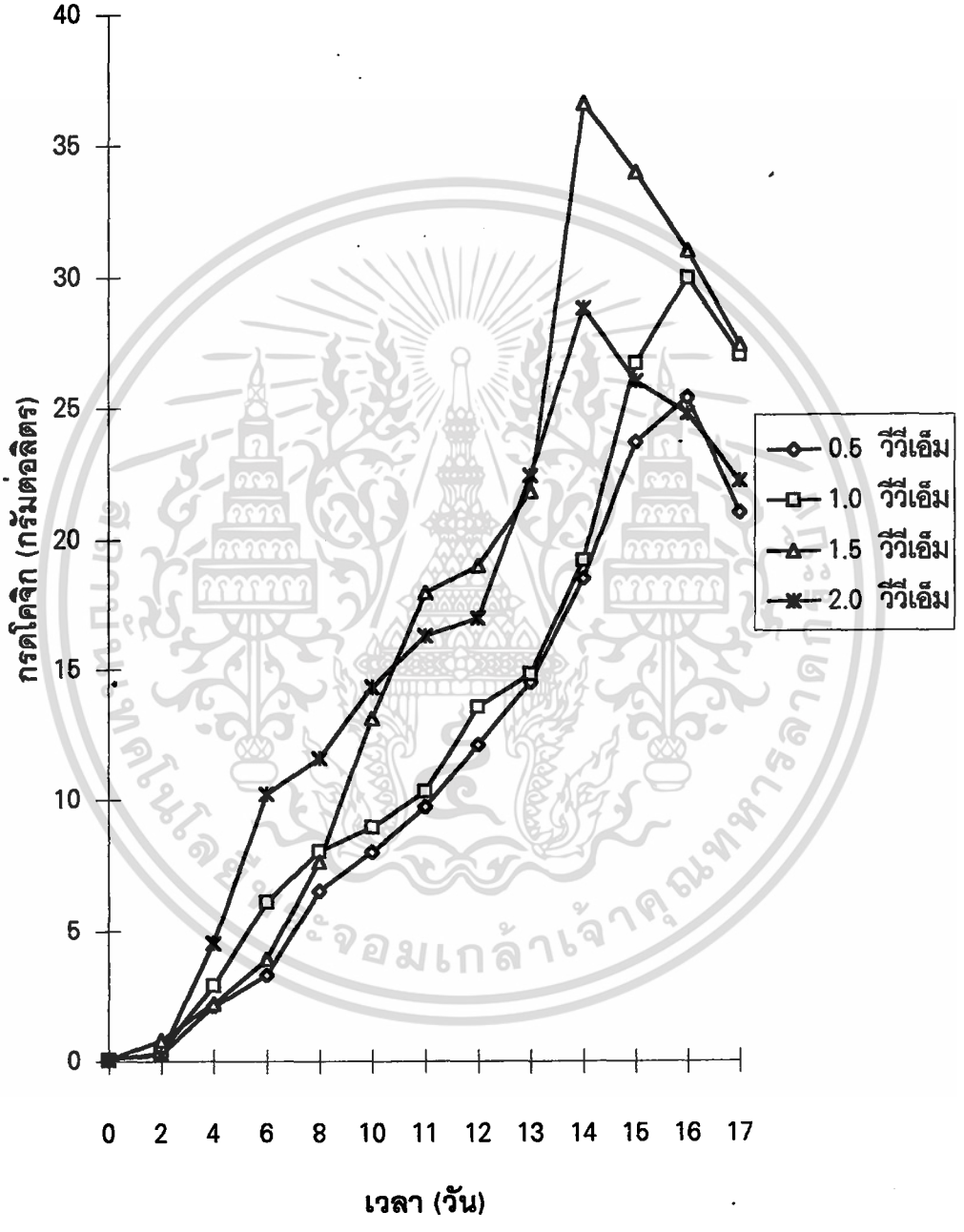
อัตราการให้อากาศ (วีวีเอ็ม)	0.5	1.0	1.5	2.0
ค่าเฉลี่ยสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	25.40[d]	29.98[b]	36.78[a]	28.80[c]

หมายเหตุ - ใช้ DMRT ตรวจสอบกรดโคจิกเฉลี่ยในอาหารที่มีความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศต่างกัน

- ค่าเฉลี่ยของกรดโคจิกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 21



การผลิตกรดโคจิกที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 17 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาพบว่าอัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดโคจิกต่ำสุด เนื่องจากอัตราการละลายของออกซิเจนจากฟองอากาศไม่เพียงพอสำหรับอัตราการใช้ออกซิเจนของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ซึ่งแตกต่างจากอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ออกซิเจนจากฟองอากาศเพียงพอหรือมากกว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของเชื้อ เชื้อจึงสามารถใช้ออกซิเจนในขณะที่มีการเจริญเติบโต และอัตราการให้อากาศที่ 2.0 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดโคจิกน้อยกว่าอัตราการให้อากาศที่ 1.0 และ 1.5 วีวีเอ็ม เนื่องจากอัตราการให้อากาศที่ 2.0 วีวีเอ็ม ในช่วงแรกระยะที่เชื้อกำลังปรับตัวยังไม่มีปัญหาในการให้อากาศ แต่หลังจากนั้นเชื้อรามีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นเชื้อเพิ่มจำนวนมากขึ้นประมาณวันที่ 2 ทำให้อัตราการให้อากาศค่อยๆลดลงเป็นผลให้อัตราการให้อากาศไม่ถึง2.0วีวีเอ็ม เนื่องจากเครื่องสูบอากาศของระบบการให้อากาศของถังหมักประสิทธิภาพในการทำงานไม่ดีนักจึงทำให้จ่ายอากาศมาน้อย และมีเส้นใยราบางส่วนมีการเจริญเติบโตมากขึ้นทำให้การจ่ายออกซิเจนน้อยตามลำดับ ออกซิเจนไม่เพียงพอสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อทำให้การผลิตกรดโคจิกลดลงตามลำดับด้วย

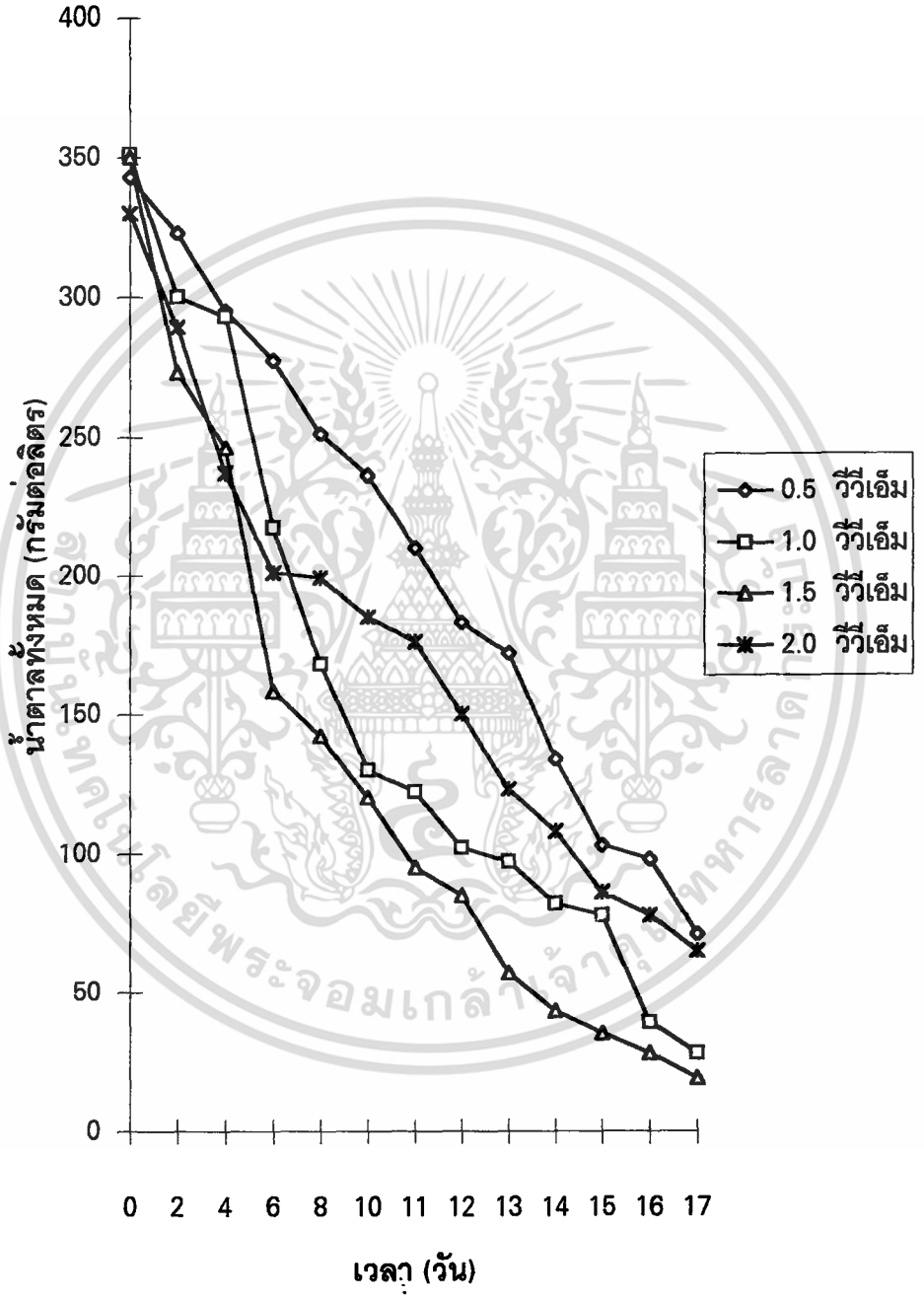
จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะค่อยๆลดลง ที่ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศที่ 1.5 วีวีเอ็ม มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 350 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 14 วัน จะให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดและเหลือปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 43 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 22 และที่อัตราการให้อากาศระดับนี้ค่าพีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 พีเอชของอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 2 จากนั้นค่าพีเอชเริ่มคงที่จนกระทั่งมีพีเอชเท่ากับ 4.9 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด และพีเอชจะค่อยๆสูงขึ้นตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 23

จากการศึกษาเมื่อน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นทำให้ปริมารกรดโคจิกเพิ่มขึ้นด้วยแสดงว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีความสัมพันธ์กับการผลิตกรดโคจิก พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลา 2 วัน จากนั้นน้ำหนักจะค่อยๆเพิ่มขึ้น และที่อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดและมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 21 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 ดังแสดงในภาพที่ 24

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA (ELISA Test Kit.) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในถังหมักมีอัตราการให้อากาศต่างกันคือ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 วีวีเอ็ม เป็นเวลา 17 วัน จากผลของการวิเคราะห์ไม่พบสารพิษอะฟลาทอกซินเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

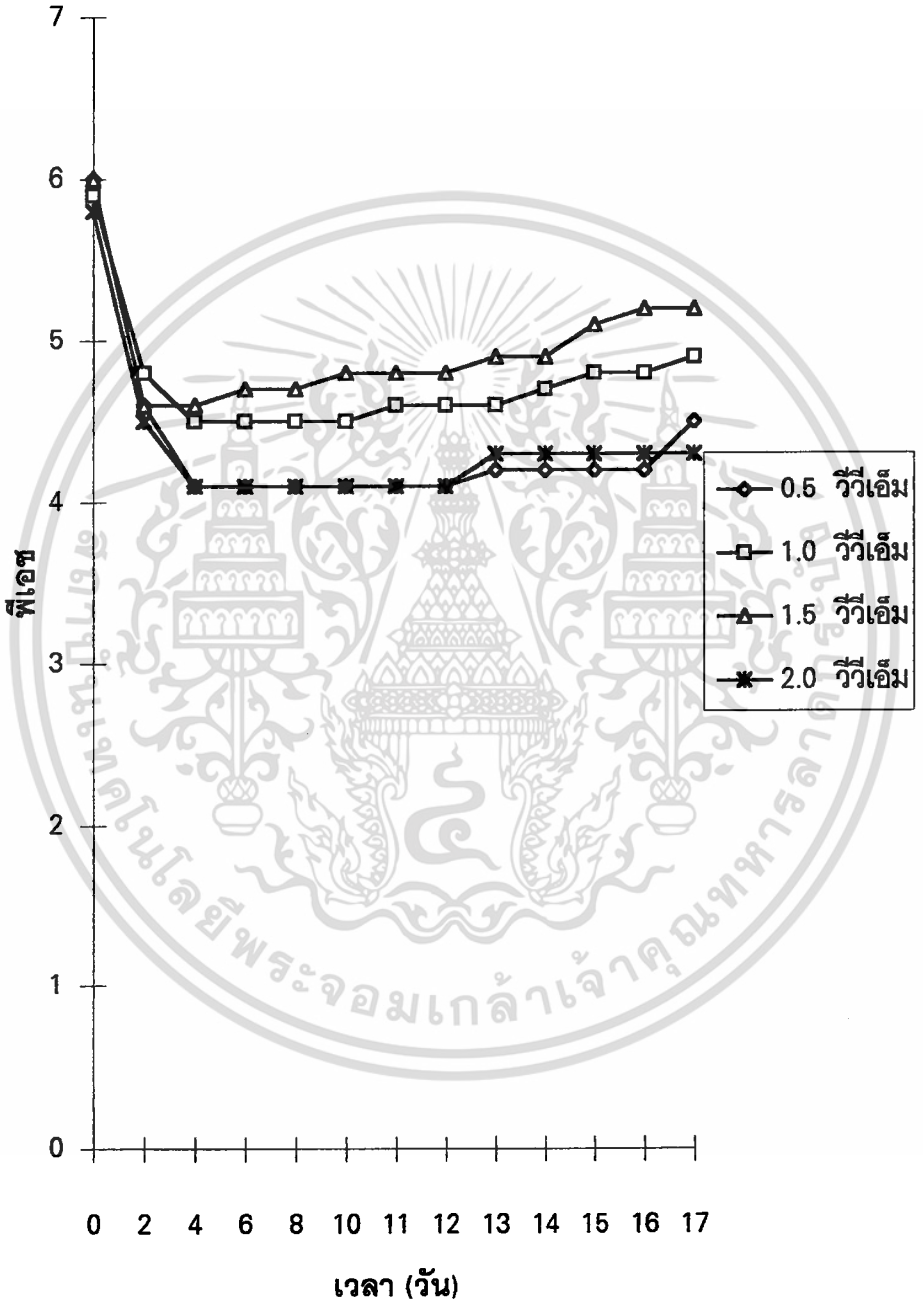
ภาพที่ 22



น้ำตาลทั้งหมดของอาหารที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 17 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

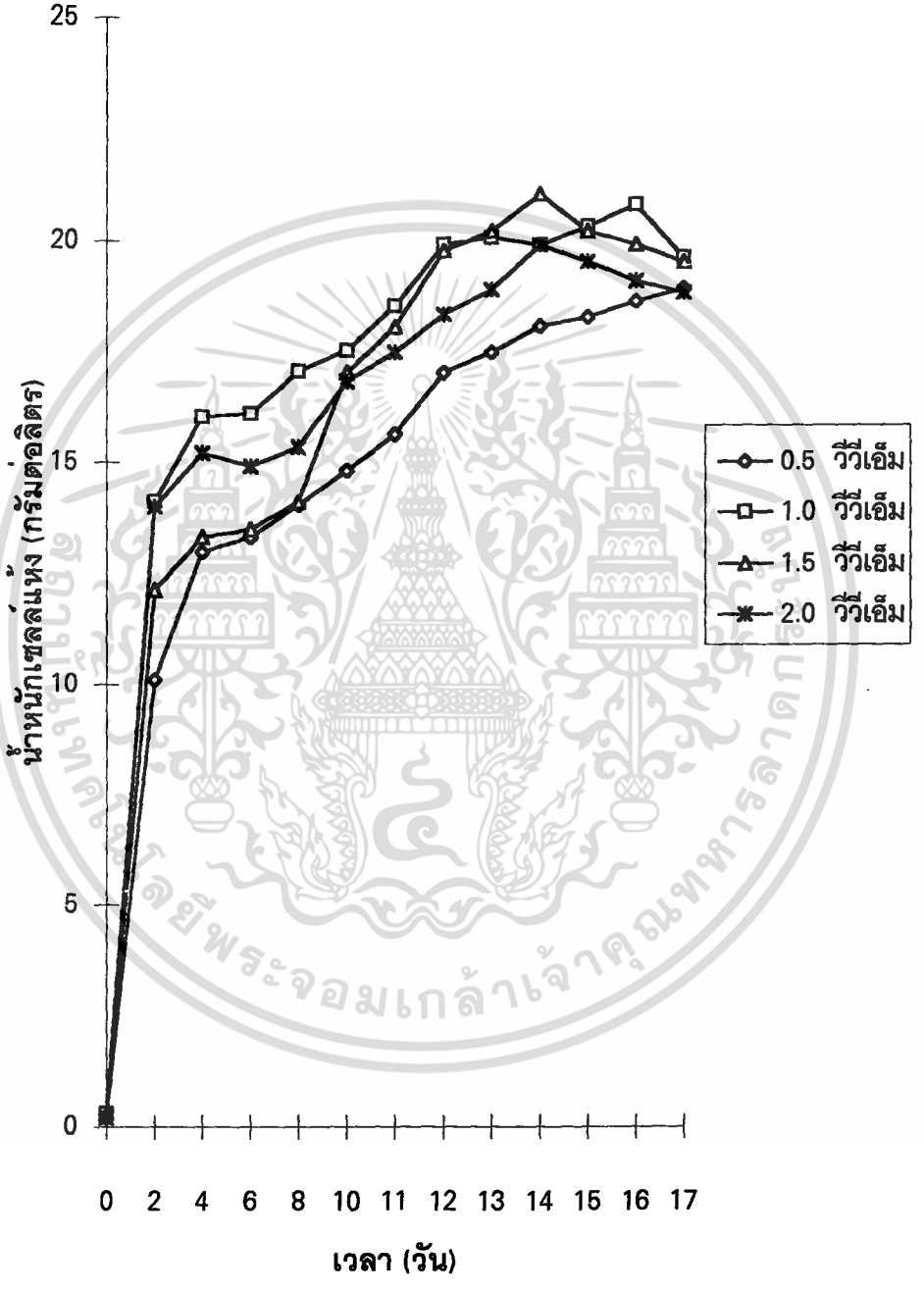
ภาพที่ 23



ค่าพีเอชของอาหารที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 17 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 24



น้ำหนักเซลล์แห้งของอาหารที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศต่างกัน โดยเลี้ยงเป็นเวลา 17 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 การศึกษาการเจริญและการผลิตกรดโคจิกในถังหมัก

ผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักโดยใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศที่ 1.5 วีวีเอ็ม เป็นเวลา 20 วัน ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 37 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 ที่พีเอช 4.8 ดังแสดงในภาพที่ 25 หลังจากนั้นลดลงตามลำดับจนมีปริมาณกรดโคจิก 20 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 20 ประกอบกับค่าพีเอชค่อยๆเพิ่มขึ้นเป็น 6.5 ดังนั้นค่าพีเอชจึงมีผลต่อปริมาณกรดโคจิกที่เกิดขึ้น เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นด่างมากขึ้นมีผลทำให้ปริมาณกรดโคจิกลดลงตามลำดับ

ในการผลิตกรดโคจิกอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 และพีเอชของอาหารจะลดลงอย่างรวดเร็วโดยลดลงจากพีเอช 6.0 เป็น พีเอช 4.6 ภายในเวลา 2 วัน หลังจากนั้นพีเอชจะค่อยๆลดลงจนคงที่ที่พีเอชประมาณ 4 ระหว่างวันที่ 2-15 และพีเอช 4.8 เป็นช่วงที่มีการผลิตกรดโคจิกสูงสุด จากนั้นพีเอชค่อยๆเพิ่มขึ้นตามลำดับ

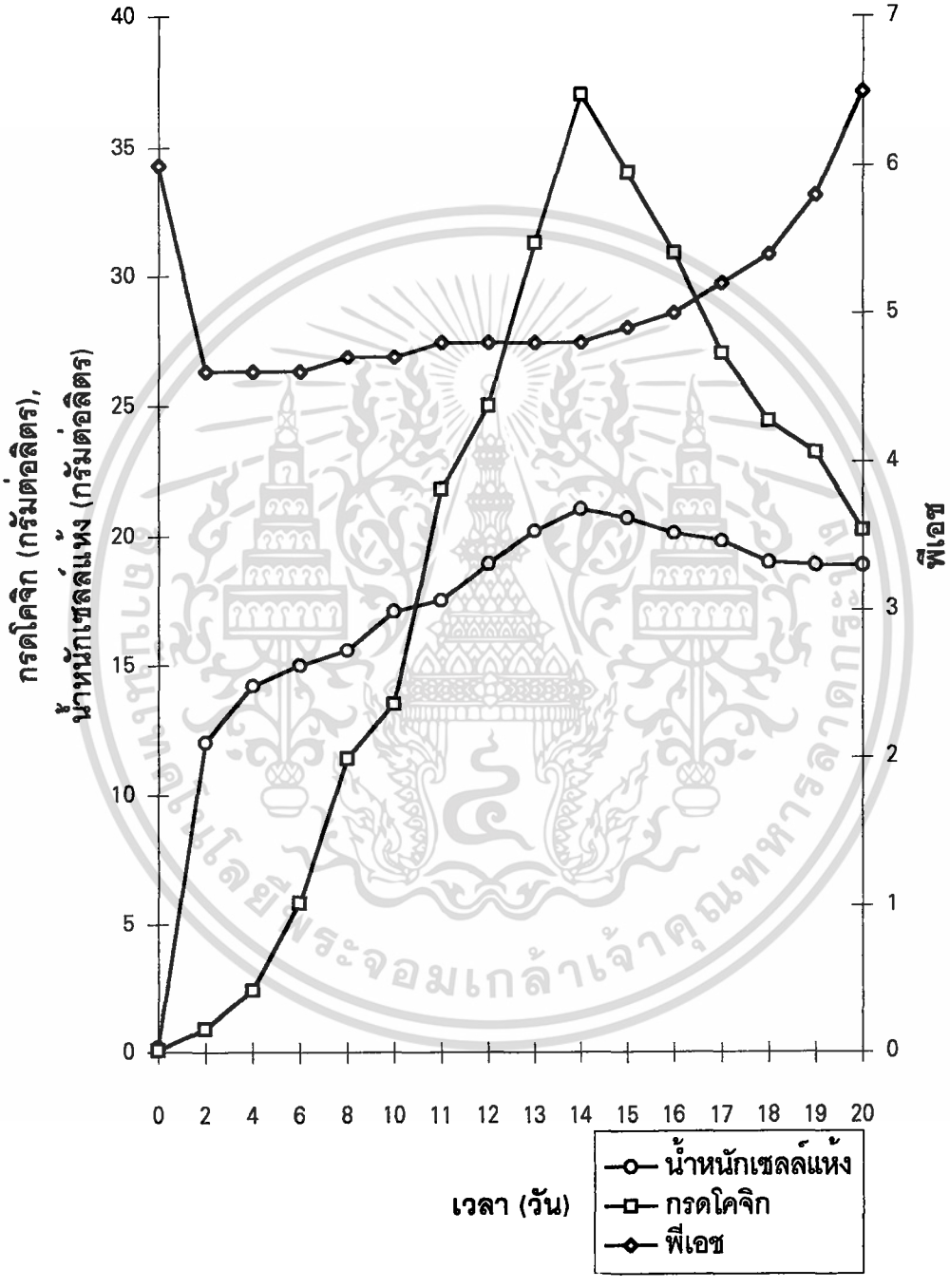
ในการเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 351 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 37 กรัมต่อลิตร และเหลือปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 135 กรัมต่อลิตร ดังนั้นผลิตผลที่ได้ (yield) เท่ากับ 0.55 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาลซูโครส (ได้มาจาก 37/ (175 - (351-135/2)) = 0.55)

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินโดยวิธี ELISA (ELISA Test Kit.) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 เป็นเวลา 20 วัน จากผลการศึกษาไม่พบสารพิษอะฟลาทอกซินเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก

กรดโคจิกเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการสร้างและสลายทุติยภูมิ(secondary metabolite) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารหรือผลิตผลจากกระบวนการสร้างและสลายปฐมภูมิ (primary metabolism) ในการหมักควรใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวนได้มากที่สุด ซึ่งการหมักต้องทำให้ระยะ lag phase สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิตเนื่องจากระยะนี้เป็นช่วงระยะเวลาที่เซลล์ใช้เวลาในการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อม ถ้าเชื้อราใช้เวลาในการปรับตัวนานทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น (Stanbury และคณะ, 1995) จากการศึกษาพบว่าเชื้อมีการปรับตัวเร็วขึ้นโดยพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 0.2 กรัมต่อลิตรเพิ่มเป็น 12.09 กรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลา 2 วัน (ภาพที่ 25) จากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนคงที่เมื่อน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 21 กรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด และหลังจากนั้นจะค่อยๆลดลงตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเมื่อน้ำหนักเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 25



การผลิตกรดโคจิกที่เลี้ยงแบบแบชในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม โดยเลี้ยงเป็นเวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แห้งเพิ่มขึ้นมีผลทำให้ปริมาณกรดโคจิกสูงขึ้นแสดงว่าน้ำหนักเซลล์แห้งจึงมีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดโคจิกที่เกิดขึ้น

ในการศึกษาใช้สารกำจัดฟองคือ น้ำมันพืชตราองุ่น 1 มิลลิลิตร จากการศึกษาไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการเกิดฟองมากนักเพราะใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งน้ำมะพร้าวมีไขมันอยู่ 0.2 กรัมต่อ 100 กรัม (Douglas และคณะ, 1982) ถ้ากระบวนการหมักไม่ค่อยมีปัญหาในการเกิดฟองแต่มีฟองเกิดขึ้นแสดงว่าเกิดการปนเปื้อนของเชื้อ

4.4 การแยกกรดโคจิก

ผลจากการศึกษาการแยกกรดโคจิกดังแสดงในภาพที่ 26 จากน้ำหมักมีลักษณะสีน้ำตาลเข้ม จำนวน 100 มิลลิลิตร มีปริมาณกรดโคจิก 30 กรัมต่อลิตร นำไประเหยภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 90 - 100 องศาเซลเซียส ($^{\circ}$ซ) จนเหลือปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมกรดแอซีติกเข้มข้น 0.1 มิลลิลิตร ปรับสภาพให้เป็นกรดเพื่อป้องกันการตกตะกอนของคอปเปอร์ฟอสเฟต จากนั้นเติมสารละลายคูพริกแอซีเตต (cupric acetate) เข้มข้น 0.2 โมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายขุ่นสีเขียวอมเหลือง เมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 - 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน สารละลายจะเกิดการแยกชั้นได้สารละลายสีน้ำตาลใสด้านบนและตะกอนสีเขียวอมเหลืองของคอปเปอร์โคเจต (copper kojate) ทำการกรองผ่านกระดาษวัทแมนเบอร์ 1 และทำการล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำตะกอนที่ได้เติมสารละลายไทโอแอเซทาไมด์ (thioacetamide) เข้มข้น 0.6 โมลาร์ จำนวน 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษวัทแมนเบอร์ 1 จะได้สารละลายใสสีเหลืองอ่อนจนถึงไม่มีสี นำไประเหยภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนได้ผลึกกรดโคจิกสีเหลืองอ่อนติดขอบขวดก้นกลม จากนั้นทำการละลายผลึกอีกครั้งด้วยสารละลายเมทานอลกับเอทิลแอซีเตตในอัตราส่วน 1 : 1 จำนวน 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไประเหยภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จะได้ผลึกของกรดโคจิก 18.06 กรัมต่อลิตร มีลักษณะเป็นผลึกรูปเข็มสีเหลืองอ่อน ดังแสดงในภาพที่ 27 จากการทดลองผลิตผลที่ได้หลังจากการสกัดคิดเป็นร้อยละ 60.2 (ได้มาจาก (18.06/30) X 100 = 60.2)

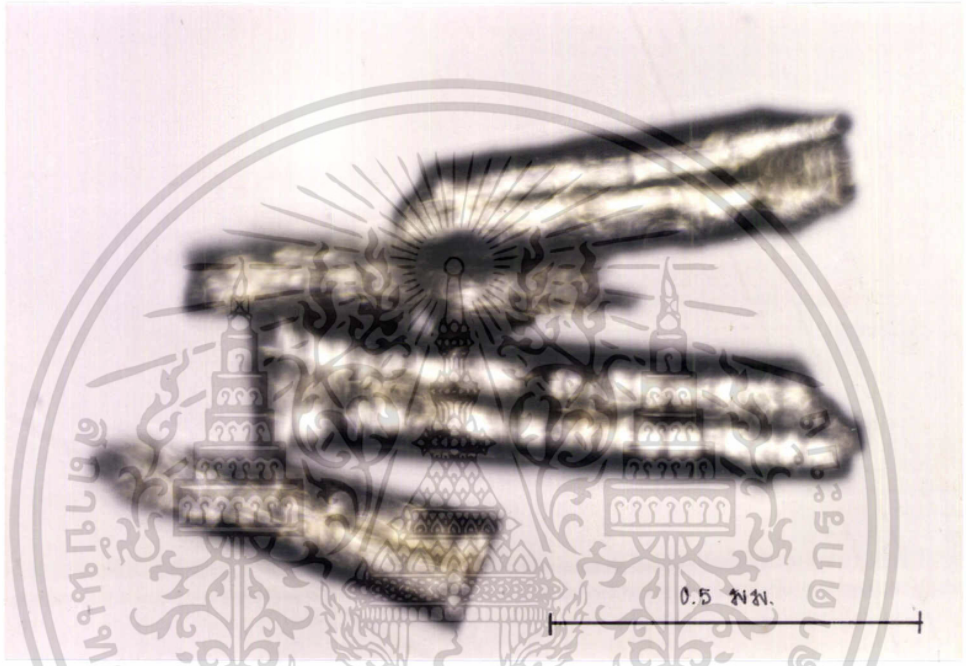
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 26

แสดงกระบวนการแยกกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 27



ลักษณะผลึกของกรดโคจิกที่แยกได้หลังจากการสกัดที่กำลังขยาย 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

การผลิตกรดโคจิกจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบ จากการศึกษาพบว่าอาหารสูตรที่เหมาะสมที่สุด ประกอบด้วย น้ำตาลซูโครส 175 กรัม แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) 2 กรัม ยีสต์สกัด (yeast extract) 1 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 1 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.25 กรัม และน้ำมะพร้าว 1 ลิตร พีเอช 6.0

จากการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 34 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 ที่พีเอช 4.7 น้ำหนักเซลล์แห้ง 19 กรัมต่อลิตร ผลิตผลที่ได้ (yield) เท่ากับ 0.45 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาลซูโครส และไม่พบสารพิษอะฟลาทอกซินเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบแบช(batch fermentation) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดียวกันในถังหมักขนาด 2 ลิตร ทำการศึกษาความเร็วรอบในการกวนที่ 300, 500 และ 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 วีวีเอ็ม พบว่าความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และมีอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 37 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 ที่พีเอช 4.8 น้ำหนักเซลล์แห้ง 21 กรัมต่อลิตร ผลิตผลที่ได้ (yield) เท่ากับ 0.55 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาลซูโครส และไม่พบสารพิษอะฟลาทอกซินเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก

หลังจากนั้นนำน้ำหมักที่มีปริมาณกรดโคจิกเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร มาทำการแยกกรดโคจิกเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการแยกจะได้ผลึกของกรดโคจิก 18.06 กรัมต่อลิตร ดังนั้นผลิตผลที่ได้หลังจากการสกัด (percentage recovery yield) คิดเป็นร้อยละ 60.2 จะเห็นได้ว่าเมื่อผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แล้วพบว่ายังมีสารอื่นปนอยู่ ควรทำการศึกษาเพิ่มโดยทำการศึกษาและพัฒนาวิธีการแยกกรดโคจิกโดยวิเคราะห์ทางเคมีโดยการแยกองค์ประกอบของกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กล้าณรงค์ ศรีรอต และจุนทนี จิตต์รำพึง. "พจนานุกรม FOOD ADDITIVES." วารสารจาร์พา ปีที่ 4 ฉบับที่ 33 (กุมภาพันธ์ 2540) : 57-59.

ดวงพร คันธโชติ. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2530.

ปราโมทย์ ศิริโรจน์. การคัดเลือกสายพันธุ์และการเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่มีโปรตีนสูงในน้ำทิ้งจากกระบวนการแปรรูปอาหารถั่วเหลือง. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2521.

มยุรี พิชญวรกุล, อัจฉรา งามวรโรจน์สกุล และอัมภาภรณ์ สิริวัตถานันต์. การผลิตเห็ดวุ้นมะพร้าวในเชิงพาณิชย์. โครงงานพิเศษ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 2536.

วิชาการเกษตร, กรม. "การตรวจสอบสารพิษอะฟลาทอกซินบีหนึ่ง โดยวิธี ELISA." กรุงเทพฯ : กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร : 2336. (อัดสำเนา)

วิเชียร กิจปรีชาวนิช. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบีสิบสองของเชื้อ *Bacillus megaterium* ATCC 13639 ในน้ำมะพร้าวแก่. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2521.

วัชรีศิริชาติ ช่วยเกลี้ยง และศราวดี อยู่แสง. การศึกษาการผลิตเซลล์ยีสต์ขนมปังจากอาหารน้ำมะพร้าว. โครงงานพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยี - พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 2532.

สมชาย ประภาวัต. "น้ำมะพร้าว." โภชนาการสาร ปีที่ 23 ฉบับที่ 2 (2532) : 130-132.

สมศรี ลิมปิพัฒนวิทย์. "การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับทำวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าวแก่." วารสารอาหาร ปีที่ 18 ฉบับที่ 4 (2531) : 239-249.

สายชล ชิวปรีชา. การศึกษาการใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2520.

อโณทัย คมเศวต. การศึกษาการเจริญของยีสต์โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2519.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัจฉรา มีวาสนา."การแสดงส่วนประกอบอาหารพื้นเมืองของประเทศ." วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปีที่ 9 ฉบับที่ 1-4 (2510) : 1-29.

Anonymous. "Coconut water speeds growth of tuberculosis germs." Sci. New Letter. (1957) : 72-75.

Arnstein, H.R.V. and R. Bentley. "The biosyntheis of kojic acid." J. Biochem. 54 (1953) : 493-508.

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

Bajpai, P., P.K. Agrawala and L. Vishwanathan. "Production of kojic acid by resuspended mycelia of *Aspergillus flavus*." Can. J. Microbiol. 28 (1982) : 340-1346.

Bajpai , P., P.K. Agrawala and L. Vishawanathan. " Kojic acid : synthesis and properties." J. Scient. Ind. Res. 41 (1982) : 185-194.

Barbesgard, P., H.P. Heldt - Hansen and B. Diderichsen. "On the safety of *Aspergillus oryzae* : a review." Appl. Microbiol. Biotech. 36 (1992) : 569-572.

Barnard, D. and F. Challenger. "The formation of kojic acid from ethyl alcohol by *Aspergillus oryzae*." J. Chem. Soc. 31 (1949) : 110-117.

Bentley, R. "Preparation and analysis of kojic acid." Method Enzymol. 3 (1957) : 238-241.

Carew, D.P. and A.E. Schwarting. "Production of rye embryo callus." Bot. Gaz. 119 (4) (1958) : 237-239.

Challenger, F., L. Klein and T.K. Walker. "The production of kojic acid from pentoses by *Aspergillus oryzae*." J. Chem. Soc. (1929) : 1498-1505.

Challenger, F., L. Klein and T.K. Walker. "The formation of kojic acid from sugars by *Aspergillus oryzae*." J. Chem. Soc. (1931) : 16-23.

Child, B.M. and W.R.N. Nathanael. "Changes in the sugar composition of coconut water during maturation and germination" J. Sci. Food Agri. 1 (1950) : 326-329.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Clamohoy, L.L. and others. "Coconut water - egg yolk (TNI) as diluter for boar semen." Philip. Agri. 46 (1962) : 352-368.

Douglas, M.C., P.E. Glenn and D. Considine. Foods and Food Production Encyclopedia. New York : Van Nostrand Rein Hone Company, 1982.

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

Friedemann, T.E. "Chemical and physiological properties of kojic acid." Science. 30 (1934) : 34.

Kayahara, H. and others. "Amino acid and peptide derivatives of kojic acid and their antifugal properties." Agric. Biol. Chem. 54 (9) (1990) : 2441-2442.

Kitada, M., H. Ueyama, H. Suzuki and T. Fukumbara. "Studies on kojic acid fermentation. I. Cultural condition in submerged culture." J. Ferment. Tech. 45 (1967) : 1101-1107.

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

Kwak, M.Y. and J.S. Rhee. " Cultivations characteristics of Immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production." Biotechnol. Bioeng. 39 (1992) : 903-906.

Leopold, A. Carl and P.E. Kriedemann. Plant Growth and Development ; Cytokinins. New York : McGraw-Hill, 1964.

Mauney, J.R.. "The culture in vitro of immature cotton embryos." Bot. Gaz. 122 (1960) : 205-209.

May, O.E. and others. "The production of kojic acid by *Aspergillus flavus*." J. Am. Chem. Soc. 53 (1931) : 774-782.

Mayer, E.F., B. F. Talley and C. F. Woodword. "Nicotine insecticides. II. Search for activators" Chem. Abstr. 41 (1947) : 2528.

Miller, C.O. and others. "Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid." J. Am. Chem. Society 77 (1955) : 1392.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Morton, Harry E. and others. "Toxicity and antibiotic activity of kojic acid produced by *Aspergillus luteovirescens*." J. Bacteriol. 50 (1945) : 579-584.

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

Nickell, L.G.. "Effect of coconut milk on the growth in vitro of plant virus tumor tissue." Bot. Gaz. 112 (1950) : 225-227.

Ogawa, A. and others. "Production of kojic acid by Membrane - Surface Liquid Culture of *Aspergillus oryzae* NRRL 484." J. Ferment. Bioeng. 80 (1) (1995) : 41-45.

Ohyama, Y. and Y. Mishima. "Melanosis-inhibitory effect of kojic acid and its action mechanism." Fragrance J. 6 (1990) : 53-58.

Parrish, F.W. and others. "Production of aflatoxins and kojic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillium*." Appl. Microbiol. 14 (1) (1966) : 139.

Prescott, S. C. and C.G. Dunn. Industrial Microbiology. New York : McGraw-Hill, 1940.

Rapee, R. and J. Kannika. "Some Optimal Conditions for Kojic Acid Production by *Aspergillus oryzae* K-13." Abstracts (Biotechnology : prospects for the future) 14-15 November. Prachuap Khiri Khan, 1996.

Rao, A.N. and P.N. Avadhani. Some aspects of vitro culture of Vanda seeds : Proceeding of the fourth world orchid conference. Singapore : Straits Times press, 1963.

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

Shantz, E.M. and F.C. Steward. "The identification of the compound from coconut milk as 1,3 - diphenylurea." J. Am. Chem. Society 77 (1955) : 6351-6355.

Stanbury, P.F. , A. Whitaker and S. J. Hall. Principles of Fermentation Technology. Oxford : Elsevier Science, 1995.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tadera, K., Yahi F. and A. Kobayashi. "Effects of cycasin on kojic acid - producting molds." Agric. Biol. Chem. 49 (1) (1985) : 203-205

Uchino, K. and others. "Kojic acid as an anti-speck agent." Agric. Biol. Chem. 52 (10) (1988) : 2609-2610.

Vanderbelt, J.M.. "Nutritive value of coconut." Nature 156 (1945) : 174-175.

Van Overbeek, J., M.F. Conklin and A.F. Blakeslec. "Factor in coconut milk essential for growth and development of very young Datura embryos." Science 94 (1941) : 350-351.

Wei, C. J. and others. "Production of kojic acid by *Aspergillus candidus* in three culture media." J. Food Protec. 54 (1991) : 546-548.

Wodroof, J.G. Domestic and industrial coconut products. Coconut ; Production, processing, products. Westpost, Connecticut : The AVI Publishing Company Inc. 1970.

Yabuta, T. "Kojic acid, new organic acid formed by *Aspergillus oryzae*." Chem. Abstr. 7 (1913) : 2191-2192.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร PDA (Potato Dextrose Agar)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDA 39 กรัม ซึ่งประกอบด้วย

Glucose	20 กรัม
Agar Powder	15 กรัม
Potato	300 กรัม

ต้มมันฝรั่งที่ปอกเปลือกและหั่นในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการกรองเอาน้ำใส ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารของ Kwak และRhee (1992)

ซึ่งประกอบด้วย

Yeast extract	0.50 กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	0.70 กรัม
K_2HPO_4	0.25 กรัม
KH_2PO_4	0.25 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.25 กรัม
30 % HCl	0.50 มิลลิลิตร
2 % $MnSO_4.7H_2O$	0.50 มิลลิลิตร
2 % $FeSO_4.7H_2O$	0.50 มิลลิลิตร
3 % $ZnSO_4.7H_2O$	0.50 มิลลิลิตร
glucose	100.00 กรัม

ปรับพีเอชเท่ากับ 6.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้มีปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.
การวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กรดโคจิก ตามวิธีของ Bentley (1957)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและเหมาะสม จากการใช้สารละลายเฟอริกคลอไรด์ทำปฏิกิริยากับสารประกอบพวกแอลฟา-ไฮดรอกซิลแอซิด (α-hydroxy acids) และสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)ให้สารละลายสีแดงเกิดขึ้น

สารเคมี

1. สารละลายเฟอริกคลอไรด์ (ferric chloride) ร้อยละ 1 โดยใช้เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$ ของ Merck) 1.0 กรัม ละลายใน 0.1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอริก (HCl ของ J.B. Baker) จำนวน 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายกรดโคจิกมาตรฐานของ Sigma โดยใช้สารละลายกรดโคจิกซึ่งมีกรดโคจิกความเข้มข้นต่างๆกันดังนี้คือ 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. ปิเปตต์สารตัวอย่างที่จะวัดปริมาณกรดโคจิกมา 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ ทำ blank ควบคู่กันไปโดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างเป็นตัวเปรียบเทียบ

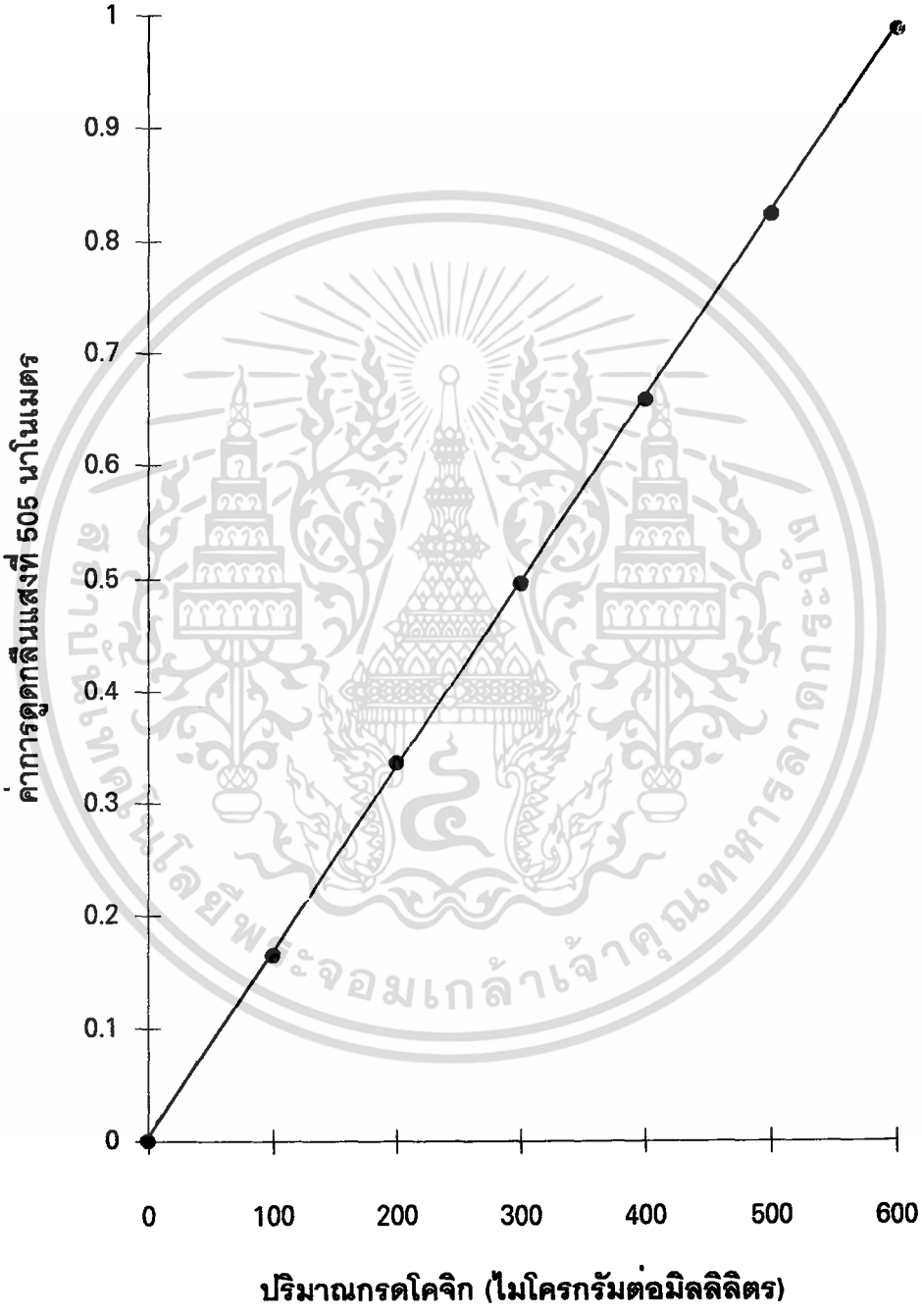
2. เติมเฟอริกคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับ blank ด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยใช้ cuvette แก้ว

4. ทำกราฟมาตรฐานที่ใช้สารละลายกรดโคจิกมาตรฐานความเข้มข้นตั้งแต่ 100 - 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดโคจิก อ่านค่ากรดโคจิกของตัวอย่างที่ต้องการจากกราฟมาตรฐานในส่วนที่เป็นเส้นตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 28



กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี phenol - sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956)

วิธีการนี้เป็นการใช้กรดเข้มข้นย่อยให้พอลิแซ็กคาไรด์เป็นโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งสามารถวัดน้ำตาลได้ประมาณ 1-100 ไมโครกรัม และเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอย่างไม่เฉพาะเจาะจง เพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิวซ์หรือ neutral sugar ทั้งชนิดที่เป็นโมโนแซ็กคาไรด์และพอลิแซ็กคาไรด์ สามารถวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีนี้

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4 ของ Merck)
2. สารละลายฟีนอลเข้มข้นร้อยละ 5 เตรียมโดยละลายฟีนอล (phenol : C_6H_5OH ของ Merck) 5 กรัม ในน้ำกลั่นเติมน้ำจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร
3. สารละลายซูโครสมาตรฐานของ Merck โดยใช้สารละลายซูโครสซึ่งมีความเข้มข้นต่างๆ กันดังนี้ 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

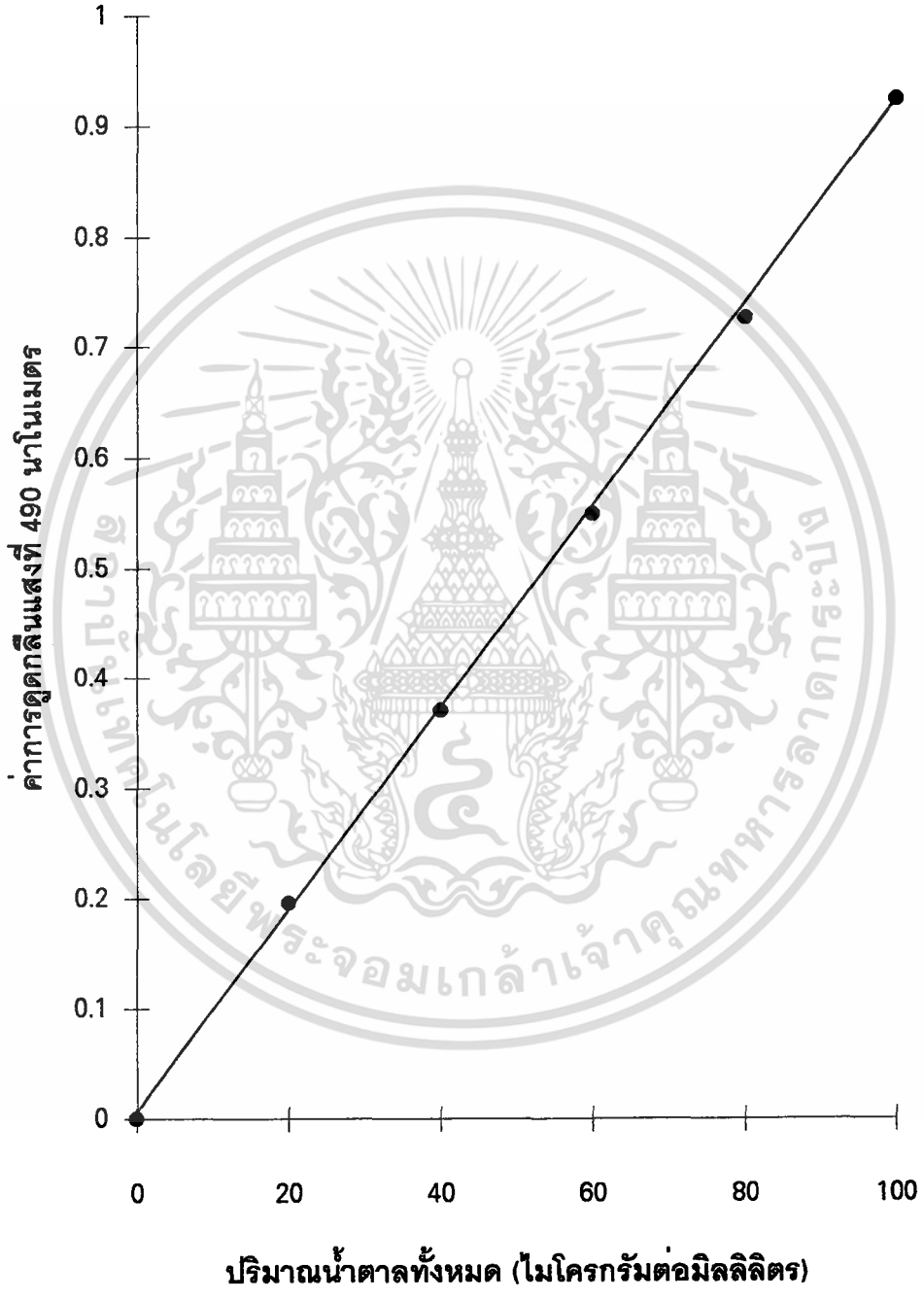
1. ปิเปตต์สารตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบทำ blank ควบคู่กันไปโดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างเป็นตัวเปรียบเทียบ
2. เติมสารละลายฟีนอลร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่หลอดทดสอบในน้ำเย็น
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันทีตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าอีกครั้ง

4.นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับblankด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

5. ทำกราฟมาตรฐานที่ใช้สารละลายซูโครสมาตรฐานความเข้มข้นระหว่าง 20 - 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลซูโครส อ่านค่าน้ำตาลซูโครสของตัวอย่างที่ต้องการจากกราฟมาตรฐานในส่วนที่เป็นเส้นตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 29



กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ดัดแปลงจากวิธีของ Kwak และ Rhee (1992)

วิธีการ

1. นำตัวอย่างมา 10 มิลลิลิตร
2. กรองด้วยชุดกรองผ่านกระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 1 ที่ผ่านการอบแห้งชั่งน้ำหนักแล้ว
3. อบในตู้อบที่ 90 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิกเคเตอร์
4. ชั่งน้ำหนักโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

จากสูตรดังนี้คือ $$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง} = \frac{(W_2 - W_1) \times 1000}{V}$$

W_1 คือ น้ำหนักกระดาษกรอง (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักเซลล์กับกระดาษกรอง (กรัม)

V คือ ปริมาตรที่ใช้ (มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การวิเคราะห์อะฟลาทอกซิน โดยวิธี AFLATOXIN B_1 ELISA TEST KIT. ตามวิธีของกองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

การตรวจสอบโดยวิธีนี้ใช้เวลาสั้นประมาณ 1 ชั่วโมงหลังจากเตรียมตัวอย่าง สามารถตรวจสอบสารพิษอะฟลาทอกซินได้ต่ำสุดถึง 0.1 พีพีบี วิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน เป็นวิธีที่ง่ายปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติ และช่วยลดมลพิษเนื่องจากสารเคมีที่ใช้ไม่เป็นอันตราย

สารเคมี

1. PBS (Phosphate-buffered saline) เข้มข้น 0.01 โมลาร์

ซึ่งประกอบด้วย $NaH_2PO_4.H_2O$ 0.88 กรัม

Na_2HPO_4 4.77 กรัม

NaCl 34.00 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 4000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 7.4

2. SDB (Sample and standard dilution buffer)

ซึ่งประกอบด้วย Methanol 7.00 มิลลิลิตร

PBS 92.00 มิลลิลิตร

DMF (dimethylformamide) 1.00 มิลลิลิตร

3. BSA-PBS buffer (0.1 % BSA ใน 0.01 โมลาร์ PBS)

ซึ่งประกอบด้วย BSA (Bovine serum albumin) 100.00 มิลลิกรัม

0.01 โมลาร์ PBS 100.00 มิลลิลิตร

4. Washing buffer

ซึ่งประกอบด้วย Tween 80 0.50 มิลลิลิตร

0.01 โมลาร์ PBS 1000.00 มิลลิลิตร

5. H_2O_2 (Peroxidase solution B)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. TMB (Peroxidase substrate ของ KPL : Kirkegaard & Perry Laboratories)

7. Enzyme conjugate

8. สารละลายอะฟลาทอกซินบี 1 มาตรฐานของ sigma โดยละลายอะฟลาทอกซินซึ่งมีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 0, 0.01, 0.05, 0.1 และ 0.5 พีพีบี (นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร)

วิธีการ

1. นำสารตัวอย่างมาทำการเจือจาง 5 เท่า โดยใช้สารตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ผสม SDB 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. ปิเปตต์สารตัวอย่างที่เจือจางใส่ลงเพลท 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ทำสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซินควบคู่ไปด้วย

3. ปิเปตต์ enzyme conjugate ที่เจือจางแล้ว (enzyme conjugate 2 vail ผสมสารละลาย BSA-PBS 8 มิลลิลิตร) ใส่ลงในเพลท 50 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าเบาๆให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. เทสารในเพลททิ้ง จากนั้นล้างหลุมด้วย washing buffer โดยเริ่มจากล่างขึ้นบนแล้ววางทิ้งไว้ 3 นาที เททิ้งและทำซ้ำอีก 2 ครั้ง ครั้งสุดท้ายให้คว่ำเพลทและสบัดให้สะเด็ดน้ำ

5. ปิเปตต์สารละลาย H_2O_2 ผสมกับ TMB (อัตราส่วน 1: 1) ปริมาณ 100 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ในที่มืด 5-10 นาที

6. เติมสารละลาย TMB 100 ไมโครลิตรต่อหลุม

7. อ่านปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยเครื่อง Micro ELISA Reader วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุกัญญา สายธิ เกิดวันที่ 21 กันยายนที่จังหวัดลำปาง สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตลำปาง ปีการศึกษา 2536 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตั้งแต่ปีการศึกษา 2537 จนถึงปีการศึกษา 2540

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้