สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตกรดโคจิกจากแป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดโดยเชื้อ *ASPERGILLUS* SP. BR1

Kojic Acid Production from Corn Starch Hydrolyzed with Acid by *ASPERGILLUS* SP. BR1

T104447

สิงหลกะ สืบท้าว
ปิยภัทร พงษ์ไพโรจน์
เมธินี สันติสุธีรวุฒิ

TP180
2551
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 104447
วัน,เดือน,ปี 2 พ.ย. 2552
b 12142086
i.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kojic Acid Production from Corn Starch Hydrolyzed with Acid by *ASPERGILLUS* SP. BR1

SINGHOLLAKA SUEBTAO

PIYAPAT PONGPAIROJD

MATHINEE SUNTISUTHEERAWOOT

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTIAL MICROBIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตกรดโคจิกจากแป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดโดยเชื้อ *ASPERGILLUS* SP. BR1

Kojic Acid Production from Corn Starch hydrolyzed with Acid by *ASPERGILLUS* SP. BR1

ชื่อนักศึกษา นาย สิงหลกะ สืบท้าว

นาย ปิยภัทร พงษ์ไพโรจน์

นางสาว เมธินี สันติสุธีรวุฒิ

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2551

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ประธาน รศ.ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ ผศ.มงคล เพ็ญสายใจ	

(ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม)

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การผลิตกรดโคจิกจากแป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดโดยเชื้อ *ASPERGILLUS* SP. BR1
นักศึกษา	นาย สิงหลกะ สืบท้าว
	นาย ปิยภัทร พงษ์ไพโรจน์
	นางสาว เมธินี สันติสุธีรวุฒิ
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2551
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหารเหลวโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน และการใช้แหล่งอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนคือ ยีสต์สกัด น้ำแช่ข้าวโพด โซเดียมไนเตรทและแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าสูตรอาหารที่ให้การผลิตกรด โคจิกสูงสุดประกอบด้วย แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรด 60 กรัมต่อลิตร $NaNO_3$ 5 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 1 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร พีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 โดยเพาะเลี้ยงในฟลาสก์บนเครื่องเขย่า ที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน พบว่าให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุด 6.48 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Kojic Acid Production from Corn Starch Hydrolyzed with Acid by *ASPERGILLUS* SP. BR1	
Student	SINGHOLLAKA	SUEBTAO
	PIYAPAT	PONGPAIROJD
	MATHINEE	SUNTISUTHEERAWOOT
Degree	Bachelor of science	
Major	Industrial Microbiology	
Academic Year	2008	
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nuanphan Naranong	

ABTRACT

Kojic acid production by *Aspergillus* sp. BR1 using corn starch hydrolyzed with hydrochloric acid as carbon source with organic and inorganic nitrogen sources (yeast extract, corn steep liquor, sodium nitrate, ammonium sulfate) was studied. An optimal production medium contained (g/L) : corn starch(hydrolyzed with acid), 60; $NaNO_3$, 5; K_2HPO_4, 1; $MgSO_4.7H_2O$, 0.5 and initial pH of 4.0. The maximum kojic acid concentration was 6.48 g/L on day 4 of cultivated when the fungus was cultivated in shake flasks with the shaking speed of 180 rpm at room temperature for 7 days.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานพิเศษในหัวข้อเรื่อง การผลิตกรดโคจิกจากแป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 โครงงานพิเศษนี้จะไม่สามารถบรรลุจุดประสงค์ไปได้ด้วยดีหากไม่ได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลเหล่านี้

ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงางนพิเศษที่ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ตลอดการดำเนินงาน ช่วยแก้ไขปัญหาและข้อบกพร่องต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานจนกระทั่งโครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดวงใจ โอชัยกุล และ ผศ.มงคล เพ็ญสายใจ ที่ให้คำปรึกษา และกรุณาสละเวลาตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ที่กรุณาอบรมสั่งสอนให้คำแนะนำตลอดการศึกษา รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ที่กรุณาอบรมสั่งสอน และเป็นกำลังใจในการทำโครงงานให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณพี่ปริญญาโททุกท่าน ที่ช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ ทำให้โครงงานพิเศษนี้สามารถดำเนินการได้อย่างราบรื่น

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ที่คอยเป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือตลอดการดำเนินงาน

สุดท้ายผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ หากมีข้อผิดพลาดประการใดต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ด้วย

สิงหลกะ สืบท้าว
ปิยภัทร พงษ์ไพโรจน์
เมธินี สันติสุธีรวุฒิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงาน	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 กรดโคจิก	3
2.2 การผลิตกรดโคจิก	4
2.2.1 เชื้อจุลินทรีย์	4
2.2.2 เชื้อราสกุล *Aspergillus* spp.	4
2.2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	5
2.2.4 ความสำคัญของเชื้อ *Aspergillus* spp. ในอุตสาหกรรม	5
2.3 การสังเคราะห์กรดโคจิก	7
2.4 ประโยชน์ของกรดโคจิก	8
2.4.1 อุตสาหกรรมด้านความงาม	8
2.4.2 อุตสาหกรรมอาหาร	8
2.4.3 การยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา	9
2.4.4 ด้านอุตสาหกรรมฟอกหนัง	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.4.5 ด้านการแพทย์	9
2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก	10
2.5.1 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน	10
2.5.2 แหล่งแร่ธาตุต่างๆ	12
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	13
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	13
3.1.1 อุปกรณ์	13
3.1.2 สารเคมี	13
3.1.3 เชื้อจุลินทรีย์	14
3.2 วิธีการทดลอง	14
3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อสปอร์	14
3.2.2 การย่อยแป้งดิบด้วยกรด	14
3.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิก	15
3.2.4 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิก	15
3.2.5 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิก	15
3.2.6 การศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากแป้งข้าวโพดที่ถูกย่อยด้วยกรดเปรียบเทียบกับสูตรอาหารเดียวกันแต่ใช้แป้งที่ไม่ได้ย่อยด้วยกรด	15
3.3 วิธีวิเคราะห์	16
บทที่ 4 ผลการทดลอง	17
4.1 ผลการย่อยแป้งด้วยกรด	17
4.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งดิบที่ย่อยด้วยกรดที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก	18
4.3 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก	23
4.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.5 ผลการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดและไม่ได้ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน	35
สรุปผลการทดลอง	38
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	43
ก.1 อาหาร Starch medium	43
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์	44
ข.1 การวิเคราะห์กรดโคจิก	44
ข.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์	46
ข.3 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 เชื้อราที่สามารถผลิตอัลฟาทอกซินและกรดโคจิก	6
ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยแป้งดิบ ชนิดต่างๆกันด้วยกรด	17
ตารางที่ 4.2 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร	19
ตารางที่ 4.3 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร	20
ตารางที่ 4.4 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร	21
ตารางที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งข้าวโพดดิบ ความเข้มข้นต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนในทางสถิติ	22
ตารางที่ 4.6 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน	24
ตารางที่ 4.7 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน	25
ตารางที่ 4.8 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน	26
ตารางที่ 4.9 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน	27
ตารางที่ 4.10 ผลการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แหล่งไนโตรเจน ต่างกันในทางสถิติ	29
ตารางที่ 4.11 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน	31
ตารางที่4.12 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 4.13 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน 33

ตารางที่ 4.14 ผลการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจนในทางสถิติ 34

ตารางที่ 4.15 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน 36

ตารางที่ 4.16 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง โดยใช้แป้งข้าวโพดที่ไม่ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก 3

รูปที่ 2.2 แผนภาพการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแลคโตน 7

รูปที่ 2.3 แผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *A. flavus* 8

รูปที่ 4.1 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร 19

รูปที่ 4.2 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร 20

รูปที่ 4.3 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร 21

รูปที่ 4.4 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน 24

รูปที่ 4.5 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้ยีสต์สสกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน 25

รูปที่ 4.6 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน 26

รูปที่ 4.7 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน 27

รูปที่ 4.8 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร 31

รูปที่ 4.9 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร 32

รูปที่ 4.10 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร 33

รูปที่ 4.11 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน 36

รูปที่ 4.12 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดที่ไม่ได้ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป(ต่อ)

	หน้า
รูปที่ข.1 กราฟมาตรฐานกรดโคจิก	45
รูปที่ข.2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

กรดโคจิก (Kojic acid) ถูกค้นพบครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่นโดย Saito ในปี ค.ศ.1907 โดยแยกได้จากเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ที่เจริญบนข้าวนึ่ง ซึ่งข้าวนึ่งนี้ในประเทศญี่ปุ่นจะเรียกว่า โคจิ (Koji) ต่อมาในปี ค.ศ.1913 Yabuta ได้ศึกษาองค์ประกอบต่างๆของสารนี้และตั้งชื่อว่ากรดโคจิก (Kojic acid) โดยกรดโคจิกนั้นมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายด้าน โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางที่ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ทำให้ผิวขาว เนื่องจากโครงสร้างของกรดโคจิกนั้นคล้ายกับโครงสร้างของเอนไซม์ไทโรซิเนส ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนไทโรซีน (tyrosine) ไปเป็นเมลานิน (melanin) ซึ่งเมลานินนั้นเป็นสารที่ทำให้เกิดเม็ดสีในผิวหนังและในเนื้อเยื่อผักชนิดต่างๆ ดังนั้นจึงทำให้เกิดการแย่งจับกับสารตั้งต้นแบบแข่งขัน (competitive inhibition) ในขั้นตอนต่างๆ ในกลไกการผลิตเมลานิน (Chen และคณะ, 1991) นอกจากนี้ยังพบว่ากรดโคจิกยังสามารถป้องกันรังสีอัลตร้าไวโอเลตได้อีกด้วย (Brtko และคณะ, 2001)

การผลิตในระดับอุตสาหกรรม เชื้อราที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิก ได้แก่ *Aspergillus* spp. และ *Pencillium* spp. แหล่งคาร์บอนที่ใช้ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครสและแป้ง แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ยีสต์สกัด ทริปโตนและน้ำแช่ข้าวโพด (Bajpai และคณะ, 1982) ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมมีผลต่อการผลิตกรดโคจิกเป็นอย่างยิ่ง องค์ประกอบที่เหมาะสมนี้แตกต่างกันในแต่ละกรณีการเลี้ยง (Futamura และคณะ, 2001) และการควบคุมพีเอช (Rosfarizan และคณะ, 2002)

การศึกษาเชื้อราที่ผลิตกรดโคจิกพบว่าส่วนใหญ่จะใช้น้ำตาลได้ดีกว่าแป้ง สำหรับเชื้อรา *Aspergillus* sp. BRl ซึ่งแยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากสามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิกได้ เมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าถ้าใช้ความเข้มข้นของแป้งสูงอาหารที่ได้จะมีความหนืดซึ่งส่งผลให้การเจริญของเชื้อราและการผลิตกรดโคจิกน้อยลง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการย่อยแป้งด้วยกรด พบว่าแป้งที่ถูกย่อยด้วยกรดจะทำให้แป้งบางส่วนเปลี่ยนเป็นน้ำตาลและโมเลกุลของแป้งเล็กลง เมื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนจะสามารถลดความหนืดของแป้งลงได้ ซึ่งน่าจะส่งผลดีต่อการเจริญของเชื้อ *Aspergillus* sp. BRl และการผลิตกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 หาสูตรอาหารที่เหมาะสมโดยการใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรด เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1

1.2.2 เปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวที่ใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยและไม่ย่อยด้วยกรด

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1.3.1 ศึกษาชนิดของแป้งดิบที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อรา

1.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยด้วยกรดที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวโดยเชื้อรา *Aspellgillus* sp. BR1

1.3.3 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลว

1.3.4 เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยและไม่ย่อยเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถนำแป้งดิบมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิกโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1

1.4.2 เป็นการนำวัตถุดิบราคาถูกมาใช้ประโยชน์เพื่อผลิตกรดโคจิกที่มีราคาแพง

1.4.3 เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการขยายกำลังการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 กรดโคจิก (Kojic acid)

กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นกรดอินทรีย์ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Saito ในปี 1907 มีชื่อทางเคมีว่า 5 -hydroxy-2 –hydroxymethyl -4 -pyranone (Brtko และคณะ, 2001)

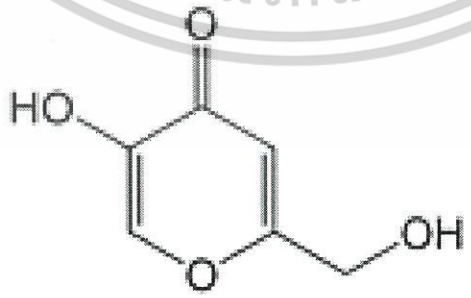
กรดโคจิกเป็นสารประกอบของสารไพโรน (pyrone) ที่ขาดกลุ่มคาร์บอกซิล โมเลกุลของกรดโคจิกประกอบขึ้นด้วย คาร์บอน 6 อะตอม ไฮโดรเจน 6 อะตอม และออกซิเจน 4 อะตอม ดังนั้นกรดโคจิกจึงมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_6O_4$ โครงสร้างทางเคมีแสดงในรูปที่ 2.1 กรดโคจิกมีมวลโมเลกุล 142.11 และทำให้บริสุทธิ์ได้โดยการตกผลึกซ้ำในอะซีโตน เอทานอล อีเทอร์ เมทานอล และเอทิลอะซิเตตหรือทำให้บริสุทธิ์ภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 150 – 200 องศาเซลเซียส และภายในโครงสร้างโมเลกุลของกรดโคจิกมีตำแหน่งต่างๆ ซึ่งมีผลต่อสมบัติทางเคมีของกรดโคจิก

หมู่ไฮดรอกซิล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ทำให้โมเลกุลมีลักษณะเป็นกรดอ่อนๆ สามารถถูกแทนที่ได้ด้วยโลหะหลายชนิดและที่ตำแหน่งนี้เมื่อถูกแทนที่แล้วจะทำให้เกิดอนุพันธ์ของกรดโคจิกมากมาย

คาร์บอนตำแหน่งที่ว่างตรงตำแหน่งที่ 3 และ 6 ไม่มีหมู่ใดมาแทนที่โดยเฉพาะตำแหน่งที่ 6 จะไวต่อปฏิกิริยาและทำให้เกิดอนุพันธ์ได้มากกว่าตำแหน่งที่ 3

หมู่คาร์บอกซิล โดยปกติไม่ทำปฏิกิริยากับสารประกอบประเภทคาร์บอนิล แต่จะทำปฏิกิริยากับโพแทสเซียมไซยาไนด์ ซึ่งจะทำให้กรดโคจิกอยู่ในรูปของเหลว

ตำแหน่งพันธะคู่ สามารถเติมไอโอดีนและโบรมีนเข้าไปทำปฏิกิริยากับพันธะคู่ เพื่อให้ได้อนุพันธ์ที่มีสมบัติแตกต่างกันออกไป (Bajpai และคณะ, 1982)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก

ที่มา : http://www.rsc.org/Publishing/Journals/NP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การผลิตกรดโคจิก

2.2.1 เชื้อจุลินทรีย์

กรดโคจิกผลิตจากเชื้อราสกุล *Aspergillus* หลายสายพันธุ์ โดยใช้คาร์โบรไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่าการผลิตกรดโคจิกต้องการอากาศในการเจริญ (Rosfarizan และคณะ ,2000)

กรดโคจิกเริ่มมีการผลิตครั้งแรกจากเชื้อ *A. oryzae* และต่อมามีการศึกษาการผลิตกรดโคจิกด้วยเชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ต่างๆดังนี้คือ *A. flavus, A. oryzae, A. awamori, A. fumigatus, A. clavatus, A. giguntiys, A. albus, A. nidulan, A. parasiticus, A. effutus, A. tamari, A. wentii, A. lutiovirescwns* และ *A. alliaceus* เป็นต้น (Bajpai และคณะ,1982)

กรดโคจิกส่วนมากผลิตจากเชื้อราโดยใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่างกันเช่นใช้ กลูโคส ซูโครสและแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ยีสต์สกัด เปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจน (Wan และคณะ 2004) การสังเคราะห์กรดโคจิกจะเกิดขึ้นในสภาวะที่มีการให้อากาศ (Bently, 1957)

มีการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อราในสกุล *Aspergillus* หลายสายพันธุ์พบว่าเชื้อราบางชนิดนอกจากผลิตกรดโคจิกแล้วยังผลิตสารอื่นๆอีก ดังแสดงตารางที่ 2.1 ถึงแม้จะเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะต่างๆ ทั้งอาหาร พีเอช อุณหภูมิ ความต้องการออกซิเจนและการคำนวณระบบการทำงานของถังให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดโคจิก แต่ก็ยังไม่สามารถกำหนดค่าสภาวะที่เหมาะสมได้เนื่องจากตัวแปรต่างๆ (Futamura และคณะ, 2001)

2.2.2 เชื้อราสกุล *Aspergillus* spp.

ลักษณะทั่วไปของ *Aspergillus* เชื้อราสกุล *Aspergillus* จัดอยู่ใน

Division Eumycota

Subdivision Ascomycotina

Class Plectomycetes

Order Eurotiales

Family Eurotiaceae

Genus *Aspergillus*

เชื้อราสกุล *Aspergillus* จัดเป็นเชื้อราฉวยโอกาสที่พบบ่อยที่สุด เป็นเชื้อราที่มีถิ่นที่อยู่กว้างขวางทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อน ในอากาศทุกหนแห่งมีโคนิเดียของเชื้อราชนิดนี้ปนอยู่ นอกจากนี้ยังพบมากในดินเจริญได้ในอินทรีย์วัตถุทุกชนิดซึ่งก่อให้เกิดผลดีและผลเสียโดยเฉพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในเขตประเทศร้อนชื้น เชื้อ *Aspergillus* ทำให้เครื่องหนัง เช่น กระเป๋า รองเท้า ตลอดจนเสื้อผ้าเสียหาย *A. fumigatus, A. flavus, A. niger* และ สปีชีส์อื่นๆ ทำให้เกิดโรค Aspergillosis ซึ่งมีอาการคล้ายวัณโรค บางชนิดทำให้หูอักเสบได้ (พรรณกร, 2535)

2.2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Aspergillus spp. มีโคโลนีมีสีต่างๆ กันขึ้นได้ที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ขึ้นได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส คุณสมบัติของเชื้อ *Aspergillus* สรุปดังนี้

จัดเป็นเชื้อราที่มีผนังกั้น (septate hypha) ชนิดสายราไม่มีสีมีก้านชู (conidiospore) งอกตรงจากสายรา ตำแหน่งที่ก้านชูงอกตรงจากสายราเรียกว่า foot cell ซึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่าสายราและมีขอบเขตที่ชัดเจน ปลายของก้านชูจะพองออกเป็นกระเปาะ (vesicle) บนกระเปาะมีติ่ง (phialide) ชั้นเดียว (unseriate) หรือ 2 ชั้น (biseriate) ติ่งอาจเกาะรอบกระเปาะ หรือเพียงบางส่วนของกระเปาะปลายติ่งเป็นที่เกิดของโคโลนี (phialo conidia) ซึ่งมีเซลล์เดียว มักมีรูปร่างกลมโคโลนีอ่อนจะอยู่ปลายติ่ง เวลาที่โคโลนีอ่อนเกิดจะดันโคโลนีแก่ออกไปจึงปรากฏโคโลนีเป็นสาย (basipetal chain) รูปของกระเปาะกลมหรือเป็นรูปโดมมีติ่งชั้นเดียวหรือสองชั้นโคโลนีผิวขรุขระหรือผิวเรียบ ใช้แยกสายพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Aspergillus* ในวุ้น Czapex Dox ซึ่งมีซูโครส 3 เปอร์เซ็นต์ ใช้วุ้นมาตรฐานที่จะดูสีและลักษณะทางจุลชีววิทยาของเชื้อ *Aspergillus*

กลุ่ม *Aspergillus* spp. พวกอื่นมีเส้นใยแบบมีผนังกั้น โดยโคนิดิโอฟอร์มีผิวเรียบและไม่มีสี เวสซิเคิลมีรูปร่างกลม ส่วนใหญ่เป็น biseriate sterigma ตอนอายุยังน้อย ส่วนหัวของโคนิเดียจะมีรูปร่างกลมและมีสีน้ำตาลปนเหลือง เมื่อโตเต็มที่รูปร่างจะเปลี่ยนไปเป็น short column หรือ loose radiate และมีสีน้ำตาลอ่อน (พรรณกร, 2535)

2.2.4 ความสำคัญของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ในอุตสาหกรรม

เชื้อรา *Aspergillus* spp. มีบทบาทสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร การผลิตสารเคมีในอุตสาหกรรม โดยเชื้อราในกลุ่มนี้ได้แก่ เชื้อรา *A. niger* หรือ *A. wetii* ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริกและกลูโคนิก นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์เพคติเนสได้ด้วยเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ (Pectzar และคณะ, 1986) รวมถึงการผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรมได้แก่เชื้อรา *A. oryzae* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไดเอสเตอร์ (diester) สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสไซรัป เชื้อรา *A. niger* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์อะไมเลสเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและอุตสาหกรรมการผลิตยาเป็นต้น (Stainerและคณะ,1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 เชื้อราที่สามารถผลิตอัลฟาทอกซินและกรดโคจิก

เชื้อจุลินทรีย์	อัลฟาทอกซิน	สารทุติยภูมิอื่นๆ
Aspergillus avenaceus	-	Avenaciolide
Aspergillus bombycis	B,G	Kojic acid
Aspergillus caelatus	-	Kojic acid
Aspergillus flavus	B,G	Aspergillic acid, cyclopiazonic acid, Kojic acid, nominine, paspaline, paspalinine
Aspergillus lanosus	-	griseofulvin, Kojic acid, met I
Aspergillus leporis	-	Antibiotic Y, Kojic acid, leporine, pseurotin
Aspergillus nomius	B,G	Aspergillic acid, Kojic acid, nominine, pseuotin
Aspergillus oryzae	-	Cyclopiazonic acid, Kojic acid
Aspergillus parasiticus	B,G	Aspergillic acid, Kojic acid, parasiticol, parasiticoline A
Aspergillus psuedotamarii	B	Cyclopiazonic acid, Kojic acid
Aspergillus sojae	-	Kojic acid
Aspergillus tamarii	-	Cyclopiazonic acid, fumigaclavine A, Kojic acid
Petromyces alliaceus	-	Asperlicine, Kojic acid, Kotanins, met I, nominine, ochratoxin A&B, paspaline

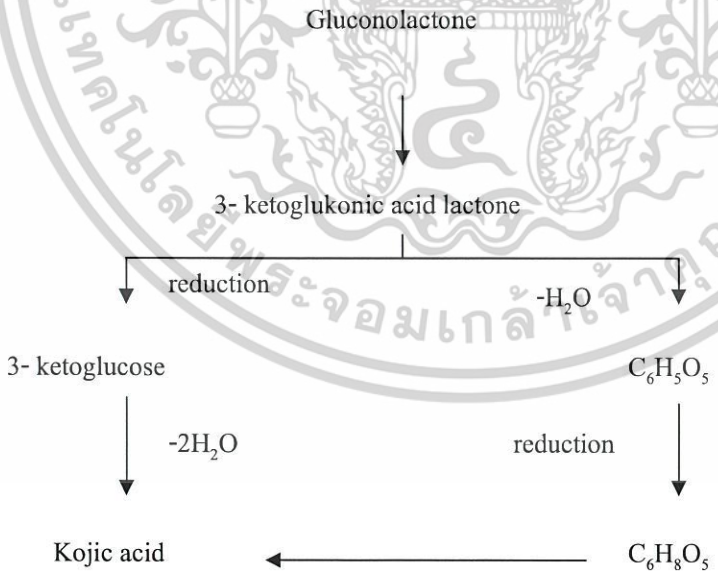
ที่มา : Schwartzburg, (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การสังเคราะห์กรดโคจิก

กรดโคจิกเป็นสารที่สามารถสังเคราะห์ได้จากน้ำตาลกลูโคส (D-glucose) การสังเคราะห์เริ่มจากกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็น กลูโคโนแลคโตน (gluconolactone) จากนั้นเปลี่ยนกลูโคโนแลคโตนเป็น 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแลกโตน (3-gluconic acid lactone) แล้วจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิก กระบวนการเกิดขึ้นได้ 2 วิถี คือ วิถีที่ 1 สาร 3- 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแลกโตน เปลี่ยนเป็น 3-คีโตกลูโคส (3-ketoglucose) จากนั้นมีการดึงน้ำออกจากโมเลกุลของ 3-คีโตกลูโคส ได้กรดโคจิก วิถีที่ 2 สาร 3-คีโตกลูโคนิคแอซิดแลคโตน มีการกำจัดหมู่ของน้ำออก 1 โมเลกุล ตามด้วยการเกิดรีดักชั่นและกำจัดโมเลกุลของน้ำ 1 โมเลกุลออกจาก $C_6H_5O_5$ จะได้กรดโคจิก ดังแสดงในรูปที่ 2.2 (Arnteins และBentley, 1953)

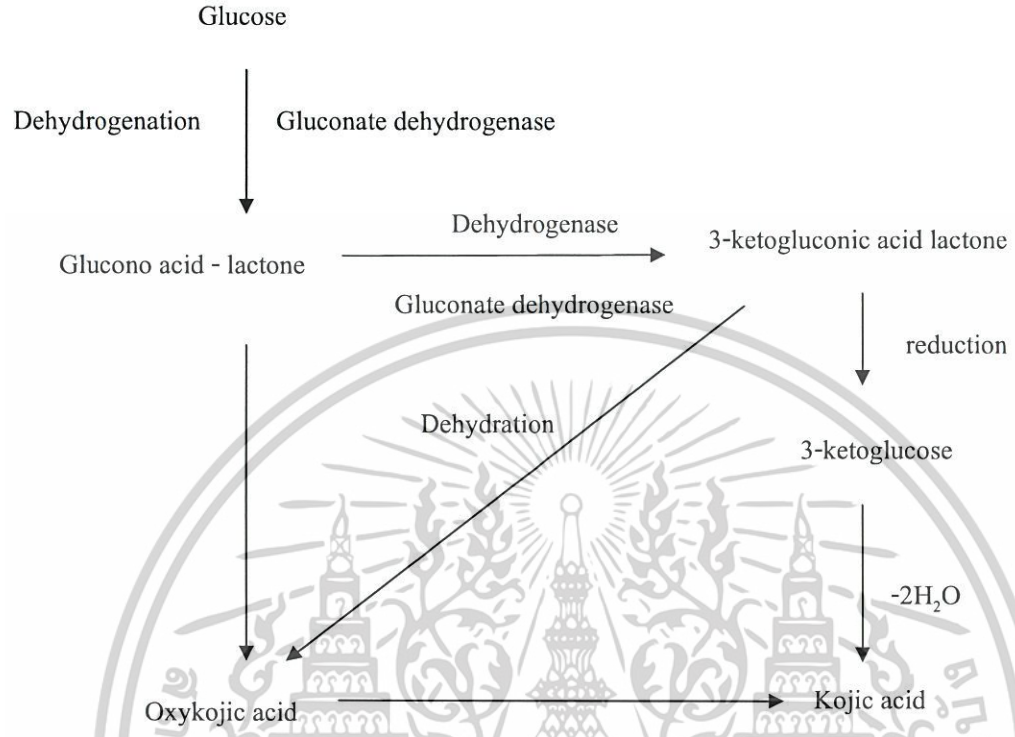
Bajpai และคณะ, (1981) ทำการศึกษาวิถีการสังเคราะห์กรดโคจิก เมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นจากเชื้อ *A. flavus* สายพันธุ์บี ซึ่งพบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างกระบวนการผลิตกรดโคจิก ได้แก่ เฮกโซไคเนส (hexokinase) กลูโคส-6-ฟอสเฟสดีไฮโดรจีเนส (6-phosphategluconate dehydrogenase) กลูโคสออกซิเดส (glucoseoxidase) และกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส (gluconate dehydrogenase) เอนไซม์ดังกล่าวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงเกิดการสร้างกรดโคจิก ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.2 แผนภาพการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแลคโตน

ที่มา: (Arnteinsและ Bentley, 1953)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 แผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *A. flavus*
ที่มา: (Bajpai และคณะ 1981)

2.4 ประโยชน์ของกรดโคจิก

2.4.1 อุตสาหกรรมด้านความงาม

กรดโคจิกออกฤทธิ์ยับยั้งหน้าที่ของ tyrosinase โดยจับกับ copper ซึ่งเป็น coenzyme ในกระบวนการสร้างสีผิว ความเข้มข้นของกรดโคจิก 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถทำให้ผิวขาวขึ้นได้เล็กน้อย ปัจจุบันมีการใช้ร่วมกับ hydroquinone แต่ผลการรักษายังไม่เป็นที่แน่นอน (บุษราภรณ์, 2551) นอกจากนี้กรดโคจิกยังช่วยป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) ได้ (Wan และคณะ, 2004)

2.4.2 อุตสาหกรรมอาหาร

กรดโคจิกสามารถป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (Burdock และคณะ, 2001) การเกิดสีน้ำตาลเกิดจากปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เกี่ยวข้องเช่น เมื่อมีผักและผลไม้มีรอยตำหนิเสียหายซึ่งเกิดจากรอยช้ำรอยปอก หั่น แช่แข็งหรือเป็นโรค ส่วนของเนื้อเยื่อที่มีตำหนิมีเอนไซม์อยู่เมื่อถูกอากาศจะเกิดเป็นสีน้ำตาลขึ้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลในผักผลไม้ เป็นกลุ่มของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ซึ่งเรียกชื่อรวมว่าฟีนอลเลส (phenolase) (Wei และคณะ, 1991) และในบางครั้งก็นำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการปรับปรุงรสชาดของอาหาร (Le Blanc และคณะ, 1989)

2.4.3 การยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อรา

มีการใช้กรดโคจิกอย่างกว้างขวางในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ และได้มีการทดสอบกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรดโคจิกในเรื่องของความเป็นไปได้ในการยับยั้งแบคทีเรีย (Ariff และคณะ, 1997) นอกจากนี้กรดโคจิกยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราพวก *Pythium araminicola, Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ทำลายเมล็ดธัญพืช (Kayaharaและคณะ, 1990)

2.4.4 ด้านอุตสาหกรรมฟอกหนัง

กรดโคจิกมีคุณสมบัติคล้ายแทนนิน (tannin) ซึ่งมีอยู่ทั่วไปในพืชและส่วนใหญ่เป็นพืชพวกไกลโคไซด์ (glycoside) มีมากในเปลือกต้นโอ๊คและฝาง มีความสามารถในการฟอกหนังสัตว์ได้โดยทำหน้าที่ในการตกตะกอนโปรตีนและแอลคาลอยด์ (Bajpai และคณะ, 1982)

2.4.5 ด้านการแพทย์

กรดโคจิกมีคุณสมบัติเป็นสารต้านเชื้อราและสารต้านการเกิดเนื้องอกได้ (Aytemir และคณะ, 2003) และได้มีการใช้อย่างแพร่หลายโดยเฉพาะการใช้เป็นสารต้านการติดเชื้อในแผล (Kayahara และคณะ, 1990)

นอกจากมีประโยชน์แล้วยังพบว่ากรดโคจิกมีความเป็นพิษโดย Friedemann (1934) ได้ศึกษาความเป็นพิษของกรดโคจิก โดยใช้สุนัขเป็นสัตว์ทดลอง โดยทำการฉีดกรดโคจิกปริมาณ 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้สุนัขมีอาการน้ำลายฟูมปาก อาเจียน ความดันเลือดสูง เกิดการง่วงนอนตลอดเวลาและอาจเกิดความพิการหรือผิดปกติ มีรายงานว่ามีการใช้เม็ดเลือดขาว (luecocyte) ทดลองโดยฉีดสารละลายโซเดียมโคเจต (Sodium kojate) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 6.8 พบว่าเม็ดเลือดขาวถูกทำลายภายในเวลา 3 ชั่วโมง ต่อมามีการทดลองกับเอ็มบริโอลูก ไก่อายุ 12 วัน โดยฉีดกรดโคจิกปริมาณ 12 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักไข่ พบว่าทำให้เอ็มบริโอลูกไก่อ่อนแอลง (Bajpai และคณะ, 1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก

2.5.1 แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน

คาร์บอนเป็นธาตุที่สำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และสร้างพลังงาน จุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50 - 55 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน และต้องเลือกใช้แหล่งคาร์บอนให้เหมาะสม

May และคณะ (1931) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลเด็กซ์โทรส ที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 10 15 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วย แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร ไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรท 1.125 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 วัน พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลเด็กซ์โทรสความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 48.2 เปอร์เซ็นต์

ในการผลิตกรดโคจิกแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมาจากแหล่งไนโตเจนอินทรีย์และแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ ทริปโตน ยีสต์สกัดและน้ำแช่ข้าวโพด เนื่องจากแหล่งไนโตเจนอินทรีย์มีราคาสูง ดังนั้นจึงมีการเสริมแหล่ง อนินทรีย์ไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแทน เช่น เกลือแอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นต้น การผลิตกรดโคจิกส่วนมากใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนหรืออาจมีการส่งเสริมสารอนินทรีย์ไนโตรเจนอื่นลงไป เช่น อาหารสูตรดัดแปลง Czapex-dox liquid medium ซึ่งมีส่วนประกอบของยีสต์สกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียมไนเตรท 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตเจน (Bentley, 1957)

สำหรับแหล่งไนโตรเจน สามารถใช้ได้ทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ ได้แก่ ทริปโตน ยีสต์สกัด น้ำแช่ข้าวโพด เกลือแอมโมเนียมไนเตรทและแอมโมเนียซันเฟต เป็นต้น (Stanbury และคณะ, 1995)

Ariff และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาสภาวะการให้อากาศและการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อรา *A. flavus* โดยใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบ Stirred-tank ที่ความเร็วรอบ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อนาที พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดโคจิกได้ 15.80 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อราที่ผลิตกรดโคจิกส่วนใหญ่ใช้ กลูโคส ซูโครส ซิเตรท เอทานอล อะราบิโนส และไซโลส ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ โดยเฉพาะดีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตกรดโคจิกเนื่องจากมีความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างกับกรดโคจิก (Rosfarizan และคณะ, 1998)

Rosfarizan และคณะ (1998) คัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยแป้งจากแหล่งต่างๆดังนี้คือ ดอกไม้ อาหารหมัก ผลไม้ น้ำพุร้อนและดิน พบว่าเชื้อที่แยกจากดอก morning glory flower ซึ่งเป็นไม้เถาชนิดหนึ่งตระกูลผักบุ้งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Bixa orellana* สามารถย่อยแป้งได้ดีที่สุด เมื่อทำการจำแนกพบว่าเชื้อราหมายเลข S33-2 มีลักษณะเหมือนเชื้อ *Aspergillus flavus* จากนั้นนำมาเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.50 กรัมต่อลิตร และใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆกันคือ แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าวโพด แป้งสาคูและน้ำตาลกลูโคส พบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวโพด 75 กรัมต่อลิตร ให้กรดโคจิกสูงสุด 12.80 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 20 รองลงมาคือ กลูโคส 50 กรัมต่อลิตรให้กรดโคจิก 12.10 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 16 และแป้งสาคู 50 กรัมต่อลิตรให้กรดโคจิกต่ำสุดเท่ากับ 0.3 กรัมต่อลิตร เห็นได้ว่าเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* S33-2 สามารถผลิตกรดโคจิกได้เนื่องจากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ แอลฟา–อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป

Futamura และคณะ (2000) ได้ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อกลายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* MK-107-39 โดยใช้อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรและใช้ โพลีเปปโตน 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งจะให้กรดโคจิกสูงสุด 28 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่า

Futamura และคณะ (2001) ทำการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* MK-107-39 ในถังหมักแบบอากาศยกตัวโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยบางส่วนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยสามารถผลิตกรดโคจิก 40 กรัมต่อลิตร และน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกสูงถึง 43 กรัมต่อลิตร

El-Aasar (2006) ได้ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus, Aspergillus glaucus*, *Aspergillus oryzae, Aspergillus parasiticus* และ *Aspergillus tamiraii* ที่แยกได้จากดินโดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสม เช่น แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และ พีเอชเริ่มต้น พบว่าเชื้อรานี้จะผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 34.38 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 6 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 1 เปอร์ เซ็นต์ โดยใช้พีเอช 5 บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 วันโดยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ณัฐลดาและคณะ (2548) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนโดยในการศึกษาได้ใช้แป้ง 3 ชนิดคือ แป้งสาลี แป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวโพดจาก การศึกษาพบว่าแป้งที่สามารถผลิตกรดโคจิกสูงสุดคือ แป้งข้าวโพด รองลงมาคือ แป้งข้าวเจ้าและ แป้งสาลีตามลำดับ

Rosfarizan และ Ariff(2007) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อรา *Aspergillus flavus* โดยใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส แป้งที่ย่อย และน้ำตาล ฟรุกโตส พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุด 45.30 และ 33.40 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

2.5.2 แหล่งแร่ธาตุต่างๆ

แร่ธาตุที่มีความสำคัญที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ แมกนีเซียม (Mg) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) ซัลเฟอร์ (S) แคลเซียม (Ca) และคลอรีน (Cl) นอกจากนี้ยังมี โคบอล (Co) คอปเปอร์ (Cu) เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) โมลิบดินัม (Mo) และสังกะสี (Zn) แร่ธาตุ ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในรูปสารอนินทรีย์ (Stanbury และคณะ , 1995)

มีการค้นพบอาหาร ที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(KH_2PO_4) และ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) เป็นส่วนประกอบ (Futamura และคณะ, 2001) ต่อมามีการ ค้นพบอาหารที่ใช้ผลิตกรดโคจิก คือ อาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapex-Dox liquid medium ที่มีการ ส่งเสริมแหล่งอาหาร คือ โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCI) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7\ H_2O$) และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7\ H_2O$) ลงในอาหารเหลว (Bently, 1957)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (larmina flow hood); Faster รุ่น Bio 48

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (autoclave); Hirayama รุ่น HA-300M IV

ตู้อบลมร้อน (hot air oven);Binder รุ่น FD 53

ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ; Sanyo

เครื่องเพาะเลี้ยงแบบเขย่า; Lab componion รุ่น SK-71

เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter); EUTECH instrument รุ่น pH510

กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope); Olympus CH 30

ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer); BOECO

ชุดกรองสาร ;Millipore

ขวดสำหรับบรรจุสาร ขนาด 50 มิลลิลิตร

ปิเปตต์แก้ว ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร

หลอดทดลอง (test tube) ;Pyrex

ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร(Flask) ;Pyrex

ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร(Flask) ;Pyrex

3.1.2 สารเคมี

โซเดียมไฮดรอกไซด์ 3 N (sodium hydroxide)

กรดไฮโดรคลอริก 0.1 N (hydrochloric acid)

กรดไฮโดรคลอริก 3 N (hydrochloric acid)

Soluble starch

เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3 . 6H_2O$) ;Ajax Finechem

ยีสต์สกัด(Yeast extract) ;Fluka

โซเดียมไนเตรท($NaNO_3$) ;Carlo Erba

โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(KH_2PO_4); Carlo Erba

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมกนีเซียมซัลเฟต($MgSO_4.7H_2O$); Sigma

แอมโมเนียมซัลเฟต($(NH_4)_2SO_4$) ;Fluka

น้ำแช่ข้าวโพด; Difco

น้ำตาลกลูโคส

Tween 80 ;Merck

ไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalisylic, DNS)

อาหาร PDA

แป้งข้าวโพด; ตราคนอร์

3.1.3 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยได้แก่ *Aspergillus* sp. BRI ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าในภาคตะวันออก เฉียงเหนือของประเทศไทยเก็บ ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสบนอาหารวุ้นเอียง PDA ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 4 เดือน

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1. การเตรียมหัวเชื้อสปอร์

เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหาร PDA ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน เติมน้ำกลั่นที่มีส่วนผสมของ ทวีน 80 (0.05 เปอร์เซ็นต์) ลงไปใน ฟลาสก์ 50 มิลลิลิตร ใช้ช้อนสแตนเลสขูดสปอร์ให้หลุดออกจากเส้นใยจนหมด นำไปกรองผ่านสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อแยกเส้นใยราที่ติดมาออกและใช้เป็นหัวเชื้อสปอร์ ตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) ปรับจำนวนสปอร์เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรอาหาร

3.2.2. การย่อยแป้งดิบด้วยกรด

เตรียมสารละลายแป้งดิบแต่ละชนิด (แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวโพด) โดยใช้ความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใส่ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของสารละลายแป้งดิบแต่ละชนิดด้วย 3N HCL จนค่าพีเอชเท่ากับ 2 จากนั้นนำไปย่อยในหม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีหลังจากสารละลายแป้งเย็นแล้วนำไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น เลือกชนิดและความเข้มข้นของแป้งที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3. การศึกษาความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิก

เตรียมอาหารเหลวสูตรของ อภิชญา(2548) ประกอบด้วยยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรต 2.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดปริมาณ 40 50 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนปรับพีเอชเป็น 4 เตรียมอาหารแต่ละสูตรใส่ฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตรปริมาตร 100 มิลลิลิตรหลังจากนึ่งฆ่าเชื้อ เติมหัวเชื้อสปอร์จากข้อ 3.2.1 โดยปรับให้มีสปอร์เริ่มต้น 1 x 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันวิเคราะห์หาปริมาณกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง เลือกความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดที่ให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุดเป็นแหล่งคาร์บอน

3.2.4 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิก

เตรียมอาหารสูตรที่ใช้ความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมที่ให้กรดโคจิกสูงสุดจากข้อ 3.2.3 เปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนเป็น แอมโมเนียมซัลเฟต น้ำแช่ข้าวโพด โซเดียมไนเตรทและยีสต์สกัดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากอาหารเย็นเติมหัวเชื้อสปอร์ลงในแต่ละฟลาสก์ให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น 1 x 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะเดียวกับ ข้อ 3.2.3 เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง แล้วนำแหล่งไนโตรเจนที่ผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุดไปหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไป

3.2.5 ศึกษาความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิก

เตรียมสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ให้กรดโคจิกสูงสุดจากข้อ 3.2.3 โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในสูตร ดังนี้ 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตรเลี้ยงในสภาวะเดียวกับข้อ 3.2.3 เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำหนักเซลล์แห้ง แล้วเลือกความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ผลิตกรดโคจิกสูงสุด

3.2.6 ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากแป้งข้าวโพดที่ถูกย่อยด้วยกรดเปรียบเทียบกับสูตรอาหารเดียวกันแต่ใช้แป้งที่ไม่ได้ย่อยด้วยกรด

เตรียมอาหารสูตรที่ได้จากจากข้อ 3.2.5 แล้วนำมาเปรียบเทียบกับอาหารสูตรเดียวกันโดยใช้แป้งที่ไม่ได้ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอนโดยเลี้ยงในสภาวะเดียวกับข้อ 3.2.3 ทำการเก็บตัว อย่างทุกวันเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 วิธีวิเคราะห์

3.3.1 การวิเคราะห์กรดโคจิก (ภาคผนวก ข 1)

3.3.2 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข 2)

3.3.3 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข 3)

3.3.4 วิธีวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (completely Randomized Design) และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการย่อยแป้งด้วยกรด

ผลการศึกษาการย่อยแป้งชนิดต่างกันเพื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อคัดเลือกชนิดของแป้งที่เหมาะสมมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิกโดยทำการย่อยแป้งที่ความเข้มข้นของแป้ง 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแป้งข้าวโพดมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ความเข้มข้นของแป้ง 5 เปอร์เซ็นต์ คือ 28.61 กรัมต่อลิตร

รองลงมาคือแป้งข้าวเจ้ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ คือ 17.20 กรัมต่อลิตรและแป้งมันสำปะหลังมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแป้งอีก 2 ชนิด คือ 5.60 กรัมต่อลิตรที่ความเข้มข้นของแป้ง 5 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุเนื่องมาจากแป้งมันสำปะหลังนั้นมีความหนืดสูงกว่าแป้งชนิดอื่นทำให้การละลายนั้นทำได้น้อยกว่าแป้งชนิดอื่นต่างจากแป้งข้าวโพดที่มีความหนืดน้อยการละลายน้ำจึงดีกว่าแป้งชนิดอื่น นอกจากนี้ในแป้งข้าวโพดยังมีปริมาณอะไมโลเพคตินสูงทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าแป้งชนิดอื่น(http://eu.lib.kmutt.ac.th/elearning/Courseware/BCT611/Chap2/chapter2_1) ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยแป้งดิบชนิดต่างๆ กันด้วยกรด

ชนิดของแป้ง	ความเข้มข้นของแป้ง (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)
แป้งมันสำปะหลัง	5	5.60
	10	5.00
แป้งข้าวเจ้า	5	17.20
	10	10.54
แป้งข้าวโพด	5	28.61
	10	15.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
104447

4.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งดิบที่ย่อยด้วยกรดที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

ในการศึกษาทำการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. BRI ในอาหารเหลวโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ผลการทดลองคือ ในวันแรกของการเพาะเลี้ยงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 26.60 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จะลดลงและมีการผลิตกรดโคจิก โดยในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงมีการผลิตกรดโคจิก 0.24 กรัมต่อลิตรและกรดโคจิกจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ 0.11 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 6 เท่ากับ 1.78 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อรามีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.67 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1

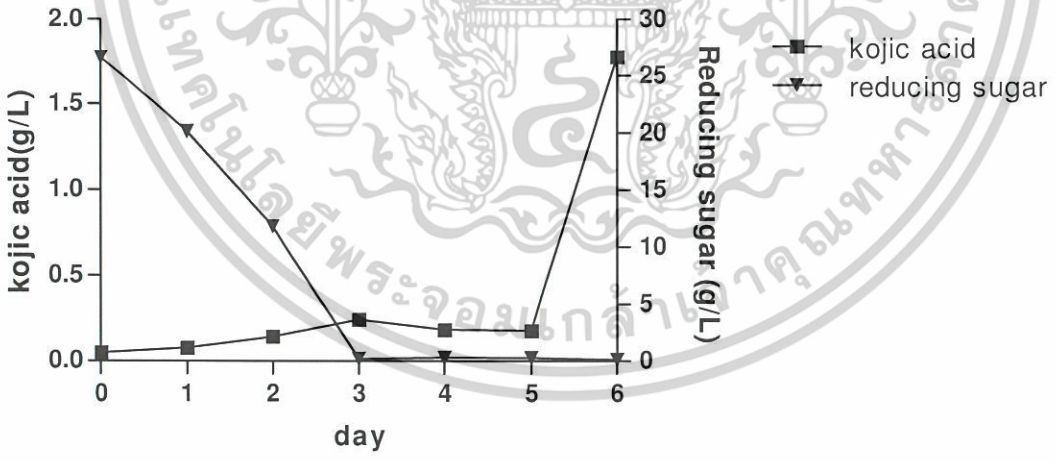
ในการศึกษาการใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ให้ผลการทดลองคือ ในวันแรกของการเพาะเลี้ยงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 24.76 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงและมีการผลิตกรดโคจิก โดยในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงมีการผลิตกรดโคจิกออกมาอย่างชัดเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ 0.19 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 6 เท่ากับ 1.76 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อรามีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.58 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.2

ในการศึกษาการใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลการทดลองคือ ในวันแรกของการเพาะเลี้ยงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 29.28 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงและมีการผลิตกรดโคจิก โดยในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงมีการผลิตกรดโคจิกออกมาอย่างชัดเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ 0.29 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 2.79 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อรามีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 10.89 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร

เวลา (วันที่)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.05	26.60	-
1	0.08	20.12	-
2	0.14	11.80	4.48
3	0.24	0.30	5.22
4	0.18	0.29	7.67
5	0.18	0.22	5.20
6	1.778	0.11	2.86

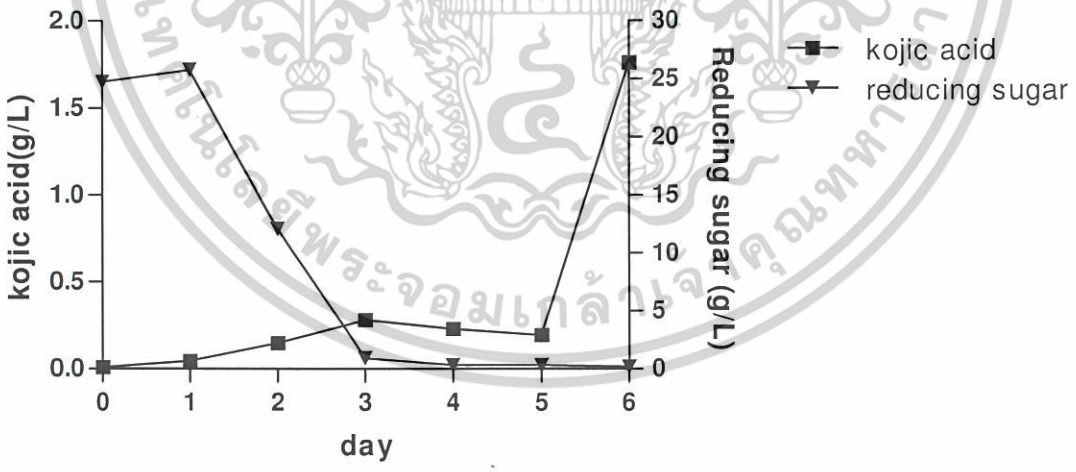


รูปที่ 4.1 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

เวลา (วันที่)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.01	24.76	-
1	0.05	25.80	-
2	0.15	12.12	4.78
3	0.28	0.93	6.15
4	0.23	0.32	7.58
5	0.19	0.31	4.11
6	1.76	0.19	2.92

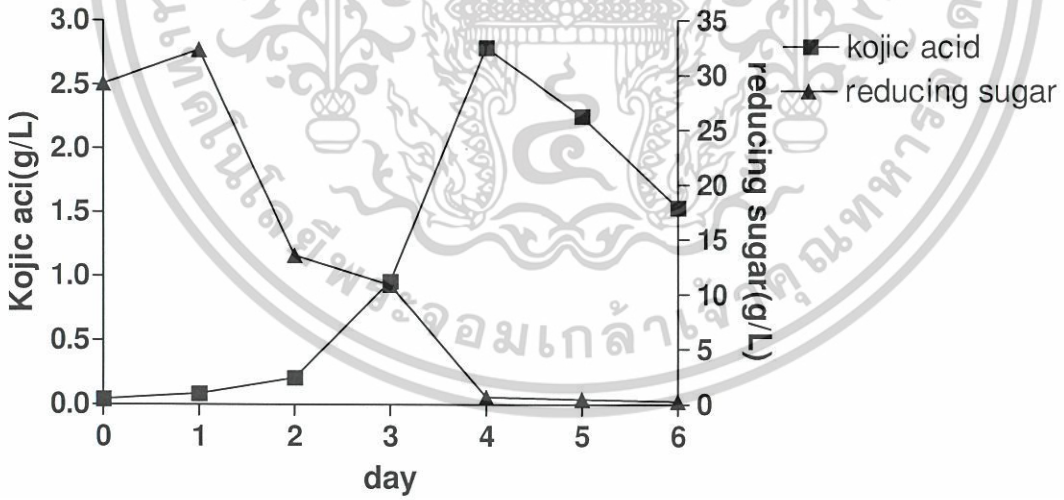


รูปที่ 4.2 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร

เวลา (วันที่)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.04	29.28	-
1	0.08	32.32	-
2	0.21	13.56	5.15
3	0.96	10.84	7.86
4	2.79	0.64	10.89
5	2.25	0.45	8.85
6	1.53	0.29	6.50



รูปที่ 4.3 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่าเมื่อทำการเพิ่มความเข้มข้นของแป้งดิบสูงขึ้นปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จะสูงขึ้นด้วยโดยจากการทดลองเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งดิบความเข้มข้นต่างกันให้ผลการทดลองคือ อาหารที่ใช้แป้งความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรนั้นให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง 2.789 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับการทดลองของ อภิชญา(2548) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิก พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 2.5 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร ให้การผลิตกรดโคจิกสุงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงคือ 8.45 กรัมต่อลิตร และการทดลองของ ณัฏยา และคณะ(2549) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งข้าวโพด โดยเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2. พบว่า เมื่อใช้แป้งข้าวโพดความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ให้การผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 3,730 หน่วยต่อมิลลิลิตร สำหรับการศึกษาของ Rosfarizan และคณะ (1998) ใช้แป้งสาคูที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส พบว่า เมื่อใช้แป้งสาคู 100 กรัมต่อลิตรสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 23.5 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการศึกษาของ Rosfarizan และคณะ ให้การผลิตกรดโคจิกสูงกว่า เพราะ ใช้เอนไซม์ทำการย่อยแป้งสาคูเพื่อเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลกลูโคสนั้นใช้ปริมาณแป้งมากกว่าจึงได้ปริมาณน้ำตาลสูงกว่าเชื้อรา *Aspergillus flavus* สามารถใช้น้ำตาลเพื่อผลิตกรดโคจิกได้ทันทีทำให้การผลิตกรดโคจิกสูงกว่า

เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของการใช้แป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยด้วยกรดทั้ง 3 ความเข้มข้นทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังนั้นจึงเลือกใช้แป้งข้าวโพดความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรทำการศึกาต่อไป ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งข้าวโพดดิบความเข้มข้นต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนในทางสถิติ

ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดดิบ (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
40	1.78^{b}
50	1.76^{b}
60	2.79^{a}

กำหนดให้ ตัวอักษรแตกต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตัวอักษรที่ไม่แตกต่างกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

ในการศึกษาทำการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. BRI ในอาหารเหลวโดยใช้โซเดียมไนเตรท ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ผลการทดลองคือ ในวันแรกของการเพาะเลี้ยง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 28.80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงและมีการผลิตกรดโคจิก โดยในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงมีการผลิตกรดโคจิกออกมาอย่างชัดเจน เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ 1.32 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 4.52 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อรามีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 17.86 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.4

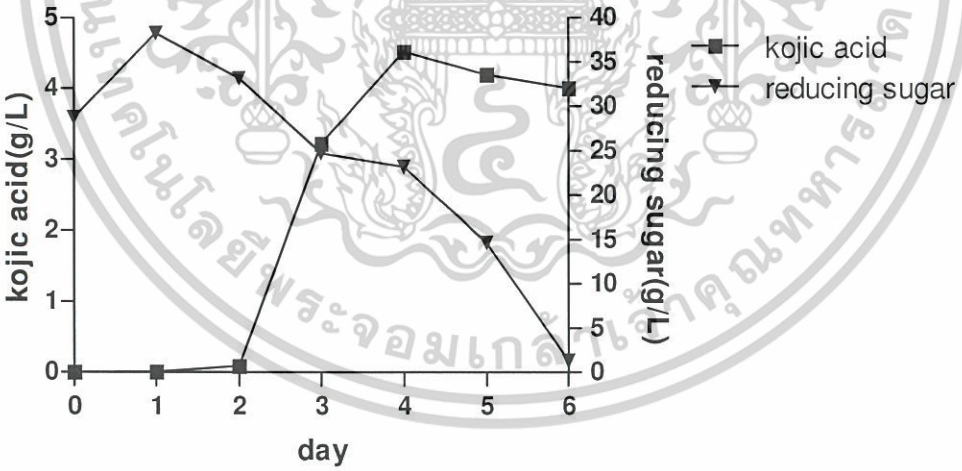
ในการศึกษาทำการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. BRI ในอาหารเหลวโดยใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ผลการทดลองคือ ในวันแรกของการเพาะเลี้ยง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 29.70 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงและมีการผลิตกรดโคจิก โดยพบว่ากรดโคจิกที่เชื้อผลิตมีปริมาณคงที่ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 6 คืออยู่ระหว่าง 0.01 – 0.15 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 0.550 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อรามีค่าสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 21.95 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.5

ในการศึกษาทำการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. BRI ในอาหารเหลวโดยใช้น้ำแช่ข้าวโพดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลการทดลองคือ ในวันแรกของการเพาะเลี้ยง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 26.52 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงและมีการผลิตกรดโคจิก โดยพบว่ากรดโคจิกที่เชื้อราผลิตตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 6 มีค่าคงที่ คืออยู่ระหว่าง 0.01– 0.10 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 0.37 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อรามีค่าสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 12.92 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วันที่)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.00	28.80	-
1	0.01	38.28	-
2	0.09	33.18	7.10
3	3.22	24.72	7.76
4	4.52	23.16	17.86
5	4.20	14.64	13.00
6	4.00	1.32	15.43

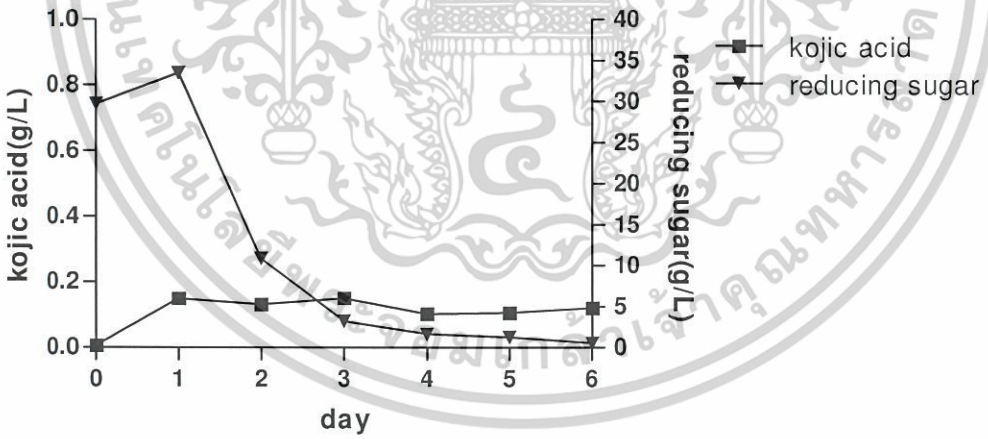


รูปที่ 4.4 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.7 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วันที่)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.01	29.70	-
1	0.15	33.48	-
2	0.13	10.86	12.48
3	0.15	3.24	13.08
4	0.10	1.62	16.93
5	0.11	1.27	21.95
6	0.12	0.55	17.5

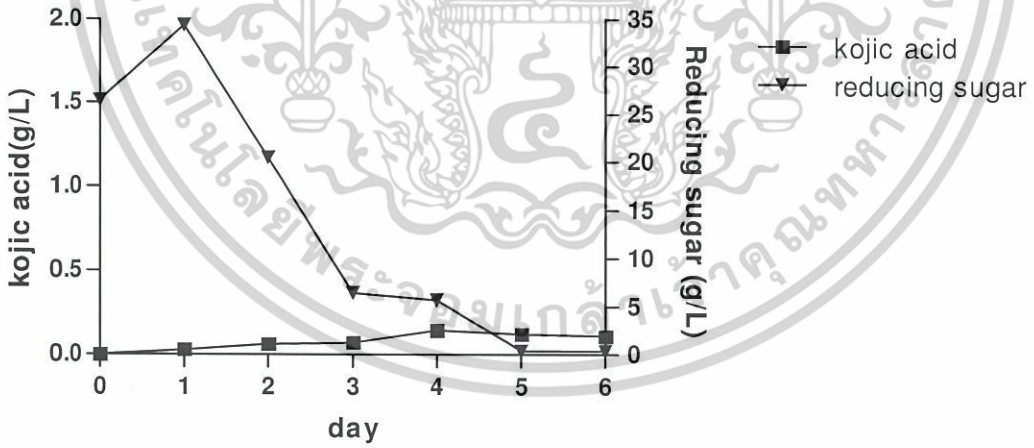


รูปที่ 4.5 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้น้ำแช่ข้าวโพด เป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วันที่)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.01	26.52	-
1	0.01	34.38	-
2	0.05	20.46	1.82
3	0.08	6.42	12.92
4	0.10	5.70	12.88
5	0.10	0.42	9.73
6	0.09	0.37	7.89

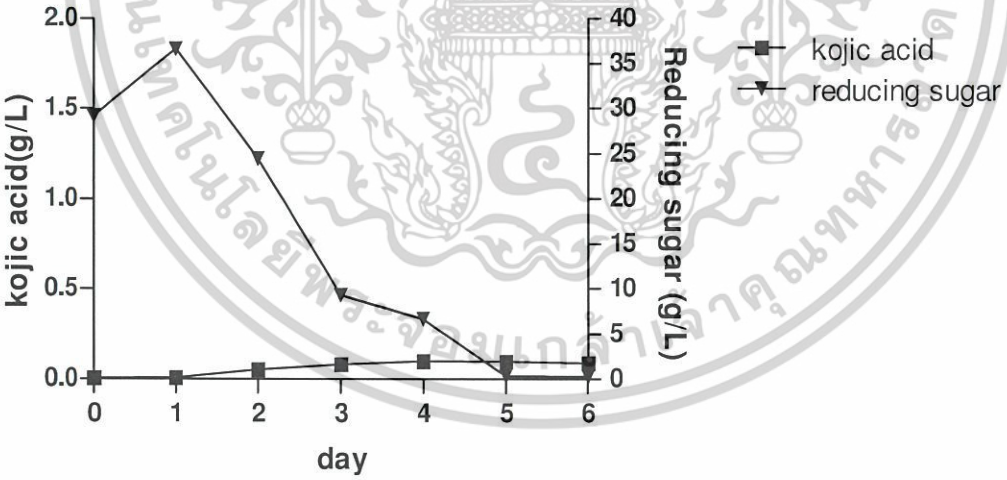


รูปที่ 4.6 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วันที่)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.00	29.16	-
1	0.03	36.66	-
2	0.06	24.48	0.75
3	0.07	9.30	1.36
4	0.15	6.66	1.58
5	0.12	0.34	1.17
6	0.11	0.29	1.26



รูปที่ 4.7 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาทำการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. BRI ในอาหารเหลวโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลการทดลองคือ ในวันแรกของ การเพาะเลี้ยง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 29.16 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ จะทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง และมีการผลิตกรดโคจิก โดยพบว่ากรดโคจิกที่เชื้อราผลิตจะคงที่ตั้งแต่วันที่ 0 ถึงวันที่ 6 คืออยู่ระหว่าง 0.00 - 0.15 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ 0.29 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อรามีค่าสูงสุดใน วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 1.58 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.7

ผลการทดลองสรุปได้ว่าอาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ผลการผลิตกรดโคจิกสูงสุด คือ 4.517 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคืออาหารที่ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนให้การผลิตกรดโคจิก 0.151 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนอาหารที่ใช้น้ำแช่ข้าวโพดและแอมโมเนียมซัลเฟตให้การผลิตกรดโคจิกน้อย โดยสอดคล้องกับการทดลองของ อภิชญา(2548) ที่ได้ศึกษาการใช้เกลืออนินทรีย์ไนโตรเจน 4 ชนิด คือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ และโซเดียมไนเตรท พบว่า เมื่อใช้โซเดียมไนเตรทให้การผลิตกรดโคจิก สุงสุด ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4.75 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ ยีสต์สกัด พบว่า การใช้ยีสต์สกัดให้การผลิตกรดโคจิกสูงกว่า การทดลองของ Kundu และคณะ(1973) ได้รายงานว่าแอมโมเนียมไนเตรทและโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลส และการทดลองของ Sadhukan และคณะ (1990) ได้ทดลองใช้โซเดียมไนเตรท โพแทสเซียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรียและกรดอะมิโนต่างๆที่ความเข้มข้นร้อยล่ะ 0.05 เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อรา พบว่าเมื่อใช้โซเดียมไนเตรทและโพแทสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่งผลให้การเจริญของเชื้อราและการผลิตเอนไซม์คล้ายกันคือ ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด แต่แตกต่างจากการทดลองของ ณัฐยา และคณะ(2549) ที่ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งข้าวโพด โดยเชื้อรา *Aspergillus* sp. REB2 ได้ทำการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างกัน คือ ยีสต์สกัด น้ำแช่ข้าวโพด โซเดียมไนเตรท และแอมโมเนียมไนเตรท พบว่า เมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนให้การผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด 4568.75 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนให้การผลิตเอนไซม์อะไมเลส 4305 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนน้ำแช่ข้าวโพดและแอมโมเนียมไนเตรทให้การผลิตต่ำสุด และแตกต่างจากการทดลองของ Futamura และคณะ(2001)ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* MK 107-39 โดยใช้ Wheat germ ร่วมกับ โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเมื่อใช้ Wheat germ 18.8 กรัมต่อลิตรและโซเดียมไนเตรท 0.3 กรัมต่อลิตร และใช้น้ำตาลกลูโคสความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุด 40 กรัมต่อลิตร จากนั้น Rofarizan และคณะ(2002) ได้ศึกษาการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตรให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุด 35-48 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองที่แตกต่างกัน เพราะใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งทำให้เชื้อรา *Aspergillus flavus* สามารถนำไปใช้ได้ทันที ดังนั้นจึงส่งผลต่อการผลิตกรดโคจิก

เมื่อเปรียบเทียบผลการใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกันในการผลิตกรดโคจิกทางสถิติ พบว่าให้ผลการผลิตกรดโคจิกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังแสดงในตารางที่ 4.10 ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากผลการทดลองพบว่าอาหารเหลวที่ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุด 4.52 กรัมต่อลิตร จึงเลือกโซเดียมไนเตรท ไปทำการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนต่อไป

ตารางที่ 4.10 ผลการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกันในทางสถิติ

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
โซเดียม ไนเตรต	4.52[a]
ยีสต์สกัด	0.15[b]
น้ำแช่ข้าวโพด	0.15[b]
แอมโมเนียม ซัลเฟต	0.10[c]

กำหนดให้ ตัวอักษรแตกต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตัวอักษรที่ไม่แตกต่างกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมไนเตรทที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

ในการศึกษาทำการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. BRI ในอาหารเหลวโดยใช้ โซเดียมไนเตรท ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลการทดลองคือ ในวันแรกของการเพาะเลี้ยง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 20.22 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงและมีการผลิตกรดโคจิก โดยมีการผลิตกรดโคจิกอย่างชัดเจนในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ 0.39 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 6 เท่ากับ 1.85 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อรามีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 9.18 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.8

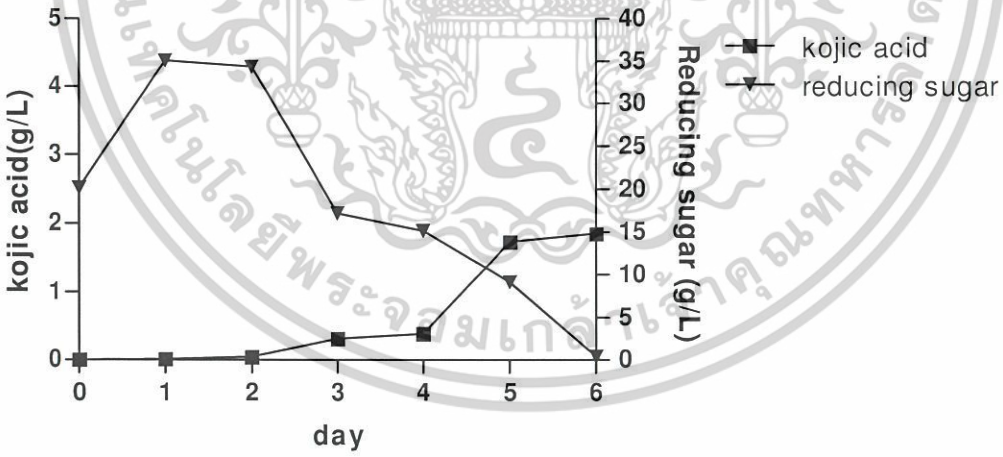
ในการศึกษาทำการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. BRI ในอาหารเหลวโดยใช้ โซเดียมไนเตรท ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลการทดลองคือ ในวันแรกของการเพาะเลี้ยง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 18.72 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงและมีการผลิตกรดโคจิก โดยมีการผลิตกรดโคจิกอย่างชัดเจนในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ 0.59 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 4 เท่ากับ 2.57 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อรามีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 12.81 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.9

ในการศึกษาทำการเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. BRI ในอาหารเหลวโดยใช้โซเดียมไนเตรท ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนให้ผลการทดลองคือ ในวันแรกของการเพาะเลี้ยง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 21.60 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงและมีการผลิตกรดโคจิก โดยมีการผลิตกรดโคจิกอย่างชัดเจนในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือ 0.73 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 เท่ากับ 6.53 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อรามีค่าสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 15.11 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.13 และรูปที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้โซเดียมไนเตรท ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วันที่)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.00	20.22	-
1	0.01	35.04	-
2	0.05	34.32	5.91
3	0.32	17.16	7.33
4	0.39	15.12	9.18
5	1.73	9.16	8.36
6	1.85	0.39	6.45

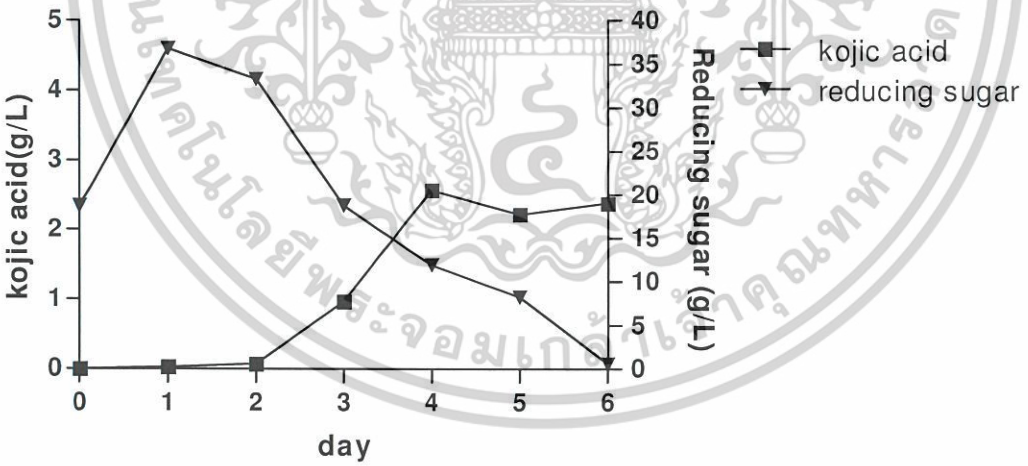


รูปที่ 4.8 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วันที่)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.00	18.72	-
1	0.03	36.84	-
2	0.07	33.30	6.71
3	0.97	18.78	8.55
4	2.57	11.94	12.81
5	2.22	8.24	10.74
6	2.38	0.59	9.76

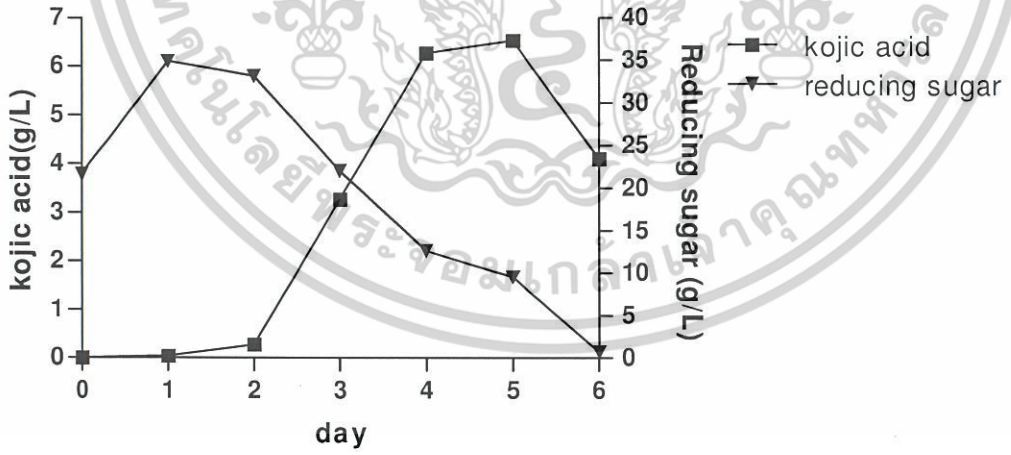


รูปที่ 4.9 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้โซเดียมไนเตรท ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

เวลา (วันที่)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.01	21.60	-
1	0.04	34.86	-
2	0.28	33.12	7.56
3	3.27	22.02	10.43
4	6.27	12.66	15.11
5	6.53	9.56	14.32
6	4.10	0.73	10



รูปที่ 4.10 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุง 6.53 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคืออาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุด 2.57 กรัมต่อลิตร ส่วนอาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตรให้การผลิตกรดโคจิก 1.85 กรัมต่อลิตร แตกต่างจากการทดลองของ May และคณะ(1931) ที่ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยใช้น้ำตาลเด็กซ์โทรส 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 2.0 กรัมต่อลิตร และใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับคือ 0.62 1.66 และ 5.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเมื่อใช้โซเดียมไนเตรท 1.66 กรัมต่อลิตรให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุด 23.7 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือใช้โซเดียมไนเตรท 5.0 กรัมต่อลิตรให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุด 20.5 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองที่แตกต่างกันเพราะ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการย่อยแป้งข้าวโพดด้วยกรดไฮโดรคลอริค จึงอาจเกิดอนุพันธ์ของคลอไรด์ได้ ซึ่งอนุพันธ์ของคลอไรด์อาจส่งผลต่อการเจริญของเชื้อรา ดังนั้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมากขึ้นจึงไม่มีผลต่อการเจริญและผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา

ผลการเปรียบเทียบการใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดโคจิกทั้ง 3 ความเข้มข้นทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังนั้นจึงเลือกโซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรทำการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.14 ผลการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้นต่างกันเป็นแหล่งไนโตรเจนในทางสถิติ

ความเข้มข้นของโซเดียม ไนเตรท (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
3	1.85^{c}
4	2.57^{b}
5	6.53^{a}

กำหนดให้ ตัวอักษรแตกต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตัวอักษรที่ไม่แตกต่างกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดและไม่ได้ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน

การศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันแรกมีค่าเท่ากับ 22.56 กรัมต่อลิตร และจะเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 และ 2 จากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็วพร้อมทั้งเกิดการสร้างกรดโคจิกไปพร้อมกัน โดยกรดโคจิกจะผลิตออกมาอย่างชัดเจนในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อครบ 7 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือเท่ากับ 0.89 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 6.48 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 10.06 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.11

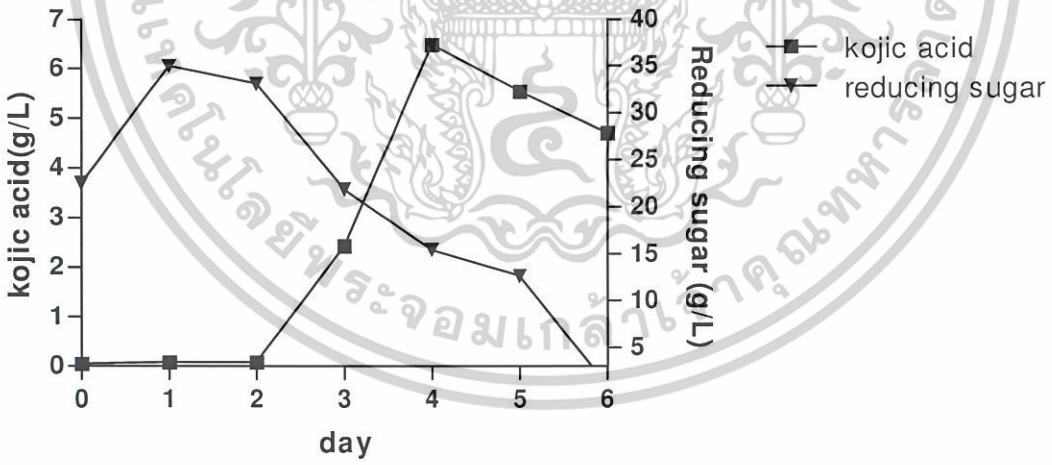
การศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ไม่ได้ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าในวันแรกของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 14.64 กรัมต่อลิตรและจะเพิ่มขึ้นในวันที่ 1 และ 2 และจะลดลงอย่างรวดเร็วพร้อมกับมีการผลิตกรดโคจิก โดยกรดโคจิกถูกผลิตออกมาอย่างชัดเจนในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อครบ 7 วัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงเหลือ 0.86 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 4.32 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งสุงสุด 13.13 กรัมต่อลิตรดังตารางที่ 4.16 และรูปที่ 4.12

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลอง พบว่าการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งที่ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอนให้การผลิตกรดโคจิก 6.48 กรัมต่อลิตร ส่วนอาหารเหลวที่ใช้แป้งที่ไม่ได้ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอนให้การผลิตกรดโคจิก 4.32 กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับการทดลองของ Rosfarizan และคณะ(1998) ที่ใช้แป้งสาคูที่ย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิกทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 50 ลิตร พบว่าเมื่อใช้แป้งสาคู 100 กรัมต่อลิตรจะให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุด 28.80 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดโคจิกที่ได้สูงกว่าเพราะใช้แป้งปริมาณมากกว่าและการใช้เอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในการย่อยแป้งสาคูก่อนทำให้แป้งเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสทั้งหมดส่งผลให้เชื้อราสามารถนำไปใช้ได้ทันทีดังนั้นจึงส่งผลต่อการผลิตกรดโคจิกที่สูงขึ้นและสอดคล้องกับการทดลองของ Yin และคณะ(1997) ที่ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* โดยใช้แป้งแป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้แป้งข้าวโพดความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร พบว่าให้การผลิตกรดแลคติกสูงสุด 98.20 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่4.15 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วันที่)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.05	22.56	-
1	0.08	34.98	-
2	0.08	33.06	6.23
3	2.43	21.84	8.46
4	6.48	15.42	10.06
5	5.53	12.66	8.62
6	4.70	0.89	8.27

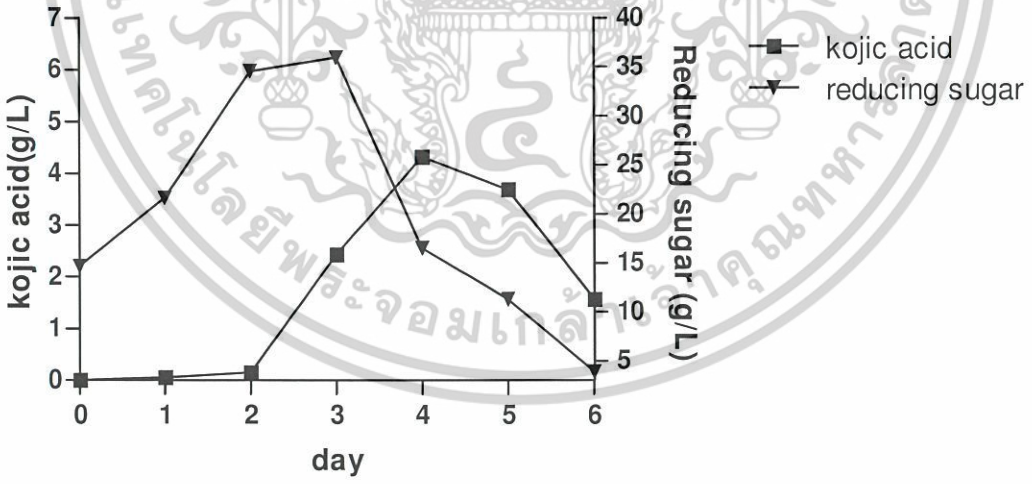


รูปที่ 4.11 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.16 แสดงการผลิตกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำหนักเซลล์แห้งโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ไม่ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (วันที่)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.00	14.64	-
1	0.06	21.66	-
2	0.15	34.56	3.86
3	2.43	35.94	5.64
4	4.32	16.5	13.13
5	3.69	11.28	10.70
6	1.57	0.86	9.76



รูปที่ 4.12 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้และน้ำตาลรีดิวซ์ของอาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดที่ไม่ได้ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการย่อยแป้งดิบด้วยกรด พบว่าเมื่อใช้แป้งทุกชนิดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรให้น้ำตาลรีดิวซ์แตกต่างกันคือ แป้งข้าวโพดให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด คือ 28.61 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ แป้งข้าวเจ้า 17.20 กรัมต่อลิตร ส่วนแป้งมันสำปะหลังให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยที่สุดคือ 5.60 กรัมต่อลิตร

การศึกษาความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกพบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุด 2.79 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงส่วนอาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้น 50 และ 40 กรัมต่อลิตรให้การผลิตกรดโคจิกเล็กน้อย

ในการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกนั้นพบว่า อาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุดคือ 4.52 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงส่วนอาหารที่ใช้ยีสต์สกัด น้ำแช่ข้าวโพดและแอมโมเนียซัลเฟตให้การผลิตกรดโคจิกเล็กน้อย

เมื่อนำโซเดียมไนเตรทมาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกพบว่า อาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุดคือ 6.53 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงรองลงมาคืออาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุด 2.57 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนอาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตรให้การผลิตกรดโคจิกน้อยที่สุดคือ 1.85 กรัมต่อลิตรในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง

ทำการเปรียบเทียบสูตรอาหารที่ให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุดโดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดและแป้งข้าวโพดที่ไม่ได้ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุดคือ 6.48 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงรองลงมาคืออาหารที่ใช้แป้งข้าวโพดที่ไม่ได้ย่อยด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอนให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุด 4.32 กรัมต่อลิตร

สูตรอาหารที่ให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุดประกอบด้วยแป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรด 60 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรทความ 5.0 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 เป็นเวลา 7 วัน ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 6.48 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ณัฐลดา พลแสน ศุภมาศ สุขโสม และศุภางค์ ระรื่นรมย์. 2548 . การผลิตกรดโคจิกจากแป้งโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ

ณัฏยา ดิลกศรี ธราภรณ์ พินิจจันทร์ นฤมล ชุมทอง. 2549. การผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากแป้งข้าวโพดโดย *Aspergillus* sp. REB2. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ

พรรณกร อิ่มขัดมา. 2535. เชื้อราก่อโรคในคน. ภาควิชาพยาบาลศาสตร์ คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ: 148 – 151.

บุษราภรณ์ จันทร์ปรุง. 2551. การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการรักษาฝ้าโดยวิธีใช้เข็มร่วมกับทาไวตามินซีและการทายา 3 เปอร์เซ็นต์ไฮโดรควิโนน, วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ

อภิชญา ทองทับ. 2548. การผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Aspergillus* sp BR1. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ

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

Ariff, A. B., Rosfarizan, M., Herng, L. S., Madihah, S., and Karim, M. I. A. 1997. Kinetics and modelling of kojic acid production by *Aspergillus flavus* Link in batch fermentation and resuspended mycelial system, World J. Microbiol. Biotechnol. 13 : 195 – 201

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

Aytemir, M. D. and D. D. Erol, 2003. Synthesis and evaluation of antimicrobial activity of new 3 -hydroxyo methyl 4 -oxo- 4 h-pyran-2 -carboxamide derivatives, Turkish Chem. 27: 757–64

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Bently, R. 1957. Preparation and analysis of kojic acid, Method Enzymol. 3 : 238 – 241.

Bernfeld, P. 1955. Amylase alpha and beta method in Enzymology, New York: Acadimic Press, Inc

Brtko, J., Hudecova , D., Bransova, J., Novotny, L., Eybl, V., Melnik , M. and Uher, M. 2001. Kojic acid: A superior source for preparation of biologically active compounds, Biomarkers and Environment, 4: 26-30

Burdock F. A., Soni M. G., and Carabin, I. G. 2001. Evaluation of health aspects of kojic acid in food, Reg. Toxicol. Pharmacol . 33: 80 -101.

Chen, J. S. Wei, C. and Marshall, M. R. 1991. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase, J. Agric. Food Chem. 36: 1867-1901.

El-Aasar, S., A. 2006. Cultural Conditions studies on kojic acid Production by *Aspergillus parasiticus*, Int. J. Agric. Biol: 468-473

Futamura, T., Okabe, M., Tamura, T., Toda, K., Matsunobu, T. and Park, Y. S. 2000. Improvement of production of kojic acid by a mutant strain *Aspergillus oryzae*, MK107-39, J. Biosci. Bioeng. 91(3): 272-276

Futamura, T., Ishihara, H., Tamura, T., Yasutake, T., Huang, G., Kojima, M. and Okabe, M. 2001. Kojic acid production in an airlift bioreactor using partially hydrolyzed raw corn starch, J. Biosci. Bioeng. 92: 360–5

Friedemann, T. E. 1934. Chemical and physiological proprties of kojic acid, Science 30 :34

Kayahara, H., Shibata, N., Tadasa, K., Maeda, H., Kotoni, T and Ichimoto, I. 1990. Amino acid and peptide derivatives of kogic acid and their antifungal properties, Agric. Biol. Chem. 54: 2422–41

Kundu, A. K., Das, S. and Grupta, T. K. 1973. Influence of culture and nutritional conditions on the production of amylase by the submerged culture of *Aspergillsu oryzae,* J. Ferment. Technol. 51:142 - 150

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

May, O. E., Herrick, H. T., Meyey, A. J. and Wells, P. A. 1931. The production of kojic acid by *Aspergillus flavus*, J. Am. Chem. Soc. 53(1) : 774 – 782.

Pectzar, M. J. J., Chan, E. C. S. and Krieg, N. R. 1986. Microbiology. 5 th ed. New York: Mograw – Hill book Company

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

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

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

Rosfarizan, M. and Ariff, A. B. 2007. Biotransformation of various carbon sources to kojic acid by cell-bound enzyme system of *Aspergillus flavus* link 44-1. Depertment of Bioprocess Technology, Faculty of Biotechnology and Biomolecular Sci, University Putra, Malaysia

Sadhukhan, R. K., Manna, S., Roy, S. k. and Chakrabarty, S. L. 1990. Thermostable amylolytic amylase enzyme from a celluolytic fungug *Myceliophthora thermophilia* D14(ATCC 48104), Appl. Microbiol. Biotechnol. 33: 692-696

Schwartzburg, K. A. 2004. Gene expression analysis in *Aspergillus flavus* identified a gene, AHPA, involved in protection against organic peroxides, Pla. Pathol. North Carolina State.

Stainer, R. Y., Adelberg, E. A. and Ingraham, J. 1976. The Microbial World. 4th ed. Eagle Wood: Prentice – Hall. Inc

Stanbury, P. F., Whitaker, A. and Hall, S. J. 1995. Principle of fermentation technology, Oxford: Elsevien Science.

Wan, H. M., Chen, C. C., Giridhar, R., Chang, T. S. and Wu, W. T. 2004. Repeated-batch production of kojic acid in a cell-retention fermenter using *Aspergillus oryzae* M3B9, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32 : 227 – 233.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wan, H. M., Chen, C. C., Chang, T. S. Giridhar, R. N., and Wu, W. T. 2004. Combining induced mutation and protoplasting for strain improvement of *Aspergillus oryzae* for kojic acid production, Biotechnol. 26 : 1163 – 1166

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

Yin, P., Yahiro, K., Ishigaki, T., Park, Y. S. and Okabe, M. 1997. L(+)-Lactic acid production by repeated batch culture of *Rhizopus oryzae* in air-lift bioreactor, J. Ferment. Bioeng. 85(1): 96-100

http://www.forest.go.th/Forprod/Micrology_wood_Phathology

http://eu.lib.kmutt.ac.th/ elearning/Courseware/BCT611/Chap2/chapter2_1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 อาหาร Starch medium สูตรของอภิชญา (2548)

ยีสต์สกัด (Yeast Extract)	2.5 กรัมต่อลิตร
โซเดียมไนเตรต ($NaNo_3$)	2.5 กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.0 กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5 กรัมต่อลิตร
แป้งดิบ	60 กรัมต่อลิตร

นำแป้งไปย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 3 N แล้วเติมส่วนผสมที่เหลือลงไปแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร และปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4 นำไปทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์

ข.1 การวิเคราะห์กรดโคจิก (Bently, 1957)

การวิเคราะห์ปริมณกรดโคจิกวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและเหมาะสมโดยการใช้สารละลายเฟอริกคลอไรด์ทำปฏิกิริยากับสารประกอบแอลฟาไอดรอกซิล (α – Hydroxyl) และสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ในกรดโคจิกให้สารละลายสีแดงเกิดขึ้น

สารเคมี

1. สารละลายเฟอริกคลอไรด์ ($FeCL_3 . 6H_2O$) 1 เปอร์เซนต์

เตรียมโดยชั่ง $FeCL_3 . 6H_2O$ 1 กรัม ละลายใน 0.1 N HCl และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วเก็บในขวดสีชา

2. สารละลายกรดโคจิกมาตรฐาน

ทำโดยเตรียมสารละลายกรดโคจิกที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 50 100 150 200 250 300 350 400 450 และ 550 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. ดูดตัวอย่างสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองทำแบลงค์ (Blank) ควบคู่กันไป โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

2. เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ที่เตรียมไว้ลงไป 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Vortex mixer

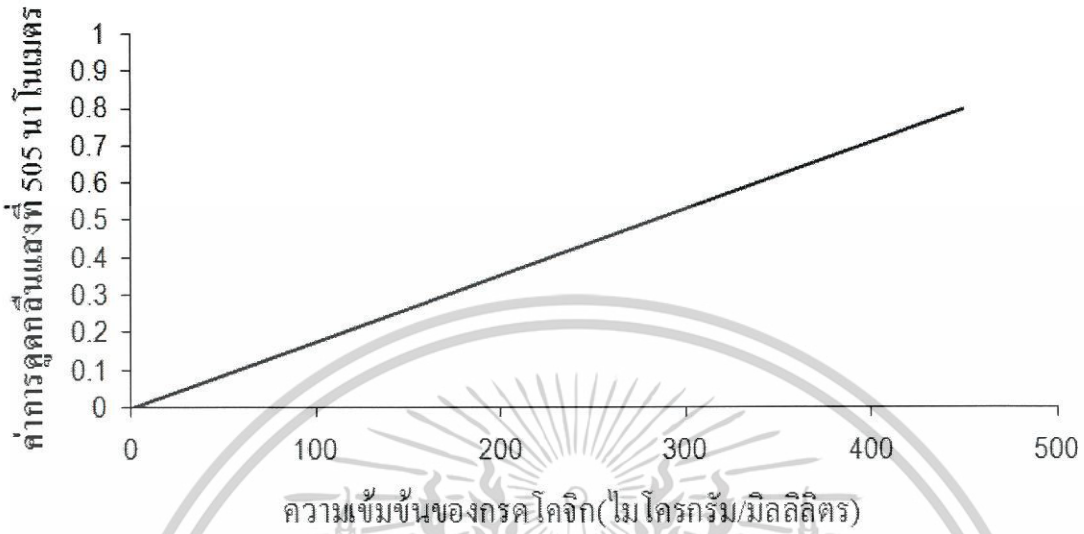
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับแบลงค์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร

4. ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกรดโคจิกมาตรฐานความเข้มข้น 50 – 550 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขียนกราฟสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดโคจิก

5. นำค่าที่วัดได้ในข้อ 4 . มาคำนวณหาปริมาณกรดโคจิกจากสูตร

$$\text{ปริมาณกรดโคจิก} = \frac{A_{505} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันกราฟมาตรฐาน}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Bernfeld,1955)

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ใช้วิธี Dinitrosalicylic (DNS) method ซึ่งเป็นวิธีในการน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจาก DNS จะไม่ทำปฏิกิริยากับแป้งทำให้การทดสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ค่าที่แท้จริง

สารเคมี

1. สารละลาย DNS

1.1 ชั่ง DNS 1 กรัม

1.2 ชั่งโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 250 กรัมละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตรเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 N 200 มิลลิลิตร นำสารในข้อ 1.1 เติมลงในสารละลายข้อ 1.2 คนจนละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วคนเก็บไว้ในขวดสีชา

2. สารละลายกลูโคส

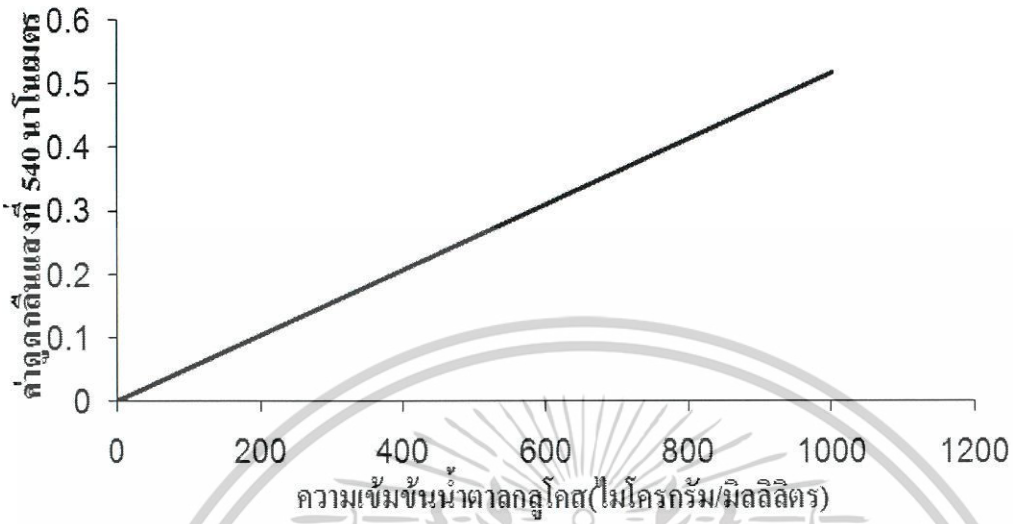
เตรียมโดยการชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัมละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรจะได้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0 200 400 600 800 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. ดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองเติมสารละลาย DNS 3 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองแล้วเขย่า นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที
2. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร
3. ทำตัวเทียบมาตรฐานโดยใช้สารละลายกลูโคสแทนตัวอย่าง
4. ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง
5. ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร
7. ทำกราฟมาตรฐานจากค่าการดูดแสงของสารละลายกลูโคส
8. นำค่าที่วัดได้ของตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน
9. คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์} = \frac{A_{540} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันกราฟมาตรฐาน}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.3 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

วิธีการวิเคราะห์

1. นำกระดาษกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 มิลลิเมตรไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงแล้วไปทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ประมาณ 1 ชั่วโมง
2. นำกระดาษกรองมาชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักของกระดาษกรองด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
3. ดูดตัวอย่างมา 10 มิลลิลิตรกรองด้วยกระดาษกรองที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้วด้วยชุดกรอง
4. นำกระดากรองที่มีเซลล์ไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
5. นำไปทำให้เย็นในเดซิเคเตอร์ประมาณ 1 ชั่วโมง
6. ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองที่มีเซลล์อยู่นำค่าไปคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง

น้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัม/ลิตร) = (น้ำหนักกระดาษกรองที่มีเซลล์ – น้ำหนักกระดาษกรอง) x 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้