สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062

Kojic acid production on solid state culture by mutant strain *Aspergillus* sp. N - 2062

นางสาวรชาภา จอโภชาอุดม

นางสาวศศิวิมล ผลพฤกษา

นางสาววีณากร คงเกิดลาภ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่
เลขทะเบียน 117221
วัน,เดือน,ปี 19 ก.ค. 2554

b
i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2553

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KOJIC ACID PRODUCTION ON SOLID STATE CULTURE BY MUTANT STRAIN *ASPERGILLUS* SP. N-2062

MISS RACHAPHA CHOPOCHA-UDOM

MISS SASIWIMON PHONPLEUKSA

MISS VEENAKORN KONGKERDLAP

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIRMENT FOR DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

DEPARTMENT OF APPLIED BIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062

Kojic acid production on solid state culture by mutant strain *Aspergillus* sp. N-2062

นักศึกษา นางสาวรชาภา จอโภชาอุดม รหัสนักศึกษา 50050851

นางสาวศศิวิมล ผลพฤกษา รหัสนักศึกษา 50050872

นางสาววีณากร คงเกิดลาภ รหัสนักศึกษา 50050873

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ลินจง สุขลำภู	
กรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์	

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062

นักศึกษา นางสาวรชาภา จอโภชาอุดม รหัสนักศึกษา 50050851

นางสาวศศิวิมล ผลพฤกษา รหัสนักศึกษา 50050872

นางสาววีณากร คงเกิดลาภ รหัสนักศึกษา 50050873

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2553

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp.N-2062 โดยใช้สับสเตรทที่แตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน คือ ปลายข้าว ข้าวฟ่าง กากถั่วเหลือง และรำข้าว ในอัตราส่วนที่ต่างกัน คือ 6:4, 7:3, 8:2 และ 9:1 โดยน้ำหนัก บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ตรวจหาปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้ พบว่าเมื่อใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลือง ที่อัตราส่วน 9:1 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด คือ 34.33 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณกรดโคจิกที่ได้รองลงมา คือจากอาหารแข็งชนิดปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 ซึ่งให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 26.32 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง จากนั้นเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมมาเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยการเติมสารละลายแร่ธาตุและไม่เติม ผลการศึกษาพบว่าผลิตกรดโคจิกได้ 35.94 และ 28.04 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง จากการใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 และปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 ตามลำดับ ซึ่งให้ปริมาณกรดโคจิกสูงกว่าอาหารแข็งที่ไม่เติมแหล่งแร่ธาตุแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ : กรดโคจิก, การหมักบนอาหารแข็ง, *Aspergillus sp.* N-2062

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Kojic acid production on solid state culture by mutant strain *Aspergillus* sp. N-2062
Student	Miss Rachapha Chopocha-Udom Miss Sasiwimon Phonpleuksa Miss Veenakorn Kongkredlap
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2010
Special Project Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nuanphan Naranong

Abstract

Kojic acid production on the solid-state culture of mutant *Aspergillus sp*. N-2062 using the various substrates as carbon and nitrogen sources was performed. These substrates included broken-milled rice, sorghum, soybean meal and rice bran in the different ratios of carbon and nitrogen sources (6:4, 7:3, 8:2 and 9:1 by weight). The concentration of kojic acid was analyzed everyday for 7 days of cultivation at room temperature. The highest yield of kojic acid was 34.33 g/100g dry weight substrate, on the fifth day of cultivation on sorghum and soybean meal in the ratio of 9:1. Kojic acid concentration of 26.32 g/100g dry weight substrate was obtained from broken-milled rice and soybean meal in 8:2 ratio. The most suitable substrates and ratio for kojic acid production was selected to study the effect of the essential nutrients on the production of kojic acid. The study was compare between the addition and no addition of mineral solution. The result showed that kojic acid concentration of 35.94 and 28.04 g/g dry weight substrate from using sorghum and soybean meal in the ratio of 9:1 and broken-milled rice and soybean meal in the ratio of 8:2, respectively and these concentrations were more than those obtained from the substrates without the addition of mineral solution. However, there was no significant difference.

Keywords : Kojic acid, Solid State Fermentation, *Aspergillus sp*. N-2062

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงงานพิเศษในหัวข้อเรื่อง การผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062 โครงงานพิเศษนี้จะไม่สามารถบรรลุจุดประสงค์ได้ หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์จากบุคคลเหล่านี้

ทางผู้จัดทำขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษนี้ที่กรุณาให้คำปรึกษา และคำแนะนำ รวมทั้งช่วยแก้ไขข้อผิดพลาด ข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นในการทดลองและให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ. ลินจง สุขลำภู และ ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ที่ให้คำปรึกษาและช่วยตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน โดยเฉพาะคุณเอกภพ คุณประสิทธิ์และคุณวิทยา ที่ได้ช่วยเหลือในการเบิกอุปกรณ์ สารเคมี ตลอดจนให้คำแนะนำวิธีการใช้เครื่องมือต่างๆในห้องปฏิบัติการ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องธุรการที่ได้อำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน และพี่ปริญญาโทที่ช่วยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา และมารดา ที่เป็นกำลังใจและได้สนับสนุนทุนการศึกษาอุปกรณ์การศึกษาให้กับคณะผู้จัดทำจนกระทั่งมาถึงทุกวันนี้ได้ ตลอดจนขอบคุณเพื่อนๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจให้กันเสมอมา

นางสาวรชาภา จอโภชาอุดม

นางสาวศศิวิมล ผลพฤกษา

นางสาววีณากร คงเกิดลาภ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ II

กิตติกรรมประกาศ III

สารบัญ IV

สารบัญตาราง VII

สารบัญรูป IX

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2

1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน 2

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 แหล่งที่พบกรดโคจิกในธรรมชาติและการผลิตกรดโคจิก 3

2.2 คุณสมบัติทั่วไปของกรดโคจิก 6

2.3 การสังเคราะห์กรดโคจิกทางชีวภาพ 7

2.3.1 กลไกการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดโคจิก 7

2.4 การผลิตกรดโคจิก

2.4.1 เชื้อจุลินทรีย์และการปรับปรุงสายพันธุ์ 9

2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก 9

2.5.1 แหล่งคาร์บอน 9

2.5.2 แหล่งไนโตรเจน 11

2.5.3 แหล่งแร่ธาตุ 13

2.6 ประโยชน์ของกรดโคจิก 14

2.6.1 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร 14

2.6.2 ใช้เป็นส่วนผสมในยา 15

2.6.3 ใช้ในอุตสาหกรรมเคมี 15

2.6.4 ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6.5 เป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา 15

2.6.6 เป็นสารปฏิชีวนะ 15

2.7 กระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง 16

2.8 วัตถุดิบทางการเกษตรที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง 18

2.8.1 ถั่วเหลืองและกากถั่วเหลือง 18

2.8.1.1 การใช้ประโยชน์จากกากถั่วเหลือง 20

2.8.2 รำข้าว 21

2.8.3 ปลายข้าว 22

2.8.4 ข้าวฟ่าง 24

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 22

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี 25

3.1.1 วัตถุดิบ 25

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์ 25

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์ 25

3.1.4 สารเคมี 26

3.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ 26

3.2 วิธีการทดลอง 26

3.2.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *Aspergillus* sp. N-2062 26

3.2.2 ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062 บนอาหารแข็ง 27

3.2.3 ศึกษาผลของการเติมสารละลายแร่ธาตุที่มีต่อการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง 27

3.2.4 การสกัดกรดโคจิก 28

3.3 การวิเคราะห์ 28

3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิก 28

3.3.2 การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของอาหารแข็ง 28

3.3.3 การวิเคราะห์ค่าพีเอช (pH) 28

3.3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล 29

4.1 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062 บนอาหารแข็ง 29

4.1.1 การผลิตกรดโคจิกโดยใช้อาหารแข็งสูตรข้าวฟ่างและกากถั่วเหลือง 29

4.1.2 การผลิตกรดโคจิกโดยใช้อาหารแข็งสูตร ข้าวฟ่างและรำข้าว 35

4.1.3 การผลิตกรดโคจิกโดยใช้อาหารแข็งสูตร ปลายข้าวและกากถั่วเหลือง 41

4.1.4 การผลิตกรดโคจิกโดยใช้อาหารแข็งสูตร ปลายข้าวและรำข้าว 47

4.2 การศึกษาผลของการเติมสารละลายแร่ธาตุที่มีต่อการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง 49

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 56

เอกสารอ้างอิง 57

ภาคผนวก ก 61

ภาคผนวก ข 62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 แสดงแหล่งวัตถุดิบธรรมชาติที่ใช้ผลิตกรดโคจิก 4

ตารางที่ 2.2 แสดงแหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์กรดโคจิก 11

ตารางที่ 2.3 แสดงแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกด้วยเชื้อรา *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ต่างๆ 11

ตารางที่ 2.4 แสดงแหล่งแร่ธาตุในการผลิตกรดโคจิก 13

ตารางที่ 2.5 แสดงตัวอย่างกระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง 15

ตารางที่ 2.6 แสดงส่วนประกอบโดยประมาณของถั่วเหลืองและส่วนของถั่วเหลือง 16

ตารางที่ 2.7 แสดงส่วนประกอบโดยประมาณของกากถั่วเหลือง 19

ตารางที่ 2.8 แสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนในกากถั่วเหลือง 19

ตารางที่ 2.9 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว 22

ตารางที่ 2.10 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของปลายข้าว 23

ตารางที่ 2.11 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของข้าวฟ่าง 24

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่ อัตราส่วน 6:4 30

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 7:3 31

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 32

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 33

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและกากถั่วเหลือง 34

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 6:4 36

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 7:3 37

ตารางที่ 4.8 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 8:2 38

ตารางที่ 4.9 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 9:1 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 4.10 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและรำข้าว 40

ตารางที่ 4.11 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 6:4 42

ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 7:3 43

ตารางที่ 4.13 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 44

ตารางที่ 4.14 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 45

ตารางที่ 4.15 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งชนิดปลายข้าวและกากถั่วเหลือง 46

ตารางที่ 4.16 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ 47

ตารางที่ 4.17 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 ที่มีการเติมแหล่งแร่ธาตุ 50

ตารางที่ 4.18 เปรียบเทียบระหว่างข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่เติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุที่อัตราส่วน 9:1 51

ตารางที่ 4.19 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 ที่มีการเติมแหล่งแร่ธาตุ 52

ตารางที่ 4.20 เปรียบเทียบระหว่างปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่เติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุที่อัตราส่วน 8:2 53

ตารางที่ 4.21 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่มีการเติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุ 54

ตารางที่ 4.22 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งชนิดปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่มีการเติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุ 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก 6

รูปที่ 2.2 แสดงการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงกลูโคสไปเป็นกรดโคจิก 8

รูปที่ 2.3 แสดงกลไกการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแลกโตน 8

รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะของเมล็ดถั่วเหลือง 18

รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะของกากถั่วเหลือง 19

รูปที่ 2.6 แสดงส่วนประกอบของเมล็ดข้าว 21

รูปที่ 4.1 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 6:4 30

รูปที่ 4.2 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 7:3 31

รูปที่ 4.3 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 32

รูปที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 33

รูปที่ 4.5 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 6:4 36

รูปที่ 4.6 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 7:3 37

รูปที่ 4.7 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 8:2 38

รูปที่ 4.8 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 9:1 39

รูปที่ 4.9 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 6:4 42

รูปที่ 4.10 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 7:3 43

รูปที่ 4.11 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.12 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 45

รูปที่ 4.13 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 ที่มีการเติมแหล่งแร่ธาตุ 50

รูปที่ 4.14 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 ที่มีการเติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุ 51

รูปที่ 4.15 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 ที่มีการเติมแหล่งแร่ธาตุ 52

รูปที่ 4.16 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 ที่มีการเติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุ 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันมีการนำกรดโคจิก (Kojic acid) มาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างกว้างขวาง เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารจะใช้กรดโคจิกเพื่อเป็นสารเพิ่มกลิ่น-รส ให้กับอาหารและเครื่องดื่มจำพวกเหล้า เบียร์ ไวน์ ไอศกรีม เป็นต้น (กล้าณรงค์ และจุนทนี, 2540) นอกจากนี้กรดโคจิกยังมีความสามารถในการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (oxidative browning) ในผลไม้ที่ตัดแต่งแล้ว และอาหารทะเลจำพวกกุ้ง ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางมีการใช้กรดโคจิกร่วมกับผลิตภัณฑ์ปรับสภาพผิว เพื่อทำให้ผิวขาวและยังสามารถป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลต (Ohyama และ Mishima, 1990) ในทางการแพทย์กรดโคจิกได้ถูกนำมาเป็นส่วนผสมในยาบรรเทาอาการปวด และป้องกันการอักเสบของแผลได้ (Kayahara และคณะ, 1990) นอกจากนี้กรดโคจิกยังสามารถทำลายอนุมูลอิสระและเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเม็ดเลือดขาวทำให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันมากขึ้น

ปัจจุบันนิยมผลิตกรดโคจิกโดยกระบวนการหมักในสภาวะอาหารเหลวเป็นส่วนใหญ่ มีการค้นพบกรดโคจิกครั้งแรกในปี 1907 โดย Saito ซึ่งสามารถแยกผลึกของกรดโคจิกที่เกิดจากเชื้อ *Aspergillus* sp. ที่เจริญเติบโตบนข้าวนึ่งและพบว่าเป็นสารที่มีลักษณะคล้ายกรดบีต้า-รีซอร์ซิลคาร์บอลิก (β – resourcylcarbuxylic acid) ต่อมาในปี 1913 Yabuta พบว่าสารที่ได้นั้นเป็นผลพลอยได้จากการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aspergillus oryzae* บนข้าวนึ่งในสภาวะการหมักในอาหารแข็ง และจากการศึกษาการผลิตกรดโคจิกมีการใช้เชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ต่างๆ เช่น *A. oryzae* (Kwak และคณะ, 1992) *A. flavus* (Kharchenco, 1999) โดยเชื้อราเหล่านี้มีความสามารถในการใช้สับสเตรทได้หลายชนิด เช่น แป้ง (Rosfarizan, 1998) น้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น กลูโคส (Arnstein และคณะ, 1956) ซูโครส (Rosfarizan และ Ariff, 2007) โดยที่กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาแพง ซึ่ง *Aspergillus* sp. N-2062 เป็นเชื้อสายพันธุ์กลายที่สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้ ข้าวฟ่าง ปลายข้าว รำข้าวและกากถั่วเหลือง มาใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตกรดโคจิกในสภาวะอาหารแข็ง ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่มีราคาถูก สามารถลดต้นทุนในการผลิตได้เนื่องจากเป็นผลพลอยได้หรือวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมและการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1.2.1 เพื่อศึกษาการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยใช้ผลผลิตจากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

1.2.2 เพื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งระหว่างอาหารที่ไม่มีการเติมสารละลายแร่ธาตุ กับ อาหารที่มีการเติมสารละลายแร่ธาตุ

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1.3.1 ทำการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ปลายข้าว (พันธุ์ผสม) ข้าวฟ่าง และแหล่งไนโตรเจนคือ รำข้าว (ชนิดหยาบ) กากถั่วเหลือง (จากน้ำเต้าหู้) โดยใช้อัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนกับแหล่งไนโตรเจนคือ 6:4 7:3 8:2 และ 9:1 (โดยน้ำหนัก) เพื่อหาชนิดของแหล่งอาหารที่อัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกให้ได้ปริมาณสูงที่สุด

1.3.2 ทำการเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งที่ให้การผลิตกรดโคจิกปริมาณสูงสุด โดยการเติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยใช้ผลผลิตจากการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูก

1.4.2 สามารถลดต้นทุนการผลิตกรดโคจิกได้

1.4.3 สามารถนำผลจากการทำวิจัยในครั้งนี้ไปเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แหล่งที่พบกรดโคจิกในธรรมชาติและการผลิตกรดโคจิก

กรดโคจิกผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิดซึ่งใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic process) มีรายงานการค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1907 โดย Satio จากเชื้อ *Aspergillus oryzae* ในกระบวนการหมักข้าวนึ่ง (koji) จากนั้นในปี ค.ศ.1913 Yabuta ค้นพบกรดโคจิกและวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตมากขึ้น ต่อมามีการค้นพบการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นจากการใช้วัตถุดิบในธรรมชาติของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.1

กรดโคจิกผลิตได้จากเชื้อราในสกุล *Aspergillus* หลายสายพันธุ์ โดยในปี ค.ศ.1913 Yabuta สามารถแยกกรดโคจิกได้จากอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ *A. albus* *A. candidus* และ *A. nidulans* นอกจากนี้กรดโคจิกยังผลิตได้จากเชื้อ *A. flavus* *A. gymosardae* *A. awamori* *A. clavatus* *A. fumigates* และ *A. giganteus* โดยเฉพาะเชื้อในกลุ่มของ *A. flavus-oryzae-tamarii* ที่มีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกอย่างเห็นได้ชัด ซึ่ง *A. flavus* และ *A. oryzae* เป็นเชื้อที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางที่สุด

Bentley และคณะ (1957) รายงานว่ากรดโคจิกส่วนมากผลิตจากเชื้อราโดยใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน และเป็นเชื้อที่ต้องการอากาศในการเจริญ ต่อมาในปี ค.ศ. 1966 มีการศึกษาการผลิตสารอะฟลาทอกซิน และกรดโคจิกจากเชื้อราสกุล *Aspergillus* และ *Penicillium* โดยทำการศึกษาสายพันธุ์ของ *Aspergillus* ได้แก่ *A. clavatus* *A. effusus* *A. flavus* *A. fumigates* *A. nidulans* *A. oryzae* *A. parasiticus* *A. tamarii* และ *A. ustus* ส่วนสายพันธุ์ของ *Penicillium* ที่นำมาทำการศึกษานั้น ได้แก่ *Penicillium citrinum* *P. rubrum* *P. griseofulvum* และ *P. urpurogenum* พบว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ผลิตกรดโคจิกได้ และไม่มีสายพันธุ์ใดที่ผลิตสารอะฟลาทอกซินเลย จึงสรุปว่าทุก สายพันธุ์ที่ผลิตกรดโคจิกได้ไม่จำเป็นต้องผลิตสารอะฟลาทอกซิน

Tadera และคณะ (1985) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *A. oryzae* *A. oryzae* IAM2024 *A. oryzae* IFO5239 *A. flavus* IAM2001 และสายพันธุ์ *A. tamarii* IFO4099 พบว่า *A. flavus* IAM2001 สามารถผลิตกรดโคจิกได้มากสุดคือ 17.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เปปโตน 6 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.01 กรัมต่อลิตร และไซคาซิน 2 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kharchenco (1999) ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus flavas* Link จำนวน 98 สายพันธุ์ พบว่ามี 14 สายพันธุ์ที่ให้การผลิตกรดโคจิกในปริมาณสูง โดยการผลิตกรดโคจิกสูงสุดจะเกิดขึ้นในช่วงที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด (exponential grow phase) แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ดี ได้แก่ กลูโคส (glucose) แซคคาโรส (saccharose) มอลโตส (maltose) และกาแลคโตส (galactose) มีผลได้การผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 8.5 - 9.5 กรัมของกรดโคจิกต่อกิโลกรัมของสับสเตรท เมื่อทำการหมักในอาหารแข็งบนเมล็ดพืชที่มีโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตปริมาณสูง

ตารางที่ 2.1 แสดงแหล่งวัตถุดิบธรรมชาติที่ใช้ผลิตกรดโคจิก

แหล่งธรรมชาติ	ความเข้มข้น	เชื้อจุลินทรีย์	อ้างอิง
รำข้าวสาลี,ถั่วเหลือง		*Aspergillus flavas*	Kharchenko *et al.* 1986
ข้าว		*Aspergillus*	L'vova *et al.* 1984
อาหารสัตว์	37.6-40.5 ppm	*A. flavus*	Kharchenko and
		A. oryzae	Yatsyshin.1984
		A. nidulans	
		A. fumigatus	
อาหารหมักของ	40 mg/ml	*A. oryzae*	Manabe *et al.* 1981
ญี่ปุ่น		*A. tamari*	
		A. flavus	
ข้าวโพด		*A. fumigatus Fres.*	Scott. 1978
Danish blue cheese		*Penicillium*	Moubasher *et al.* 1979
เนยถั่วอัดก้อน		*Aspergillus*	Torrey and Marth. 1977
เครื่องเทศ		*Aspergillus* spp.	Torrey and Marth. 1977
Yeast exract-sucrose	0.133-3.4 mg/ml	*A. flavus*	
medium	22 mg/ml	*A. flavus* ATCC9179	
น้ำมะพร้าว	23.5 mg/ml	*A. flavus*	Wei *et al.*1991
แป้งสาคู			Rosfarizan *et al.* 1998b

ที่มา : Burdock *et al.* (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

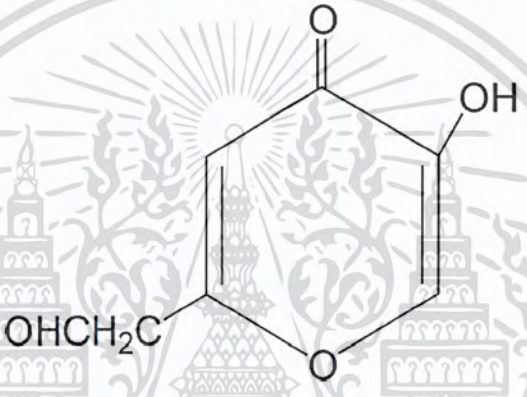
Kwak และ Rhee (1991) ศึกษาการปรับปรุงการผลิตกรดโคจิกโดยตรึงเส้นใยของ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร และสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ที่ประกอบด้วย แมงกานีสซัลเฟต 2 เปอร์เซ็นต์ เฟอรัสซัลเฟต 2 เปอร์เซ็นต์ และซิงค์ซัลเฟต 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการปรับพีเอชของอาหารเป็น 6.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 นอร์มอล พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงของ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 สามารถผลิตกรดโคจิกได้ นอกจากนี้ยังพบว่า แหล่งไนโตรเจนและขนาดของเซลล์ที่ถูกตรึงมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และผลิตกรดโคจิก โดยเซลล์ที่มีขนาดเล็กจะมีการผลิตกรดโคจิกสูงกว่าเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ และสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน ต่อมา Kwak และ Rhee (1992) มีการศึกษาเพิ่มเติมโดยเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL484 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตกับการเพาะเลี้ยงเส้นใยโดยตรงในอาหารเหลว พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบตรึงเซลล์สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 22 วัน ขณะที่การเพาะเลี้ยงเส้นใยโดยตรงในอาหารเหลวผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 25 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน

Ogawa และคณะ (1995) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยเลี้ยงบนเมมเบรน (MSLC : membrane-sulface liquid culture) ในอาหาร 1 ลิตร ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 100 กรัม ยีสต์สกัด 0.5-1.0 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.5 กรัม และเฟอรัสฟอสเฟต 0.01 กรัม ที่พีเอช 6.0 จากการทดลองเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยงบนเมมเบรนกับการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า พบว่าการเพาะเลี้ยงบนเมมเบรนผลิตกรดโคจิกได้มากว่าการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า โดยผลิตกรดโคจิกสูงสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเพาะเลี้ยงบนเมมเบรนที่มีกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน 3 แบบ คือการหมักแบบแบตช์ (batch MSLC) การหมักแบบกึ่งแบตช์มีการเติมสารอาหารลงไปโดยไม่มีการถ่ายออก (fed batch - MSLC) การหมักแบบกึ่งแบตช์ที่มีการเติมอาหารซ้ำ (repeated fed batch) เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า พบว่าการหมักแบบกึ่งแบตช์ที่มีการเติมอาหารซ้ำให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 1.6 กรัมต่อลิตรต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 คุณสมบัติทั่วไปของกรดโคจิก (Kojic acid)

กรดโคจิกหรือ 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-γ -pyrone หรือ 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4H-pyran-4-one (Nandan และ Polasa, 1985) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_6O_4$ เป็นสารประกอบของสารไพโรนที่ขาดหมู่ คาร์บอกซิล มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 142.11 กรัมต่อโมล มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 151–154 องศาเซลเซียส สามารถละลายได้ง่ายในน้ำ ละลายได้เล็กน้อยในอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม หรือเอทิลอะซิเตต เป็นต้น สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 150–200 องศาเซลเซียส หรือใช้การตกผลึกซ้ำในอะซิโตน เอทานอลอีเทอร์ เมทานอล และเอทิลอะซีเตต



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก
ที่มา : Rosfarizan และคณะ (2010)

Presscot และ Dunn (1959) รายงานว่ากรดโคจิกเป็นกรดอินทรีย์หรือเป็นสารทุติยภูมิที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักแบบใช้อากาศของเชื้อราหรือแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เช่น *Aspergillus* สายพันธุ์ต่างๆ โดยเฉพาะ *Aspergillus oryzae* , *Aspergillus flavus, Aspergillus awamori* เป็นต้น ซึ่งมีการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน เช่น กลูโคส ซูโครส อะซีเตต เอทานอล อะราบิโนส และไซโลส

กรดโคจิกเป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดีว่าเป็นหนึ่งในสารที่ได้รับความนิยมอย่างมากในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส และมีการใช้กรดโคจิกกันอย่างกว้างขวางในประเทศญี่ปุ่นและประเทศอื่นๆ ในการเป็นสารปรับสภาพสีผิวในเครื่องสำอางรวมทั้งการรักษาทางด้านผิวหนัง พบว่ากรดโคจิกสามารถใช้ในการรักษาฝ้าได้อย่างประสบผลสำเร็จ (Nakayama และคณะ , 2001) ความสามารถในการปรับสภาพสีผิวของกรดโคจิก เกิดขึ้นมาจากความสามารถในการยับยั้งแบบผันกลับได้ (reversible competitive inhibition) ของกรดโคจิกในการยับยั้งการทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเอนไซม์ไทโรซิเนส (Kahn, 1995) แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการยับยั้งของกรดโคจิกไม่มีศักยภาพเพียงพอที่จะนำมาใช้ได้โดยตรง เนื่องจากกรดโคจิกไม่เสถียรเมื่อเก็บไว้เป็นระยะเวลานาน จึงทำการศึกษาและสังเคราะห์อนุพันธ์กรดอะมิโนของกรดโคจิกขึ้นมาซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้มากขึ้นเมื่อเทียบกับกรดโคจิก แต่ยังคงสังเคราะห์ได้ในปริมาณต่ำ (Kim และคณะ, 2004)

ในประเทศญี่ปุ่นมีการใช้ประโยชน์จากกรดโคจิกในเชิงพาณิชย์มาเป็นเวลานานหลายปีแล้ว ซึ่งผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่จะผลิตได้จากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* และนำไปใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารเพื่อให้ผัก ผลไม้ กุ้งหรืออาหารทะเลคงความสดใหม่ และสามารถป้องกันการเกิดสีน้ำตาลหรือการเปลี่ยนสีเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Nohynek และคณะ, 2004)

2.3 การสังเคราะห์กรดโคจิกทางชีวภาพ (Biosynthesis of Kojic acid)

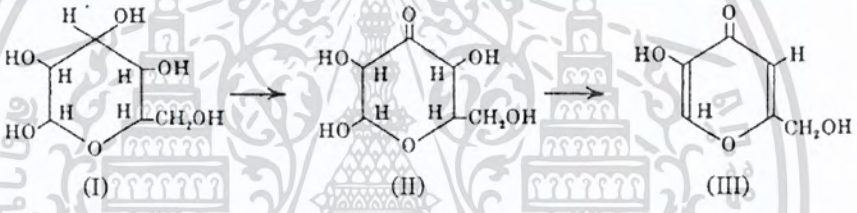
คุณลักษณะที่โดดเด่นของการสังเคราะห์กรดโคจิกทางชีวภาพ คือการมีความสามารถในการใช้แหล่งอาหารหรือสารตั้งต้นได้อย่างหลากหลาย ได้แก่ จากสารประกอบที่มีคาร์บอนสองอะตอม (C_2) เช่น เอทานอล, อะราบิโนส, สารประกอบคาร์บอนสามอะตอม (C_3) เช่น กลีเซอรอล, ไดไฮดรอกซีอะซีโตน , น้ำตาลคาร์บอนห้าอะตอมและหกอะตอม (pentose และ hexose sugar), สารประกอบคาร์บอนเจ็ดอะตอม (C_7), ไดแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์ เช่น แป้งและเด็กซ์ตริน เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำตาลกลูโคส คือ แหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดและทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดโคจิก (Arnstein และ Bentley, 1953)

2.3.1 กลไกการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดโคจิก (Arnstein และ Bentley, 1953)

ในการผลิตกรดโคจิกจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงมาจากกลูโคสโดยตรง ซึ่งกลูโคสจะผ่านการเกิดปฏิกิริยาหลายขั้นตอนโดยที่สายโซ่คาร์บอนของกลูโคสไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ปฏิกิริยาเริ่มต้นคือการออกซิเดชันของกลูโคสทำให้ได้ผลิตภัณฑ์แรกคือ กลูโคนิกแอซิดแลกโตน (Gluconic acid lactone) ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาคล้ายๆ กับการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ กลูโคส-6-ฟอสเฟต(Glucose-6-phosphate)ไปเป็น 6- ฟอสโฟกลูโคโนแลกโตน (6-Phosphogluconolactone) ทำให้สามารถสัณนิษฐานได้ว่าขั้นตอนแรกของการสร้างกรดโคจิกเกิดจากการกำจัดอะตอมไฮโดรเจนสองอะตอมออกจากคาร์บอนสามอะตอม (C_3) ของกลูโค - ไพราโนส (Gluco-pyronose) โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ CHOH ได้เป็น CO ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้บ่อยในกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์พวกฟังไจและแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียในกลุ่มที่สามารถผลิตกรดอะซีติกถือเป็นแบคทีเรียกลุ่มเดียวที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้ เช่น *Acetobacter melanogenum*

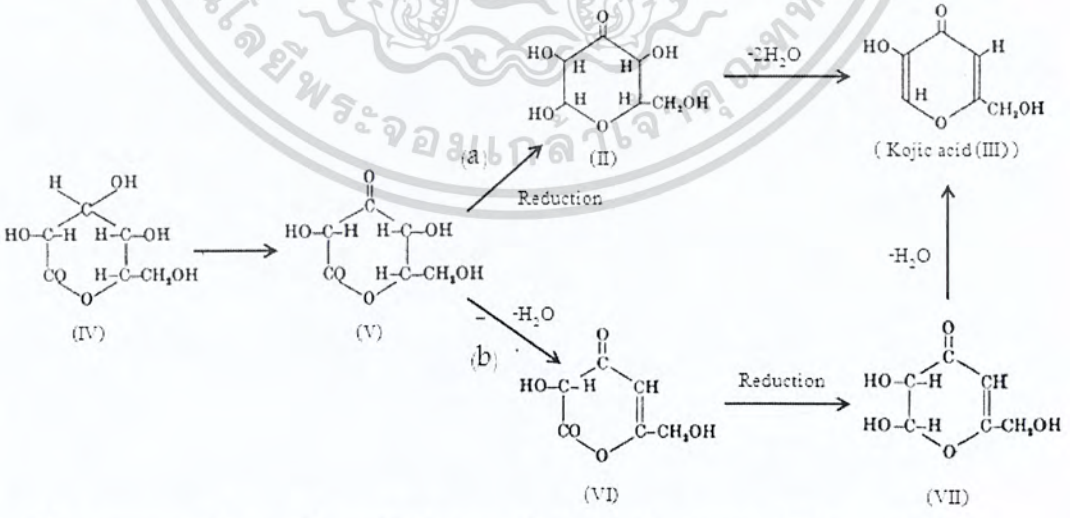
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 2.2 แสดงการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดโคจิกไปเป็น 3-คีโตกลูโคส (3-ketoglucose) โดยการกำจัดอะตอมของไฮโดรเจนภายใต้การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากนั้นกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไปสองโมเลกุลทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดโคจิก นอกจากนี้พบว่ากลูโคโนแลกโตน (Gluconolactone ; (IV)) รวมทั้งกลูโคนิกแอซิด (Gluconic acid) ที่ผลิตได้จาก *Aspergillus* ยังสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดโคจิกได้โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนไปเป็น 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแลกโตน (3-ketogluconic acid lactone ; (V)) ต่อจากนั้นกระบวนการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดโคจิกจะเกิดขึ้น 2 วิถีทาง คือ (a) เกิดปฏิกิริยารีดักชันเปลี่ยน 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแลกโตน ไปเป็น 3-คีโตกลูโคส (II) จากนั้นกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไปสองโมเลกุลได้เป็นกรดโคจิก และ (b) กำจัดโมเลกุลของน้ำจาก 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแลกโตนออกไปหนึ่งโมเลกุล ได้เป็น $C_6H_5O_5$ (VI) จากนั้นเกิดปฏิกิริยารีดักชันของหมู่คาร์บอนิลได้เป็น $C_6H_8C_5$ (VII) แล้วจึงกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไปได้เป็นกรดโคจิก (III) ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.2 แสดงการเกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงกลูโคสไปเป็นกรดโคจิก (I) กลูโคส, (II) 3-คีโตกลูโคส, (III) กรดโคจิก

ที่มา : Arnstein และ Bentley (1953)



รูปที่ 2.3 แสดงกลไกการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแลกโตน (IV) กลูโคโนแลกโตน, (V) 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแลกโตน, (VI) $C_6H_5O_5$, (VII) $C_6H_8C_5$ และ (III) กรดโคจิก

ที่มา : Arnstein และ Bentley (1953)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การผลิตกรดโคจิก

2.4.1 เชื้อจุลินทรีย์และการปรับปรุงสายพันธุ์

โดยทั่วไปมักใช้ *Aspergillus* spp. กันอย่างแพร่หลายในการหมักเพื่อให้ได้กรดโคจิก โดย Kitada (1970), Kwak และ Rhee (1991) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้ *A. oryzae* และผลได้ของกรดโคจิกเท่ากับ 0.26 กรัมต่อ 1 กรัมกลูโคส นอกจากนี้ยังมีการผลิตกรดโคจิกโดยใช้ *A. parasiticus* และ *A. candidus* ผลได้ของกรดโคจิกเป็น 0.089 กรัมต่อกรัมกลูโคส และ 0.3 กรัมต่อกรัมซูโครส ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามผลได้ของกรดโคจิกในอัตราที่สูง คือ 0.453 กรัมต่อกรัมกลูโคส ได้มาจากการหมักด้วย *A. flavus* โดย Ariff (1996) และ Rosfarizan (2007) แต่ในการหมักด้วยเชื้อราดังกล่าวนี้เกิดความเสี่ยงเนื่องจากการเกิดสารอะฟลาทอกซินขึ้นด้วย แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า สามารถยับยั้งสารอะฟลาทอกซินที่เกิดขึ้นจากการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *A. flavus* ได้ โดยการใช้อาหารและเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสม นอกจากนี้การสังเคราะห์กรดโคจิกและการเกิดสารอะฟลาทอกซินั้นเกิดขึ้นในวิถี (pathway) ที่แตกต่างกัน ดังนั้นกรดโคจิกจึงไม่ใช่สารตัวกลางสำหรับการสังเคราะห์อะฟลาทอกซินโดยเชื้อ *Aspergillus* spp. แต่อย่างใด

Futamura (2000) อธิบายว่า สายพันธุ์ MK107-39 มีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกได้ในปริมาณสูง เป็นสายพันธุ์ที่ได้มาจากการคัดแยกด้วยวิธีใหม่ โดยใช้ 96-well microtiter plate จากเชื้อ *A. oryzae* ATCC 22788 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากสายพันธุ์ MK107-39 ในฟลาสก์แบบเขย่า คือ 28 กรัมต่อลิตร จากกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีการผลิตสูงกว่าสายพันธุ์เดิม โดยผลได้ของกรดโคจิกต่อเซลล์และปริมาณการใช้กลูโคสเป็น 9.8 และ 6 เท่าของสายพันธุ์เดิม สายพันธุ์ MK107-39 เป็นสายพันธุ์กลายที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการแมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต จากการปรับแต่งอาหารและสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ เช่น ความเข้มข้นของกลูโคส ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายได้ และความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เกิดการผลิตกรดโคจิกขึ้นในปริมาณที่มากกว่า 110 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 3 ลิตร และสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตกรดโคจิกได้อย่างประสบความสำเร็จในขนาดการหมัก 600 ลิตร ซึ่งผลได้ของกรดโคจิกจากการใช้กลูโคส ($Y_{p/s}$) คือ 0.43 กรัมต่อกรัม

2.5 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก

2.5.1 แหล่งคาร์บอน

ความหลากหลายและความแตกต่างของแหล่งคาร์บอนที่มีอยู่ในสับสเตรทเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการนำสับสเตรทเหล่านั้นมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเลี้ยงเชื้อหรับการผลิตกรดโคจิกที่เหมาะสม (ตารางที่ 2.2) โดยสับสเตรทเหล่านี้ประกอบด้วย แป้ง ซูโครส มอลโทส กลูโคส ฟรักโตส แมนโนส กาแลกโตส ไซโลส อะราบิโนส ซอร์บิทอล อะซีเตท เอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลีเซอรอล และอะราบิโนส แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่นำมาใช้เพื่อการผลิตกรดโคจิกด้วยเชื้อ *A. oryzae* ได้แก่ แป้ง ซูโครส ฟรักโตส กลูโคส และไซโลส

Kitada (1970) อธิบายว่า ความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *A. oryzae* อยู่ในช่วง 25 – 150 กรัมต่อลิตร ถึงแม่ว่าผลได้ของเซลล์สูงสุดจะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นของกลูโคสมากกว่า 50 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้สูงสุดมาจากการใช้กลูโคสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลได้เท่ากับ 0.24 กรัมต่อกรัมกลูโคส

Wei (1991) ได้รายงานว่าสำหรับการผลิตกรดโคจิกด้วย *A. candidus* พบว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่ากลูโคส โดยผลได้ของกรดโคจิกคือ 0.5 กรัมต่อกรัมซูโครส ซึ่งมีค่ามากกว่าผลได้จากการใช้กลูโคสด้วยเชื้อนี้ถึง 2 เท่า (0.25 กรัมต่อกรัมกลูโคส) จากการรายงานของ Mohamad (1998) กล่าวว่า โดยทั่วไปในการผลิตกรดโคจิกด้วยเชื้อ *A. flavus* (S33-2) โพลีแซคคาไรด์ เช่น แป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่ดีสำหรับการผลิตกรดโคจิกด้วยเชื้อนี้ แต่เชื้อ *A. flavus* (S33-2) เป็นเชื้อที่สามารถเจริญได้ในแป้งสุกและให้การผลิตกรดโคจิกในปริมาณที่สูง คือ 0.25 กรัมต่อกรัมแป้งข้าวโพด

Rosfarizan และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการนำแป้งสาคูที่ผ่านการย่อยแล้วมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus flavus* Link 44-1 ในถังหมักแบบกวนขนาด 8 ลิตร ที่ความเร็วรอบ 600 รอบต่อนาที มีการควบคุมอุณหภูมิ พีเอช และปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ (dissolved oxygen tension, DOT) โดยสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกที่ใช้ในการศึกษานี้ ประกอบด้วย สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.5 กรัมต่อลิตร และแป้งสาคูที่ย่อยแล้วที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแป้งสาคู 60 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด เท่ากับ 16.43 กรัมต่อลิตร หลังจากวันที่ 2 ของการหมัก

El-Aasar (2006) ได้รายงานถึงผลของการผลิตกรดโคจิกสูงสุดที่ได้จากการหมัก โดยใช้กลูโคส 60 กรัมต่อลิตร ซูโครส 40 กรัมต่อลิตร และกากน้ำตาลจากหัวบีท 60 กรัมต่อลิตร ได้ผลได้ของกรดโคจิกดังนี้ 0.43 กรัมต่อกรัมกลูโคส 0.475 กรัมต่อกรัมซูโครส และ 0.35 กรัมต่อกรัมกากน้ำตาลจากหัวบีท ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงแหล่งคาร์บอนสำหรับการสังเคราะห์กรดโคจิก

จำนวนคาร์บอน (อะตอม)	แหล่งคาร์บอน
2	เอทานอล , ไกลซีน , โซเดียมอะซีเตต
3	กลีเซอรอล , กลีเซอรอลดีไฮด์,โซเดียมแลกเตต
4	โซเดียมไพรูเวต
5	กรดทาร์ทาริก
6	กลูโคส , ไซโลส , 2-ดีออกซีกลูโคส , กาแลกโตส กรดกลูโคนิก , กลูโคโนแลกโตน , อินโนซิทอล , แมนนิทอล , ฟรักโตส , แมนโนส
7	ซอร์บิทอล , ซอร์โบส
12	ซูโครส , กรดแล็กโทไบโอนิก
18	แลกโตส , มอลโตส , เดกซ์ทริน , เพกติน , แป้ง

ที่มา : Bajpai และคณะ (1987)

2.5.2 แหล่งไนโตรเจน

Kitada (1970) รายงานว่าสำหรับการผลิตกรดโคจิกแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนดีกว่าแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น เปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ มีวิตามินเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย ซึ่งวิตามินเหล่านี้เป็นตัวชักนำให้เกิดการผลิตกรดโคจิก มีรายงานว่าสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดโคจิกเมื่อเปรียบเทียบกับเปปโตนและโพลีเปปโตน จากตารางที่ 3 แสดงแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกด้วยเชื้อรา *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ต่างๆ

ตารางที่ 2.3 แสดงแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกด้วยเชื้อรา *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ต่างๆ

เชื้อรา	แหล่งไนโตรเจน	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)
A. oryzae	$(NH_4)_2SO_4$	0.5
	Yeast extract	10
A. flavus	NH_4NO_3	10
	Yeast extract	1
A. tamari	$NaNO_3$	2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 แสดงแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกด้วยเชื้อรา *Aspergillus* sp. สายพันธุ์ต่างๆ

เชื้อรา	แหล่งไนโตรเจน	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)
A. albus	Polypeptone	7
A. candidus	Yeast extract	1
A. parasiticus	Peptone	2
	Yeast extract	10

ที่มา : Rosfarizan และคณะ (2010)

Kwak และ Rhee (1991) รายงานว่าแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจน คือ อะมิโนไนโตรเจน 0.3 กรัมต่อลิตร หรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกด้วยเชื้อ Aspergillus สายพันธุ์ต่างๆ ประกอบไปด้วยแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจน คือ สารสกัดจากยีสต์ 0.5-2.5 กรัมต่อลิตร หรือเปปโตน 1.0-5.0 กรัมต่อลิตร

Futamura (2000) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกในการผลิตกรดโคจิก ได้แก่ กากเมล็ดฝ้าย กลูเตนจากข้าวโพด กากถั่วเหลือง จมูกข้าวสาลี และเมล็ดทานตะวัน เป็นต้น จากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่า พบว่าจมูกข้าวสาลีให้การผลิตกรดโคจิกดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โพลีเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน แสดงให้เห็นว่าโพลีเปปโตนซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาแพงสามารถใช้จมูกข้าวสาลีหรือแหล่งไนโตรเจนอื่นซึ่งเป็นผลผลิตหรือกากเหลือใช้จากการเกษตรอันมีราคาถูกกว่าทดแทนได้

Rosfarizan และ Ariff (2007) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus flavus* 44-1 ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้แก่ กลูโคส ไซโลส ซูโครส แป้ง มอลโตส แลกโตส และฟรักโตส ส่วนแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมไอโอซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเตรท และยีสต์สกัดหรือเปปโตน พบว่าปริมาณกรดโคจิกสูงสุด คือ 39.90 กรัมต่อลิตร จากการใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์นั้นเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกมากกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 แหล่งแร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีความสำคัญที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แมกนีเซียม (Mg) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) ซัลเฟอร์ (S) แคลเซียม (Ca) และคลอรีน (Cl) นอกจากนี้ยังมีโคบอล (Co) คอปเปอร์ (Cu) เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) โมลิบดินัม (Mo) และสังกะสี (Zn) แร่ธาตุที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในรูปสารอนินทรีย์ ดังแสดงในตาราง 2.4

ตารางที่ 2.4 แสดงแหล่งแร่ธาตุในการผลิตกรดโคจิก

แร่ธาตุ	ปริมาณที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)
KH_2PO_4	1.0 – 4.0
$MgSO_4.7H_20$	0.25 – 3.0
KCl	0.5 – 12.0
$CaCO_3$	5.0 – 17.0
$FeSO.4H_2O$	0.01 – 0.1
$ZnSO_4.8H_2O$	0.1 – 1.0
$MnSO_4.5H_2O$	0.01 – 0.1
$CuSO_4.5H_20$	0.003 – 0.01
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.01 – 0.1

ที่มา : Stanbury และคณะ (1995)

May และคณะ (1931) มีการใช้แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดร้อยละ 48.2

Arnstein และ Bentley (1953) กล่าวว่าฟอสเฟตเป็นสารอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญของเชื้อราส่วนใหญ่ ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรม (ดีเอ็นเอ, อาร์เอ็นเอ) โปรตีน ฟอสโฟลิปิด และน้ำตาลฟอสเฟต ฟอสเฟตมีบทบาทสำคัญในการเผาผลาญพลังงาน ความเข้มข้นของฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลอย่างชัดเจนต่อการผลิตกรดโคจิกด้วย *A. oryzae* ความเข้มข้นที่สูงของฟอสเฟตในอาหารเหลว (0.55 – 13.72 มิลลิโมล) ให้ผลการผลิตกรดโคจิกอย่างรวดเร็ว ในทางกลับกันความเข้มข้นที่ต่ำ (0.0055 – 0.055 มิลลิโมล) ส่งผลให้มีอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ต่ำมากทำให้ได้ความเข้มข้นของกรดโคจิกมีค่าน้อยกว่าเป็น 2 เท่าของการใช้ฟอสเฟตที่ความเข้มข้นสูงๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tareda และคณะ (1985) ได้ศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวที่มีการเสริมแร่ธาตุ คือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) และเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 17.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

Wei และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเลี้ยงเชื้อ Aspergillus candidus ในอาหารเหลว 3 ชนิด คืออาหารสูตรดัดแปลงจากอาหารเหลว Czapek-Dox อาหารของ Tareda เสริมแร่ธาตุพวกโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต แคลเซียมซัลคลอไรด์ เฟอริกคลอไรด์ และอาหาร yeast extract sucrose (YES) ไม่มีแร่ธาตุเป็นส่วนประกอบในอาหารเหลว จากการใช้อาหารทั้ง 3 ชนิดเลี้ยงเชื้อพบว่าอาหาร YES ให้กรดโคจิกสูงสุด 57 - 59 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร

Kwak และ Rhee (1992) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการเสริมแร่ธาตุพวกไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) และซิงก์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) พบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกสูงสุด 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน ต่อมาได้มีการผลิตกรดโคจิกจาการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเสริมแร่ธาตุไดโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) พบว่าปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Ogawa และคณะ, 1995)

2.6 ประโยชน์ของกรดโคจิก

2.6.1 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล การเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลเกิดจากปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เกี่ยวข้อง เช่น เมื่อผักผลไม้มีรอยตำหนิเสียหายซึ่งเกิดจากรอยช้ำ รอยปอก หั่นแช่แข็ง หรือเป็นโรค ส่วนของเนื้อเยื่อที่มีรอยตำหนิซึ่งมีเอนไซม์อยู่เมื่อถูกอากาศ รอยช้ำต่างๆจะปรากฏสีน้ำตาลขึ้น เอนไซม์เหล่านี้เรียกว่าฟีนอลเลส (phenolase) ซึ่งกรดโคจิกจะช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลนี้ได้

กรดโคจิกสามารถป้องกันรอยด่างได้ โดยทดสอบกับแป้งสาลีระหว่างการเก็บรักษาก่อนที่จะนำไปผลิตเส้นบะหมี่จะเกิดการเปลี่ยนสีขึ้น ซึ่งสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นเรียกว่า รอยด่าง (Uchino และคณะ, 1988)

อนุพันธ์ของกรดโคจิกที่มีชื่อว่า มอลทอล (maltol;3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone) และเอทิลมอลทอล (ethylmaltol;3-hydroxy-2-ethyl-4-pyrone) มีคุณสมบัติในการเพิ่มกลิ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รสผลไม้ประเภทเบอร์รี่ ลูกกวาดกลิ่นผลไม้ต่างๆ และในเครื่องดื่มจำพวกเหล้า เบียร์ ไวน์ ไอศกรีม เป็นต้น (กล้าณรงค์ และจุนทนี, 2540)

2.6.2 ใช้เป็นส่วนผสมในยา

กรดโคจิกสามารถใช้บรรเทาอาการปวดและป้องกันการอักเสบของแผล (Kayahara และคณะ, 1990)

2.6.3 ใช้ในอุตสาหกรรมเคมี

กรดโคจิกมีคุณสมบัติเป็นเรซินสังเคราะห์ สามารถใช้เป็นสารเพื่อการวิเคราะห์ธาตุต่างๆ เช่น ทองคำ เหล็ก สังกะสี และวานาเดียม (Bajpai และคณะ, 1982)

2.6.4 ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

โดยนำกรดโคจิกมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง อาจใช้ขัดผิวหรือช่วยปรับสภาพสีผิวให้ขาวขึ้น และสามารถป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลตจากแสงแดด (Ohyama และ Mishima, 1990) ต่อมาได้มีการศึกษาการใช้กรดโคจิกในผลิตภัณฑ์รักษาผิว โดยใช้กรดโคจิกร้อยละ 1 เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ ทำหน้าที่เปลี่ยนเม็ดสีผิว (skin - depigmentin) ทำให้ผิวขาวขึ้น ในทางการค้ามีการนำกรดโคจิกมาใช้ในผลิตภัณฑ์รักษาผิวตั้งแต่ปี ค.ศ. 1988 เป็นต้นมา (Nakagawa และ Kawai, 1995)

2.6.5 เป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

กรดโคจิกสามารถต้านกิจกรรมของแบคเรียพวก *Staphylococcus aureus* 209 P. ต่อมาพบว่ากรดโคจิกสามารถต้านการเจริญของเชื้อราพวก *Pythium graminico*, *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับเมล็ดธัญพืช ถั่ว และฝักมะขามเทศ (Kayahara และคณะ, 1990)

2.6.6 เป็นสารปฏิชีวนะ

จากผลการศึกษาของ Yabuta (1913) รายงานว่ากรดโคจิกปริมาณร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้ ต่อมา Morton และคณะ (1945) ได้ทำการศึกษาการใช้กรดโคจิกความเข้มข้นต่างๆ ทดสอบแบคทีเรีย 166 สายพันธุ์ พบว่าความเข้มข้นของกรดโคจิกในอัตราส่วน 1 ใน 500 ส่วน พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียบางสายพันธุ์ได้อย่างสมบูรณ์ เช่น *Bacillus mycoides, Chromobacterium indicum, Clostridium novyi, Micrococcus roseus, Salmonella enteritidis* และ *Serratia marcescens* นอกจากนี้พบว่า *Leptospiracanicola* จำพวกที่ไม่ทนกรดจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อมีกรดโคจิกที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แกรมลบเพราะแบคทีเรียแกรมบวกจะไวต่อโซเดียมโคเจต (sodium kojate) มากกว่าแกรมลบ (Bajpai และคณะ, 1982)

กรดโคจิกสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน (amino acids) โดยทำการทดสอบกับตับและไตของหมู โดยกรดโคจิกจะไปยับยั้งเอนไซม์จากตับและไตของหมู โปรตีนที่หมูกินเข้าไปจึงไม่สามารถย่อยสลายเป็นกรดอะมิโนและไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เพราะโปรตีนจะถูกย่อยสลายได้ต้องอาศัยเอนไซม์ที่สร้างขึ้นจากกระเพาะและตับอ่อนจึงสามารถย่อยสลายให้เป็นกรดอะมิโนได้ ต่อมามีการค้นพบว่ากรดโคจิกสามารถต้านการเกิดปุ่ม หรือ ตุ่มของวัณโรค (tubercle) โดยทำการทดสอบกับแบคทีเรียสกุล Bacillus ที่ทำให้เกิดวัณโรค โดยใช้กรดโคจิก 45 มิลลิกรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร ต่อมาได้มีการค้นพบว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งการสังเคราะห์กรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซีในสัตว์ทดลอง ทำให้หลอดเลือดเปราะและเกิดโรคลักปิดลักเปิด (scurvy) เพราะไม่มีเอนไซม์กลูโคโนแลกโทนออกซิเดส (L - gluconolactone oxidase) ที่ใช้ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแอสคอร์บิก (Bajpai และคณะ, 1982)

2.7 กระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง

การใช้อาหารแข็งในกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์เป็นกรรมวิธีที่เก่าแก่ที่สุด (Hesseltine, 1977) โดยการหมักชนิดนี้มีในแถบตะวันออกเป็นเวลานานหลายร้อยปี ในขณะที่กระบวนการหมักแบบนี้เริ่มขึ้นไม่นาน กระบวนการหมักที่นิยมหมักในอาหารแข็งนี้ ได้แก่ การผลิตเทมเป้ ซีอิ๊ว ออง จอม (ontjom) เนยแข็ง การเพาะเห็ด การผลิตเอนไซม์และกรดอินทรีย์ การทำปุ๋ยหมัก และการกำจัดน้ำเสีย (ตารางที่ 2.5) เป็นต้น

ตารางที่ 2.5 แสดงตัวอย่างกระบวนการหมักแบบสภาวะอาหารแข็ง

ตัวอย่าง	วัตถุดิบ	จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง
การผลิตเห็ด	ฟางข้าว	*Agaricus bisporus, Lentinus edodes*
ซีอิ้ว	ข้าวสาลีและถั่วเหลือง	*Aspergillus oryzae*
เทมเป้ (tempeh)	ถั่วเหลือง	*Rhizopus* sp.
อองจอม (ontjom)	กากถั่วเหลือง(สกัดน้ำมัน)	*Neurospora sitophila*
เนยแข็ง	นม	*Penicillium roqueforti*
กรดอินทรีย์	น้ำตาลทราย กากน้ำตาล	*Aspergillus niger*
เอนไซม์	รำข้าวสาลี อื่นๆ	*Asprtgillus niger*
ปุ๋ยหมัก	อินทรียวัตถุต่างๆ	รา แบคทีเรีย *Actinomycetes*

ที่มา : Smith และ Aidoo, 1988

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

Kunamneni และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งจากเชื้อรา *Thermomyces lanuginosus* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง โดยอาหารแข็งที่ใช้ ได้แก่ รำข้าวสาลี รำกากน้ำตาล รำข้าว ข้าวโพด ซีเรียลข้าวฟ่าง เกล็ดข้าวสาลี รำข้าวบาเลย์ ข้าวโพดบด ซังข้าวโพด และข้าวสาลีบด พบว่าการเลี้ยงเชื้อในรำข้าวสาลีมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด คือเท่ากับ 534 หน่อยต่อกรัมข้าวสาลี ภายใต้สภาวะการบ่มที่เหมาะสมเป็นเวลา 120 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาณความชื้นเริ่มต้น 90 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ความเข้มข้นของสารละลายเกลือแร่ 1.5:10 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ใช้อัตราส่วนของสับสเตรทต่อฟลาสก์ เป็น 1:100 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเติมแหล่งอาหารเสริมได้แก่ สารละลายแป้งและเปปโตนอย่างละ 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

จันทนี และปริยาภัทร (2007) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 โดยเลือกใช้ปลายข้าว ข้าวโพดบด รำข้าวและกากถั่วเหลือง เป็นสับสเตรท พบว่าเมื่อใช้ปลายข้าวและรำข้าวในอัตราส่วน 80:20 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน เติมสารละลายเกลือแร่ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่อกรัมอาหาร ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณกรดโคจิกสูงสุดที่ผลิตได้เท่ากับ 3.10 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัม อัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 1.55 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง

การหมักในสภาวะอาหารแข็งมีข้อดี คือ อาหารแข็งมีความชื้นต่ำช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ ปริมาตรของภาชนะหรือถังหมักมีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักเนื่องจากใช้น้ำในปริมาณน้อย อากาศสามารถแพร่ไประหว่างช่องว่างของอาหารและจุลินทรีย์ได้ดี และผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักสามารถนำมาสกัดออกจากอาหารแข็งได้ทันทีโดยการเติมสารละลายลงไป การหมักในสภาวะอาหารแข็งนี้วัตถุดิบที่นิยมใช้ในการหมักส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบที่ได้จากของเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรม เช่น เมล็ดธัญพืช (เช่น ข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และถั่วเหลือง) รำข้าวสาลี วัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลส (เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด ไม้ เป็นต้น) รวมทั้งของเสียจากกระบวนการผลิตอาหาร โดยทั่วไปปัจจัยที่ควรพิจารณาในการเลือกวัตถุดิบเพื่อใช้เป็นสับสเตรทในการหมัก (สมใจ, 2537) ได้แก่ วัตถุดิบควรมีราคาถูก คุณภาพคงที่ หาได้ง่ายตลอดปี ทำให้ได้ผลผลิตหรือมวลเซลล์ต่อกรัมสับสเตรทที่ใช้ไปมากที่สุด ทำให้ได้ผลผลิตที่ต้องการในปริมาณสูงและเกิดสารอื่นที่ไม่ต้องการน้อยที่สุด รวมทั้งก่อให้เกิดปัญหาในกระบวนการผลิต การสกัด การทำให้บริสุทธิ์ และการกำจัดของเสียน้อยที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
117221

2.8 วัตถุดิบทางการเกษตรที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

2.8.1 ถั่วเหลืองและกากถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นแหล่งไขมันและโปรตีนที่ได้จากพืชมากที่สุดแหล่งหนึ่ง ปริมาณสารอาหารโดยประมาณดังแสดงในตารางที่ 2.6 พบว่าในเนื้อถั่วเหลืองซึ่งเป็นส่วนของใบเลี้ยงมีปริมาณโปรตีนและไขมันรวมกันอยู่ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักถั่วเหลืองทั้งหมด มีคาร์โบไฮเดรตประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ซึ่งรวมถึงน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลต่างๆกันอยู่ประมาณ 3.8 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยน้ำตาลราฟฟิโนสประมาณ 1.1 เปอร์เซ็นต์ และซูโครสประมาณ 5.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีสารอาหารประเภทฟอสฟาทิเดส สเตอรอลแอช ซึ่งจัดเป็นแร่ธาตุและวิตามิน เป็นต้น (http://th.wikipedia.org/wiki (7 กุมภาพันธ์ 2554))

รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะของเมล็ดถั่วเหลือง

ที่มา : http://www.thairath.co.th (7 กุมภาพันธ์ 2554)

ตารางที่ 2.6 แสดงส่วนประกอบโดยประมาณของถั่วเหลืองและส่วนของถั่วเหลือง (โดยน้ำหนักแห้ง)

ถั่วเหลืองและส่วนของถั่วเหลือง	โปรตีน	ไขมัน	คาร์โบไฮเดรต	เถ้า
ถั่วเหลืองทั้งหมด	40	21	34	4.9
ใบเลี้ยง	43	23	29	5.0
เปลือกถั่วเหลือง	8.8	1	86	4.3
ยอดอ่อน	41	11	43	4.4

ที่มา : สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร (2527)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กากถั่วเหลืองเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันพืช ผลิตเต้าหู้ และน้ำนมถั่วเหลือง ซึ่งกากถั่วเหลืองมีลักษณะค่อนข้างเหนียว มีความชื้นสูง ยังคงมีคุณค่าอาหารสูงโดยเฉพาะโปรตีน และเส้นใยอาหาร แสดงส่วนประกอบของกากถั่วเหลือง ดังตารางที่ 2.7 และ 2.8

รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะของกากถั่วเหลือง

ที่มา : http://51011811289.blogspot.com/2010_08_01_archive.html (7 กุมภาพันธ์ 2554)

ตารางที่ 2.7 แสดงส่วนประกอบโดยประมาณของกากถั่วเหลือง

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์
ความชื้น	10.0
โปรตีน	44.0
ไขมัน	1.0
เยื่อใย	7.0
เถ้า	6.0
แคลเซียม	0.25
ฟอสฟอรัส	0.20

ที่มา: http://www.dld.go.th/nutrition/exhibision/feed_stuff/soybean_meal.htm (7 กุมภาพันธ์ 2554)

ตารางที่ 2.8 แสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนในกากถั่วเหลือง

กรดอะมิโน	เปอร์เซ็นต์
ไลซีน	2.73
เมทไธโอนีน	0.59
เมทไธโอนีน และซีสทีน	1.26
ทริปโตเฟน	0.59
ทรีโอนีน	1.72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.8 แสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนในกากถั่วเหลือง

กรดอะมิโน	เปอร์เซ็นต์
ไอโซลูซีน	2.17
อาร์จินิน	3.18
ลูซีน	3.39
เฟนิลอะลานีน และไทโรซีน	3.82
ฮิสติดีน	1.11
เวลีน	2.24
ไกลซีน	1.83

ที่มา: http://www.dld.go.th/nutrition/exhibision/feed_stuff/soybean_meal.htm (7 กุมภาพันธ์ 2554)

2.8.1.1 การใช้ประโยชน์จากกากถั่วเหลือง

ยุพร (2550) ศึกษาการใช้กากถั่วเหลืองเพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร ทำให้ได้อาหารเพื่อสุขภาพ จากการทดลองผลิตคุกกี้ โดยใช้กากถั่วเหลืองสดที่ได้จากการผลิตนมถั่วเหลืองที่เลียนแบบการผลิตในครัวเรือน และกากถั่วเหลืองสดจากโรงงานผลิตนมถั่วเหลืองขนาดใหญ่ทดลองทดแทนแป้งสาลีที่ระดับ 60, 70 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแป้ง พบว่ากากถั่วเหลืองทั้งสองชนิดทดแทนแป้งสาลีได้ 80 เปอร์เซ็นต์ คุกกี้ที่ใช้กากถั่วเหลืองสดมีปริมาณเส้นใยอาหารมากกว่าคุกกี้เนยสูตรควบคุมถึง 4.61 เท่า และสามารถเก็บในถุงโพลีโพพิลีนที่อุณหภูมิห้องได้มากกว่า 21 วัน

นอกจากผลิตภัณฑ์ในกลุ่มเบเกอรี่ กากถั่วเหลืองอาจนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก เนื่องจากกากถั่วเหลืองมีสารอาหารที่มีประโยชน์ จึงใช้เป็นสับสเตรท (substrate) สำหรับการหมักของเชื้อได้ดี

Khare และคณะ (1995) ศึกษาการใช้กากถั่วเหลืองหรือ Okara ในการผลิตกรดซิตริกโดยการหมักในสภาวะอาหารแข็งด้วยเชื้อ *Aspergillus terreus* ซึ่งสามารถย่อยเซลลูโลสและย่อยแป้งได้ร่วมกับเชื้อ *Aspergillus niger* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตกรดซิตริก พบว่าที่ pH 8.3 และอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก 30 องศาเซลเซียส ให้การผลิตกรดซิตริก 5.10 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ในวันที่ 8 ของการหมัก

Ohno และคณะ (1996) ได้ศึกษาความเป็นไปได้ของการนำกากถั่วเหลืองซึ่งเป็นผลพลอยได้หรือของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง หรือที่เรียกว่า okara มาใช้เพื่อการผลิตไอทูริน (Iturin) หรือสารยับยั้งเชื้อราและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคในพืช เช่น มะเขือเทศ ในสภาวะการหมักบนอาหารแข็ง โดยนำกากถั่วเหลืองมาหมักกับเชื้อ *Bacillus subtillis* มีการควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

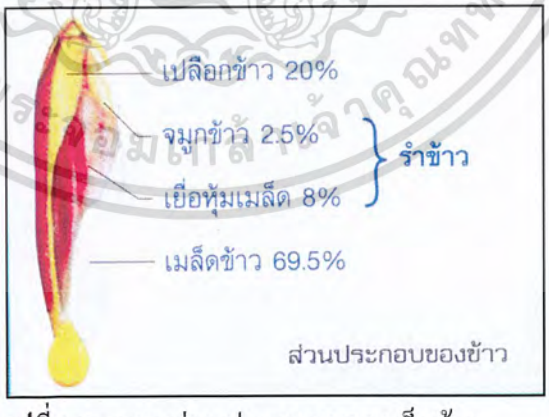
อุณหภูมิละความชื้น ในการหมักแบ่งเป็น 2 ระดับ คือ ใช้ okara 15 กรัม และ 3 กิโลกรัม โดยทั้งสองระดับมีปริมาณความชื้นเท่ากัน คือ 82 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาในการหมักทั้งสิ้น 48 ชั่วโมง พบว่าให้ผลการผลิตไอทูรินมากกว่าการหมักในอาหารเหลว 6-8 เท่า โดยปริมาณไอทูรินที่ผลิตได้จากการหมักใน okara 15 กรัม คือ 1.65 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักเปียก และการหมักใน okara 3 กิโลกรัม ให้ไอทูรินประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของการหมักใน okara 15 กรัม

Yokata และคณะ (1996) นำกากถั่วเหลืองมาหมักกับเชื้อ *Bacillus natto* ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อผลิตสารแอนตี้ออกซิแดนท์ (crude antioxidant preparation NTX) ช่วยลดการอักเสบของเนื้อเยื่อที่อักเสบและบวมของเท้า (foot edema) นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในอาหารหมัก ได้แก่ นัตโต (natto) และเทมเป้ (tempeh) การนำกากถั่วเหลืองมาหมักกับเชื้อจุลินทรีย์จะได้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีคุณภาพเช่นเดียวกับการใช้ถั่วเหลืองทั้งเมล็ด

2.8.2 รำข้าว (rice bran)

รำข้าวเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการสีข้าว (milling rice) รำข้าวมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองปนน้ำตาล ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ของเมล็ดข้าว ดังรูปที่ 2.6 รำข้าวแบ่งออกเป็น รำข้าวกล้องหรือรำหยาบซึ่งมีประมาณน้ำมันน้อย นิยมใช้สำหรับเลี้ยงสัตว์, รำผสม, รำสกัดน้ำมัน และรำข้าวขาวหรือรำละเอียดซึ่งมีปริมาณน้ำมันประมาณร้อยละ 17.0-22.9 จึงจะเหมาะสมสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบการผลิตน้ำมัน เป็นต้น

(www.agri.ubu.ac.th/~kanjana/1203321/Data/rice_bran.doc (7 กุมภาพันธ์ 2554))



รูปที่ 2.6 แสดงส่วนประกอบของเมล็ดข้าว

ที่มา : http://www.goodoryza.com (มีนาคม 2554)

รำหยาบ : มีส่วนของเปลือกนอกติดกับเมล็ดข้าว ส่วนของจมูกข้าว ส่วนของปลายข้าว และอาจมีส่วนของแกลบปนมาด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รำละเอียด : ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว ปลายข้าวและแกลบเล็กน้อย

รำสกัดน้ำมัน : ได้จากการนำรำละเอียดหรือรำสดไปสกัดน้ำมันด้วยสารเคมี

องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในรำข้าว ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน ไขมัน แร่ธาตุ วิตามิน แสดงดังตารางที่ 2.9 รำข้าวมีคุณสมบัติในการดูดซับ (adsorption) และคายความชื้น (desorption) ดังนั้นค่าความชื้นในรำข้าวจึงเปลี่ยนแปลงไปตามค่าความชื้นสัมพันธ์ของบรรยากาศ ซึ่งมีผลต่อความเสถียรของรำข้าวในระหว่างการเก็บรักษา

ตารางที่ 2.9 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของรำข้าว

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์			
	รำอ่อน	รำหยาบ	รำข้าวขาว	รำสกัดน้ำมัน
ความชื้น	9.0	10.0	10.0	9.0
โปรตีน	13.4	7.1	11.8	15.0
ไขมัน	15.1	2.6	13.2	1.0
เยื่อใย	11.0	27.4	3.0	13.0
เถ้า	10.9	16.2	8.0	15.9
แป้งรวม	40.5	36.4	54.0	47.0
แคลเซียม	0.06	0.4	0.04	0.12
ฟอสฟอรัส	1.82	1.42	1.42	1.48
ไทอามีน (mg/kg)	22.4	-	19.7	-
ไนอาซีน	303.2	-	531.7	-
โคลีน (mg/kg)	1254.0	-	1307.0	-
ไลซีน (mg/kg)	0.50	0.50	0.50	-
ทริปโตเฟน	0.10	0.10	0.10	-

ที่มา : http://www.nsru.ac.th/e-learning/dairy/lesson3_9.php#Scene_1 (7 กุมภาพันธ์ 2554)

2.8.3 ปลายข้าว (Broken - milled rice)

ปลายข้าวเป็นผลพลอยได้จากการสีข้าว ซึ่งจะได้ส่วนของปลายข้าว ประมาณ 15% ปลายข้าวประกอบด้วยเศษข้าวที่หักและส่วนของจมูกข้าว โดยทั่วไปปลายข้าวมีโปรตีนประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ มีไขมันและเยื่อใยต่ำ ปลายข้าวมี 3 ขนาด คือขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่หรือที่เรียกกันว่าข้าวท่อน ปลายข้าวขนาดเล็กมักมีส่วนของจมูกข้าวซึ่งเป็นต้นอ่อนที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีน ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุมากกว่าส่วนอื่นของเมล็ดจึงเหมาะกับการเลี้ยงสัตว์มากกว่า เพราะสัตว์สามารถย่อยและใช้ประโยชน์ได้ดีกว่า องค์ประกอบทางเคมีของปลายข้าว แสดงดังตารางที่ 2.10

ตารางที่ 2.10 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของปลายข้าว

องค์ประกอบทางเคมี	เปอร์เซ็นต์
ความชื้น	12.0
โปรตีน	8.0
ไขมัน	0.9
เยื่อใย	1.0
เถ้า	0.7
แคลเซียม	0.03
ไลซีน	0.04
เมทไธโอนีน	0.27
เมทไธโอนีน + ซีสทีน	0.27
ทริปโตเฟน	0.32
ทรีโอนีน	0.10
ไอโซลูซีน	0.36
อาร์จินีน	0.45
ลูซีน	0.71
เฟนิลอะลานีน + ไทโรซีน	1.15
ฮิสติดีน	0.18
เวลีน	0.53
ไกลซีน	0.71

ที่มา : http://www.dld.go.th/inform/krice.html (7 กุมภาพันธ์ 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.4 ข้าวฟ่าง (Sorghum)

เมล็ดข้าวฟ่างเป็นอาหารที่สำคัญของในทวีปแอฟริกา ประเทศอินเดียและจีน มนุษย์อาจบริโภคข้าวฟ่างโดยตรงเป็นอาหารหลัก โดยหุงต้มคล้ายข้าว หรือบริโภคในรูปของผลิตภัณฑ์ทำจากแป้งข้าวฟ่าง นอกจากนี้นิยมใช้ข้าวฟ่างผสมเป็นอาหารสัตว์ ข้อได้เปรียบของข้าวฟ่าง เมื่อเทียบกับข้าวโพด ก็คือ ราคาถูกกว่า แม้ว่าข้าวฟ่างจะมีไขมันน้อยกว่าข้าวโพดเล็กน้อย ต้นและใบของข้าวฟ่างบางชนิด ใช้ทำหญ้าแห้ง หญ้าหมัก หรือทุ่งหญ้าเลี้ยงสัตว์ได้เป็นอย่างดี องค์ประกอบสำคัญโดยประมาณของข้าวฟ่าง แสดงดังตารางที่ 2.10

(www.agri.ubu.ac.th/~kanjana/1203321/Data/rice_bran.doc (7 กุมภาพันธ์ 2554))

ตารางที่ 2.11 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของข้าวฟ่าง

ส่วนประกอบทางเคมี	เปอร์เซ็นต์
ความชื้น	12.0
โปรตีน	10.4
ไขมัน	3.1
เยื่อใย	2.0
เถ้า	1.6
คาร์โบไฮเดรต	70.7

ที่มา : http://www.blackherbals.com/homepage2.htm (28 เมษายน 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

- ข้าวฟ่างอาหารสัตว์
- ปลายข้าว ปลายข้าวที่ใช้ในการวิจัยเป็นปลายข้าวผสมระหว่างพันธุ์ชัยนาท ปทุม และข้าวหอมมะลิ
- รำข้าวหยาบ
- กากถั่วเหลือง จากน้ำเต้าหู้

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

- เชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp.N-2062

3.1.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (autoclave) HIRAYAMA รุ่น HA-300M IV
- เครื่องเขย่า (shaker) LABNET รุ่น ORBIT 1900
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) UNICO รุ่น 2800A
- เครื่องวัดค่าการเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) DENVER instrument รุ่น UB-10
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge) รุ่น Spectrafuge 16 M
- เครื่องเขย่าผสม (votex mixer) VELP scientific ประเทศอิตาลี
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง OHAUS รุ่น AR 2140
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง LIBROR รุ่น EB-4000H
- ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow) FASTER รุ่น Bio 48
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator) MEMMERT รุ่น BE 600
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven) CONTHERM รุ่น thermotec 2000
- กล้องจุลทรรศน์ (microscope) OLYMPUS ประเทศญี่ปุ่น
- โถดูดความชื้น (dasicator)
- เฮมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)
- เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ไมโครปิเปต
- หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 1.7 มิลลิลิตร (microcentrifuge) บริษัท COSTAR
- เครื่องแก้วชนิดต่างๆ
- คิวเวตแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร
- ผ้าขาวบาง
- ถ้วยหาความชื้น (moisture can)

3.1.4 สารเคมี

- กรดโคจิก
- ทวีน 80 (Tween 80)
- แอมโมเนียซัลเฟต [$(NH_4)_2 SO_4$]
- แมกนิเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 .7H_2O$)
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$)
- วุ้น (Agar)

3.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Potato Dextros Agar (PDA)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *Aspergillus* sp. N-2062

เขี่ยเชื้อรา *Aspergillus* sp. N-2062 อายุ 7 วัน ลงในอาหาร PDA ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลากส์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญและสร้างสปอร์ เตรียมสารแขวนลอยสปอร์โดยเติมน้ำกลั่นที่มีทวีน 80 (0.05 เปอร์เซ็นต์) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงใน ฟลาสก์ที่มีเชื้อราเจริญอยู่ (ประมาณ 40 มิลลิลิตร) ใช้ช้อนสแตนเลสด้ามยาวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขูดให้สปอร์ออกจากเส้นใย จากนั้นทำการกรองเส้นใยออกโดยกรองผ่านสำลีที่วางบนกรวยแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำส่วนของเหลวที่กรองได้ซึ่งจะมีสปอร์แขวนลอยอยู่มานับจำนวน โดยใช้ Haemacytometer นำสปอร์ที่นับได้มาใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง 1 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062 บนอาหารแข็ง

อาหารแข็งที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อราเพื่อผลิตกรดโคจิก ประกอบไปด้วยแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด คือข้าวฟ่าง และปลายข้าว แหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด คือกากถั่วเหลือง และรำข้าว อาหารแข็งที่ใช้ศึกษามี 4 สูตร ดังนี้

สูตรที่ 1 ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลือง

สูตรที่ 2 ข้าวฟ่างและรำข้าว

สูตรที่ 3 ปลายข้าวและกากถั่วเหลือง

สูตรที่ 4 ปลายข้าวและรำข้าว

นำแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมาผสมกันในอัตราส่วน 6:4 7:3 8:2 และ 9:1 โดยน้ำหนัก (ตามสูตรที่กำหนด) ปรับความชื้นเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแบ่งอาหารใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณฟลาสก์ละ 50 กรัม นำอาหารทั้งหมดไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นจากนั้นเติมสารละลายสปอร์ที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2.1 โดยมีจำนวนสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 2×10^6 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อสกัดหาปริมาณกรดโคจิกและค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร บันทึกผล และทำการเปรียบเทียบเพื่อหาสูตรอาหารและอัตราส่วนที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุดเพื่อนำไปศึกษาต่อ

3.2.3 ศึกษาผลของการเติมสารละลายแร่ธาตุที่มีต่อการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง

สารละลายแร่ธาตุที่ใช้ประกอบด้วย แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) เข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl_2) 1 กรัมต่อลิตร และ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 2 กรัมต่อลิตร เตรียมอาหารแข็งสูตรที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดที่คัดเลือกไว้จากข้อ 3.2.2 มา 2 สูตร ทำการเติมสารละลายแร่ธาตุปริมาตร 2 มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 กรัมลงในสูตรอาหารที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากัน ปรับปริมาณความชื้นเริ่มต้นให้เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ แบ่งอาหารลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณฟลาสก์ละ 50 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งให้เย็นแล้วนำไปเติมสารละลายสปอร์ที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2.1 โดยจะมีจำนวนสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 2×10^6 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อสกัดหาปริมาณกรดโคจิกและวัดพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปของอาหารแข็ง บันทึกผล และเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารที่ไม่มีการเติมสารละลายแร่ธาตุกับสูตรอาหารที่มีการเติมสารละลายแร่ธาตุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การสกัดกรดโคจิก

ชั่งอาหารที่มีการเจริญของเชื้อรา 5 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นผสมทวีน 80 (0.05 เปอร์เซ็นต์) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไป นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมากรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกส่วนที่เป็นของเหลวออก นำอาหารแข็งที่แยกได้ไปสกัดซ้ำด้วยวิธีการเดิมดังกล่าวข้างต้น กระทั่งกรดโคจิกถูกสกัดออกจนหมด วิธีการตรวจสอบกรดโคจิกในสารละลายที่สกัดจากอาหารแข็งโดยหยดเฟอร์ริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ลงไป สังเกตการณ์เปลี่ยนสี ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีแดงแสดงว่ายังมีกรดโคจิกเหลืออยู่ในอาหารแข็ง จึงต้องสกัดซ้ำ และทดสอบจนกว่าจะไม่มีการเปลี่ยนสี บันทึกปริมาตรของน้ำกลั่นที่ใช้ นำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิก (ภาคผนวก ข.1)

3.3 การวิเคราะห์

3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิก **(ภาคผนวก ข.1)**

3.3.2 การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของอาหารแข็ง **(ภาคผนวก ข.2)**

3.3.3 การวิเคราะห์ค่าพีเอช (pH) **(ภาคผนวก ข.3)**

3.3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ **(ภาคผนวก ข.4)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062 บนอาหารแข็ง

ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลือง ข้าวฟ่างและรำข้าว ปลายข้าวและกากถั่วเหลือง ปลายข้าวและรำข้าว โดยมีสปอร์เริ่มต้น $2x10^6$ สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม ที่ความชื้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 7 วัน

4.1.1 การผลิตกรดโคจิกโดยใช้อาหารแข็งสูตรข้าวฟ่างและกากถั่วเหลือง

จากการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง โดยใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 6:4 พบว่าในวันที่ 1 ถึงวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ หลังจากนั้นมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง คือ 19.57 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นปริมาณกรดโคจิกเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงไม่มาก โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 4.3 - 5.3 และมีอัตราการผลิตกรดโคจิก 3.91 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน (ดังรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.1)

เมื่อใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 7:3 พบว่าในวันที่ 1 ถึงวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ปริมาณกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ หลังจากนั้นมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง คือ 27.38 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นปริมาณกรดโคจิกเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงไม่มาก โดยค่าพีเอชจะอยู่ระหว่าง 4.8 - 5.4 และมีอัตราการผลิตกรดโคจิก 5.48 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน (ดังรูปที่ 4.2 และตารางที่ 4.2)

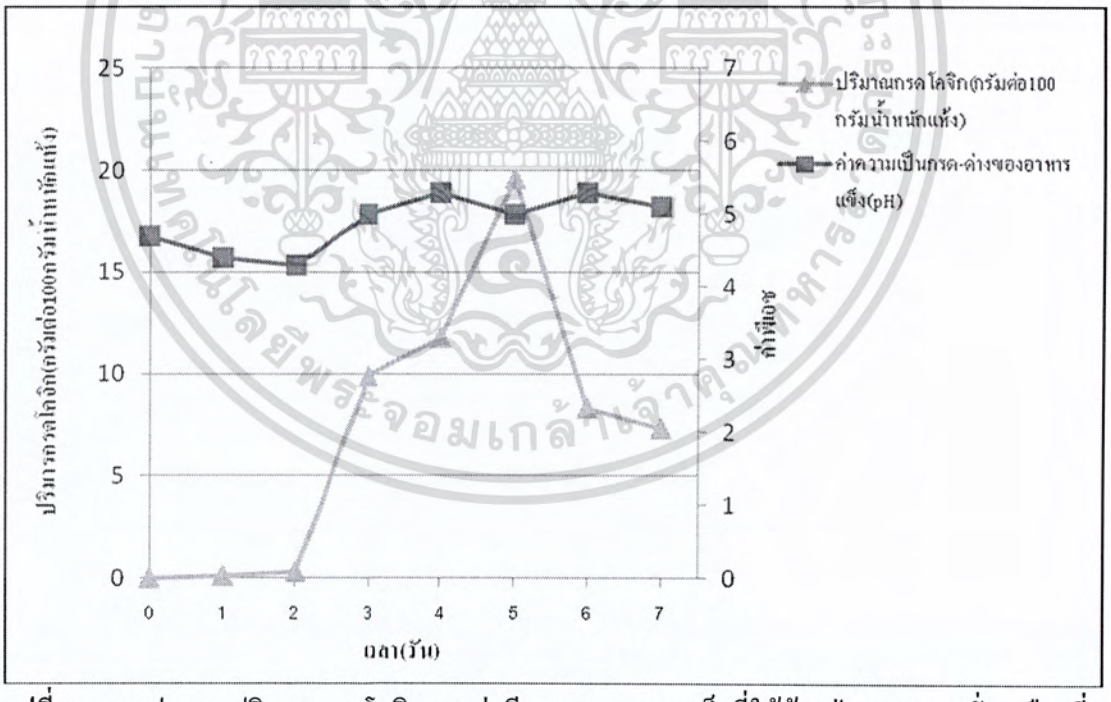
เมื่อใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 พบว่าในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง มีการผลิตกรดโคจิกเพียงเล็กน้อย หลังจากนั้นมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง คือ 29.23 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นปริมาณกรดโคจิกเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงไม่มาก โดยจะอยู่ในช่วง 4.8 - 5.2 และอัตราการผลิตกรดโคจิก 7.31 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน (ดังรูปที่ 4.3 และตารางที่ 4.3)

เมื่อใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 พบว่าในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง มีการผลิตกรดโคจิกเพียงเล็กน้อย หลังจากนั้นมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 6:4

เวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารแข็ง (pH)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง)
0	4.7	0
1	4.4	0.09
2	4.3	0.29
3	5.0	9.90
4	5.3	11.78
5	5.0	19.57
6	5.3	8.33
7	5.1	7.30

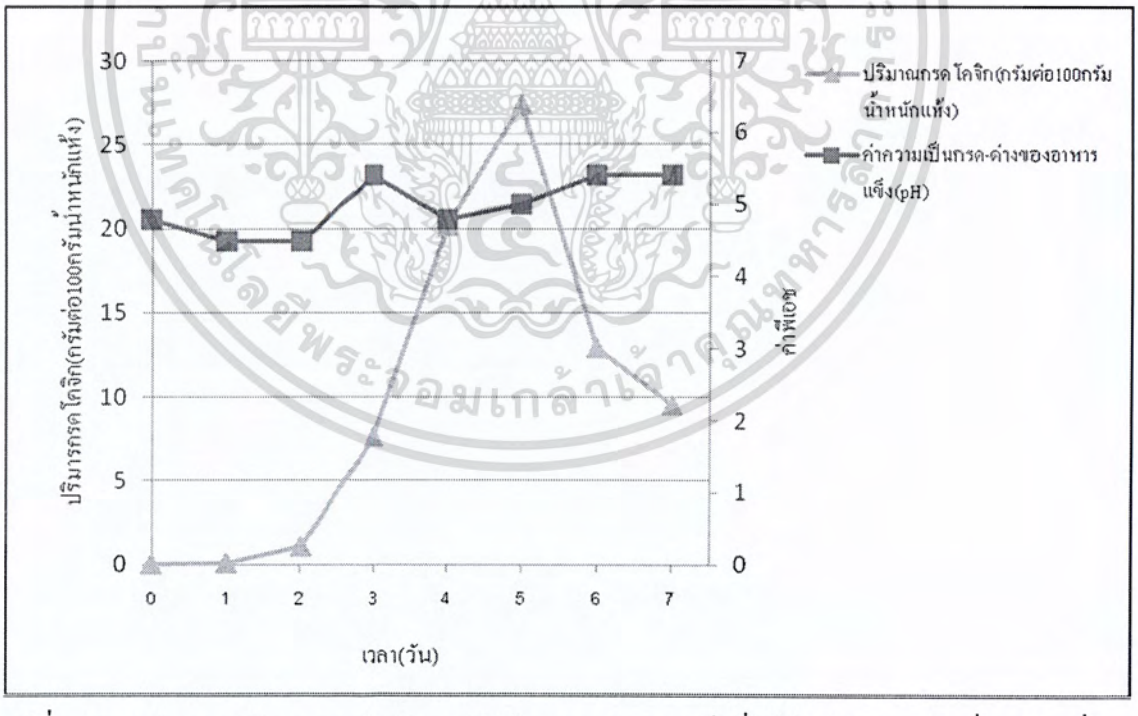


รูปที่ 4.1 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 6:4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 7:3

เวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารแข็ง (pH)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง)
0	4.8	0
1	4.5	0.06
2	4.5	1.06
3	5.4	7.65
4	4.8	20.13
5	5.0	27.38
6	5.4	12.94
7	5.4	9.54

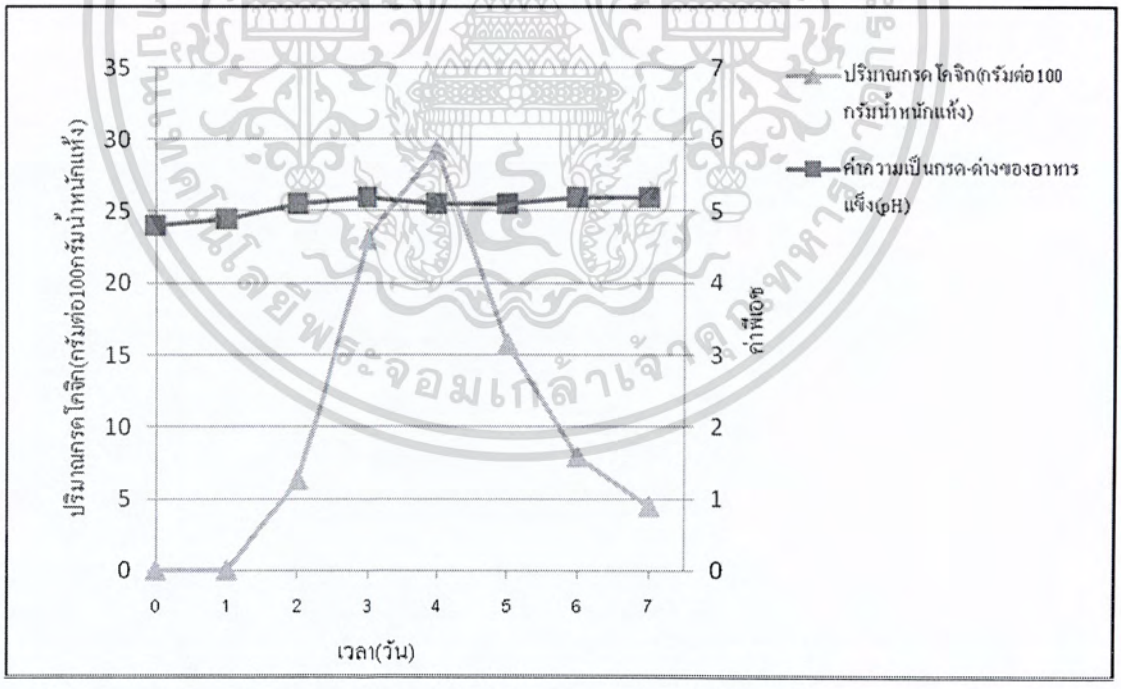


รูปที่ 4.2 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 7:3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2

เวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารแข็ง (pH)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง)
0	4.8	0
1	4.9	0.06
2	5.1	6.63
3	5.2	24.20
4	5.1	29.23
5	5.1	16.55
6	5.2	8.33
7	5.2	4.72

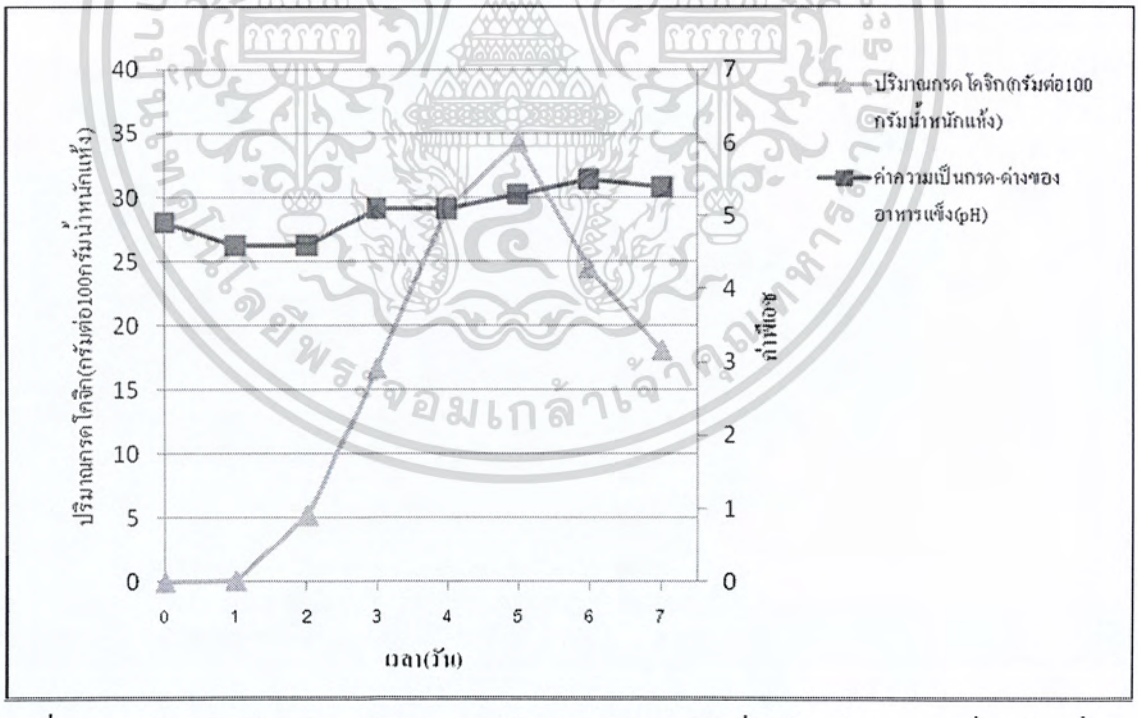


รูปที่ 4.3 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1

เวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารแข็ง (pH)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง)
0	4.9	0
1	4.6	0.05
2	4.6	5.21
3	5.1	16.69
4	5.1	29.06
5	5.3	34.33
6	5.5	24.44
7	5.4	18.09



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากนั้นปริมาณกรดโคจิกเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงไม่มาก โดยจะอยู่ในช่วง 4.6 - 5.5 และอัตราการผลิตกรดโคจิก 6.87 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน (ดังรูปที่ 4.4 และตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและกากถั่วเหลือง

อัตราส่วน ข้าวฟ่าง:กากถั่วเหลือง	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)
6:4	19.57[c]
7:3	27.38[b]
8:2	29.23[b]
9:1	34.33[a]

กำหนดให้ ตัวอักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรที่เหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 4.5 แสดงผลจากการคำนวณค่าทางสถิติโดยแสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วนต่างๆ กัน ซึ่งปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 6:4 7:3 8:2 และ 9:1 พบว่าที่อัตราส่วน 9:1 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 34.33 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง มีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 6.87 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน เนื่องจากข้าวฟ่างทำให้เกิดช่องว่างระหว่างอาหารแข็ง อากาศจึงกระจายตัวในอาหารได้ดี ทำให้เชื้อรามีอากาศเพียงพอสำหรับการเจริญและแทรกไปในอาหารได้อย่างทั่วถึง นอกจากนี้กากถั่วเหลืองยังเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสม เนื่องจากอุดมไปด้วย โปรตีน กรดอะมิโนจำเป็น เกลือแร่และวิตามินต่างๆ (http://th.wikipedia.org/wiki)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การผลิตกรดโคจิกโดยใช้อาหารแข็งสูตร ข้าวฟ่างและรำข้าว

จากการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง โดยใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 6:4 พบว่าในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงยังไม่มีการผลิตกรดโคจิก หลังจากนั้นมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง คือ 10.24 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นปริมาณกรดโคจิกเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงไม่มาก โดยค่าพีเอชจะอยู่ระหว่าง 5.4 - 6.5 และอัตราการผลิตกรดโคจิก 2.05 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน (ดังรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.6)

เมื่อใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 7:3 พบว่าในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงยังไม่มีการผลิตกรดโคจิก หลังจากนั้นมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างอย่างต่อเนื่อง และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง คือ 18.26 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นปริมาณกรดโคจิกเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงไม่มาก โดยค่าพีเอชจะอยู่ระหว่าง 5.4 - 5.9 และอัตราการผลิตกรดโคจิก 4.57 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน (ดังรูปที่ 4.6 และตารางที่ 4.7)

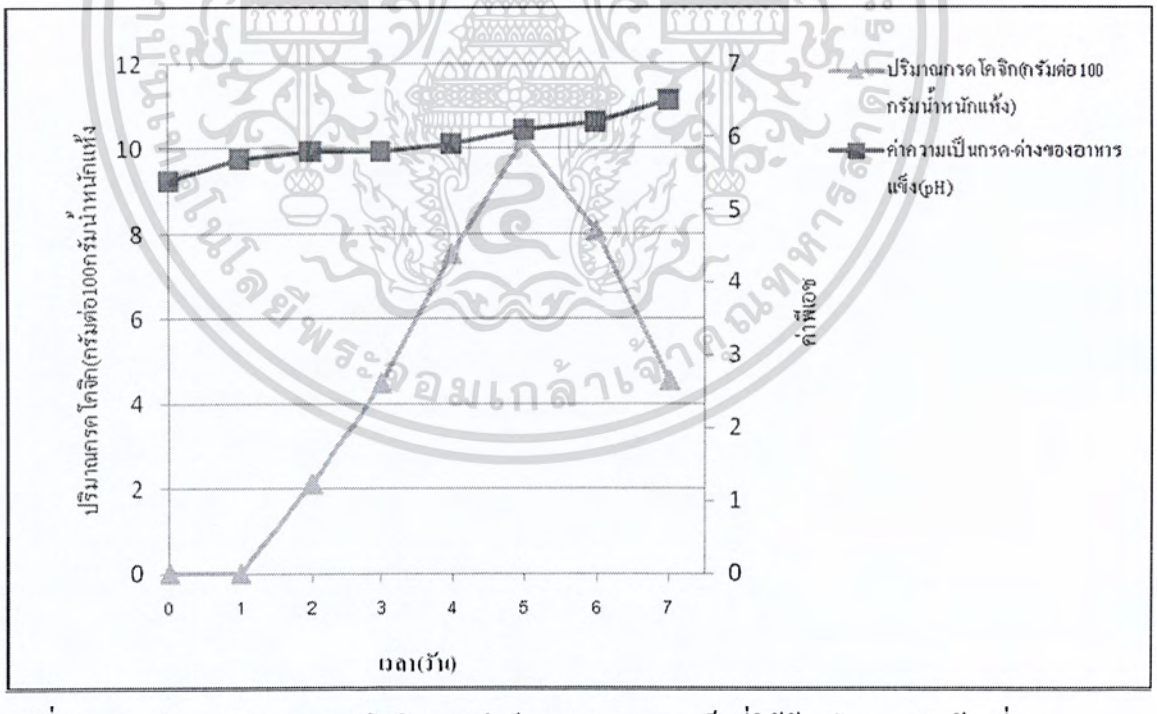
เมื่อใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 8:2 พบว่าในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงยังไม่มีการผลิตกรดโคจิก หลังจากนั้นมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง คือ 17.32 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นปริมาณกรดโคจิกเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงไม่มาก โดยจะอยู่ในช่วง 5.2 - 6.3 และอัตราการผลิตกรดโคจิก 3.46 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน (ดังรูป 4.7 และตารางที่ 4.8)

เมื่อใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 9:1 พบว่าในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงยังไม่มีการผลิตกรดโคจิก หลังจากนั้นมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง คือ 20.64 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นปริมาณกรดโคจิกเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงไม่มาก โดยจะอยู่ในช่วง 5.0 - 6.2 และอัตราการผลิตกรดโคจิก 4.13 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน (ดังรูปที่ 4.8 และตารางที่ 4.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 6:4

เวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารแข็ง (pH)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง)
0	5.4	0
1	5.7	0
2	5.8	2.12
3	5.8	4.50
4	5.9	7.53
5	6.1	10.24
6	6.2	8.08
7	6.5	4.55

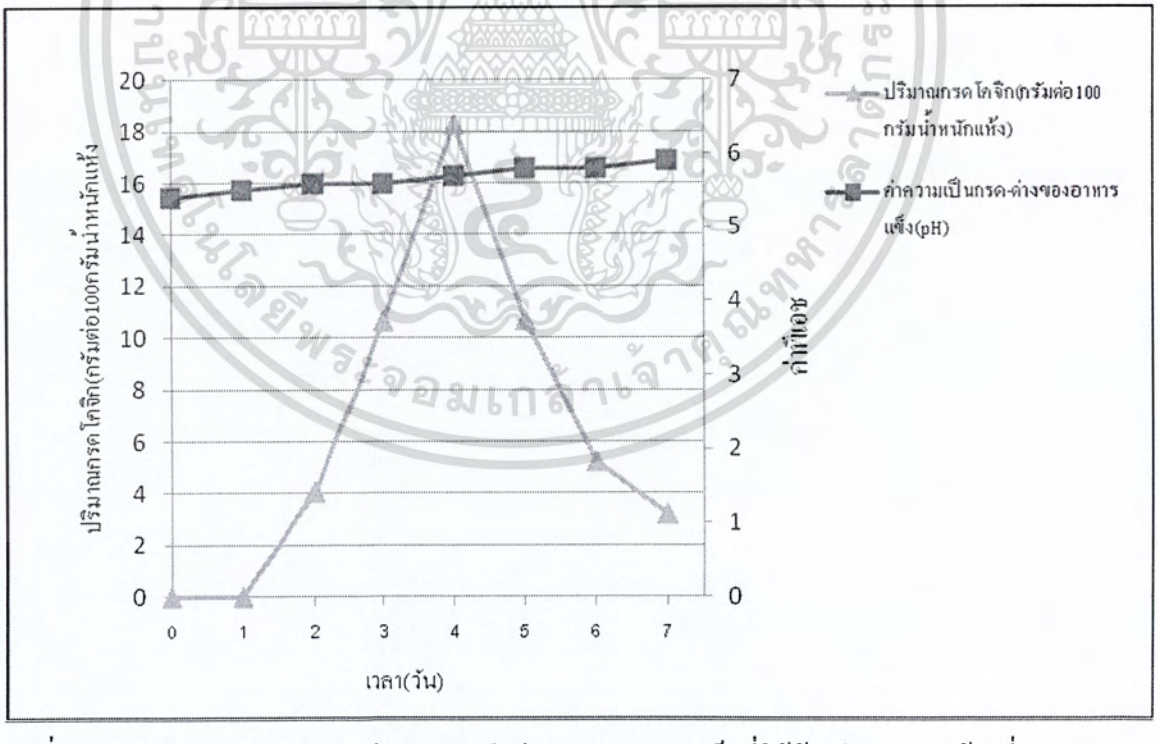


รูปที่ 4.5 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 6:4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 7:3

เวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารแข็ง (pH)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง)
0	5.4	0
1	5.5	0
2	5.6	4.02
3	5.6	10.61
4	5.7	18.26
5	5.8	10.67
6	5.8	5.25
7	5.9	3.21

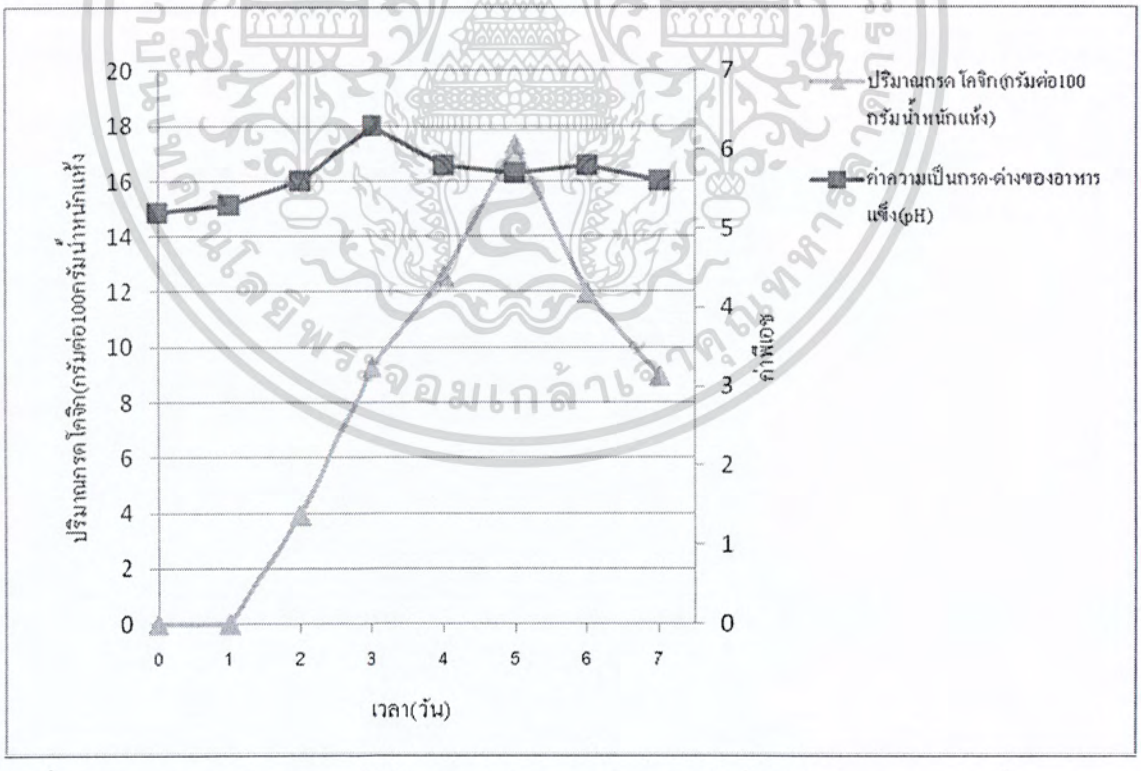


รูปที่ 4.6 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 7:3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 8:2

เวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารแข็ง (pH)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง)
0	5.2	0
1	5.3	0
2	5.6	3.90
3	6.3	9.26
4	5.8	12.53
5	5.7	17.32
6	5.8	11.97
7	5.6	8.95

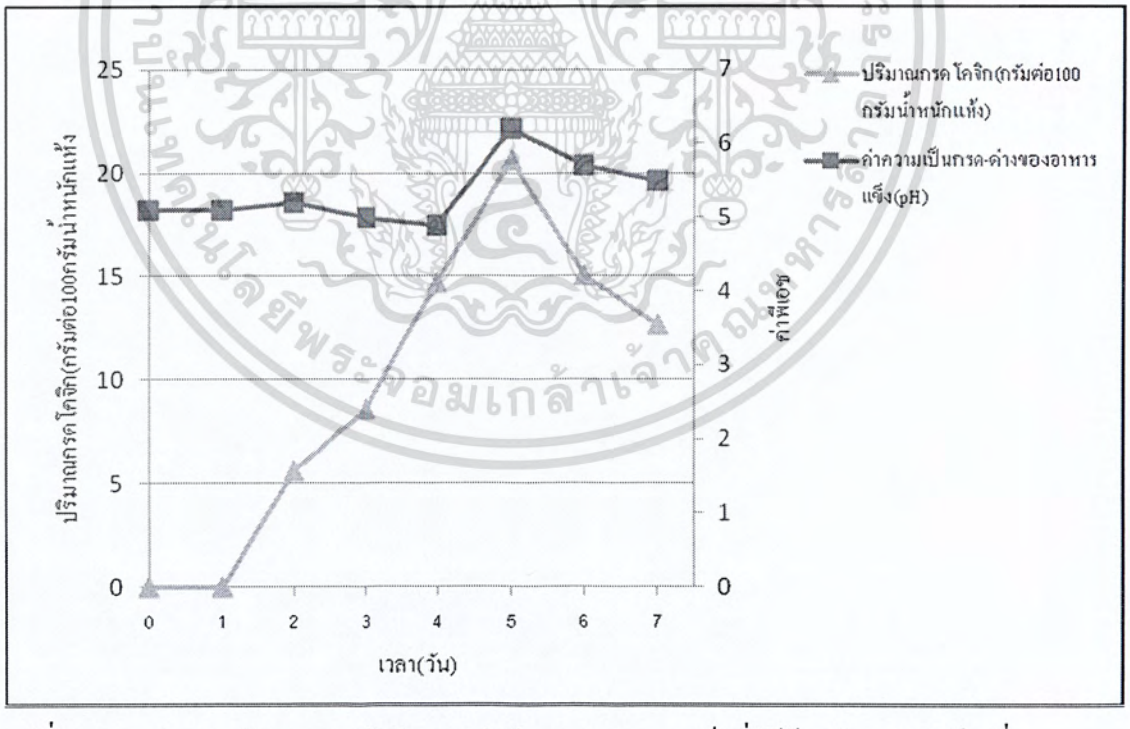


รูปที่ 4.7 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 8:2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 9:1

เวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารแข็ง (pH)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100 กรัมน้ำหนักแห้ง)
0	5.1	0
1	5.1	0
2	5.2	5.58
3	5.0	8.55
4	4.9	14.68
5	6.2	20.64
6	5.7	15.09
7	5.5	12.64



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 9:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและรำข้าว

อัตราส่วน ข้าวฟ่าง:รำข้าว	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)
6:4	10.24[c]
7:3	18.26[b]
8:2	17.32[b]
9:1	20.64[a]

กำหนดให้ ตัวอักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรที่เหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 4.6 แสดงผลจากการคำนวณค่าทางสถิติโดยแสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วนต่างๆ ซึ่งปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 6:4 7:3 8:2 และ 9:1 พบว่าที่อัตราส่วน 9:1 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด เท่ากับ 20.64 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง มีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 4.13 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน รองลงมาคือ อาหารแข็งที่ประกอบด้วยข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วน 7:3 ให้ปริมาณกรดโคจิก 18.26 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง อัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 4.57 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน เนื่องจากข้าวฟ่างทำให้เกิดช่องว่างระหว่างอาหารแข็ง อากาศจึงกระจายตัวในอาหารได้ดี ทำให้เชื้อรามีอากาศเพียงพอสำหรับการเจริญและแทรกไปในอาหารได้อย่างทั่วถึง นอกจากนี้ รำข้าวยังเป็นแหล่งอาหารที่ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต โปรตีน กรดอะมิโน แร่ธาตุ และวิตามินต่างๆ ช่วยส่งเสริมการเจริญ และเชื้อรา *Aspergillus* เป็นเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งได้ (www.agri.ubu.ac.th/~kanjana/1203321/Data/rice_bran.doc)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การผลิตกรดโคจิกโดยใช้อาหารแข็งสูตร ปลายข้าวและกากถั่วเหลือง

จากการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง โดยใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 6:4 พบว่าในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงยังไม่มีการผลิตกรดโคจิก หลังจากนั้นมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง คือ 20.96 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง อัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 5.24 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวันหลังจากนั้นปริมาณกรดโคจิกเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 4.9 - 6.8 (ดังรูปที่ 4.9 และตารางที่ 4.11)

เมื่อใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 7:3 พบว่าในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงยังไม่มีการผลิตกรดโคจิก หลังจากนั้นมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างอย่างต่อเนื่อง และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง คือ 16.49 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง อัตราการผลิตกรดโคจิก 4.12 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน หลังจากนั้นปริมาณกรดโคจิกเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 4.7 – 6.6 (ดังรูปที่ 4.10 และตารางที่ 4.12)

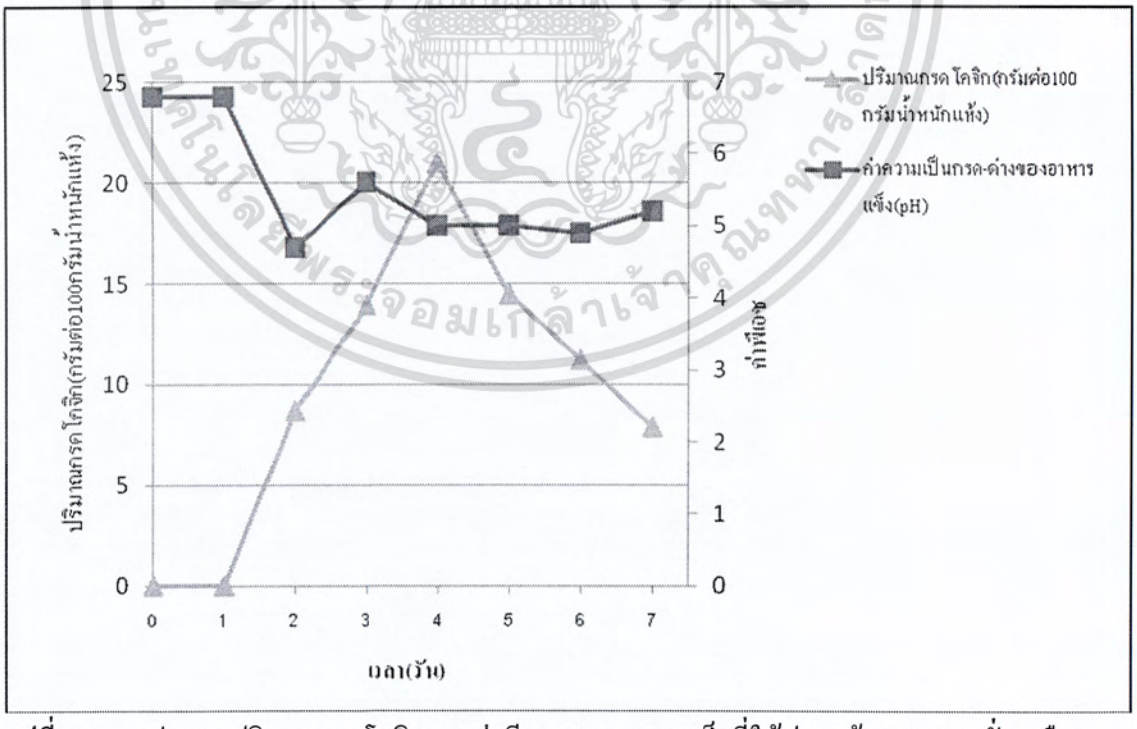
เมื่อใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 พบว่าในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงยังไม่มีการผลิตกรดโคจิก หลังจากนั้นมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง คือ 26.32 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง อัตราการผลิตกรดโคจิก 6.58 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน หลังจากนั้นปริมาณกรดโคจิกเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 4.4 - 6.2 (ดังรูปที่ 4.11 และตารางที่ 4.13)

เมื่อใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 พบว่าในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงยังไม่มีการผลิตกรดโคจิก หลังจากนั้นมีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง คือ 18.08 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง อัตราการผลิตกรดโคจิก 3.62 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน หลังจากนั้นปริมาณกรดโคจิกเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 4.4 - 4.9 (ดังรูปที่ 4.12 และตารางที่ 4.14)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลือง ที่อัตราส่วน 6:4

เวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารแข็ง (pH)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง)
0	6.8	0
1	6.8	0
2	4.7	8.71
3	5.6	13.95
4	5.0	20.96
5	5.0	14.45
6	4.9	11.22
7	5.2	7.88

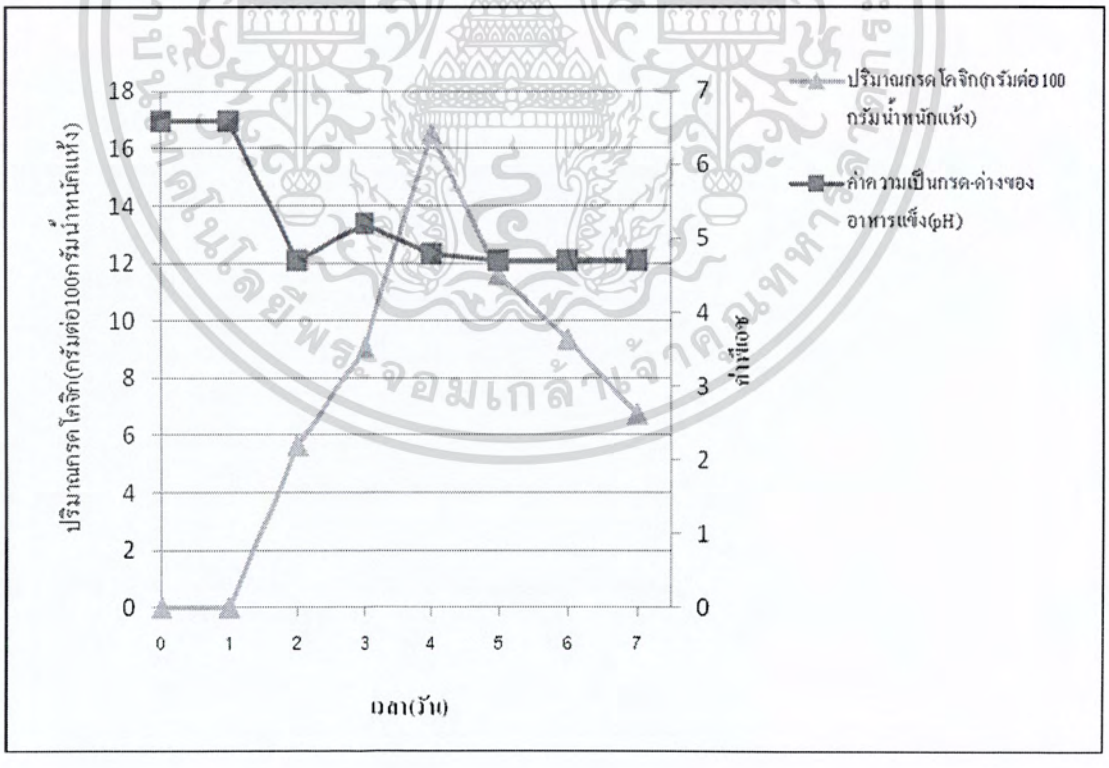


รูปที่ 4.9 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลือง ที่อัตราส่วน 6:4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 7:3

เวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารแข็ง (pH)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง)
0	6.6	0
1	6.6	0
2	4.7	5.61
3	5.2	9.08
4	4.8	16.49
5	4.7	11.61
6	4.7	9.35
7	4.7	6.72

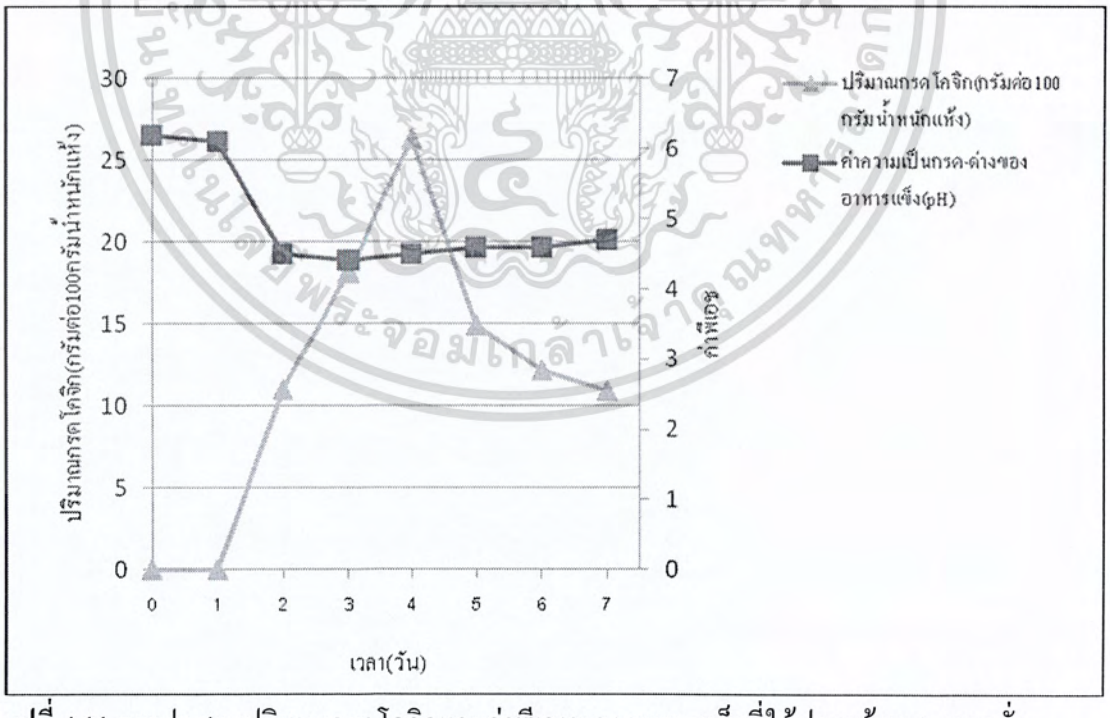


รูปที่ 4.10 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 7:3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2

เวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารแข็ง (pH)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง)
0	6.2	0
1	6.1	0
2	4.5	11.02
3	4.4	18.11
4	4.5	26.32
5	4.6	14.88
6	4.6	12.19
7	4.7	10.95

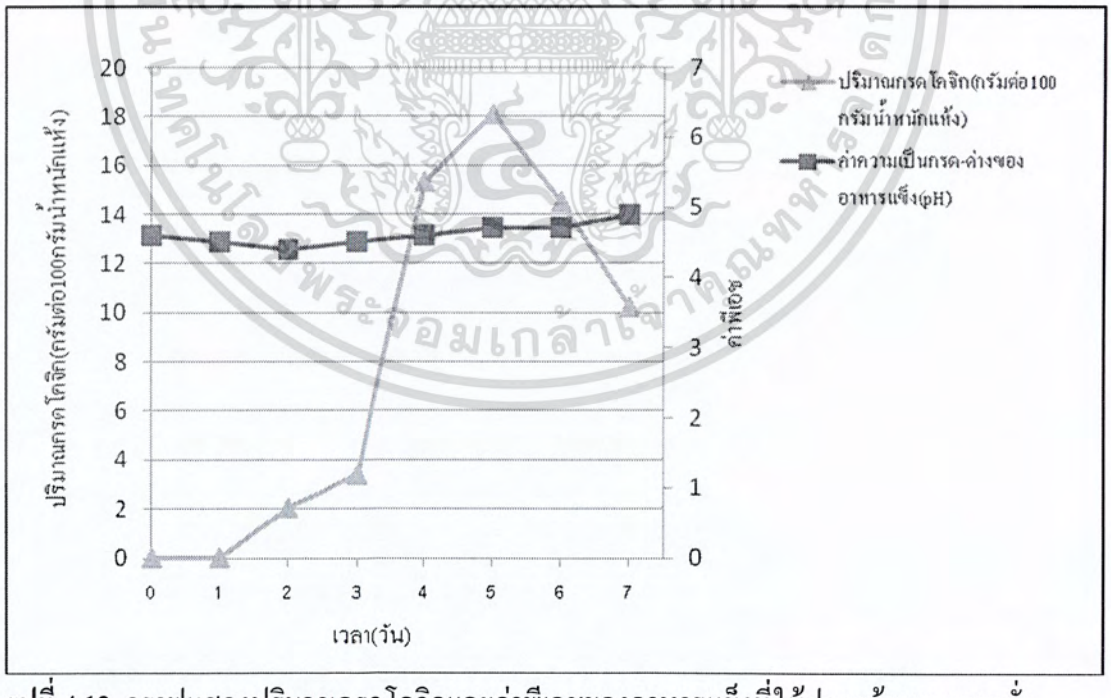


รูปที่ 4.11 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.14 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1

เวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารแข็ง (pH)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง)
0	4.6	0
1	4.5	0
2	4.4	2.05
3	4.5	3.40
4	4.6	15.32
5	4.7	18.08
6	4.7	14.48
7	4.9	10.23



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.15 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งชนิดปลายข้าวและกากถั่วเหลือง

อัตราส่วน ปลายข้าว:กากถั่วเหลือง	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)
6:4	20.96^{b}
7:3	16.49^{c}
8:2	26.32^{a}
9:1	18.08^{bc}

กำหนดให้ ตัวอักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรที่เหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 4.15 แสดงผลจากการคำนวณค่าทางสถิติโดยแสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วนต่างๆ ซึ่งปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วนต่างๆ พบว่าที่อัตราส่วน 8:2 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด เท่ากับ 26.32 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง มีอัตราการผลิตกรดโคจิกเป็น 6.58 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน เนื่องจากในอาหารที่มีปลายข้าว มีคาร์โบไฮเดรตปริมาณสูง เมื่อผสมกับกากถั่วเหลืองซึ่งประกอบด้วยโปรตีน กรดอะมิโน วิตามิน และแร่ธาตุต่างๆ จึงทำให้มีอาหารเพียงพอสำหรับการเจริญของเชื้อรา และการผลิตกรดโคจิก แต่ได้ปริมาณน้อยกว่าเมื่อใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 การผลิตกรดโคจิกโดยใช้อาหารแข็งสูตร ปลายข้าวและรำข้าว

จากผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งชนิดปลายข้าวและรำข้าว พบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อ *Aspergillus* sp. N-2062 เกิดขึ้นเนื่องจากการเติมน้ำเพื่อปรับความชื้นให้ได้ 70 เปอร์เซ็นต์ในอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าว หลังจากนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที พบว่าปลายข้าวและรำข้าวมีการจับตัวอัดแน่นเป็นก้อน ทำให้ช่องอากาศหรือโพรงอากาศระหว่างอาหารมีน้อย เชื้อราไม่สามารถเจริญแทรกเส้นใยเข้าไปในอาหารแข็งที่อยู่ด้านในได้ จึงไม่มีการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งที่ประกอบด้วยปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 6:4 7:3 8:2 9:1

ตารางที่ 4.16 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ

สูตรอาหาร	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)
ข้าวฟ่าง:กากถั่วเหลือง (9:1)	34.33^{a}
ข้าวฟ่าง:กากถั่วเหลือง (8:2)	29.23^{b}
ข้าวฟ่าง:กากถั่วเหลือง (7:3)	27.38^{bc}
ข้าวฟ่าง:กากถั่วเหลือง (6:4)	19.57^{defg}
ข้าวฟ่าง:รำข้าว (9:1)	20.64^{def}
ข้าวฟ่าง:รำข้าว (8:2)	17.32^{ef}
ข้าวฟ่าง:รำข้าว (7:3)	18.26^{efg}
ข้าวฟ่าง:รำข้าว (6:4)	10.24^{h}
ปลายข้าว:กากถั่วเหลือง (9:1)	18.08^{efg}
ปลายข้าว:กากถั่วเหลือง (8:2)	26.32^{c}
ปลายข้าว:กากถั่วเหลือง (7:3)	16.49^{f}
ปลายข้าว:กากถั่วเหลือง (6:4)	20.96^{d}

กำหนดให้ ตัวอักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรที่เหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.16 แสดงผลจากการคำนวณค่าทางสถิติโดยแสดงปริมาณกรดโคจิกสูงสุดที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ซึ่งปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062 จากอาหารแข็งสูตรต่างๆ พบว่าอาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองให้การผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด คือ 34.33 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ที่อัตราส่วน 9:1 คิดเป็นอัตราการผลิตกรดโคจิกต่อวัน เท่ากับ 6.78 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ส่วนอาหารแข็งชนิดที่ให้ปริมาณกรดโคจิกรองลงมา คือ อาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 และ 7:3 ให้ปริมาณกรดโคจิก 29.23 และ 27.38 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ สำหรับอาหารแข็งที่ประกอบด้วยปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 จะให้ปริมาณกรดโคจิกสูงกว่าที่อัตราส่วนอื่นๆคือ 26.32 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และอัตราการผลิตกรดโคจิกต่อวัน เท่ากับ 6.58 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง และอาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองผลิตกรดโคจิกได้น้อยที่สุดจากอาหารทั้งสามสูตร คือได้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดที่อัตราส่วน 9:1 เท่ากับ 20.64 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง อัตราการผลิตกรดโคจิกต่อวัน เท่ากับ 4.13 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ดังนั้นจึงเลือกอาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 และอาหารแข็งชนิดปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 มาศึกษาต่อเพื่อศึกษาผลของการเติมสารละลายแร่ธาตุที่มีต่อการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งทั้งสองสูตรและเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งสูตรที่มีการเติมและไม่เติมสารละลายแร่ธาตุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาผลของการเติมสารละลายแร่ธาตุที่มีต่อการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง

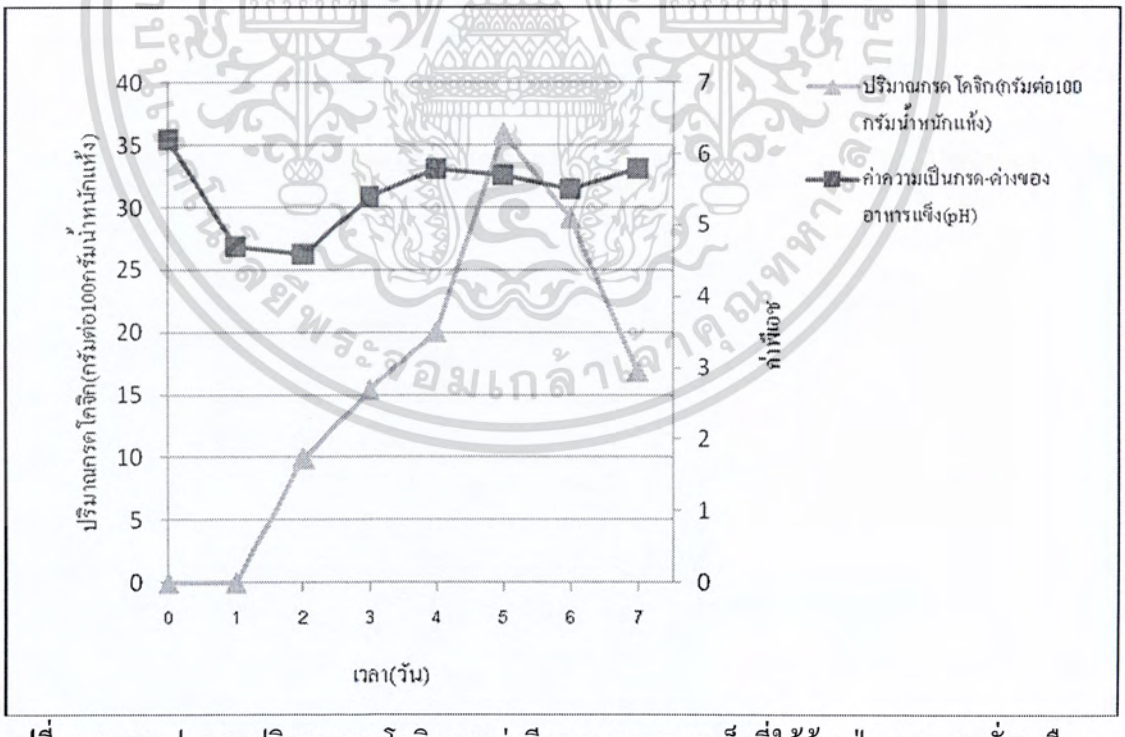
จากการศึกษาผลของการเติมสารละลายแร่ธาตุ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้ระหว่างสูตรอาหารที่เติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุ พบว่า อาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่เติมแหล่งแร่ธาตุในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงยังไม่มีการผลิตกรดโคจิก ต่อมามีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 35.94 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นการผลิตกรดโคจิกเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากจะมีพีเอชอยู่ในช่วง 4.6-6.2 (ตารางที่ 4.17) และมีอัตราการผลิตกรดโคจิก เท่ากับ 7.19 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่ไม่เติมแหล่งแร่ธาตุพบว่าอาหารสูตรที่เติมแหล่งแร่ธาตุให้ปริมาณกรดโคจิกสูงกว่าเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 4.18)

จากการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งชนิดปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่เติมแหล่งแร่ธาตุ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้ระหว่างสูตรอาหารที่เติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุ พบว่า อาหารแข็งชนิดปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่เติมแหล่งแร่ธาตุในวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยงยังไม่มีการผลิตกรดโคจิก ต่อมามีการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนมีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 28.04 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง หลังจากนั้นการผลิตกรดโคจิกเริ่มลดลง สำหรับค่าพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงไม่มาก จะมีพีเอชอยู่ในช่วง 4.4-4.7 (ตารางที่ 4.19) และมีอัตราการผลิตกรดโคจิก เท่ากับ 5.61 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารแข็งชนิดปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่ไม่เติมแหล่งแร่ธาตุพบว่าอาหารสูตรที่เติมแหล่งแร่ธาตุให้ปริมาณกรดโคจิกสูงกว่าเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 4.20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 ที่มีการเติมแหล่งแร่ธาตุ

เวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารแข็ง (pH)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง)
0	6.2	0
1	4.7	0
2	4.6	9.84
3	5.4	15.44
4	5.8	20.05
5	5.7	35.94
6	5.5	29.11
7	5.8	16.89

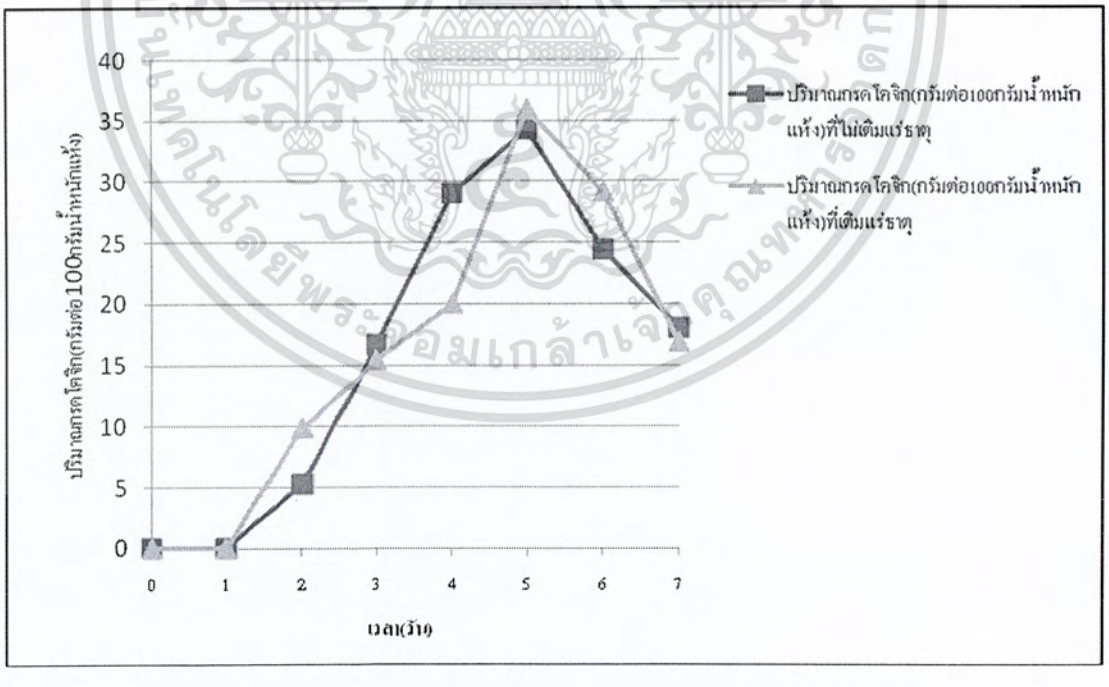


รูปที่ 4.13 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 ที่มีการเติมแหล่งแร่ธาตุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.18 เปรียบเทียบระหว่างข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่เติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุที่อัตราส่วน 9:1

เวลา (วัน)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง) ที่ไม่เติมแร่ธาตุ	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง) ที่เติมแร่ธาตุ
0	0	0
1	0.05	0
2	5.20	9.84
3	16.69	15.44
4	29.06	20.05
5	34.33	35.94
6	24.43	29.11
7	18.09	16.89

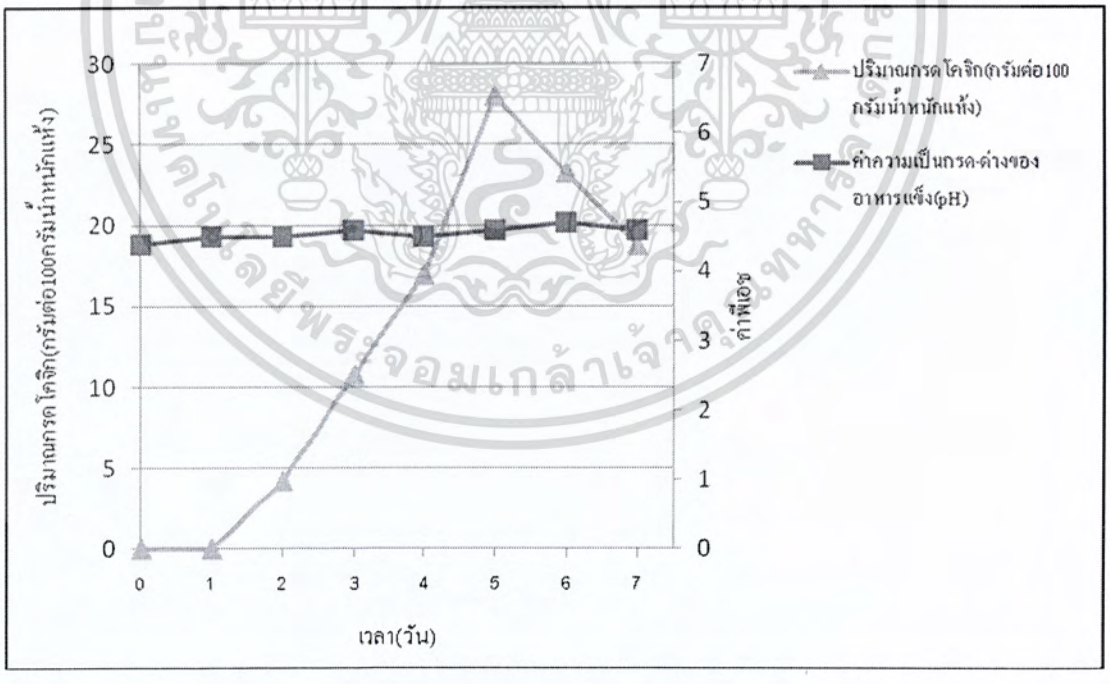


รูปที่ 4.14 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 ที่มีการเติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.19 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 ที่มีการเติมแหล่งแร่ธาตุ

เวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารแข็ง (pH)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง)
0	4.4	0
1	4.5	0
2	4.4	4.16
3	4.6	10.76
4	4.5	16.94
5	4.6	28.04
6	4.7	23.29
7	4.6	18.77

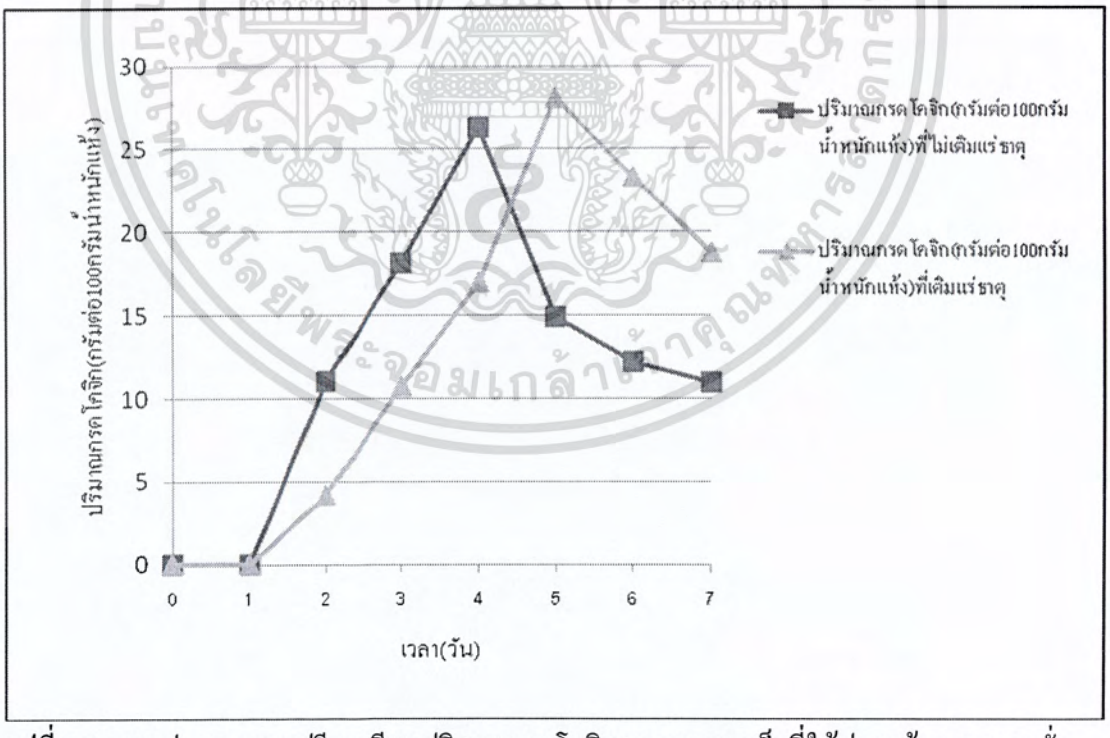


รูปที่ 4.15 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 ที่มีการเติมแหล่งแร่ธาตุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.20 เปรียบเทียบระหว่างปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่เติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุที่อัตราส่วน 8:2

เวลา (วัน)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง) ที่ไม่เติมแร่ธาตุ	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ100กรัมน้ำหนักแห้ง) ที่เติมแร่ธาตุ
0	0	0
1	0	0
2	11.02	4.16
3	18.11	10.76
4	26.32	16.94
5	14.88	28.04
6	12.19	23.29
7	10.95	18.77



รูปที่ 4.16 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 ที่มีการเติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.21 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่มีการเติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุ

สูตรอาหาร	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)
ข้าวฟ่าง:กากถั่วเหลือง (9:1) ที่ไม่เติมแร่ธาตุ	34.3338[a]
ข้าวฟ่าง:กากถั่วเหลือง (9:1) ที่เติมแร่ธาตุ	35.9405[a]

กำหนดให้ ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ตัวอักษรที่เหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 4.21 แสดงผลการคำนวณค่าทางสถิติโดยแสดงปริมาณกรดโคจิกสูงสุดที่ผลิตได้จากอาหารแข็งที่ใช้ข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 ที่เติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุ

อาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 ที่เติมแหล่งแร่ธาตุให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 35.94 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง มีอัตราการผลิตกรดโคจิก เท่ากับ 7.19 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่ไม่เติมแหล่งแร่ธาตุ ซึ่งได้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 34.33 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 4.21)

ตารางที่ 4.22 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งชนิดปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่มีการเติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุ

สูตรอาหาร	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)
ปลายข้าว:กากถั่วเหลือง (8:2) ที่ไม่เติมแร่ธาตุ	26.3203[a]
ปลายข้าว:กากถั่วเหลือง (8:2) ที่เติมแร่ธาตุ	28.0356[a]

กำหนดให้ ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
ตัวอักษรที่เหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.22 แสดงผลการคำนวณค่าทางสถิติโดยแสดงปริมาณกรดโคจิกสูงสุดที่ผลิตได้จากอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 ที่เติมและไม่เติมแหล่งแร่ธาตุ

อาหารแข็งชนิดปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่เติมแหล่งแร่ธาตุให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 28.04 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง มีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 5.61 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารแข็งชนิดปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่ไม่เติมแหล่งแร่ธาตุ ซึ่งได้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 26.32 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 4.22)

จากผลการศึกษาที่ได้แตกต่างจากผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 (จันทนีและปริยาภัทร, 2550) จากการใช้ปลายข้าว ข้าวโพดบด รำข้าว และกากถั่วเหลือง เป็นสับสเตรทเพื่อผลิตกรดโคจิก พบว่าเมื่อใช้ปลายข้าวและรำข้าวในอัตราส่วน 80:20 เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด อาหารแข็งที่เหมาะสมประกอบด้วย ปลายข้าว 8 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) รำข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่อกรัมอาหาร และอาหารมีความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลิตกรดโคจิกสูงสุด 3.10 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัม อัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 1.55 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยเชื้อสายพันธุ์กลาย *Aspergillus* sp. N-2062 โดยใช้แหล่งคาร์บอน คือ ข้าวฟ่าง และปลายข้าว แหล่งไนโตรเจน คือ กากถั่วเหลือง และรำข้าว ในอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจน 9:1 8:2 7:3 และ 6:4 โดยอาหารแข็งมีความชื้น 70 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เติมกล้าสปอร์ที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น $2x10^6$ สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัมน้ำหนักเปียก พบว่าอาหารแข็งที่ประกอบด้วยชนิดข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 34.33 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง อัตราการผลิตกรดโคจิก เท่ากับ 6.87 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน เมื่อใช้ปลายข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าอาหารที่ประกอบด้วยปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 ให้ปริมาณกรดโคจิกเท่ากับ 26.32 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง อัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 6.58 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งต่อวัน และเมื่อศึกษาผลของการเติมสารละลายแร่ธาตุต่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งที่ประกอบด้วยข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 และปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 พบว่าปริมาณกรดโคจิกจากอาหารทั้งสองชนิด เท่ากับ 35.94 และ 28.04 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารแข็งสูตรเดียวกันที่ไม่เติมสารละลายแร่ธาตุที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาวัสดุทางการเกษตรชนิดอื่นเพิ่มเติม เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการวิจัย เพื่อให้ได้แหล่งอาหารที่เหมาะสมและยังเป็นการลดต้นทุนในการผลิต

2. ควรทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกเพิ่มเติม เช่น อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ความชื้นเริ่มต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอุต และ จุนทนี จิตต์รำพึง. 2540. พจนานุกรม Food Additive. วารสารจาร์พา. ปีที่ 4 ฉบับที่ 33, 39 - 59

จันทนี สถิรสถาพร และปริยาภัทร แก้วภู่. 2550. การผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยเชื้อ *Aspergillus sp.* BR1. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพ.

ณัฐลดา พลแสน, ศุภมาศ สุขโสม และศุภางค์ ระรื่นรมย์. 2548. การผลิตกรดโคจิกจากแป้งโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพ.

ยุพร พืชกมุทร. 2550. การใช้ประโยชน์จากกากถั่วเหลือง. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Vol. II, 15th ed. Sec.985.29.

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

Arnstein, H.R.V. and Bentley, R. 1953. The Biosysthesis of Kojic. National Institute for Medical Research.54, 493 – 508

Arnstein, H.R.V. and Bentley, R. 1956. The Biosynthesis of kojic acid Production from pentose and methyl pentose. Biochem. J. 62, 403-411

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

Bentley, R. 1957. Preparation and analytsis of kojic acid. Method Enzymol. 3, 238-241.

Bordock, G.A., Soni, M.G., Carabin, I.G. 2001. Evaluation of health aspects of Kojic acid in food. Reg. Toxicol. Phamacol. 33, 80-101

El-Aaser, SA. 2006. Cultural conditions studies on Kojic acid Production by *Aspergillus parasiticus*. Int. J. Agric. Biol. 8, 468-473

Hesseltine, C.W. and Wang, H.L. 1977. Contributions of the Orient. Persented at Fifth International Conference on Global Impacts of Applied Microbiology

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Futamura. T., Okabe. M., Tamura. T., Toda. K., Matsunobu. T. and Park S.Y. 2000. Improvement of Production of Kojic Acid by a Mutant Strain *Aspergillus oryzae,* MK107-39. J. Biosci. Bioeng. 91(3), 272 – 276

Kahn, V., 1995. Effect of kojic acid on the oxidation of DL-DOPA, norepinephrine, and dopamine by mushroom tyrosinase. Pigment Cell Research 8, 235–240.

Kayahara, H., Tanabe, K. and Yamada, N. 1990. Amino acid and peptide derivatives of kojic acid and their antifungal properties. Agric. Biol. Chem. 54 (9), 2441 – 2442

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

Khare, S.K., Krishra Jha and Gandhi, A.P. 1995. Citric acid Production from Okara (soy-residue) by Solid-state Fermentation. Bioresour. Technol. 54, 323-325

Kitada, M., Fukimbara, T. 1970. Studies on kojic acid fermentation (IV). Kojic acid production by continuous culture. J. Ferment. Technol. 48, 411-415.

Kwak, M.Y., Rhee, J.S. 1991. Cultivation characteristics of immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production. Biotechnol. Bioeng. 39, 903-906.

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

Kunamneni, A., Permaul, K. and Singh, S. 2005. Amylase Production in Solid State Fermentation by the Thermophilic Fungus *Thermomyces lanuginosus*. J. Biosci. Bioeng. 100(2), 168-171

May, O.E., Herrick, H.T., Meyer, A.J. and Wells, P.A. 1931. The production of Kojic acid By *Aspergillus flavus*. J.Am. Chem. Soc. 53, 774 – 782

Morton, H.E., Kocholaty, W., R.J., Kelner, A. 1945. Toxicity and antibiotic activity of kojic acid produced by *Apergillus luteo-virecens*. J. Bacterial. 50, 579 - 584

Nakagawa, M. and Kawai, K. 1995. Contact allergy to kojic acid in skin care products. Skin Res.33 (1), 9 – 13

Nakayama, H., Ebihara, T., Satoh, N., Jinnai, T., 2001. Depigmentation agents. Cosmeceuticals.Drugs vs. cosmetics. Marcel Dekker, 123–144.

Nandan, R. and Polasa, H. 1985. Inhibition of growth of kojic acid biosysthesis in *Aspergillus* by some chlorinated hydrocarbons. Microbial. 25, 21-25

Nohynek, G.J., Kirkland, D., Marzin, D., Toutain, H., Ribaud, C.L. and Jinnai, H. 2004. An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. Food and chemical toxicology. 42, 93 – 105

Ogawa, A., Wakisaka, Y., Tanaka, T., Sakiyama, T. and Nahanishi, K. 1995. Production of Kojic acid by membrane – surface liquid culture of *Appergillus oryzae* NRRL 484.J. Ferment. Bioeng.80 (10), 41 -45

Oho, A., Ano, T. and Shoda, M. 1996. Use of Soybean Curd Residue, Okara for Solid State Substrate in the Production of Lipopeptide Antibiotic, Inturin A, by *Bacillus subtilis* NB22. Process Biochem. 31(8), 801-806

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

Presscot, S.C. and Dunn, C.G. 1959. Industrial microbiology, MC Graw - Hill Book. 3

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

Rosfarizan, M., Ariff, AB., Hassan, M.A., Karim, MIA., Shimizu, 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, AB. 2007. Biotransformation of various carbon sources to kojic acid by cell-bound enzyme system of *A. flavus* Link 44-1. Biochem. Eng. J. 35 , 203–209

Rosfarizan, M., Mohamed S.M., Suhaili, N., Saleh M.M and Ariff B.A. 2010. Kojic acid: Applications and development of fermentation process for production. Biotechnology and Molecular Biology Reviews. 5(2) : 24 – 37

Satio, K. 1907. Uber die Saurebinding von *Aspergillus oryzae*. Bot. Mag. 2, 7-11.

Smith, J.E. and Aidoo, K.E. 1988. Growth of fungi on solid substrate. Physiology of Intustrial fungi, 249-269

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

Tadera, K., Yahi, F., and Kobayashi, A.. 1985. Effects of cycasin on kojic and producing moulds. Agric. Biol. Chem . 49(1) , 203-205.

Uchino, K.,Nagawa, M., Tonosaki, Y., Oda, M. and Fukuchi, A. 1988. Kojic acid as an antispeck agent. Agric. Biol. Chem. 52 (10), 2609 – 2610

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wei, C.l., Huang, TS., Fernando, S.Y. and Chung, KT. 1991. Mutagenicity studies of kojic acid Toxicol. 59, 213-220

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

Yokata, T., Hottori, T., Ohishi, H., Ohami, H. and Watanabe, K. 1996. Effect of Oral Administration of Crude Antioxidant Preparation form Fermentation Products of Okara (bean curd residue) on Experimentally induced Inflammation. Techol. 29, 304-309.

[Online]. Available : http://th.wikipedia.org/wiki

[Online]. Available : http://www.thairath.co.th

[Online]. Available : http://51011811289.blogspot.com/2010_08_01_archive.html

[Online]. Available : http://www.dld.go.th/nutrition/exhibision/feed_stuff/soybean_meal.htm

[Online]. Available : http://www.goodoryza.com

[Online]. Available : http://www.nsru.ac.th/e-learning/dairy/lesson3_9.php#Scene_1

[Online]. Available : http://www.dld.go.th/inform/krice.htm

[Online]. Available : http://www.blackherbals.com/homepage2.htm

[Online]. Available : www.agri.ubu.ac.th/~kanjana/1203321/Data/rice_bran.doc

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato Dextrose Agar (PDA)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDA 39 กรัม ประกอบด้วย

เด็กซ์โตรส (Dextrose)	20	กรัม
ผงวุ้น (Agar Powder)	15	กรัม
มันฝรั่ง (Potato)	200	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีการ

ละลาย PDA 39 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นจนอุณหภูมิลดลงถึงประมาณ 50 – 60 องศาเซลเซียส จึงเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ จานละประมาณ 8 มิลลิลิตร

หรือ เตรียมโดยใช้มันฝรั่งสด ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
กลูโคส (Glucose) หรือ เด็กซ์โตรส (Dextrose)	20	กรัม
ผงวุ้น (Agar Powder)	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
pH 5.6		

วิธีการ

นำมันฝรั่งมาปอกเปลือกแล้วหั่นเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปต้มในน้ำกลั่น อัตราส่วนมันฝรั่ง 200 กรัมต่อน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 15 นาที หรือจนมันฝรั่งนิ่ม กรองแยกส่วนของน้ำออกมา เติมน้ำตาล 20 กรัม ผงวุ้น 15 กรัม ที่ผ่านการละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วลงไป นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์

ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิก ตามวิธีของ Bentley (1957)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและเหมาะสม โดยการใช้สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ทำปฏิกิริยากับสารละลายประกอบแอลฟาไฮดรอกซิล (α-hydroxyl) และสารประกอบฟีนอลลิก (phenolic compound) ที่มีอยู่ในกรดโคจิก ทำให้เกิดสารละลายที่มีสีแดง

สารเคมี

1. สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) 1 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 นอร์มอล และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายกรดโคจิกมาตรฐาน

เตรียมสารละลายกรดโคจิกมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกรดโคจิก 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ดูดสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ทำแบลงค์ (blank) ควบคู่กันไปด้วยโดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างเป็นตัวเปรียบเทียบ

2. เติมสารละลาย เฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) ที่เตรียมไว้ลงไป 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer)

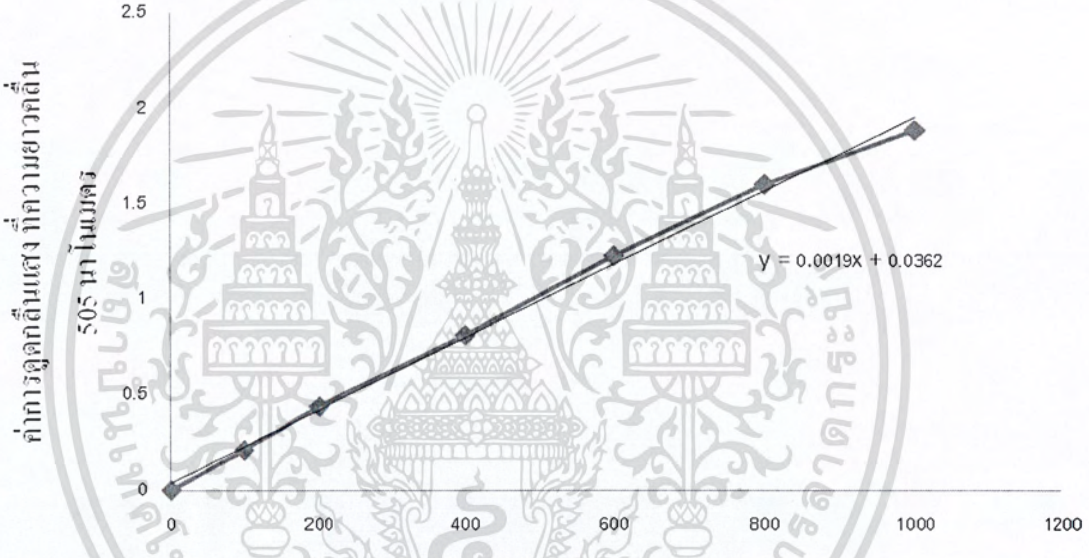
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับแบลงค์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร

4. ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายกรดโคจิกมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 100 200 300 400 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากสารละลายกรดโคจิกมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโคกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาวิเคราะห์เช่นเดียวกับ ข้อ 1-3 ทำการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 505 นาโนเมตร (A_{505}) ที่วัดได้จากตัวอย่างมาคำนวณหาปริมาณกรดโคจิกจากสูตร

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



รูปที่ ข.1 แสดงกราฟมาตรฐานกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น (AOAC, 1995)

อุปกรณ์

1. ภาชนะอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น (Moisture can)
2. ตู้อบลมร้อน (Hot Air oven)
3. โถดูดความชื้น (Desiccator)
4. เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 100 – 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักภาชนะ ทำซ้ำจนได้ผลต่างของน้ำหนักไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
2. ชั่งน้ำหนักของตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ประมาณ 5 กรัม ใส่ลงในภาชนะสำหรับหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว
3. อบตัวอย่างในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 100 – 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 – 6 ชั่วโมง
4. นำออกจากตู้อบลมร้อน ใส่ในโถดูดความชื้น รอให้เย็นประมาณ 30 – 60 นาที แล้วชั่งน้ำหนัก
5. อบซ้ำ ครั้งละประมาณ 30 นาที จนกระทั่งได้ผลต่างของน้ำหนักไม่เกิน 1 - 3 มิลลิกรัม
6. คำนวณหาปริมาณความชื้น จากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น} = \frac{(w_1 - w_2) \times 100}{w_1 - w}$$

เมื่อ w = น้ำหนักของภาชนะอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด (กรัม)

w_1 = น้ำหนักของภาชนะอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด และตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

w_2 = น้ำหนักของจานอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด และตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.3 การวิเคราะห์ค่าพีเอช (pH) ในของแข็ง

(ดัดแปลงจากวิธีการของ AOAC (1995))

วิธีการ

1. นำตัวอย่างของแข็งปริมาณ 10 กรัม เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
2. นำไปเข้าเครื่องเขย่า (Shaker) เป็นเวลา 10 นาที
3. ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน
4. นำไปวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง ในส่วนของของเหลวด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง โดยเทียบมาตรฐานด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชมาตรฐาน 4.00 7.00 และ 10.00

ข.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Factional Factorial Design และวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) โดยวิธี Duncan's Multiple Rang Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข5-1 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งสูตรต่างๆ จากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Duncan[a]

สูตรอาหาร	จำนวนครั้ง (N)	ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95				
		1	2	3	4	5
ข้าวฟ่าง:รำข้าว (6:4)	2	10.2448				
ปลายข้าว:กากถั่วเหลือง	2		16.4906			
(7:3)	2		17.3203	17.3203		
ข้าวฟ่าง:รำข้าว (8:2)	2		18.0794	18.0794	18.0794	
ปลายข้าว:กากถั่วเหลือง	2		18.2630	18.2630	18.2630	
(9:1)	2		19.5664	19.5664	19.5664	19.5664
ข้าวฟ่าง:รำข้าว (7:3)	2			20.6352	20.6352	20.6352
ข้าวฟ่าง:กากถั่วเหลือง	2					20.9580
(6:4)						
ข้าวฟ่าง:รำข้าว (9:1)						
ปลายข้าว:กากถั่วเหลือง						
(6:4)						

ตาราง ข5-1 (ต่อ) แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งสูตรต่างๆ จากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Duncan[a]

สูตรอาหาร	จำนวนครั้ง (N)	ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95		
		6	7	8
ปลายข้าว:กากถั่วเหลือง (8:2)	2	26.3203		
ข้าวฟ่าง:กากถั่วเหลือง (7:3)	2	27.3770	27.3770	
ข้าวฟ่าง:กากถั่วเหลือง (8:2)	2		29.2311	
ข้าวฟ่าง:กากถั่วเหลือง (9:1)	2			34.3338

Means for groups in homogeneous are diaplayed.

a. Uses Hamonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข5-2 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งชนิดปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วนต่างๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Duncan[a]

ปลายข้าว:กากถั่วเหลือง อัตราส่วน	จำนวนครั้ง (N)	ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์		
		1	2	3
7:3	2	16.4906		
9:1	2	18.0794	18.0794	
6:4	2		20.9580	
8:2	2			26.3203

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตาราง ข5-3 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วนต่างๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Duncan[a]

ข้าวฟ่าง:กากถั่วเหลือง อัตราส่วน	จำนวนครั้ง (N)	ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์		
		1	2	3
6:4	2	19.5664		
7:3	2		27.3770	
8:2	2		29.2311	
9:1	2			34.3338

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข5-4 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและรำข้าวที่อัตราส่วนต่างๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Duncan[a]

ข้าวฟ่าง:รำข้าว อัตราส่วน	จำนวนครั้ง (N)	ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์		
		1	2	3
6:4	2	10.2448		
8:2	2		17.3203	
7:3	2		18.2630	
9:1	2			20.6352

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ตาราง ข5-5 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งชนิดข้าวฟ่างและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 9:1 โดยน้ำหนัก เมื่อมีการเติมและไม่เติมแร่ธาตุ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Duncan[a]

สูตรอาหาร	จำนวนครั้ง (N)	ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ 1
ข้าวฟ่าง:กากถั่วเหลือง (9:1) ที่ไม่เติมแร่ธาตุ	2	34.3338
ข้าวฟ่าง:กากถั่วเหลือง (9:1) ที่เติมแร่ธาตุ	2	35.9405

Means for groups in homogeneous are diaplayed.

a. Uses Hamonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข5-6 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารแข็งชนิดปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 8:2 โดยน้ำหนัก เมื่อมีการเติมและไม่เติมแร่ธาตุ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Duncan[a]

สูตรอาหาร	จำนวนครั้ง (N)	ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์
		1
ปลายข้าว:กากถั่วเหลือง (8:2) ที่ไม่เติมแร่ธาตุ	2	26.3203
ปลายข้าว:กากถั่วเหลือง (8:2) ที่เติมแร่ธาตุ	2	28.0356

Means for groups in homogeneous are diaplayed.

a. Uses Hamonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้