สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตกรดโคจิกจากแป้งโดยเชื้อ *ASPERGILLUS* SP. BR1

นางสาวณัฐลดา พลแสน
นางสาวศุภมาศ สุขโสม
นางสาวศุภางค์ ระรื่นรมย์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....67266.....
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549

.b.....11662697.....
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF KOJIC ACID FROM STARCH BY *ASPERGILLUS* SP. BR1

Miss. Natlada Polsan

Miss. Supamas Suksom

Miss. Supank Raruenrom

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requiment for

the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Acadamic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การผลิตกรดโคจิกจากแป้ง โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1	
นักศึกษา	นางสาว ณัฐลดา พลแสน	รหัสประจำตัว 45050737
	นางสาว ศุภมาศ สุขโสม	รหัสประจำตัว 45050779
	นางสาว ศุภางค์ ระรื่นรมย์	รหัสประจำตัว 45050782
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม	
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง	
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
คณะวิทยาศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ. ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ	รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ	อาจารย์ กนึงกานต์ กลั่นบุศย์	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตกรดโคจิกจากแป้ง โดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1

นักศึกษา นางสาว ณัฐลดา พลแสน

นางสาว ศุภมาศ สุขโสม

นางสาว ศุภางค์ ระรื่นรมย์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2548

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 เมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน โดยศึกษาผลของชนิดของแป้ง คือ แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้า แป้งสาลี และผลของแหล่งไนโตรเจน คือ เปปโตน ยีสต์สกัด และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่มีต่อการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์แบบเขย่า จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อราให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งข้าวโพดและเปปโตน สำหรับสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกประกอบด้วย แป้งข้าวโพด 50 กรัมต่อลิตร เปปโตน 4 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 1 กรัมต่อลิตรและ $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร โดยผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 14 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 3.46 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อนำเชื้อรามาเลี้ยงในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารเดียวกันในสภาวะที่มีอัตราการกวนของใบพัด 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม สามารถผลิตกรดโคจิกสูงสุด 18 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง และมีอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 4.46 กรัมต่อลิตรต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Production of Kojic Acid from Starch by *Aspergillus* sp. BR1
Name	Miss Natlada Polsan
	Miss Supamas Suksom
	Miss Supank Raruenrom
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2005
Special Project Advisor	Assoc. Prof. Dr. Naunphan Naranong

Abstract

The optimization of culture medium for kojic acid production by *Aspergillus* sp. BR1 using starch as carbon source was studied. The effects of different types of starch (corn starch, rice starch and wheat flour) and nitrogen sources (peptone, yeast extract and ammonium sulphate) were determined using shake flasks. It was found that kojic acid production was highest when corn starch and peptone were used. The optimized medium contained (g/l) : corn starch, 50 ; peptone, 4 ; K_2HPO_4, 1.0 ; $MgSO_4.7H_2O$, 0.5 The maximum kojic acid concentration was 14 g/l on day 4 of cultivation with the productivity of 3.46 g/l.d. The cultivation of *Aspergillus* sp. BR1 in a 2-litre stirred tank fermenter using the same medium was also studied. The highest kojic acid production was 18 g/l on day 4 of cultivation at the agitation rate of 400 rpm and the aeration rate of 1.5 vvm. The productivity of kojic acid was 4.46 g/l.d.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ให้คำแนะแนวทางในการค้นคว้า และจัดทำงานวิจัย รวมทั้งช่วยในการแก้ไข และตรวจทานโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล และอาจารย์ คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ ที่ได้ช่วยตรวจทานแก้ไขในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการทุกท่าน สำหรับการสอบวิชาโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ได้ช่วยเหลือในการเบิกอุปกรณ์ สารเคมี และให้คำแนะนำวิธีการใช้เครื่องมือต่าง ๆในห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการที่ได้อำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน พี่ๆปริญญาโท ที่ช่วยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในทุกๆด้าน

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เป็นทั้งกำลังกายและกำลังใจให้กับคณะผู้จัดทำจนกระทั่งก้าวมาถึงวันนี้ได้ ตลอดจนขอขอบคุณเพื่อนๆที่ให้ความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจให้กันเสมอมา

ณัฐลดา พลแสน
ศุภมาศ สุขโสม
ศุภางค์ ระรื่นรมย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 กรดโคจิก	3
2.2 การผลิตกรดโคจิก	4
2.3 การสังเคราะห์กรดโคจิก	6
2.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก	8
2.5 ประโยชน์ของกรดโคจิก	12
2.6 ความเป็นพิษของกรดโคจิก	13
2.7 เชื้อราสกุล *Aspergillus* spp.	14
2.8 แป้ง	15
2.9 การผลิตกรดโคจิกในถังหมัก	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	25
3.1 อุปกรณ์และสารเคมี	25
3.2 วิธีการทดลอง	26
3.3 วิธีการวิเคราะห์	27
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	28
4.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์เขย่า	28
4.2 ผลของการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในถังหมัก	48
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	50
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	55
ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 2.1	แสดงเชื้อราที่ผลิตกรดโคจิก	5
ตารางที่ 2.2	แสดงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิก	9
ตารางที่ 2.3	แสดงแหล่งแร่ธาตุในการผลิตกรดโคจิก	11
ตารางที่ 2.4	องค์ประกอบของแป้งชนิดต่าง ๆ	16
ตารางที่ 2.5	สรุปความแตกต่างของอะมิโลสและอะมิโลเพกติน	17
ตารางที่ 2.6	สัดส่วนของอะมิโลสต่ออะมิโลเพกตินของธัญพืชต่างๆ	17
ตารางที่ 2.7	ขนาดและรูปร่างของเม็ดแป้งชนิดต่างๆ	18
ตารางที่ 2.8	คุณสมบัติในการพองตัวและความสามารถในการละลายของแป้งแต่ละชนิดที่ 95 องศาเซลเซียส	20
ตารางที่ 2.9	แสดงองค์ประกอบภายในเมล็ดข้าวหัก	21
ตารางที่ 2.10	แสดงคุณสมบัติของแป้งข้าวเจ้า	21
ตารางที่ 2.11	แสดงคุณสมบัติของแป้งข้าวโพด	22
ตารางที่ 2.12	แสดงองค์ประกอบภายในเมล็ดข้าวสาลี	23
ตารางที่ 2.13	แสดงคุณสมบัติของแป้งสาลี	23
ตารางที่ 4.1	แสดงค่าพีเอช และปริมาณกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวโดยใช้แป้งต่างชนิดกัน	31
ตารางที่ 4.2	แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราโดยใช้แป้งต่างชนิดกัน	32
ตารางที่ 4.3	แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารเหลวโดยใช้แป้งต่างชนิดกัน	32
ตารางที่ 4.4	แสดงค่าพีเอช และปริมาณกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวโดยใช้ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดต่างกัน	36
ตารางที่ 4.5	แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราโดยใช้ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดต่างกัน	37
ตารางที่ 4.6	แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารเหลวโดยใช้ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดต่างกัน	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าพีเอช และปริมาณกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว โดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน 41

ตารางที่ 4.8 แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา โดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน 42

ตารางที่ 4.9 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารเหลว โดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน 42

ตารางที่ 4.10 แสดงค่าพีเอช และปริมาณกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว โดยใช้เปปโตนความเข้มข้นต่างกัน 46

ตารางที่ 4.11 แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา โดยใช้เปปโตนความเข้มข้นต่างกัน 47

ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารเหลว โดยใช้เปปโตนความเข้มข้นต่างกัน 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

		หน้า
รูปที่ 2.1	แสดงโครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก	3
รูปที่ 2.2	แสดงแผนภาพการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแล็กโตน	6
รูปที่ 2.3	แสดงแผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus flavus*	7
รูปที่ 4.1	แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งข้าวโพด	29
รูปที่ 4.2	แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งข้าวเจ้า	29
รูปที่ 4.3	แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งสาลี	30
รูปที่ 4.4	แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งข้าวโพด 50 กรัมต่อลิตร	34
รูปที่ 4.5	แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งข้าวโพด 40 กรัมต่อลิตร	35
รูปที่ 4.6	แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งข้าวโพด 30 กรัมต่อลิตร	35
รูปที่ 4.7	แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เปปโตน	39
รูปที่ 4.8	แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ยีสต์สกัด	40
รูปที่ 4.9	แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต	40
รูปที่ 4.10	แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เปปโตน 4 กรัมต่อลิตร	44
รูปที่ 4.11	แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร	45
รูปที่ 4.12	แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เปปโตน 6 กรัมต่อลิตร	45
รูปที่ 4.13	แสดงค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก	49
รูปที่ ข.1	กราฟมาตรฐานกรดโคจิก	57
รูปที่ ข.2	กราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดโคจิก (Kojic acid) เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolism) ของเชื้อรา *Aspergillus* ในหลายๆสกุล พบครั้งแรกโดย Yabuta ในปี1913 จากการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. oryzae* บนข้าวนึ่งในสภาพการหมักในอาหารแข็ง (Yabuta, 1913) ปัจจุบันการผลิตกรดโคจิกมักนิยมระบบการหมักในสภาพอาหารเหลวเป็นส่วนใหญ่ และนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างกว้างขวาง เช่น ทางด้านการแพทย์ ทางด้านอาหาร ด้านการเกษตร (Futamura และคณะ, 2001b) โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางที่ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ที่ทำให้ผิวขาว และยังสามารถป้องกันแสงอัลตร้าไวโอเลตได้อีกด้วย (Oyama และ Mishima, 1990)

การศึกษาการผลิตกรดโคจิกนี้ได้เลือกเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1 เนื่องจากเป็นเชื้อราที่คัดแยกมาจากลูกแป้งเหล้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยจึงเป็นการส่งเสริมให้เกิดการผลิตขึ้นภายในประเทศ และสามารถลดเงินตราต่างประเทศได้ โดยในการผลิตส่วนใหญ่จะใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพราะทำให้ได้กรดโคจิกในปริมาณสูง แต่เนื่องจากกลูโคสเป็นวัตถุดิบที่มีราคาแพง จึงเลือกใช้แป้งชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอนแทนเนื่องจากมีราคาต่ำกว่าและสามารถหาซื้อได้ง่ายในทุกฤดูกาล จึงทำการศึกษาวิธีการผลิตจากแป้งที่มีราคาถูกเพื่อลดต้นทุนการผลิตและขยายกำลังการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากแป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้าและแป้งสาลี
2. หาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก
3. เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์เขย่ากับในถังหมักแบบแบตช์

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกจากแป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้า แป้งสาลีและความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหารแป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารแป้ง
3. เปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์เขย่ากับถังหมักแบบแบตช์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าน่าจะได้รับ

1. สามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกในการผลิตกรดโคจิก
2. เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการขยายการผลิตในถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

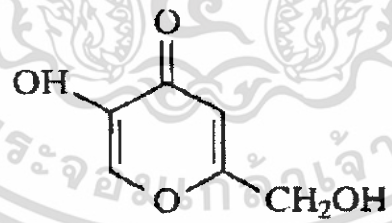
บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 กรดโคจิก (Kojic acid)

กรดโคจิก (Kojic acid) มีชื่อทางเคมีว่า 5 - hydoxy - 2 hydroxymethyl - γ - pyrone เป็นกรดอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการสร้างและสลายทุติยภูมิ (secondary metabolite) การค้นพบกรดโคจิกมีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1907โดย Saito ซึ่งสามารถแยกสารที่ลักษณะคล้ายกรดบีต้า-รีซอร์ซิลคาร์บอกซิลิก (β - resourcylcarboxylic acid) หลังจากนั้นไม่นาน Yabuta (1913) ได้ตรวจสอบสารนี้อย่างจริงจังแล้วตั้งชื่อว่า " กรดโคจิก" และกำหนดองค์ประกอบที่แน่นอนของกรดโคจิกในปี ค.ศ. 1924 การสังเคราะห์กรดโคจิกทางเคมีจากน้ำตาลกลูโคส ทำสำเร็จในปีค.ศ.1930 (Maurer, 1930) ตั้งแต่นั้นมามีการทดลองเกี่ยวกับการสังเคราะห์กรดโคจิกทางชีวภาพ และมีการตีพิมพ์เผยแพร่คุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพของกรดโคจิกออกมาเป็นจำนวนมาก (Bajpai และคณะ, 1982)

2.1.1 คุณสมบัติของกรดโคจิก

กรดโคจิกเป็นสารประกอบของไพโรน (pyrone) ที่ขาดกกลุ่มคาร์บอกซิล โมเลกุลของกรดโคจิกประกอบขึ้นด้วย คาร์บอน 6 ตัว ไฮโดรเจน 6 ตัวและออกซิเจน 4 ตัว ดังนั้นกรดโคจิกจึงมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_6O_4$ (Bajpai และคณะ, 1982) ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก
ที่มา : Bajpai และคณะ (1982)

Bently (1957) รายงานว่าผลจากการศึกษาทาง x - ray investigation ของกรดโคจิกบริสุทธิ์ พบว่ามีลักษณะเป็นผลึกทรงปริซึมรูปเข็ม ไม่มีสี ผลึกละลายได้ง่ายในน้ำ (3.95 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 20 องศาเซลเซียส) เอทานอลและอะซีโตน ละลายได้เล็กน้อยในอีเทอร์ เอทิลอะซิเตต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอโรฟอร์มและไพริดีน และละลายยากมากในของเหลวชนิดอื่น กรดโคจิกมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 142.11 และมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 153 - 154 องศาเซลเซียส การทำให้กรดโคจิกบริสุทธิ์ทำได้โดยการตกผลึกซ้ำในอะซีโตน เอทานอล - อีเทอร์ เมทานอล และเอทิลอะซีเตต หรือการทำให้บริสุทธิ์ภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 150 - 200 องศาเซลเซียส

2.2 การผลิตกรดโคจิก

2.2.1 เชื้อจุลินทรีย์

กรดโคจิกเป็นผลิตภัณฑ์จาก *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. โดยส่วนใหญ่ผลิตจาก *A. flavus, A. oryzae, A. tamarii.* โดยในกลุ่ม *A. flavus* และ *A. parasiticus* มีรายงานว่ามีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด (Ariff และคณะ, 1996)

Bajpai และคณะ (1982) รายงานว่ากรดโคจิกเริ่มผลิตครั้งแรกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* จากนั้นได้ศึกษาการผลิตจากเชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้คือ *A. oryzae* , *A. flavus* , *A. awamori* , *A. fumigatus* , *A. clavatus, A. gigantius* , *A. albus, A. nidulan* , *A. paraciticus* , *A. effutus* , *A. tamari* , *A. luteovirescwns, A. lutescens* , *A. wentii* และ *A. Alliaceus*

กรดโคจิกส่วนมากผลิตจากเชื้อราโดยใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนและในสภาพมีอากาศในการเจริญ (Bently, 1957) ในปีค.ศ. 1970 Bassapa พบว่าการสังเคราะห์กรดโคจิกและสารอะฟลาทอกซินมีวิถีการสังเคราะห์แยกออกจากกันและกรดโคจิกไม่ได้เป็นสาร intermidiate ที่เกิดขึ้นในระหว่างการสังเคราะห์สารอะฟลาทอกซินในการทดลองได้ใช้เซลล์ระยะพักตัวของเชื้อ *Aspergillus flavus* และทำการทดสอบโดยใช้ ดี-ไซโลส (D - xylose) และเอทานอล (ethanol) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกรดโคจิกเกิดขึ้นแต่ไม่มีสารอะฟลาทอกซินเกิดขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตกรดโคจิกและอะฟลาทอกซินนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นต้น

กรดโคจิกสามารถผลิตได้จากเชื้อราสกุล *Aspergillus* และ *Pennicillium* หลายสายพันธุ์โดยมีการศึกษาพบเชื้อราที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้หลายสายพันธุ์ดังแสดงในตารางที่ 2.1 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งจะสร้างกรดขึ้นในระหว่างที่เชื้อมีการเจริญในอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) เกลือแร่อื่นๆ กลูโคส ซูโครส และไซโลส และการเติมเอทิลีนคลิโรไฮดรินปริมาณเพียงเล็กน้อยลงในอาหารจะช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตกรดโคจิก แต่ต้องระวังไม่ให้มีเหล็ก (Fe)ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะเหล็กจะทำปฏิกิริยากับกรดโคจิกเกิดเป็นสารสีแดงเข้มเนื่องจากในโมเลกุลของกรดชนิดนี้มีกลุ่มที่มีความว่องไวในการทำปฏิกิริยา (ดวงพร, 2530)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงเชื้อราที่ผลิตกรดโคจิก

เชื้อจุลินทรีย์ (organism)	อ้างอิง (referrence)
Aspergillus oryzae (19 isolate)	Manabe และคณะ 1984
A. paraciticus SRRC 162 mutant	Anasari and Shrivasta 1991
A. flavus (46 isolate)	Manabe และคณะ 1984
A. tamari (9 isolate)	Manabe และคณะ 1984
A. sojae (3 isolate)	Manabe และคณะ 1984
A. flavus link	Lin และคณะ 1976
A. paraciticus (UNBF A12)	EI – Khadm และคณะ 1976
A. flavus	Kharchenko และคณะ 1993; Moubasher และคณะ 1977
A. fumigatus	Kharchenko และคณะ 1993; Moubasher และคณะ 1977
A. luteo – virescens	Manabe และคณะ 1984b
A. albus	Manabe และคณะ 1984b
A. effusus	Manabe และคณะ 1984b
A. lutesens	Manabe และคณะ 1984b
A. alliaceus	Manabe และคณะ 1984b
A. awamori	Manabe และคณะ 1984b
A. candidus	Manabe และคณะ 1984b
A. clavatus	Manabe และคณะ 1984b
A. gianteus	Manabe และคณะ 1984b
A. gymosardae	Manabe และคณะ 1984b
A. nidulan	Manabe และคณะ 1984b
A. ustus	Manabe และคณะ 1984b
A. wentii	Manabe และคณะ 1984b
Penicillium critinum	Manabe และคณะ 1984b
P. daleae	Manabe และคณะ 1984b
P. geiseofulvum	Manabe และคณะ 1984b
P. rubrum	Manabe และคณะ 1984b

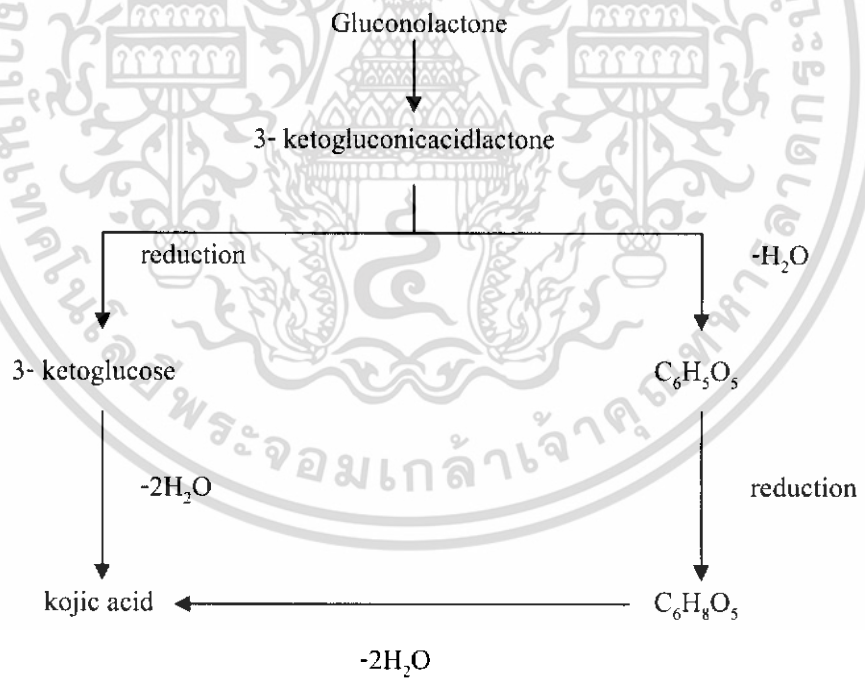
ที่มา : Burduck และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การสังเคราะห์กรดโคจิก

กรดโคจิกมีโครงสร้างคล้ายสารโมโนแซคคาไรด์เนื่องจากสังเคราะห์ได้มาจากน้ำตาลกลูโคส (D - glucose) การสังเคราะห์เริ่มจากกลูโคสถูกออกซิไดซ์เป็นสารคีโตนิกอินเตอร์มิเดียด (ketonic intermideate) จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิกโดยการกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 2 โมเลกุล (Bajpai และคณะ, 1982)

Arnteins และBently (1953) รายงานว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นสารเริ่มต้นในการผลิตกรดโคจิกจากการเปลี่ยนกลูโคสเป็นสาร 3 – คีโตกลูโคส (3 - ketoglucose) โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็นกรดโคจิกโดยการกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 2 โมเลกุลนอกจากนี้ยังพบว่ากลูโคโนแลคโตน (gluconolactone) เป็นสารเริ่มต้นในกระบวนการผลิตกรดโคจิกได้โดยการเปลี่ยนไปเป็น 3 - คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทน (3 - ketogluconicacidlactone) แล้วจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิก 2 ทางคือ วิถีที่ 1 เปลี่ยน 3- คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทนเป็น 3 – คีโตกลูโคสก่อน แล้วจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิก วิถีที่ 2 คือสาร 3 - คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทนจะถูกกำจัดโมเลกุลของน้ำไป 1 โมเลกุล โดยการรีดักชันและเกิดการกำจัดโมเลกุลของน้ำอีก 1 โมเลกุลตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2.2

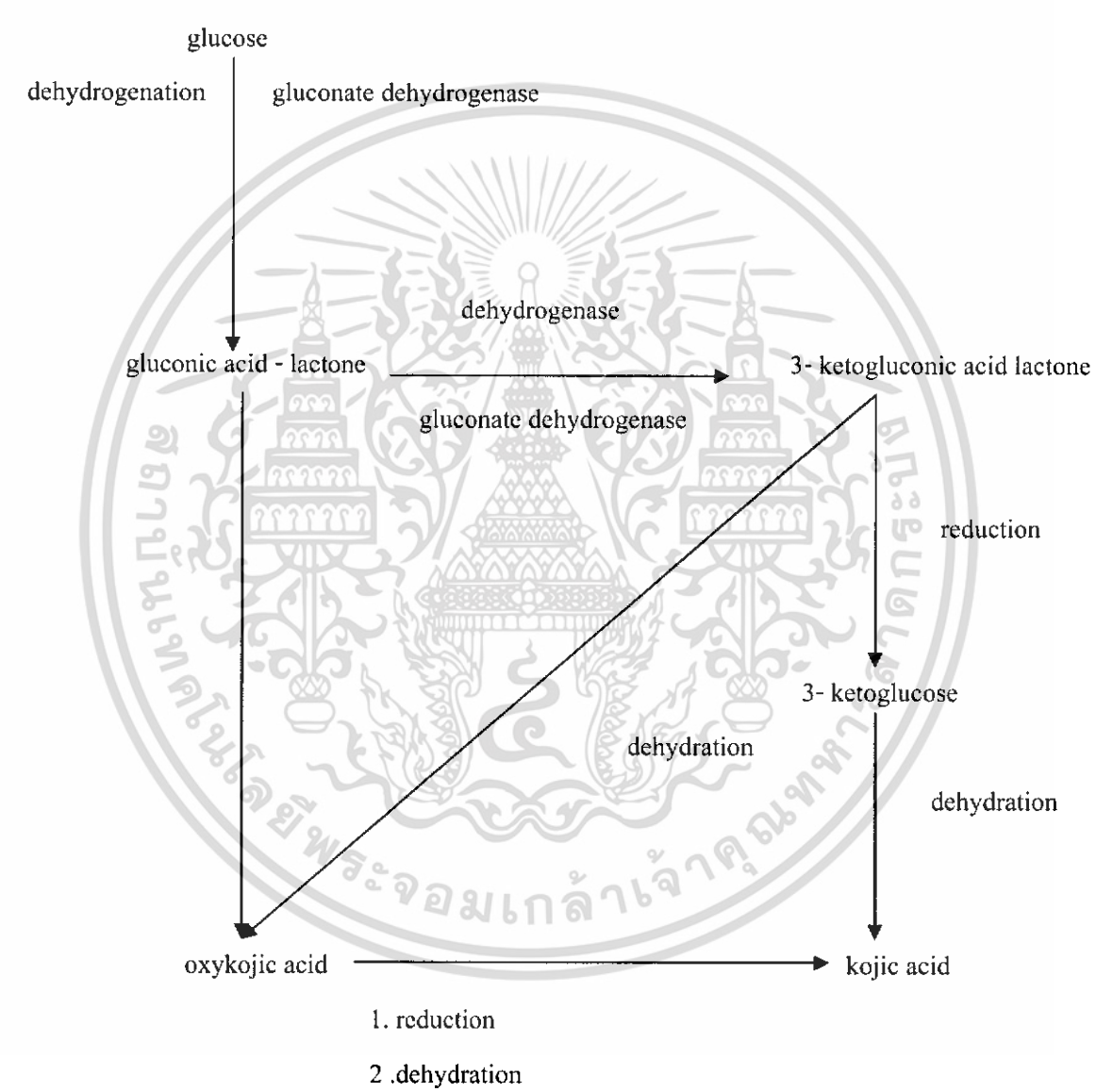


รูปที่ 2.2 แสดงแผนภาพการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแล็กโตน

ที่มา : Arnteins และ Bently (1953)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bajpai และคณะ (1981) ได้ทำการศึกษาวิถีการสังเคราะห์กรดโคจิกเมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นจากเชื้อ *Aspergillus flavus* สายพันธุ์บี ซึ่งพบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างกระบวนการผลิตกรดโคจิกได้แก่ เฮกโซไคเนส (hexokinase) กลูโคส - 6 - ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glucosephosphate dehydrogenase) 6 - ฟอสเฟตกลูโคเนต ดีไฮโดรจีเนส (6 - phosphategluconate dehydrogenase) กลูโคสออกซิเดส (glucoseoxidase) และกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส (gluconate dehydrogenase) เอนไซม์ดังกล่าวสัมพันธ์กับการสร้างการผลิตกรดโคจิกดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงแผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus flavus*
ที่มา : Bajpai และคณะ (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก

2.4.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน จุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศจะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณร้อยละ 50 - 55 ในการสังเคราะห์เซลล์ กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนและต้องเลือกใช้แหล่งคาร์บอนให้เหมาะสม (Stanbury และคณะ, 1995)

มีสารหลายชนิดที่ใช้ในการสร้างกรดโคจิกซึ่งส่วนใหญ่คือ กลูโคส ซูโครสซิเตรต เอทานอล อะราบิโนส และ ไซโลส ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดโคจิก เป็นที่รู้กันดีว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตกรดโคจิกเนื่องจากมีความคล้ายคลึงของโครงสร้าง (Rosfarizan และคณะ, 1998)

Challenger และคณะ (1929) ได้ศึกษาการใช้น้ำตาล 3 ชนิดคือ อะราบิโนส ไซโลส และกลูโคสในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ*Aspergillus oryzae* โดยใช้ปริมาณร้อยละ 10 เป็นส่วนประกอบในอาหารเค (Kinoshita's basal salt medium : K medium) ประกอบด้วยโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเทรต 0.4 กรัมต่อลิตร

Bently (1957) มีการนำอาหารดัดแปลงจาก Czapex – Dox liquid medium มาเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการผลิตกรดโคจิก โดยมีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 10 เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกรดโคจิกเกิดขึ้น 7 – 10 กรัมต่อลิตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิก

จำนวนคาร์บอน (อะตอม)	แหล่งคาร์บอน
2	เอทานอล ,ไกลซีน, โซเดียมแอซีเตต
3	1,3 –ไดไฮดรอกซิล-2-โพรพานอล
4	กลีเซอรออลดีไฮด์
5	กลีเซอรอล
6	โซเดียมแลคเตต
7	โซเดียมไพรูเวต
12	กรดทาร์ทาลิก
18	ลิบิทอล,อะราบิโนส,ไซโลส
	2- ดีออกซิกลูโคส
	กาแลคโทส
	กรดกลูโคนิก
	กลูโคส
	กลูโคโนแลคโตน
	แมนนิทอล
	ฟรักโทส,แมนโนส
	ซอร์บิทอล, ซอร์โบส
	กรดคิวนิก,กรดซิคิมิก
	ทริทาโลส,ซูโครส
	แล็กโทส, มอลโทส
	ราฟิโนส,เดกซ์ตริน
	อินซูลิน,เพคติน,แป้ง

ที่มา : Bajpai และคณะ (1981)

มีรายงานว่าได้มีการใช้แป้ง (starch) เป็นแหล่งคาร์บอน ปรากฏว่าไม่พบกรดโคจิกเกิดขึ้นในระหว่างการหมัก (Kitada และคณะ, 1967) ต่อมา Rosfarizan และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยแป้งจากแหล่งต่างๆดังนี้คือ ดอกไม้ อาหารหมัก ผลไม้ น้ำพุร้อนและดินพบว่าเชื้อที่แยกจากดอกไม้ morning glory flower ซึ่งเป็นไม้เถาชนิดหนึ่งตระกูลผักบุ้งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Bixa orellana* สามารถย่อยแป้งได้ดีที่สุด เมื่อทำการจัดจำแนกพบว่าเชื้อราหมายเลข S33-2 มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะเหมือนกับเชื้อ *Aspergillus flavus* จากนั้นนำมาเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในอาหารที่ประกอบด้วยยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆกันคือ แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าวโพด แป้งสาคู และน้ำตาลกลูโคส พบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวโพด 75 กรัมต่อลิตร ให้กรดโคจิกสูงสุด 12.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 20 รองลงมาคือ กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ให้กรดโคจิก 12.1 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 16 และแป้งสาคู 50 กรัมต่อลิตร ให้กรดโคจิกต่ำสุดเท่ากับ 0.3 กรัมต่อลิตรจะเห็นได้ว่าเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนเลี้ยงเชื้อ *A. flavus* S33-2 สามารถผลิตกรดโคจิกได้เนื่องจากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์แอลฟา - อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป

2.4.2 แหล่งไนโตรเจน

ในการผลิตกรดโคจิกแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมาจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัด และทริปโตน แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ได้แก่ เกลือแอมโมเนียมและไนเทรต เช่น แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นต้น เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มีราคาสูง ดังนั้นจึงมีการเสริมแหล่งไนโตรเจน อนินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแทน จากการผลิตกรดโคจิกส่วนมากใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนหรืออาจมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์อื่น ในการผลิตกรดจากอาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapex – Dox liquid medium ซึ่งมีส่วนประกอบของยีสต์สกัดร้อยละ 0.1 และแอมโมเนียมไนเทรตร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งไนโตรเจน (Bently, 1957)

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

Kwak และRhee (1992) ได้ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยการควบคุมการเจริญเติบโตของเส้นใยที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* ทำการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีส่วนประกอบของยีสต์สกัดและแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆกันคือ 0.137 0.183 0.275

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.367 และ 0.55 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.275 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดคือ 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวันเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 8 วัน

2.4.3 แหล่งแร่ธาตุ

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

ตารางที่ 2.3 แสดงแหล่งแร่ธาตุในการผลิตกรดโคจิก

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

ที่มา : Stanbury และคณะ (1995)

Challenger และคณะ (1929) ได้ค้นพบอาหารเคซึ่งมีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) เป็นส่วนประกอบ ต่อมามีการค้นพบอาหารที่ใช้ผลิตกรดโคจิกคืออาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapex – Dox liquid medium ที่มีการเสริมแหล่งอาหารคือไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ลงในอาหารเหลว (Bently, 1957)

May และคณะ (1931) มีการใช้แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดร้อยละ 48.2 ต่อมา Tadera และคณะ (1985) ได้ศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวที่มีการเสริมแร่ธาตุคือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟอสเฟต (KH_2PO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) และเฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 17.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 14

ต่อมาได้ทำการผลิตกรดโคจิกจากการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเสริมแร่ธาตุพวกไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) พบว่าได้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Ogawa และคณะ, 1995)

2.5 ประโยชน์ของกรดโคจิก

2.5.1 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล การเกิดสีน้ำตาลเกิดจากปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เกี่ยวข้อง เช่น เมื่อมีผักและผลไม้มีรอยตำหนิเสียหายซึ่งเกิดจากรอยช้ำ รอยปอก หั่น แช่แข็งหรือเป็นโรค ส่วนของเนื้อเยื่อที่มีตำหนิมีเอนไซม์อยู่เมื่อถูกอากาศจะเกิดเป็นสีน้ำตาลขึ้น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลในผักผลไม้เป็นกลุ่มของเอนไซม์ซึ่งเรียกชื่อรวมว่าฟีนอลเลส (phenolase) ดังนั้นกรดโคจิกจึงช่วยป้องกันการเกิดปฏิริยาสีน้ำตาล ในประเทศญี่ปุ่นมีการใช้กรดโคจิก กรดแอสคอร์บิก และกรดซิตริกเพื่อยับยั้งเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenoloxidase : PPO) ในเห็ด มันฝรั่ง และแอปเปิ้ล (Wei และคณะ, 1991)

Uchino และคณะ (1988) รายงานว่ากรดโคจิกสามารถป้องกันรอยด่างได้โดยทดสอบกับแป้งสาลี ซึ่งแป้งสาลีจะเกิดการเปลี่ยนสีขึ้นระหว่างการเก็บรักษาก่อนที่จะนำไปผลิตเส้นบะหมี่ ซึ่งสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นเรียกว่า รอยด่าง (speck)

2.5.2 ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

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

Minami (1994) ได้ทำการศึกษาผลของกรดโคจิกที่ผสมในครีมรักษาผิวโดยใช้ครีมที่มีส่วนผสมของกรดโคจิกร้อยละ 1 ทดสอบกับผู้หญิง 54 คน ที่มีสภาพผิวแตกต่างกัน อายุระหว่าง 18-47 ปี ทาครีมวันละ 2 ครั้ง พบว่าสีผิวเปลี่ยนไปทำให้ผิวขาวขึ้นภายในเวลา 4 เดือนโดยประมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.3 ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง

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

2.5.4 เป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

Kayahara และคณะ (1990) มีรายงานว่ากรดโคจิกสามารถต้านกิจกรรมของแบคทีเรียพวก *Staphylococcus aureus* 209P. ต่อมาพบว่ากรดโคจิกต้านการเจริญของเชื้อราพวก *Pythium araminicola* *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำลายเมล็ดธัญพืช ถั่ว และฝักมะขามเทศ

2.5.5 เป็นสารปฏิชีวนะ

Yabuta (1913) รายงานว่ากรดโคจิกปริมาณร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้ และในปีต่อมาได้มีการค้นพบว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งการสังเคราะห์กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) หรือวิตามินซีในสัตว์ทดลอง ทำให้หลอดเลือดเปราะและเกิดโรคลักปิดลักเปิด (scurvy) เพราะไม่มีเอนไซม์กลูโคโนแล็กโทนออกซิเดส (L–gluconolactone oxidase) ที่ใช้ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแอสคอร์บิก (Bajpai และคณะ, 1982)

2.6 ความเป็นพิษของกรดโคจิก

Friedemann (1934) ศึกษาความเป็นพิษของกรดโคจิก โดยใช้สุนัขเป็นสัตว์ทดลอง ทำการฉีดกรดโคจิกปริมาณ 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้สุนัขมีอาการน้ำลายฟูมปาก อาเจียน ความดันเลือดสูง เกิดการง่วงนอนตลอดเวลาและอาจเกิดความพิการหรือผิดปกติ มีรายงานว่ามีการใช้เม็ดเลือดขาว (leucocytes) ทดลองโดยฉีดสารละลายโซเดียมโคเจต (sodium kojate) เข้มข้นร้อยละ 1 พีเอช 6.8 พบว่าเม็ดเลือดขาวถูกฆ่าภายในเวลา 3 ชั่วโมง ต่อมามีการทดลองกับเอ็มบริโอลูกไก่อายุ 12 วัน โดยฉีดกรดโคจิกปริมาณ 12 มิลลิลิตรต่อ 100 กรัมของน้ำหนักไข่ พบว่าทำให้เอ็มบริโอลูกไก่อ่อนแอลง (Bajpai และคณะ, 1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 เชื้อราสกุล *Aspergillus* spp.

2.7.1 ลักษณะทั่วไปของ *Aspergillus* (พรรณกร, 2535)

เชื้อราสกุล *Aspergillus* จัดอยู่ใน

Division Eumycota

Subdivision Ascomycotina

Class Plectomycetes

Order Eurotiales

Family Eurotiaceae

Genus *Aspergillus*

เชื้อราสกุล *Aspergillus* จัดเป็นเชื้อราฉวยโอกาสที่พบบ่อยที่สุด เป็นเชื้อราที่มีถิ่นที่อยู่กว้างขวางทั้งในเขตอบอุ่นและเขตร้อน ในอากาศทุกหนแห่งมีโคนิเดียของเชื้อราชนิดนี้ปนอยู่ นอกจากนี้ยังพบมากในดิน เจริญได้ในอินทรียวัตถุทุกชนิด ซึ่งก่อให้เกิดผลดีและผลเสียโดยเฉพาะในเขตประเทศร้อนชื้น เชื้อ *Aspergillus* ทำให้เครื่องหนัง เช่น กระเป๋า รองเท้า ตลอดจนเสื้อผ้าเสียหาย *A. fumigatus* , *A. flavus*, *A. niger* และสปีชีส์อื่นๆ ทำให้เกิดโรค Aspergillosis ซึ่งมีอาการคล้ายวัณโรค บางชนิดทำให้หูอักเสบได้

2.7.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Aspergillus spp. จะมีโคโลนีมีสีต่างๆกันขึ้นได้ที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ขึ้นได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส คุณสมบัติของเชื้อ *Aspergillus* สรุปได้ดังนี้

ก.) จัดเป็นเชื้อราที่มีผนังกั้น (septate hypha) ชนิดสายราไม่มีสี

ข.) มีก้านชู (conidiospore)งอกตรงจากสายรา ตำแหน่งที่ก้านชูงอกตรงจากสายราเรียกว่า foot cell ซึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่าสายราและมีขอบเขตที่ชัดเจน ปลายของก้านชูจะพองออกเป็นกระเปาะ (vesicle)

ค.) บนกระเปาะมีติ่ง (phialide) ชั้นเดียว (unseriate) หรือ 2 ชั้น (biseriate) ติ่งอาจเกาะรอบกระเปาะ หรือเพียงบางส่วนของกระเปาะ

ง.) ปลายติ่งเป็นที่เกิดของโคโลนี (phialo conidia) ซึ่งมีเซลล์เดียว มักมีรูปร่างกลมโคโลนีอ่อนจะอยู่ปลายติ่ง เวลาที่โคโลนีอ่อนเกิดจะดันโคโลนีแก่ออกไปจึงปรากฏโคโลนีเป็นสาย (basipetal chain) ผิวของโคโลนีอาจเรียบหรือขรุขระคล้ายหนามโดยการอาศัยสีของโคโลนี รูปของกระเปาะที่กลมหรือเป็นรูปโดมมีติ่งชั้นเดียวหรือสองชั้น โคนิเดียผิวขรุขระหรือผิวเรียบ ใช้แยกสายพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Aspergillus* ในวุ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Czapex Dox ซึ่งมีซูโครส ร้อยละ 3 ใช้เป็นวุ้นมาตรฐานที่จะดูสีและลักษณะทางจุลชีววิทยาของเชื้อ *Aspergillus*

กลุ่ม *Aspergillus* spp. พวกอื่น มีเส้นใยแบบมีผนังกั้น โดยโคนิดิโอฟอร์มีผิวเรียบและไม่มีสี เวสซิเคิลมีรูปร่างกลม ส่วนใหญ่เป็น biseriate sterigma ตอนอายุยังน้อย ส่วนหัวของโคนิเดียจะมีรูปร่างกลมและมีสีน้ำตาลปนเหลือง เมื่อโตเต็มที่รูปร่างจะเปลี่ยนไปเป็น short column หรือ loose radiate และมีสีน้ำตาลอ่อน

2.7.3 ความสำคัญของเชื้อรา *Aspergillus* spp. ในอุตสาหกรรม

เชื้อรา *Aspergillus* spp. มีบทบาทสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร การผลิตสารเคมีในอุตสาหกรรม โดยเชื้อราในกลุ่มนี้ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus niger* หรือ *A. wetii* ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดซิตริก และกลูโคนิก นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์เพคติเนสได้ด้วย เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ (Petczar และคณะ, 1986) รวมถึงการผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรม แก่เชื้อรา *Aspergillus oryzae* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไดเอสเตอร์ (diester) สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสไซรัป เชื้อรา *Aspergillus niger* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสและเอนไซม์อะไมเลสเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและอุตสาหกรรมการผลิตยาเป็นต้น (Stainer และคณะ, 1976)

2.8 แป้ง

แป้งเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆที่ได้จากธัญพืช เช่น ข้าว พืชประเภทหัวมีแป้งมาก (Tubers) เช่น มันฝรั่ง พวกรากพืช เช่น มันสำปะหลัง หัวท้าวยายม่อม และต้นสาคู ถ้าเป็นธัญพืช กรรมวิธีการผลิตก็จะเริ่มจากการสีเพื่อแยกเอนโดสเปิร์มออกจากรำและจมูกข้าว แล้วนำเอาส่วนเอนโดสเปิร์มที่มีแป้งสตาร์ชประกอบอยู่เป็นส่วนใหญ่นั้นไปแช่น้ำโม่หรือบดแล้วทำให้แห้งเป็นผง ถ้าเป็นพืชประเภทหัวก็ไม่ต้องผ่านการสี แป้งต่างชนิดกันจะมีส่วนประกอบต่างกันจึงทำให้แป้งมีคุณสมบัติทั้งทางด้านคุณค่าทางโภชนาการ ทางด้านเคมีและทางด้านกายภาพต่างกันด้วยโดยแป้งจะมีคาร์โบไฮเดรตมากที่สุด รองลงมาคือโปรตีน นอกจากนี้มีไขมัน เซลลูโลส เถ้า วิตามิน สารสี เอนไซม์ความชื้นหรือน้ำโดยคาร์โบไฮเดรตในแป้งอยู่ในรูปสตาร์ช จะมีผลต่อการหุงต้มอาหารมากที่สุด (อรวรรณ, 2529)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 องค์ประกอบของแป้งชนิดต่าง ๆ

ชนิดแป้ง	ความชื้น 65% RH 20° ซ.	% ไขมัน	% โปรตีน	% เถ้า	% ฟอสฟอรัส
แป้งข้าวโพด	13	0.6	0.35	0.1	0.015
แป้งมันฝรั่ง	19	0.05	0.06	0.4	0.08
แป้งสาลี	14	0.8	0.4	0.15	0.06
แป้งมันสำปะหลัง	13	0.1	0.1	0.2	0.01
แป้งข้าวโพดเหนียว	13	0.2	0.25	0.07	0.007
แป้งข้าวฟ่าง	13	0.7	0.3	0.08	ไม่มีรายงาน
แป้งข้าวเจ้า	16	0.8	0.45	0.5	0.1
แป้งมันเทศ	13	0.9	ไม่มีรายงาน	0.1	ไม่มีรายงาน

ที่มา : Korus และคณะ (2004)

2.8.1 โครงสร้างทางเคมี (กล้าณรงค์, 2542)

แป้ง และความหมายของคำว่าแป้งในที่นี้หมายถึง สารประกอบอะมิโลส (Amylose) และอะมิโลเพคติน (Amylopectin) ซึ่งในบางครั้งเราอาจต้องใช้คำว่า สตาร์ช (Starch) แทนเพื่อให้ได้ความเข้าใจที่ถูกต้อง คำว่าแป้งในภาษาไทย เช่น แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียวนั้น มีความหมายถึงผงสีขาวที่ส่วนประกอบมีได้ทั้ง โปรตีน เกลือแร่ และสตาร์ช หรือที่ภาษาอังกฤษเรียกว่า ฟลาว์ (Flour) โมเลกุลของแป้งนั้นจะประกอบด้วย D (+) glucose unit ซึ่งอยู่ในรูปของ α-glucopyranosering แต่ละหน่วยของกลูโคสมีพันธะเชื่อมเข้าด้วยกัน โดยเชื่อมต่อกับอะตอมของออกซิเจนที่ตำแหน่ง 1,4 ทำให้โมเลกุลมีลักษณะคล้ายเส้นด้าย โดยทั่วไปประกอบด้วยโมเลกุล 2 ชนิด คือ อะมิโลสและอะมิโลเพกติน อะมิโลสเป็นพอลิเมอร์เส้นตรงมีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 1.5×10^5- 1.5×10^6 มีค่าระดับของการเกิดพอลิเมอร์ (degree of polymerization = DP.) ในช่วง 250-400 AGU (Anhydro-Glucose Unit) ต่อ 1 โมเลกุลของอะมิโลส ส่วนอะมิโลเพกตินเป็นพอลิเมอร์กิ่งก้านที่ประกอบด้วยโมเลกุลส่วนของเส้นตรงประมาณร้อยละ 64-69 มีค่า DP. อยู่ในช่วง 12-50 AGU เชื่อมต่อกับส่วนกิ่งก้านของพอลิเมอร์สั้นๆ ของกลูโคส 20-26 หน่วยซึ่งแทรกอยู่ประมาณร้อยละ 4- 6 ที่ตำแหน่ง α-1,6 มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 10^6-10^9 อะมิโลส และ อะมิโลเพกตินจะเรียงตัวกันอย่างมีระเบียบแบบแผนในเม็ดแป้ง

ภายในเม็ดแป้งประกอบด้วย 2 ส่วนคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Crytalline region โมเลกุลเรียงตัวกันเป็นกลุ่มๆอย่างมีระเบียบเหมือนผลึกจะมีอะมิโลสประกอบอยู่มาก โดยประกอบตามความยาวกับส่วนที่เป็นเส้นตรงของอะมิโลเพกตินด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างภายในโมเลกุลเดียวกันและต่างโมเลกุลขึ้นอย่างมากมาย ทำให้โมเลกุลในบริเวณนี้หนาแน่นและมีแรงยึดเหนี่ยวสูง การดูดน้ำและการพองตัวเกิดขึ้นอย่างจำกัด เนื้อค่อนข้างแข็งและไม่ค่อยทำปฏิกิริยากับสารอื่น

2. Amorphous region โมเลกุลจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ประกอบด้วยอะมิโลเพกตินเป็นส่วนใหญ่ จึงสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลได้น้อยและเป็นส่วนที่ดูดน้ำได้ดี ไวต่อปฏิกิริยา โดยธรรมชาติจะไม่ละลายน้ำเมื่ออยู่ในสภาพที่อุณหภูมิต่ำ

ตารางที่ 2.5 สรุปความแตกต่างของอะมิโลสและอะมิโลเพกติน

อะมิโลส	อะมิโลเพกติน
1. ละลายน้ำได้ดีกว่า	1. ละลายน้ำได้น้อยกว่า
2. เมื่อต้มในน้ำหนืดข้นน้อยกว่าแต่ขุ่นกว่า	2. หนืดข้นมากกว่าและใส
3. ให้สีน้ำเงินแก่กับไอโอดีน	3. ให้สีแดงม่วงหรือสีน้ำตาล
4. ประกอบด้วยโมเลกุลต่อกันเป็นสายตรง	4. โมเลกุลต่อกันคล้ายกิ่งไม้
5. ประกอบด้วยกลูโคส 250 – 2,000 หน่วย	5. แต่ละกิ่งมีกลูโคส 20 – 25 หน่วย
6. ต้มแล้วทิ้งไว้จับเป็นวุ้นได้ดี	6. ไม่จับตัวเป็นวุ้น

ที่มา: กล้าณรงค์และจุนทนี (2540)

ตารางที่ 2.6 สัดส่วนของอะมิโลสต่ออะมิโลเพกตินของธัญพืชต่าง ๆ

ธัญพืช	อะมิโลส / อะมิโลเพกติน
ข้าวโพดธรรมดา	26 / 74
ข้าวโพดเหนียว	1 / 99
ข้าวเจ้า	17 / 83
ข้าวเหนียว	1 / 99
ข้าวฟ่าง	26 / 74

ที่มา : นิรนาม (2521)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
67266

2.8.2 สมบัติทางกายภาพ

แป้งจากธัญพืชมีลักษณะเป็นเม็ด (granule) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-30 ไมโครเมตร จากต้นปาล์มมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ไมโครเมตร และจากรากพืชและหัวพืชมีเส้นผ่านศูนย์กลางถึง 100ไมโครเมตร

โดยธรรมชาติแป้งจะไม่ละลายน้ำเมื่ออยู่ในสภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิเจลาติไนซ์ เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลที่อยู่ใกล้กันในโมเลกุล พันธะไฮโดรเจนนี้อาจเชื่อมกับน้ำทำให้สามารถพองตัวได้เล็กน้อยและมีลักษณะผันกลับได้

ตารางที่ 2.7 ขนาดและรูปร่างของเม็ดแป้งชนิดต่าง ๆ

แหล่งแป้ง	ขนาด (ไมครอน)	รูปร่าง
ข้าวสาลี	2 – 35	กลม ค่อนข้างรี
ข้าวโพด	5 – 25	กลม แบน มีหลายเหลี่ยม รูปร่างคล้ายแท่ง
ข้าวเจ้า	3 – 5	แบน มีหลายเหลี่ยม
ข้าวบาร์เลย์	2 – 35	กลม คล้ายไข่
ข้าวฟ่าง	15 – 35	กลม แบนมีหลายเหลี่ยม
ข้าวโอ๊ต	5 – 8	กลม แบนมีหลายเหลี่ยม
ข้าวไรน์	10 – 50	กลม ค่อนข้างรี
ลูกเดือย	8 – 20	กลม แบนมีหลายเหลี่ยม
ทริทิเคล (Triticale)	2 – 35	กลม ค่อนข้างรี
มันฝรั่ง	15 – 121	กลม รูปไข่มีวงคล้ายเปลือกหอย
มันสำปะหลัง	5 – 35	กลม คล้ายไข่ที่มีรอยตัด
ท้าวยายม่อม	13 – 70	รูปไข่
สาคู	15 - 65	รูปไข่ที่มีรอยตัด

ที่มา : Feng Du และคณะ (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.3 การพองตัวและการละลาย

เม็ดแป้งไม่ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จึงสามารถสกัดแป้งออกจากแหล่งวัตถุดิบได้ด้วยน้ำในระบบการโม่เปียก ความสามารถในการพองตัวและการละลายของเม็ดแป้งขึ้นกับอุณหภูมิ เมื่อแป้งได้รับความร้อนจะเกิดปฏิกิริยาเคมี ทำให้พันธะไฮโดรเจนที่ยึดโมเลกุลของแป้งเข้าด้วยกันมีการเปลี่ยนแปลง โมเลกุลของแป้งจึงแยกออกจากกันและเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำขึ้น การพองตัวของแป้งจะเกิดขึ้นเร็วหรือช้าขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของพันธะไฮโดรเจนในโครงสร้างขององค์ประกอบหลักของเม็ดแป้ง ซึ่งองค์ประกอบหลักนั้นมีอัตราส่วนของส่วนที่เป็นผลึกและส่วนที่เป็นอสัณฐานต่างกัน เม็ดแป้งที่มีส่วนผลึกมากจะมีพันธะไฮโดรเจนหนาแน่นทำให้โครงสร้างของเม็ดแป้งแข็งแรงกว่า โดยทั่วไปส่วนที่เป็นอสัณฐานของเม็ดแป้งจะแข็งแรงน้อยกว่าส่วนที่เป็นผลึกจึงทำให้ส่วนที่เป็นอสัณฐานพองตัวได้ก่อนและสูงมาก เมื่อถึงระดับอุณหภูมิหนึ่งจะทำให้ส่วนที่เป็นผลึกซึ่งมีการจัดเรียงอย่างมีระเบียบเป็นรูปวงแหวนเริ่มบิดเบี้ยวไปที่อุณหภูมิเจลาติไนเซชัน แสดงว่าโมเลกุลในส่วนที่เป็นผลึกมีการดูดซับน้ำบ้างทำให้เม็ดแป้งพองตัวมากขึ้น โมเลกุลในส่วนที่เป็นรูปผลึกที่เหลืออยู่เกิดสภาพคล้ายร่างแหยึดเหนี่ยวกันไว้ทำให้เม็ดแป้งยังคงสภาพอยู่ได้แต่อาจมีโมเลกุลอะมิโลสและอะมิโลเพกติน ซึ่งมีขนาดเล็กและเป็นอิสระกระจายตัวออกจากเม็ดแป้งทำให้เม็ดแป้งพองตัวเต็มที่ สารแขวนลอยแป้งจะมีความหนืดสูงสุดจนในที่สุดเม็ดแป้งก็จะแตก ปัจจัยที่มีผลต่อการพองตัวของเม็ดแป้ง มีดังนี้

1. การจัดเรียงตัวของโมเลกุลในเม็ดแป้ง
2. สัดส่วนของอะมิโลสต่ออะมิโลเพกติน
3. การกระจายของน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน
4. องค์ประกอบที่ไม่ใช่แป้งภายในเม็ดแป้ง โดยเฉพาะไขมันและโปรตีน

2.8.4 การเกิดเจลาติไนเซชันด้วยความร้อน

โดยทั่วไปแป้งจะไม่ละลายในน้ำเย็น เนื่องจากการจัดเรียงในส่วนที่เป็นผลึกของโมเลกุลเป็นไปอย่างมีระเบียบและซับซ้อนกัน โมเลกุลที่อยู่ใกล้กันจะเกาะเกี่ยวด้วยแรงพอเหมาะซึ่งกันและกัน โอกาสที่น้ำจะซึมเข้าในส่วนนี้จะน้อยมาก แต่น้ำอาจซึมเข้าไปในส่วนที่เป็นอสัณฐานของเม็ดแป้งซึ่งไม่แข็งแรงจะมีกลุ่มไฮดรอกซิลอิสระจับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนไว้บ้างแต่เมื่อสารแขวนลอยแป้งในน้ำเย็นได้รับความร้อนอย่างช้าๆจนถึงอุณหภูมิ 60 - 70 องศาเซลเซียส เม็ดแป้งจะสูญเสียรอยกากบาทเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ภายใต้แสงโพลาไรซ์ก่อนที่จะเห็นการพองตัวของมัน ซึ่งเรียกว่าอุณหภูมิเจลาติไนเซชัน แสดงว่าโมเลกุลของแป้งในส่วนที่เป็นผลึกคลายตัวลง เกิดปฏิกิริยาการดูดน้ำ และเกิดการพองตัวของเม็ดแป้งซึ่งสามารถผันกลับได้ ทำให้สารละลายของแป้งมีความหนืดและใสขึ้น กระบวนการนี้เรียกว่า เจลาติไนเซชัน หรือการสุกของเม็ดแป้งโดยแป้งแต่ละชนิดมีช่วงอุณหภูมิแป้งสุกแตกต่างกันไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.8 คุณสมบัติในการพองตัวและความสามารถในการละลายของแป้งแต่ละชนิดที่ 95 องศาเซลเซียส

แป้ง	กำลังการพองตัว	การละลาย (%)
มันฝรั่ง	1,000	82
สาคู	97	39
มันสำปะหลังพุทธรักษา (Canna)	71	48
ท้าวยายม่อม (Arrowroot)	72	37
มันเทศ	54	28
ข้าวโพด	46	18
ข้าวฟ่าง	24	25
ข้าวสาลี	22	22
ข้าวเจ้า	21	41
ข้าวโพดข้าวเหนียว	19	18
ข้าวเจ้าข้าวเหนียว	64	23
ข้าวฟ่างข้าวเหนียว	56	13
ถั่ว (Wrinkled pea)	49	19
ข้าวโพดชนิดอะมิโลสสูง (High-amylose corn)	6	12
ถั่วการ์บาโซ (Garbanzo)	13	15

ที่มา : Feng Du และคณะ, (2002)

2.8.5 แป้งข้าวเจ้า (อรรควุฒิ, 2526)

ข้าวเจ้าหรือ *Oryza sativa* L. มีต้นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีหลายพันธุ์ ข้าวที่ใช้ในกระบวนการผลิตจะเป็นข้าวหักหรือข้าวเกรดสองที่ไม่เหมาะสมต่อการบริโภค โดยตรง ข้าวหักมีองค์ประกอบดังตารางที่ 2.9 แป้งข้าวเจ้ามีการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ มากมาย ใช้เป็นส่วนประกอบของแป้งฝุ่นในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแป้งฝุ่นสำหรับเด็ก เนื่องจากแป้งข้าวเจ้าไม่มีพิษและไม่มีสารระคายเคือง และใช้เป็นสารทำให้แข็ง (laundry stiffening agent) ในการซักรีด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.9 แสดงองค์ประกอบภายในเมล็ดข้าวหัก

องค์ประกอบ	%
ความชื้น	12.0
แป้ง	79.0
โปรตีน	7.0
ไขมัน	0.4
เถ้า	0.5
ส่วนที่เหลือ	0.9

ที่มา: อรรควุฒิ (2526)

ตารางที่ 2.10 แสดงคุณสมบัติของแป้งข้าวเจ้า

คุณสมบัติ	แป้งข้าวเจ้า
ขนาดเม็ดแป้ง (ไมครอน)	1-20
ปริมาณอะมิโลส (%)	15-20
DP อะมิโลส	800-2000
Onset temperature(T0,)	50-55
Peak tempeature	62-67

ที่มา: อรรควุฒิ (2526)

2.8.6 แป้งข้าวโพด (สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม, 2526)

แป้งข้าวโพด (corn starch) หมายถึง แป้งที่ได้จากเมล็ดของข้าวโพด ซึ่งมีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *ซี เมย์ซ ลินน์. (Zea mays Linn.)* ผ่านกรรมวิธีการบดเปียก (wet milling) แยกโปรตีนและไขมันออกและอบแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.11 แสดงคุณสมบัติของแป้งข้าวโพด

รายการที่	คุณสมบัติ	เกณฑ์ที่กำหนด
1	ความชื้นร้อยละไม่เกิน	13.0
2	ความเป็นกรด-ด่าง	4.0 – 7.0
3	เถ้า ร้อยละของน้ำหนักอบแห้ง ไม่เกิน	0.3
4	แป้ง ร้อยละของน้ำหนักอบแห้ง ไม่น้อยกว่า	95.0
5	โปรตีน (Nx6.25) ร้อยละของน้ำหนักอบแห้ง	0.4
6	ไขมัน ร้อยละของน้ำหนักอบแห้ง ไม่เกิน	0.2
7	เหล็ก ร้อยละของน้ำหนักอบแห้ง ไม่เกิน	ไม่กำหนด
8	สารออกซิไดซ์ (oxidizing substance)	ไม่กำหนด
9	ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ร้อยละของน้ำหนักอบแห้ง ไม่เกิน	ไม่กำหนด

ที่มา: สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม (2526)

2.8.7 แป้งสาลี (พัชทรา, 2532)

ข้าวสาลี (wheat) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Triticum* spp. ในปัจจุบันได้มีการนำแป้งสาลีมาใช้ประโยชน์ในร้านซักรีดต่างๆ เนื่องจากความแตกต่างของขนาดเม็ดแป้ง เม็ดแป้งที่มีขนาดเล็กจะเข้าไปในช่องว่างระหว่างเส้นใยของเนื้อผ้า ส่วนเม็ดแป้งขนาดใหญ่จะเคลือบผิวหน้าเสื้อผ้า ใช้เป็นสารประกอบในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอางเนื่องจากมีสีขาวบริสุทธิ์ สำหรับอุตสาหกรรมอาหารได้มีการนำแป้งสาลีมาใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติการเป็นเจลที่อุณหภูมิเย็น ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด ได้แก่ เค้ก ใช้ในการผลิตกาวติดวอลเปเปอร์ (wallpaper) นอกจากนี้ยังใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแป้งแปรรูปต่างๆ เช่น ไดแอลดีไฮด์สตาร์ช (dialdehyde starch) สตาร์ชแซนไทด์ (starch xanthide) และเป็นวัตถุดิบในการหมักกรดอินทรีย์อีกมากมาย องค์ประกอบต่างๆในเมล็ดข้าวสาลี ดังแสดงในตารางที่ 2.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.12 แสดงองค์ประกอบภายในเมล็ดข้าวสาลี

องค์ประกอบ	%
ความชื้น	14
คาร์โบไฮเดรต	64
โปรตีน	12.5
ไขมัน	1.65
เยื่อใย	2.5
เถ้า	1.75
น้ำตาลและกัม	3.6

ที่มา: พัชทรา (2532)

ตารางที่ 2.13 แสดงคุณสมบัติของแป้งสาลี

คุณสมบัติ	แป้งสาลี
ขนาดของเม็ดแป้ง(ไมครอน)	1-40
ปริมาณอะมิโลส	24-27
DP อะมิโลส	800-1600
Pasting temperature	77
Peak viscosity (BU)	65
Final viscosity (BU)	270
Trough viscosity (BU)	60
Onset temperature (T_0, C)	48-50
Peak temperature (Tp, C)	59-60

ที่มา: พัชทรา (2532)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9 การผลิตกรดโคจิกในถังหมัก

Ogawa และคณะ (1995) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยเลี้ยงบนเมมเบรน (Membrane - Surface Liquid Culture, MSLC) ในอาหาร 1 ลิตร จากการทดลองเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยการเลี้ยงบนเมมเบรนกับบนเครื่องเขย่าพบว่าการเลี้ยงบนเมมเบรนผลิตกรดโคจิกได้มากกว่าการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าโดยการเลี้ยงบนเมนเบรนผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าได้กรดโคจิกสูงสุดเพียง 20.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเลี้ยงบนเมมเบรนที่มีกระบวนการหมักแตกต่างกัน 3 แบบ คือ การหมักแบบแบตซ์ (batch MSLC) การหมักแบบเฟดแบตซ์ (fed batch MSLC) ซึ่งมีการเติมอาหารลงไปโดยไม่มีการถ่ายออก และการหมักแบบเฟดแบตซ์ (repeated fed batch MSLC) ที่มีการเติมอาหารซ้ำลงไป เปรียบเทียบกับการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า พบว่าการหมักแบบเฟดแบตซ์ ที่มีการเติมอาหารซ้ำลงไปให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 14.2 กรัมต่อลิตรต่อวัน และการเลี้ยงแบบเขย่าธรรมดาให้ปริมาณกรดโคจิกน้อยที่สุดเท่ากับ 1.6 กรัมต่อลิตรต่อวัน

Ariff และคณะ (1996) ทำการศึกษาความต้องการอากาศ และยีสต์สกัดในการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus flavus* Link 44 - 1 โดยการควบคุมระดับปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ (dissolved oxygen tension , DOT) ต่างกัน ทำการหมักโดยใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีระบบควบคุม พีเอช อุณหภูมิ และออกซิเจนที่ละลายได้ กำหนด พีเอช เป็น 3.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการกวน 600 รอบต่อนาที พบว่าการควบคุมการให้อากาศแบบสองระยะจะทำให้การผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นถึง 28.9 กรัมต่อลิตร มากกว่าการหมักที่ไม่มีการควบคุมการให้อากาศเลยถึง 2 เท่า

Futamura และคณะ (2001a) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* MK107 - 39 เพื่อผลิตกรดโคจิกในถังหมักแบบอากาศยกตัว (airlift bioreactor) ขนาด 3 ลิตร ใช้อาหารกลูโคสกับจมูกข้าวสาลีและเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบใบพัดกวน (jar fermenter) พบว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศยกตัวไม่มีการผลิตกรดโคจิก แต่การเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบใบพัดกวนผลิตกรดโคจิกได้สูง เมื่อทำการคัดเลือกหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศยกตัวประกอบด้วยแป้งข้าวโพดดิบที่ถูกย่อยบางส่วนและน้ำแช่ข้าวโพดปริมาณเล็กน้อย จะสามารถผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณ 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งเท่ากับปริมาณที่ผลิตได้เมื่อเลี้ยงในถังหมักแบบใบพัดกวนที่มีกลูโคสกับจมูกข้าวสาลี ส่วนอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมที่สุดสำหรับถังหมักแบบอากาศยกตัวเท่ากับ 2 วีวีเอ็ม นอกจากนี้ค่าใช้จ่ายสำหรับวัตถุดิบที่ใช้ในถังหมักแบบอากาศยกตัวรวมถึงค่าใช้จ่ายทางด้านพลังงานนั้นยังต่ำกว่าการใช้ถังหมักแบบใบพัดกวนอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave) ; Harvey รุ่น Hydroclave MC 10

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker); New Burnwick Scientificรุ่น INNOVA 4230

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ; Shimazu รุ่น UV - 1601

ตู้เขี่ยเชื้อ (Larminar air flow) ; ISSCO Laminar air flow รุ่น BVT 123

เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ; Shimazu รุ่น Libror EB-4000H

เครื่องชั่งละเอียด 3 ตำแหน่ง ; Sartorius analytic รุ่น A200S

เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) ; Sanyo รุ่น Falcon 6/300

เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่าง (pH meter) ; Denver Instrument รุ่น 215

ถังหมักขนาด 2 ลิตรและชุดควบคุมการทำงาน ; Biostat รุ่น Biostat B

ตู้อบลมร้อน (Hot air owen) ; Memmert รุ่น Model 600

กล้องจุลทรรศน์ (microscope) ; Olympus รุ่น CHS

เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) ; Vortex Genie 2 รุ่น G-560E

ไมโครปิเปต (micropipette) ; Labsystem รุ่น A85810

แผ่นนับเลือด (Haemacytometer) ; Boeco รุ่น Neubauer Bright Line

ชุดกรองสุญญากาศ ; Millipore Bedford รุ่น MA 01730

คิวเวตแก้ว

กระดาษกรอง

หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 10 มิลลิลิตร

เครื่องแก้วชนิดต่างๆ

3.1.2 สารเคมี

กรดโคจิก ; Sigma

ทวีน 80 ; Labchem

แป้งข้าวเจ้า ตราเอราวัณ

แป้งข้าวโพด ตราแม็กกาแรต

แป้งสาลี ตราหงส์ขาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหาร PDA (ภาคผนวก ก)

อาหาร Starch medium (ภาคผนวก ก)

เฟอริกคลอไรด์ ; Unilab (ภาคผนวก ข)

3.1.3 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยได้แก่ *Aspergillus* sp. BR1 ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยได้รับความอนุเคราะห์จากคุณคึกฤทธ์ ศิลาลาย เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บนอาหารวุ้นเอียง PDA ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 3 เดือน

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหาร PDA ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จนเชื้อราสร้างสปอร์ เติมน้ำกลั่นที่ผสมทวีน 80 (0.05 เปอร์เซ็นต์) ลงไปในฟลาสก์ 20 มิลลิลิตร ใช้ช้อนสแตนเลสขูดสปอร์ออกให้หลุดจากเส้นใย นำไปกรองผ่านสำลีที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อแยกเส้นใยราที่ติดมาออก ตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วยเฮมาไซโตมิเตอร์ ปรับจำนวนสปอร์ให้ได้ 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.2.2 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษาเป็นสูตรดัดแปลงจาก Rosfarizan และคณะ (1998) ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน 40 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.5 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร เตรียมอาหารแป้ง 3 ชนิด ประกอบด้วยแป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้า แป้งสาลีแทนลงในแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหาร โดยแต่ละสูตรจะใช้แป้งชนิดละ 30 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร เตรียมอาหารแป้งแต่ละชนิดปริมาตร 70 มิลลิลิตร เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร อาหารแป้งแต่ละชนิดทำ 4 ซ้ำ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่ออาหารเย็นเติมหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.2.1 ลงไปในแต่ละฟลาสก์ เพื่อให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น 1.42×10^5 สปอร์ต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิก

เตรียมอาหารแป้งโดยใช้แป้งที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดมาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสม มาแปรผันความเข้มข้นของแป้งดังนี้คือ 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร จากนั้นดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดโคจิก และค่าพีเอชทุกวันจนครบ 5 วัน

3.2.4 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิก

นำสูตรอาหารที่ได้กรดโคจิกสูงสุดจากข้อ 3.2.3 มาแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ดังนี้ เปปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟตโดยใช้ความเข้มข้นที่ 5 กรัมต่อลิตร จากนั้นดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดโคจิก และค่าพีเอชทุกวันจนครบ 5 วัน

3.2.5 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิก

นำสูตรอาหารที่ได้กรดโคจิกสูงสุดจากข้อ 3.2.4 มาศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนโดยแปรผันความเข้มข้นดังนี้คือ 4 5 และ 6 กรัมต่อลิตร จากนั้นดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดโคจิก และค่าพีเอชทุกวันจนครบ 5 วัน

3.2.6 การศึกษาการผลิตกรดโคจิกในถังหมัก (fermenter)

นำสูตรอาหารที่ได้จากการศึกษาระดับฟลาสก์ มาทำการเลี้ยงในถังหมักแบบแบตช์ขนาด 2 ลิตร ปริมาตรอาหาร 1.4 ลิตร ใส่สารกำจัดฟองโดยใช้น้ำมันพืชตราองุ่น 1 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 40 นาที เมื่ออาหารเย็นเติมหัวเชื้อที่มีสปอร์เริ่มต้น 1.42×10^5 สปอร์ต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 5 วัน นำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดโคจิก พีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี phenol-sulfuric acid แล้วทำการเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้จากการเลี้ยงในถังหมักและระดับฟลาสก์

3.3 วิธีการวิเคราะห์

3.3.1 การวิเคราะห์กรดโคจิก (ภาคผนวก ข.1)

3.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ภาคผนวก ข.2)

3.4.3 การวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์เขย่า

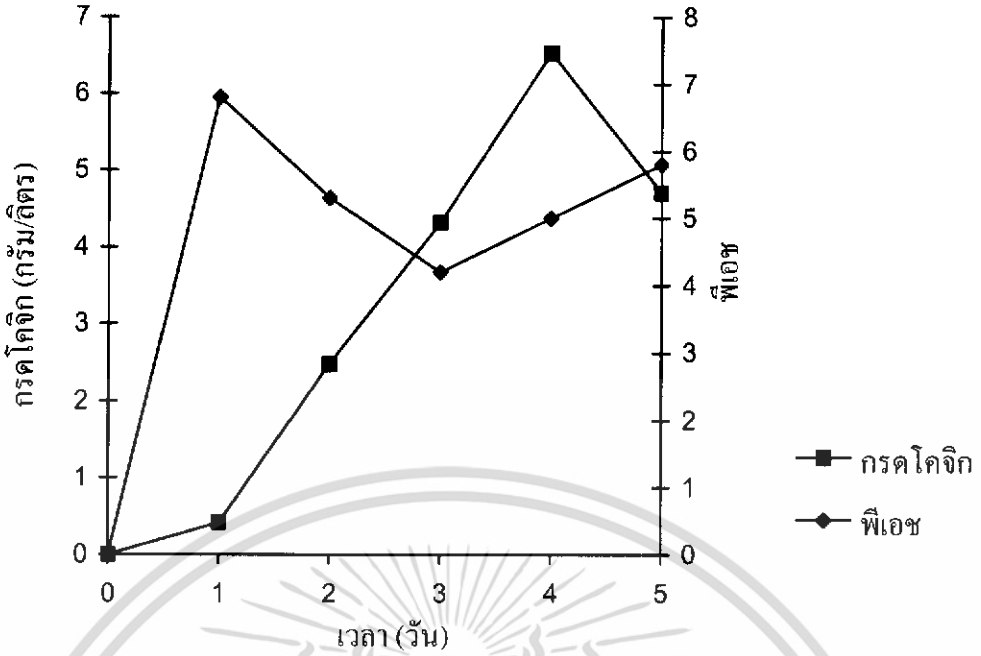
4.1.1 ผลการศึกษาชนิดของอาหารแป้งที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหาร starch medium ที่ใช้แป้งแตกต่างกัน 3 สูตร คือ แป้งสาลี แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้าโดยใช้ความเข้มข้นเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตรให้ผลการทดลอง คือ อาหารเหลวที่ใช้แป้งข้าวโพดสามารถให้การผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดโดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 2 วันเชื้อราจึงผลิตกรดโคจิกออกมาอย่างชัดเจน แล้วจะสะสมสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงคือ 6.53 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงลดลงในวันที่ 5 สำหรับการเปลี่ยนแปลงของพีเอชที่เกิดขึ้นจะลดลงเรื่อยๆจากวันแรกที่พีเอชเริ่มต้นที่ 6.8 แล้วลดลงต่ำสุดที่ 4.2 ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จากนั้นจึงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชสุดท้ายอยู่ที่ 5.8 (รูปที่ 4.1) รองลงมาคืออาหารเหลวที่ใช้แป้งข้าวเจ้าซึ่งจะผลิตกรดโคจิกอย่างชัดเจนในวันที่ 2 แล้วสะสมจนสูงสุดในวันที่ 4 คือ 4.21 กรัมต่อลิตร จากนั้นก็จะลดลงในวันที่ 5 ส่วนพีเอชของอาหารจะมีการเปลี่ยนแปลงคือ ลดลงเรื่อยๆจากวันแรกที่พีเอชของอาหารอยู่ที่ 7.1 จากนั้นก็จะลดลงต่ำสุดในวันที่ 3 คือ 4.2 แล้วจึงค่อยๆเพิ่มขึ้นจนวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีพีเอชอยู่ที่ 5.9 (รูปที่ 4.2)

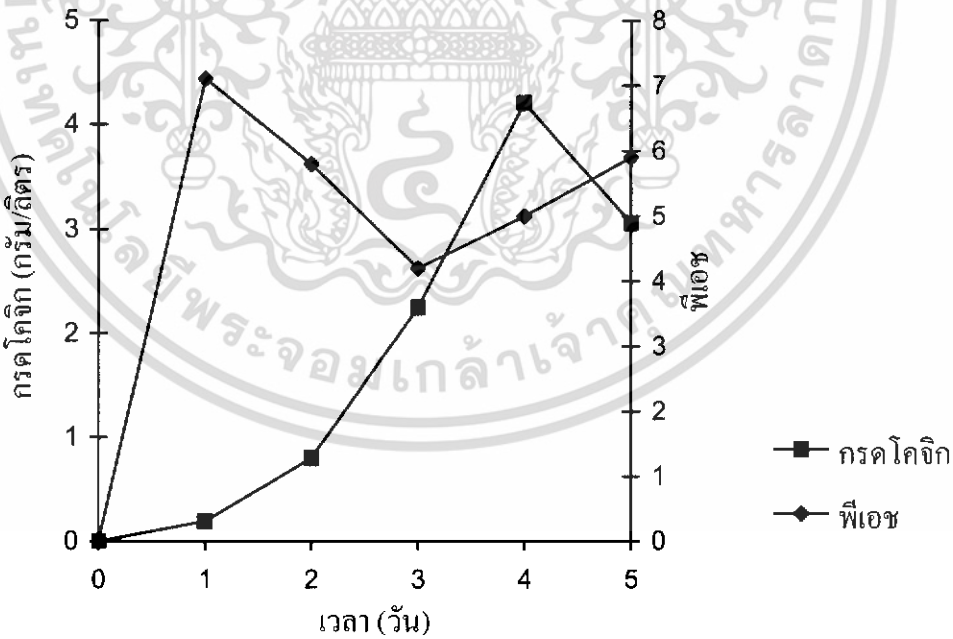
สำหรับอาหารเหลวที่ใช้แป้งสาลีจะให้อัตราการผลิตกรดโคจิกน้อยที่สุดคือ 0.26 กรัมต่อลิตรในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงแล้วจึงลดลงในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับอาหารเหลวที่ใช้แป้งข้าวโพดและแป้งข้าวเจ้า ค่าพีเอชของอาหารมีการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายกันคือจะลดลงจากวันแรกที่มีพีเอช 7.1 จนลดลงต่ำที่สุดในวันที่ 3 คือ 4.2 จากนั้นจึงค่อยๆเพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงอาหารมีพีเอชอยู่ที่ 5.5 (รูปที่ 4.3) การที่กรดโคจิกจะลดลงหลังจากวันที่กรดโคจิกมีการสะสมสูงสุดแล้วนั้น เนื่องมาจากเชื้อรานี้สามารถนำกรดโคจิกที่เกิดขึ้นไปใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญต่อไป

ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rosfarizan และคณะ (1998) ที่ศึกษาหาชนิดแป้งที่เหมาะสมกับการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* โดยใช้แป้ง 3 ชนิดคือ แป้งสาคู แป้งมันฝรั่ง และแป้งข้าวโพด พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดโคจิกได้มากที่สุด 19.2 กรัมต่อลิตรในแป้งข้าวโพด เนื่องจากมีการสร้างเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

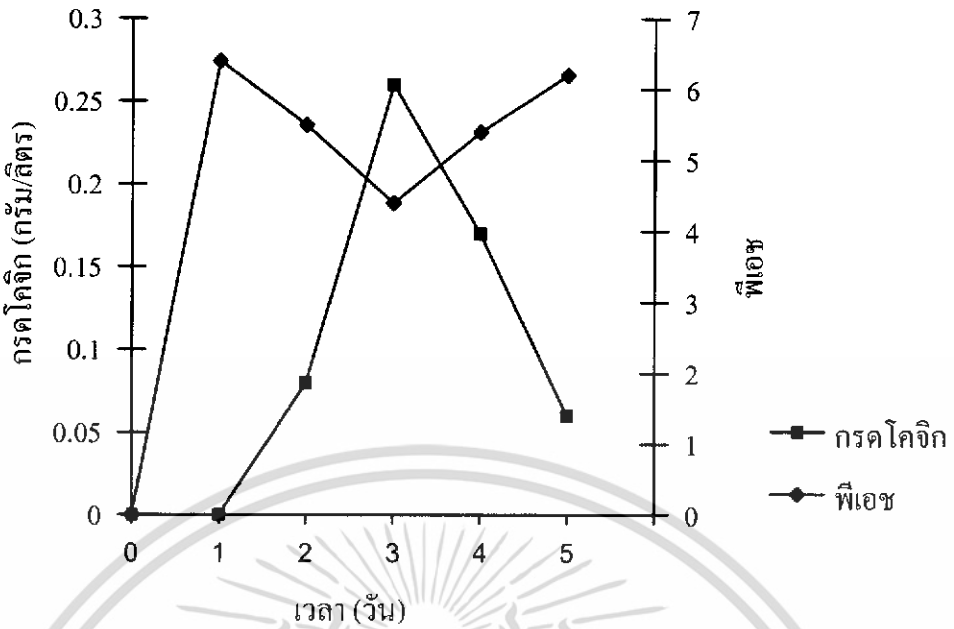


รูปที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งข้าวโพด



รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งข้าวเจ้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งสาลี

Futamura และคณะ (2001b) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* MK-107-39 ในถังหมักแบบอากาศยกตัวขนาด 3 ลิตร พบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ถูกย่อยแล้วบางส่วน 100 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงถึง 40 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้มีการศึกษาการผลิตกรดอินทรีย์จากแป้งข้าวโพดดังนี้ Yahiro และคณะ(1997) ศึกษาการผลิตกรด itaconic ในอาหารเหลวที่ใช้แป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไนตริกเป็นแหล่งคาร์บอน 140 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *Aspergillus terreus* พบว่าสามารถผลิตกรด itaconic ได้มากกว่า 60 กรัมต่อลิตร

Yin และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกในอาหารเหลวเมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสเป็นแหล่งคาร์บอน 120 กรัมต่อลิตรพบว่าเชื้อ *Rhizopus oryzae* สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 82 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าพีเอชและปริมาณกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวโดยใช้แป้งต่างชนิดกัน

ชนิดแป้ง	เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
แป้งสาลี	1	6.4	0.00
	2	5.5	0.08
	3	4.4	0.26
	4	5.4	0.17
	5	6.2	0.06
แป้งข้าวโพด	1	6.8	0.42
	2	5.3	2.48
	3	4.2	4.32
	4	5.0	6.53
	5	5.8	4.71
แป้งข้าวเจ้า	1	7.1	0.19
	2	5.8	0.80
	3	4.2	2.25
	4	5.0	4.21
	5	5.9	3.06

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราโดยใช้แป้งต่างชนิดกัน

ชนิดแป้ง	อัตราการผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตรต่อวัน)
แป้งสาลี	0.08
แป้งข้าวโพด	1.63
แป้งข้าวเจ้า	1.05

จากตารางจะเห็นได้ว่าการใช้ แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ให้อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดคือ 1.63 กรัมต่อลิตรต่อวัน รองลงมาคือแป้งข้าวเจ้า 1.05 กรัมต่อลิตรต่อวัน สุดท้ายคือแป้งสาลีให้อัตราการผลิตกรดโคจิกต่ำสุดคือ 0.08 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของการใช้แป้งทั้ง 3 ชนิดเพื่อผลิตกรดโคจิกทางสถิติพบว่าให้ผลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารเหลวโดยใช้แป้งต่างชนิดกัน

ชนิดแป้ง	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
สาลี	0.26^{c}
ข้าวโพด	6.53^{a}
ข้าวเจ้า	4.21^{b}

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ตัวอักษรไม่ต่างกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ดังนั้นชนิดของแป้งที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 มากที่สุดคือ แป้งข้าวโพด เนื่องจากแป้งข้าวโพดมีกำลังในการพองตัวและการละลายน้ำสูงจึงทำให้อาหารที่เตรียมไว้ไม่จับตัวเป็นก้อนหลังจากทิ้งไว้ให้เย็น ส่งผลให้เอนไซม์อะไมเลสทำงานได้ดีกว่าการใช้แป้งชนิดอื่น โดยให้ปริมาณกรดโคจิก 6.53 กรัมต่อลิตรจึงเลือกใช้แป้งข้าวโพดในการศึกษาครั้งต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

ผลการศึกษาการใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณต่างๆกันคือ แป้งข้าวโพดความเข้มข้น 30 40 และ50 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหารเหลวที่ใช้แป้งข้าวโพดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด โดยเชื้อราจะผลิตกรดโคจิกออกมาอย่างชัดเจนเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงสะสมมากที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงคือ 9.57 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงลดลงในวันที่ 5 สำหรับการเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีค่าลดลงเรื่อยๆ จากวันแรกที่มีพีเอชเริ่มต้นที่ 6.6 แล้วลดลงต่ำสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงคือ 4.0 จากนั้นจึงค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงพีเอชของอาหารจะอยู่ที่ 6.0 (รูปที่4.4) รองลงมาคืออาหารเหลวที่ใช้แป้งความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรโดยเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราเป็นเวลา 2 วันเชื้อราจึงทำการผลิตกรดโคจิกออกมาอย่างชัดเจนแล้วสะสมจนสูงสุดในวันที่ 4 คือ 7.32 กรัมต่อลิตรจากนั้นจึงลดลงในวันที่ 5 สำหรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงคือลดลงเรื่อยๆจากวันแรกอาหารมีพีเอช 7.0 จากนั้นจะลดลงต่ำสุดในวันที่ 3 คือ 4.8 ซึ่งเป็นวันที่กรดโคจิกถูกสะสมจนมีปริมาณมากที่สุดนั่นเอง จากนั้นพีเอชจึงค่อยๆเพิ่มขึ้นจนวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงอาหารมีพีเอช 6.0 (รูปที่ 4.5)

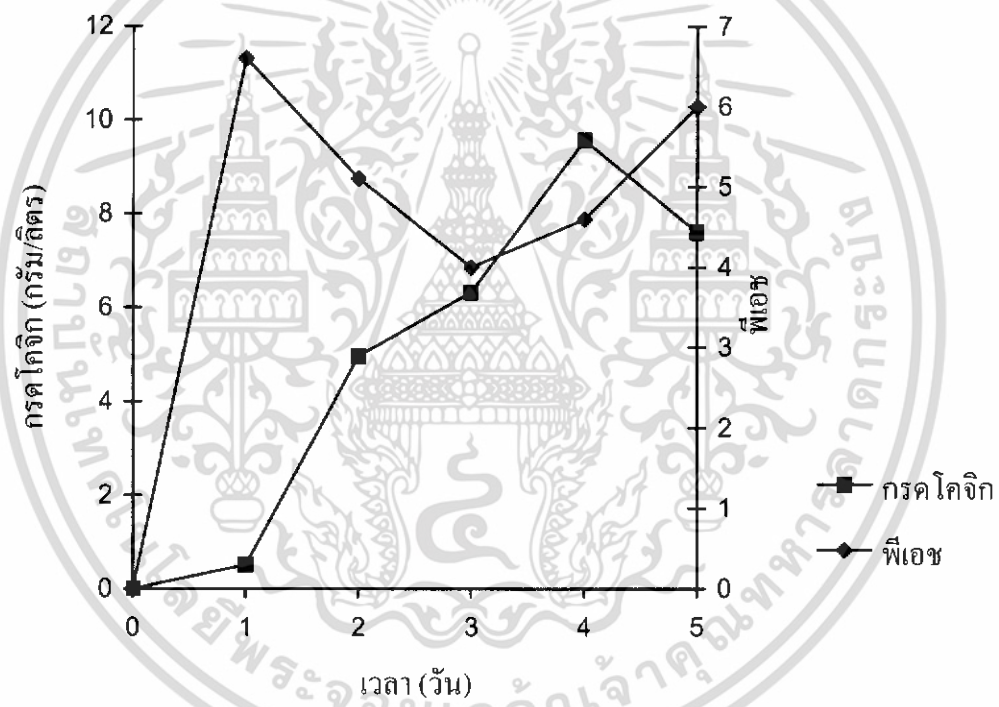
สำหรับอาหารเหลวที่ใช้แป้งข้าวโพดความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรจะผลิตกรดโคจิกได้น้อยที่สุด เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรานาน 2 วันจะผลิตกรดโคจิกออกมาอย่างชัดเจนแล้วสะสมจนมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 4 คือ 5.91 กรัมต่อลิตร แล้วจึงลดลงในวันที่ 5 สำหรับการเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดขึ้น จะลดลงเรื่อยๆจากวันแรกที่พีเอชเริ่มต้น 6.8 จนในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงพีเอชจะลดลงต่ำสุดเหลือ 4.0 แล้วค่อยๆเพิ่มขึ้นจนพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในวันสุดท้ายเป็น 5.6 (รูปที่ 4.6)

จากการศึกษาหาปริมาณความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดที่เหมาะสม พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งให้มากขึ้นสามารถทำให้เชื้อราผลิตกรดโคจิกได้มากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1 เป็นเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าในภาคอีสานของไทยจึงสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสออกมาเพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ (อภิชญา, 2548) ดังนั้นเมื่อใช้ปริมาณแป้งเข้มข้นขึ้นก็จะมีแหล่งคาร์บอนสูงขึ้นตามไปด้วยและเมื่อมีน้ำตาลมากเชื้อราจึงสามารถเปลี่ยนให้เป็นกรดโคจิกได้มากขึ้นนั่นเอง แต่ถ้าใช้แป้งที่มีความเข้มข้นสูงจนเกินไปอาหารจะมีความหนืดเกิดขึ้นอาจส่งผลให้เชื้อราผลิตกรดโคจิกได้ลดน้อยลง โดยการศึกษาครั้งนี้มีความใกล้เคียงกับอภิชญา (2548) ที่ศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 โดยแปรผันความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังดังนี้ 20 40 และ60 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 11.62 กรัมต่อลิตร

Rosfarizan และคณะ (1998) ศึกษาหาความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดในการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* โดยใช้ความเข้มข้น 25 30 50 75 และ 100 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้

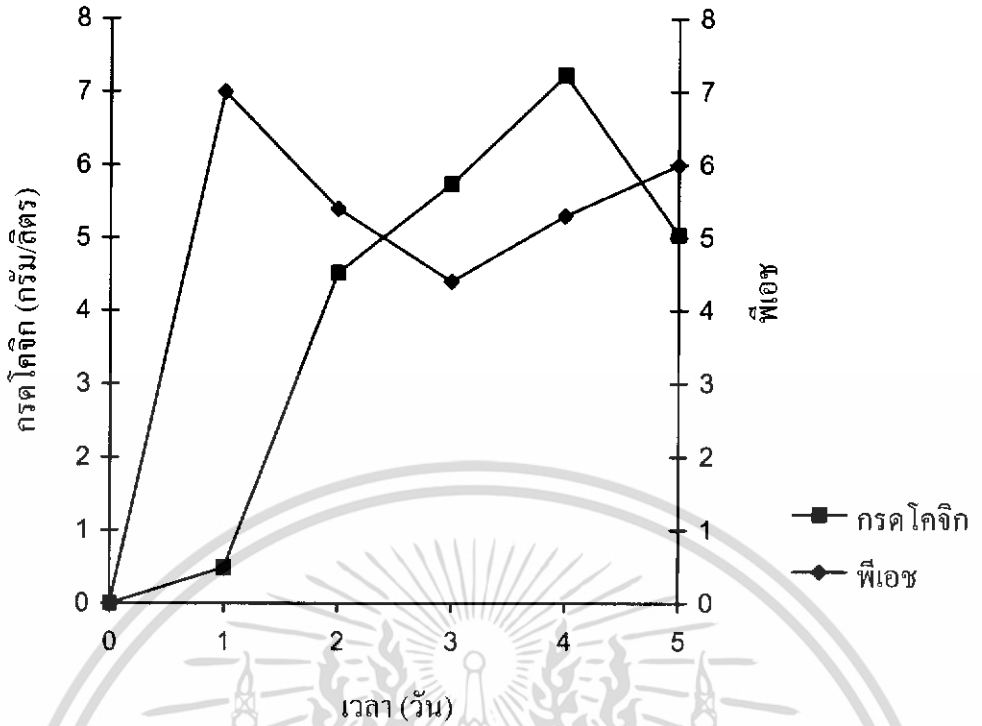
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แป้งข้าวโพดความเข้มข้น 75 กรัมต่อลิตร ให้กรดโคจิกสูงสุด 12.8 กรัมต่อลิตร แต่จากการศึกษาของ Futamura และคณะ (2001b) ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus oryzae* MK -107-39 ในถังหมักแบบอากาศยกตัวขนาด 3 ลิตร โดยใช้แป้งข้าวโพดที่ถูกย่อยแล้วบางส่วนเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกได้ 40 กรัมต่อลิตรจากการใช้แป้งข้าวโพดที่มีความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากการทดลองในครั้งนี้พบว่ามีค่ามากกว่า อาจเนื่องมาจากการใช้แป้งข้าวโพดความเข้มข้นสูงถึง 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ถูกย่อยแล้วบางส่วนดังนั้นอาหารที่เตรียมได้จึงมีความหนืดน้อยหรือไม่มีความหนืดเลยทั้งที่ใช้แป้งความเข้มข้นสูง จึงทำให้เชื้อราสามารถนำแป้งที่มีอยู่ในปริมาณมากเปลี่ยนไปเป็นกรดโคจิกได้มากขึ้นนั่นเอง

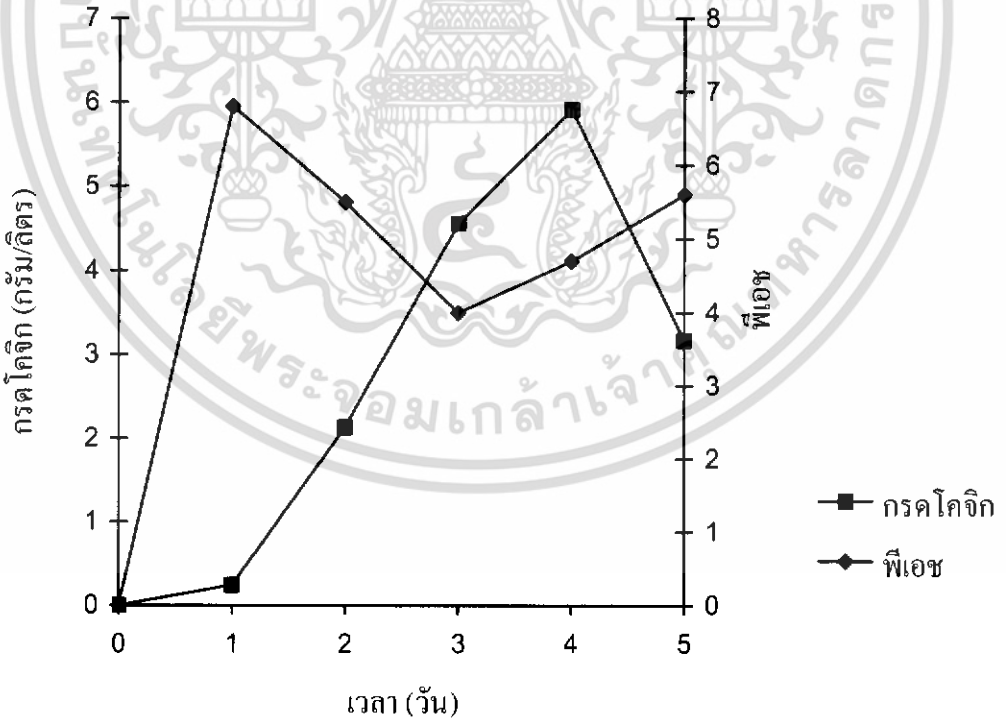


รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งข้าวโพด 50 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งข้าวโพด 40 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งข้าวโพด 30 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าพีเอช และปริมาณกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวโดยใช้ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดต่างกัน

ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพด (กรัมต่อลิตร)	เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
30	1	6.8	0.24
	2	5.5	2.13
	3	4.0	4.56
	4	4.7	5.91
	5	5.6	3.17
40	1	7.0	0.49
	2	5.4	4.52
	3	4.4	5.74
	4	5.3	7.23
	5	6.0	5.04
50	1	6.6	0.51
	2	5.1	4.96
	3	4.0	6.32
	4	4.6	9.57
	5	6.0	7.60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราโดยใช้ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดต่างกัน

แป้งข้าวโพด (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตรต่อวัน)
30	1.47
40	1.80
50	2.39

จากตารางจะเห็นได้ว่าการใช้แป้งข้าวโพดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อราสามารถให้อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดคือ 2.39 กรัมต่อลิตรต่อวัน รองลงมาคือแป้งข้าวโพดความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรให้อัตราการผลิตกรดโคจิก 1.80 กรัมต่อลิตรต่อวัน สุดท้ายคือแป้งข้าวโพดความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตรให้อัตราการผลิตกรดโคจิก 1.47 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของการใช้แป้งข้าวโพดทั้ง 3 ความเข้มข้นเพื่อผลิตกรดโคจิก ทางสถิติพบว่าให้ผลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารเหลวโดยใช้ความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดต่างกัน

แป้งข้าวโพด (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
30	5.91^{c}
40	7.23^{b}
50	9.57^{a}

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ตัวอักษรไม่ต่างกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

ดังนั้นความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp.BR1 มากที่สุดคือ การใช้แป้งข้าวโพดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร โดยให้ปริมาณกรดโคจิก 9.57 กรัมต่อลิตร จึงเลือกใช้แป้งข้าวโพดความเข้มข้นนี้ในการศึกษาครั้งต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

ผลการศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกันคือ เปปโตน ยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต (NH_2SO_4) พบว่าเปปโตนให้การผลิตกรดโคจิกที่สูงที่สุดโดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 2 วันเชื้อราจึงเริ่มทำการผลิตกรดโคจิกออกมาอย่างชัดเจนแล้วสะสมจนสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงคือ 12.04 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นจึงลดลงเล็กน้อยในวันที่ 5 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง สำหรับการเปลี่ยนแปลงของพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันแรกมีพีเอช 6.8 โดยจะค่อยๆลดลงจนในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง อาหารจะมีพีเอชต่ำที่สุด 4.0 จากนั้นจึงค่อยๆเพิ่มขึ้นจนวันสุดท้ายอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอช 5.4 (รูปที่ 4.7)

รองลงมาคืออาหารที่ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อราจะผลิตกรดโคจิกออกมาอย่างชัดเจนในวันที่ 2 แล้วสะสมจนสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง 8.81 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นจึงลดลงเล็กน้อยในวันที่ 4 และวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงคือในวันแรกอาหารมีพีเอช 7.0 จากนั้นจึงลดลงจนมีพีเอชต่ำสุดในวันที่ 3 ซึ่งเป็นวันที่กรดโคจิกถูกสะสมมากที่สุด จากนั้นจึงค่อยๆเพิ่มขึ้นจนวันสุดท้ายมีพีเอช 6.1 (รูปที่ 4.8) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนให้การผลิตกรดโคจิกต่ำที่สุดโดยตลอดการเพาะเลี้ยงเชื้อราสามารถผลิตกรดโคจิกสูงสุดได้เพียง 0.64 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับค่าพีเอชของอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจะมีค่าพีเอชลดต่ำลงมากในวันแรกอาหารมีพีเอช 4.2 แล้วลดลงจนเหลือ 3.4 ในการเพาะเลี้ยงวันที่ 3 แล้วเพิ่มขึ้นเล็กน้อย จนวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงอาหารมีค่าพีเอช 4.4 (รูปที่ 4.9) เมื่อพิจารณาผลการใช้แหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดพบว่า เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตดีที่สุด รองลงมาคือยีสต์สกัด ส่วนแอมโมเนียมซัลเฟตให้ผลผลิตที่น้อยมาก อาจเนื่องมาจากแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปสารประกอบอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมคลอไรด์นั้นจะไปทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาวะเป็นกรดมากเกินไป สังเกตุได้จากค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนจะมีค่าลดต่ำลงมากอยู่ในช่วง 2.4 - 3.5 เพราะแอมโมเนียมเมื่ออยู่ในรูปสารละลายแล้วจะอยู่ในรูป แอมโมเนียม (NH_4) มีผลไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางตัวที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิกและเอนไซม์อะไมเลสทำให้เชื้อราเจริญได้น้อยลงไปด้วย (Ariff และ Webb, 1998)

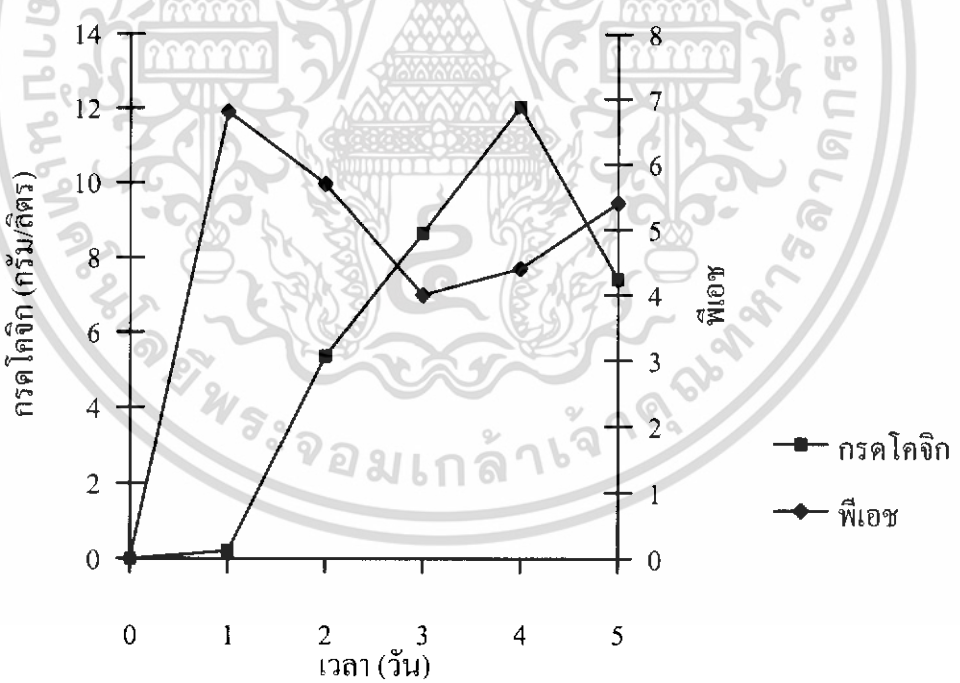
เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Davis (1962) ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus flavus* NTCC 10124 โดยศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แหล่งไนโตรเจน 26 ชนิดพบว่า เมื่อใช้เปปโตนความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดโคจิกได้ต่ำที่สุดคือ 1 กรัมต่อลิตรซึ่งน้อยกว่าการทดลองในครั้งนี้ ส่วนการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตให้ผลการทดลองเช่นเดียวกันคือพบว่าเชื้อไม่สามารถผลิตกรดโคจิกได้

Futamura และคณะ (2001a) ทำการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* MK107-39 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนทั้งหมด 6 ชนิดคือ เมล็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

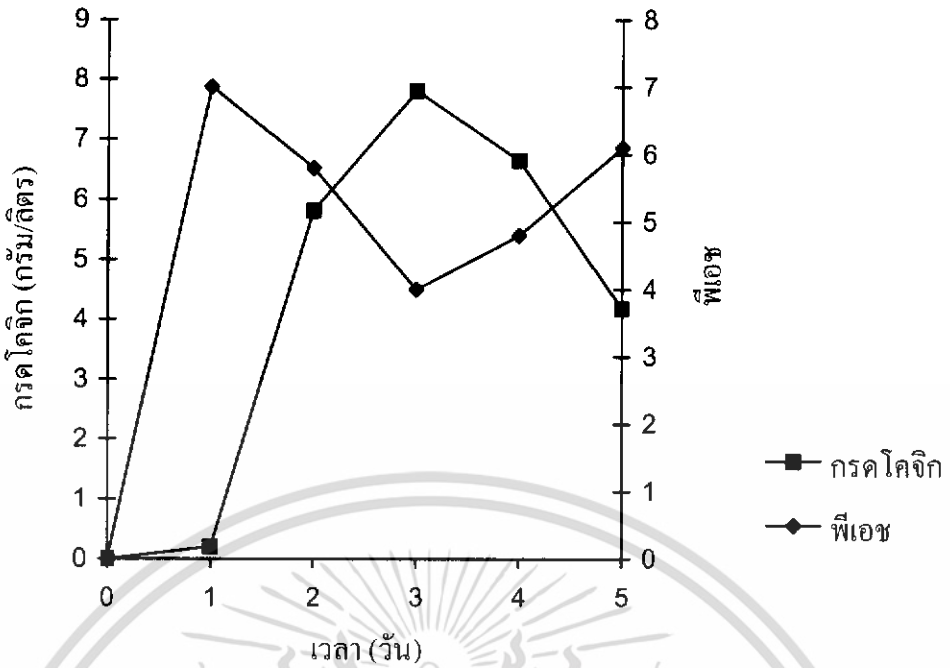
ฝ้ายบด กลูเตน เมล็ดถั่วเหลืองบด จมูกข้าวสาลี เมล็ดทานตะวัน และเปปโตน พบว่าเมื่อเลือกใช้เปปโตน 2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อราผลิตกรดโคจิกได้ต่ำที่สุดคือ 15 กรัมต่อลิตร ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้ดีที่สุดคือ จมูกข้าวสาลี แต่มีข้อเสียคือมีราคาแพงกว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆมาก

จากการศึกษาของ Wei และคณะ (1991) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่สามารถผลิตกรดโคจิกสูงสุดโดยใช้อาหาร 3 ชนิดคือ ชนิดที่ 1 อาหารดัดแปลงจาก czapex- dox liquid medium ที่มีส่วนประกอบของโซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) 2.5 กรัมต่อลิตร กับยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร ชนิดที่ 2 คืออาหารของ Tadera ที่มีส่วนประกอบของเปปโตน 5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน และชนิดสุดท้ายคืออาหารของ Yeast Extract Sucrose (YES) มีส่วนประกอบของยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าอาหาร YES ให้ปริมาณกรดโคจิกมากที่สุด 57-59 กรัมต่อลิตร ส่วนอาหารชนิดที่ 2 ให้การผลิตกรดโคจิกน้อยที่สุดคือ 20 กรัมต่อลิตร จากการทดลองทั้งสองพบว่าเมื่อเลือกใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้เชื้อราผลิตกรดโคจิกได้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนที่ทำการศึกษา แต่เมื่อพิจารณาดูที่ปริมาณกรดโคจิกที่เชื้อราผลิตขึ้นจะพบว่ามีค่าใกล้เคียงการการศึกษาในครั้งนี้

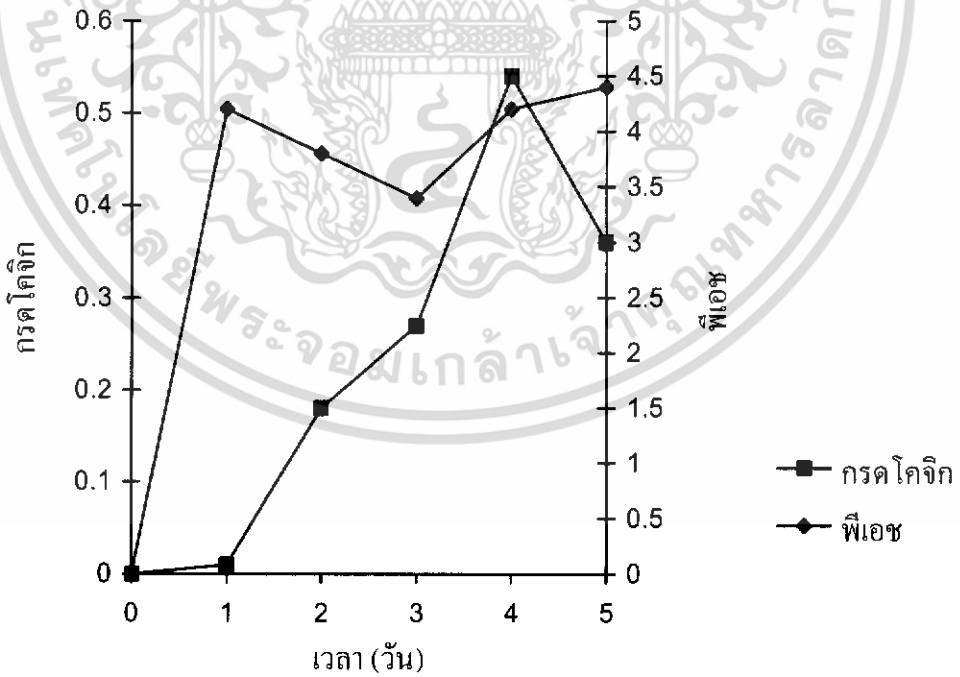


รูปที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เปปโตน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ยีสต์สกัด



รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าพีเอช และปริมาณกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวโดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน

ชนิดของแหล่งไนโตรเจน	เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
เปปโตน	1	6.8	0.21
	2	5.7	5.37
	3	4.0	8.65
	4	4.4	12.04
	5	5.4	7.41
ยีสต์สกัด	1	7.0	0.20
	2	5.8	5.81
	3	4.0	7.81
	4	4.8	6.65
	5	6.1	4.18
แอมโมเนียมซัลเฟต	1	4.2	0.01
	2	3.8	0.18
	3	3.4	0.27
	4	4.2	0.64
	5	4.4	0.36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราโดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน

แหล่งไนโตรเจน	อัตราการผลิตกรดโคจิก (กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน)
เปปโตน	3.01
ยีสต์สกัด	2.60
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.16

จากตารางพบว่าเมื่อเลือกใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อรามีอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุด 3.01 กรัมต่อลิตรต่อวัน รองลงมาคือยีสต์สกัดอัตราการผลิตกรดโคจิก 2.60 กรัมต่อลิตรต่อวัน สุดท้ายคือการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อราจะมีอัตราการผลิตกรดโคจิกต่ำที่สุดคือ 0.16 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดในการผลิตกรดโคจิกทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญดังแสดงในตารางที่ 4.9 ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 มากที่สุดคือ การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นเปปโตนโดยให้ปริมาณการผลิตกรดโคจิก 12.04 กรัมต่อลิตร การที่เปปโตนในอาหารเลี้ยงเชื้อให้การผลิตกรดโคจิกสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่น อาจเนื่องจากเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมของเชื้อราดังนั้นจึงเลือกใช้เปปโตนในการศึกษาครั้งต่อไป

ตารางที่ 4.9 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารเหลวโดยใช้แหล่งไนโตรเจนต่างกัน

แหล่งไนโตรเจน	กรดโคจิก(กรัมต่อลิตร)
เปปโตน	12.04[a]
ยีสต์สกัด	7.81[b]
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.54[c]

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01
ตัวอักษรไม่ต่างกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเปปโตนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

ผลการศึกษาการใช้เปปโตนความเข้มข้นต่างกัน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เปปโตน 4 กรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด โดยเชื้อราจะผลิตกรดโคจิกออกมาอย่างชัดเจนในวันที่ 2 แล้วสะสมจนสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง 13.87 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงลดลงเล็กน้อยในวันที่ 5 ซึ่งเป็นวันที่สิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ส่วนพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นในวันแรก 7.1 จากนั้นจะลดลงจนต่ำสุดในวันที่ 3 แล้วค่อยเพิ่มขึ้นจนในวันสุดท้ายอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอช 6.0 (รูปที่ 4.10)

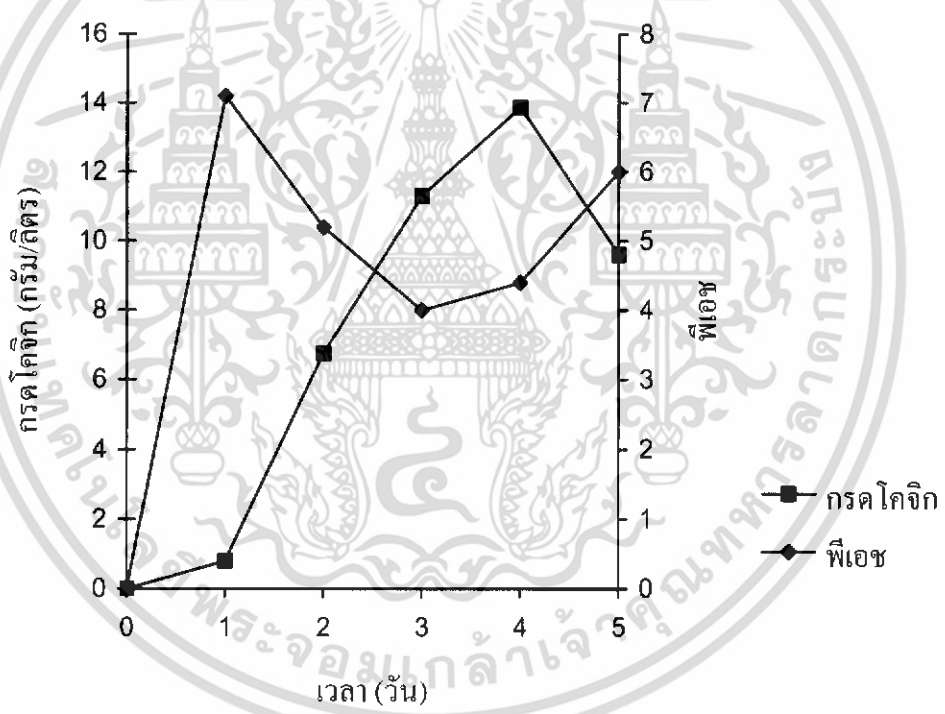
รองลงมาคือการใช้เปปโตนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เชื้อราจะผลิตกรดโคจิกออกมาอย่างชัดเจนในวันที่ 2 แล้วสะสมจนสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง 11.28 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงลดลงในวันที่ 5 ซึ่งเป็นวันเพาะเลี้ยงวันสุดท้าย พีเอชของอาหารเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงดังนี้ในวันแรก 6.9 แล้วลดลงต่ำสุดในวันที่ 3 วันสุดท้ายที่เพาะเลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอช 5.8 (รูปที่ 4.11) สุดท้ายคืออาหารที่ใช้เปปโตนความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร จะให้การผลิตกรดโคจิกที่ต่ำสุด โดยเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อรานาน 2 วันจะให้การผลิตกรดที่ชัดเจน แล้วจะสะสมจนมีปริมาณสูงที่สุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง 4.62 กรัมต่อลิตร จากนั้นจึงลดลงในวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง สำหรับพีเอชของอาหารก็มีลักษณะเช่นเดียวกับการใช้เปปโตนความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร และ 5 กรัมต่อลิตร คือเมื่อเพาะเลี้ยงในวันแรกอาหารมีพีเอช 7.6 แล้วลดลงในวันต่อมาจนต่ำสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง 4.5 ในวันสุดท้ายอาหารมีค่าพีเอช 5.9 (รูปที่ 4.12) จากการทดลองพบว่าเมื่อเลือกใช้เปปโตนความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำการศึกษา จะให้การผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุด เนื่องจากในการผลิตกรดอินทรีย์จากเชื้อรานั้นจำเป็นต้องควบคุมไม่ให้มีปริมาณไนโตรเจนมากเกินไป เพราะจะไปทำให้การผลิตกรดลดลง เนื่องจากถ้ามีปริมาณไนโตรเจนมากขึ้นจะทำให้ไซโตพลาสซึมในเส้นใยไหลไปสู่ส่วนปลาย (tip) เพื่อทำการสร้างเซลล์ใหม่โดยจำนวนเซลล์ที่ถูกผลิตจะสูงขึ้นตามความเข้มข้นของไนโตรเจน ซึ่งส่วนนี้จะไม่มีการสร้างหรือผลิตกรดอินทรีย์ขึ้นภายในเซลล์ (nonproducting tip) เพราะบริเวณนี้ไม่ทนต่อกระบวนการผลิตกรดอินทรีย์ของเชื้อรานั่นเอง (Kristiansen และ Sinclair, 1979)

การศึกษาในครั้งนี้มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ อภิชญา (2548) ที่ศึกษาหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อรา *Aspergillus* sp.BR1 พบว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรที่ประกอบไปด้วยยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตรและโซเดียมไนเตรท 2.5 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 11.62 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Rosfarizan และคณะ(2000) ทำการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus flavus* พบว่าเมื่อเลือกใช้เปปโตนหรือยีสต์สกัดความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรจะให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุด 39.90 กรัมต่อลิตร และการศึกษานี้ให้ผลแตกต่างจากวรรณี (2546) ที่ศึกษาหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

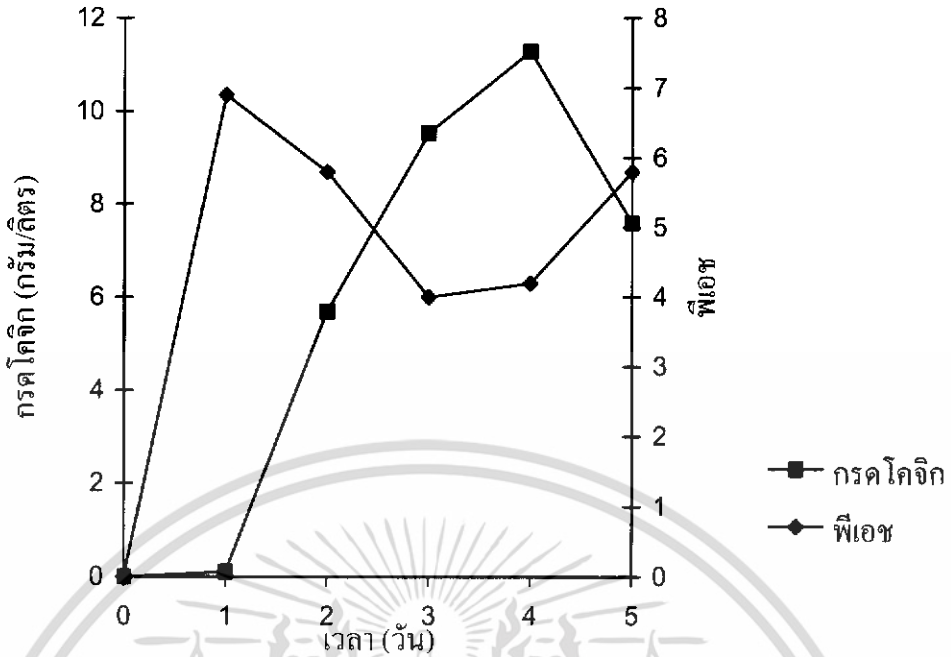
NRRL484 โดยแปรผันความเข้มข้นดังนี้ 0 5 10 15 และ20 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตรจะให้การผลิตกรดโคจิกสูงสุด 24.32 กรัมต่อลิตร และสุกัญญา (2541) ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร จะผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 34 กรัมต่อลิตร การที่ใช้แหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นต่างกันเนื่องจากองค์ประกอบที่แตกต่างกันของอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อราที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกเป็นคนละสายพันธุ์

นอกจากนี้ Yankasil และคณะ (2005) ศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรทในการผลิตกรดซิตริกจากเชื้อ *Aspergillus niger* โดยแปรผันความเข้มข้น 0.05 0.1 0.15 0.2 และ 0.25 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรทความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ 0.05 กรัมต่อลิตรจะผลิตกรดซิตริกได้สูงสุด 1.2 กรัมต่อลิตร

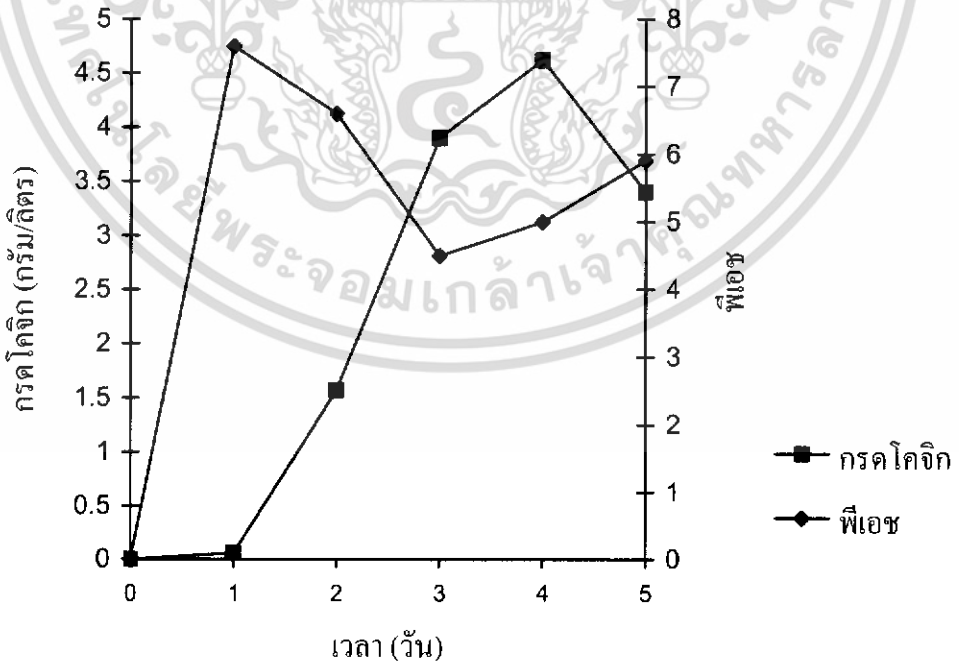


รูปที่ 4.10 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เปปโตน 4 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดโคจิกและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เปปโตน 6 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงค่าพีเอช และปริมาณกรดโคจิกเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวโดยใช้เปปโตน ความเข้มข้นต่างกัน

ความเข้มข้น เปปโตน (กรัมต่อลิตร)	เวลา (วัน)	พีเอช	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
4	1	7.1	0.80
	2	5.2	6.75
	3	4.0	11.31
	4	4.4	13.87
	5	6.0	9.60
5	1	6.9	0.11
	2	5.8	5.60
	3	4.0	9.54
	4	4.2	11.28
	5	5.8	7.60
6	1	7.6	0.06
	2	6.6	1.57
	3	4.5	3.90
	4	5.0	4.62
	5	5.9	3.40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 แสดงอัตราการผลิตกรดโคจิกของเชื้อราโดยใช้เปปโตนความเข้มข้นต่างกัน

เปปโตน (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตรต่อวัน)
4	3.46
5	2.82
6	1.15

จากตารางพบว่าเมื่อใช้เปปโตนความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตรเชื้อรามีอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงที่สุด 3.46 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน รองลงมาคือการใช้เปปโตนความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีอัตราการผลิตกรดโคจิก 2.82 กรัมต่อลิตรต่อวัน สุดท้ายคือเปปโตนความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร จะให้อัตราการผลิตกรดโคจิกต่ำที่สุดคือ 1.15 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของการใช้เปปโตนที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ในการผลิตกรดโคจิกทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญดังแสดงในตารางที่ 4.12 ดังนั้นเปปโตนที่ความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร จะให้การผลิตกรดโคจิกที่สูงที่สุด โดยจะให้ปริมาณกรดโคจิก 11.22 กรัมต่อลิตร จึงเลือกใช้เปปโตนความเข้มข้นนี้ในการศึกษาครั้งต่อไป

ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอาหารเหลวโดยใช้เปปโตนเคามเข้มข้นต่างกัน

เปปโตน (กรัมต่อลิตร)	กรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)
4	13.87^{a}
5	11.22^{b}
6	7.45^{c}

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01
ตัวอักษรไม่ต่างกันหมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในถังหมัก

จากการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในถังหมักพบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดโคจิกได้ 17.84 กรัมต่อลิตรโดยมีอัตราการผลิตกรดโคจิก 4.46 กรัมกรดโคจิกต่อลิตรต่อวัน ซึ่งเพิ่มมากขึ้นจากการเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า 1.28 เท่า อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบไปด้วย แป้งข้าวโพด 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน มีแหล่งไนโตรเจนเป็นเปปโตน 4 กรัมต่อลิตรนำมาเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่ใช้อัตราการกวนของใบพัด 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม จากผลการทดลองจะเห็นว่าเมื่อใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม เชื้อราสามารถผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณสูงกว่าระดับฟลาสก์ เนื่องจากเชื้อรากระจายตัวในอาหารได้ดีขึ้นจึงได้รับอาหารและอากาศอย่างเพียงพอ จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในวันที่ 1 และวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงเนื่องจากเชื้อรานำน้ำตาลไปใช้ในการสร้างเซลล์และเพิ่มจำนวนเป็นส่วนใหญ่ซึ่งสังเกตุได้จากปริมาณกรดโคจิกที่ยังมีปริมาณไม่สูงมากในวันแรก หลังจากนั้นจึงพบว่ากรดโคจิกมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนในวันที่ 2 และสะสมจนมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 4 หลังจากนั้นจึงมีปริมาณลดลงในวันที่ 5 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง

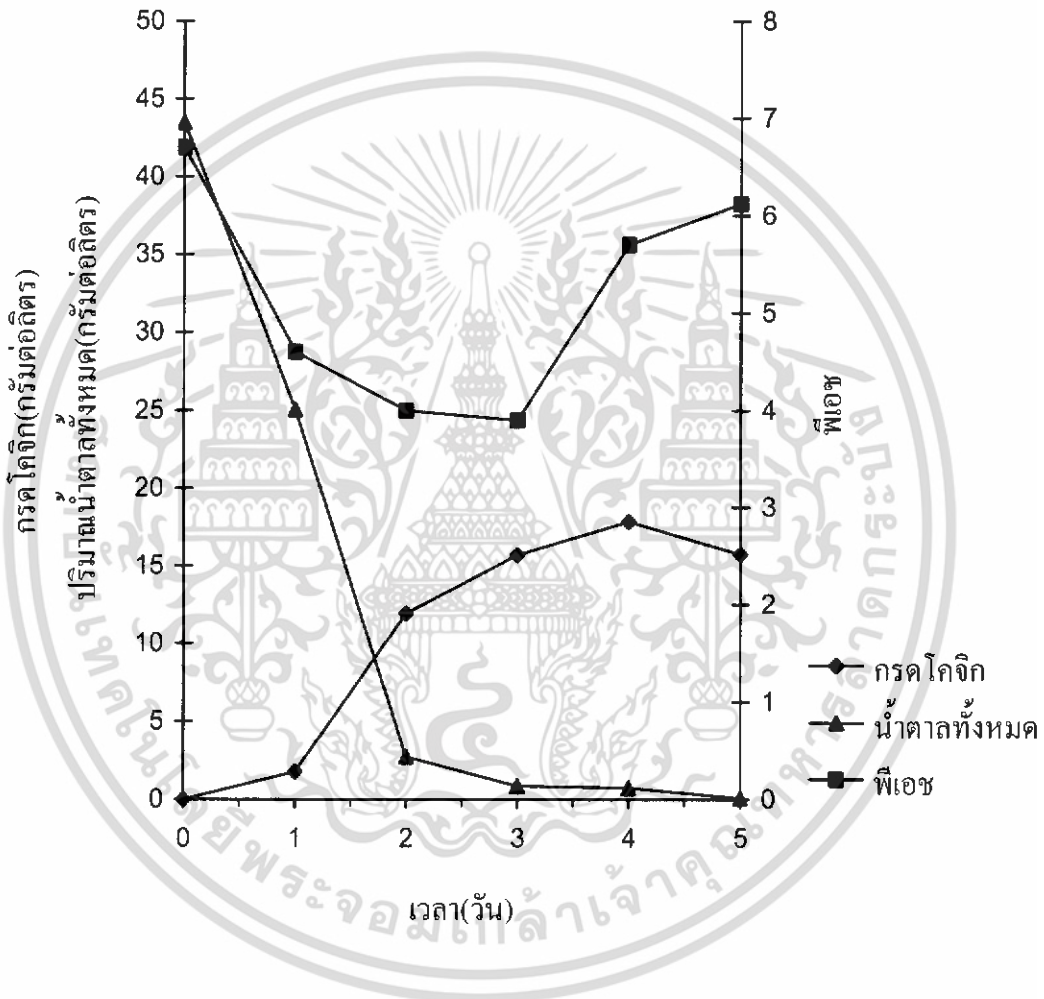
อภิชญา (2548) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยมีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัด 2.5 กรัมต่อลิตร โซเดียมไนเตรท 2.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 16.36 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม

วรรณี (2546) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยใช้น้ำอ้อย 1 ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร นำมาเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตรแบบแบตช์ พบว่าผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 45.15 กรัมต่อลิตร ที่ความเร็วรอบในการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม

สุกัญญา (2541) เพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* NRRL 484 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดโคจิกในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบแบตช์ โดยใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีสูตรอาหาร คือ ซูโครส 175 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมไนเตรต 2 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร น้ำมะพร้าว 1 ลิตร พบว่าผลิตกรดโคจิกได้ 37 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rosfarizan และคณะ (2002) ทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus flavus* Link 44-1 เพื่อศึกษาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก ในถังหมักขนาด 8 ลิตรแบบกึ่งแบตช์ อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที ในอาหาร1 ลิตรประกอบด้วย แป้งสาคู 60 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัม พบว่ามีอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมคือ 40-50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเซลล์เจริญ และสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 31.07 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.13 แสดงค่าพีเอช ปริมาณกรดโคจิก และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 โดยหาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่จะให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด พบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวโพดความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีแหล่งไนโตรเจนเป็นเปปโตนความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โดยเพาะเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 5 วัน ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง 15.18 กรัมต่อลิตร เมื่อนำสูตรอาหารนี้มาศึกษาต่อโดยทำการเลี้ยงในถังหมักแบบแบตช์ขนาด 2 ลิตรควบคุมให้มีอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม พบว่าเชื้อราสามารถสร้างกรดโคจิกได้สูงขึ้นจากระดับฟลาสก์ 1.28 เท่าคือ 17.71 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอต. 2542 . เทคโนโลยีของแป้ง. บริษัทเท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด กรุงเทพฯ : 87-100.

กล้าณรงค์ ศรีรอต และจุนทนี จิตต์รำพึง. 2540. พจนานุกรม FOOD ADDITIVES.วารสารจาร์พา. ปีที่ 4 ฉบับที่ 33 : 57 – 59.

ดวงพร คันธโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ :โอเดียนสโตร์.

นิรนาม. 2521. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรรณกร อิ่มขัดมา. 2535. เชื้อราก่อโรคในคน. ภาควิชาพยาบาลศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ : 148-151.

พัชทรา มณีศิลป์. 2532. การใช้แป้งที่ผลิตภายในประเทศทดแทนแป้งสาลีในการทำบะหมี่. โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม. 2526. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมแป้งข้าวโพด. มอก. 638 กระทรวงอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ.

วรรณี สุวรรณเวช. 2546. การผลิตกรดโคจิกจากน้ำอ้อยโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

สุกัญญา สายธิ. 2541. การผลิตกรดโคจิกจากน้ำมะพร้าวโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

อภิชญา ทองทับ. 2548. การผลิตกรดโคจิกจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

อรวรรณ เดหุสุขเจริญ. 2529. คุณสมบัติบางประการในการนำไปใช้ประโยชน์ของแป้งต่างๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อรรควุฒิ ทัศน์สองชั้น. 2526. เรื่องของแป้ง. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. บางเขน. กรุงเทพฯ.

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. Enzyme Microb. Technol. 19 : 545 – 550.

Ariff, A. B., and Webb, C. 1998. Effect of initial carbon and nitrogen source concentration on growth of *Aspergillus awamori* and glucoamylase production. Asia. Pac. J. Mol. Biol. Biotecnol. 6 : 161 – 169.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

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

Bassapa, S.C., Screenivasamurthy, V. and Parpia, H. A. B. 1970. Alflatoxin and kojic acid production by resting cell of *Aspergillus oryzae* Link. J. Gen. Microbiol. 61 : 81 – 86.

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

Burdock, G.A., Soni, M.G. and Carabin, I.G. 2001. Evalution of health aspect of kojic acid in food. Reg. Toxicol. Pharmacol. 33 : 80 – 101.

Challenger, Klein, F. L. and Walker, T. K. 1929. The production of kojic acid from Pentose by *Aspergillus oryzae*. J. Chem. Soc. 26 : 1498 – 1505.

Davis, D. 1962. Growth and kojic acid production by *Aspergillus flavus* growing on peanut oil. Economic Botany. 17 : 263-269.

Dubois, Gilles, K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and. related substances. Anal. Chem. 31: 350 - 356

Feng Du, X., Ying Xu, S. and Wang, Z. 2002. The morphology and Characterization of starch from Pueraria lobate. J. sci. and Technol.

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

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

Futamura, T., Okabe, M., Tamura, T., Toda, K., Matsunobu, T., and Park, Y.S. 2001b. Kojic acid production in an airlift bioreactor using partially hydrolyzed raw corn starch. J. Biosci. Bioeng. 92 : 360 – 365.

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

Kitada, M., Ueyama, H., Sazuki, E. and Fukubara, T. 1967. Studies on Kojic acid fementation. I. Cultural condition in submerged culture. J. Ferment. Technol. 45 : 1101 – 1107.

Korus, J., Juszozak, L., Witczak, M.and Achremowicz, B. 2004. Influence of selected hydrocolloids on triticale starch rheological properties. J. Sci. & technol.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kristiansen, B., Sinclair,C.G. 1979. Production of citric acid in continuous culture. Biotechnol and Bioeng. 21 : 297 - 315

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

Maurer, K. 1930. Formation of kojic acid. Ber. dt. Chem. Ges. 63 : 25

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.

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

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

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

Ogawa, A., Wakisaka, Y. ,Tanaka,T. ,Sakiyama,T. ,Nakanishi, K. 1995. Production of kojic acid by Membrane – Surface Liquid Culture of *Aspergillus oryzae* NRRL. 484. J. Ferment. Bioeng. 80(1) : 41 – 45.

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

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

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

Rosfarizan, M., Ariff, A. B., Hassan, M. A., Karim, M. I. A., 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.

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Yabuta, T. 1913. Kojic acid new organic acid formed by *Aspergillus oryzae*. Chem. Abstr. 7 : 2191 – 219

Yankasil, K.O., Demirel, G., Yasar, A. 2005. Influence of alcohol on citric acid production by *Aspergillus niger* A-9 entrapped in polyacrylamide gels. J. of Food eng. 70 : 518 - 522

Yahiro, K., Shibata, S., Jia, S., Park, Y.S. and Okabe, M. 1997 Effieient itaconic acid production from raw corn stach. J. ferment. Bioeng. 84 :375 – 377

Yin, P., Nichina, N., Kasakai, Y. , Yohiro, K. , Park, Y.S. and Okabe, M. 1997. Enhanced production of L(+) – lactic acid from corn stach in culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreceter. J. ferment. Bioeng. 84 : 249 - 253

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 อาหาร PDA (Potato Dextose Agar)

มันฝรั่ง (Potato)	200 กรัม
เด็กซ์โตรส (Dextose)	20 กรัม
วุ้น (Agar)	15 กรัม

หั่นมันฝรั่งเป็นก้อนขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มมันฝรั่งในน้ำกลั่นจนก้อนมันฝรั่งเริ่มนิ่ม จากนั้นกรองเอาแต่น้ำใสเติมน้ำตาลเด็กซ์โตรส และวุ้นละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที

ก.2 Starch medium สูตรของ Rosfarizan และคณะ (1998)

ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5 กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	1 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5 กรัม
แป้ง (Starch)	50 กรัม

เตรียมส่วนผสมทั้งหมดผสมลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ให้ความร้อนโดยให้แป้งสุกทั่วก่อน ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หากเตรียมเป็นอาหารแข็งให้เติมวุ้น (agar) ลงไป 20 กรัมต่อลิตร ละลายให้เข้ากันก่อนทำการนึ่งฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์

ข.1 การวิเคราะห์กรดโคจิก (Bently, 1957)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกและเหมาะสม โดยการใช้สารละลายเฟอริกคลอไรด์ทำปฏิกิริยากับสารประกอบแอลฟาไฮดรอกซิล (α - Hydroxyl) และสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ในกรดโคจิกให้สารละลายสีแดงเกิดขึ้น

สารเคมี

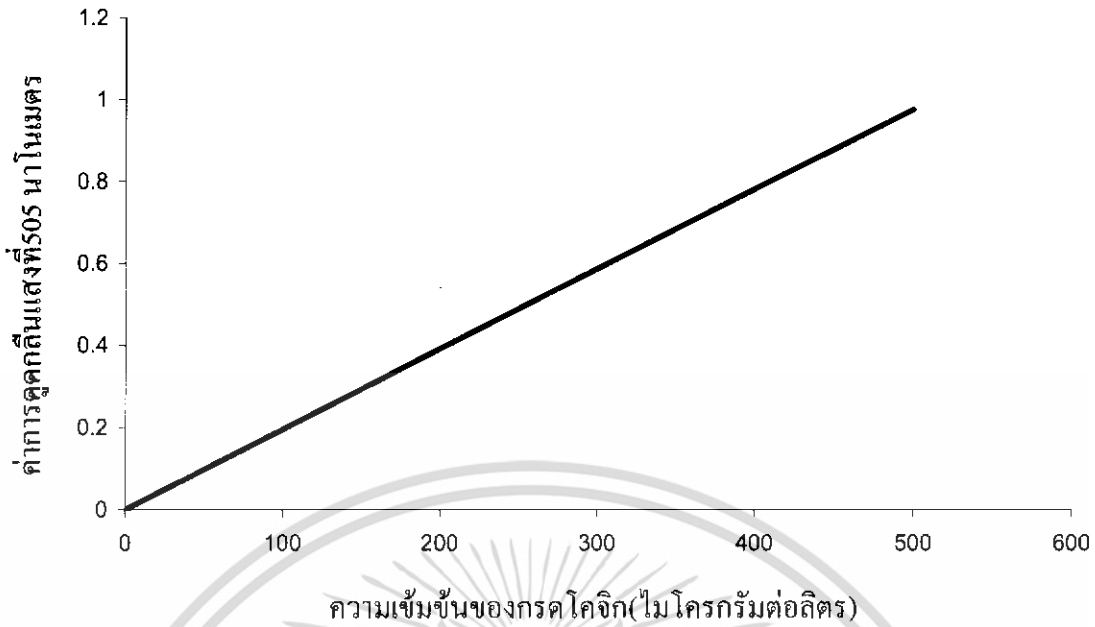
1. สารละลายเฟอริกคลอไรด์ ($FeCL_3 \cdot 6H_2O$) 1 %
เตรียมโดย ชั่ง $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 1 กรัม ละลายใน 0.1 N HCl และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วเก็บในขวดสีชา
2. สารละลายกรดโคจิกมาตรฐานของ Sigma
ทำโดยเตรียมสารละลายกรดโคจิกที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้คือ 50 100 150 200 250 300 350 400 450 และ 550 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. ดูดสารละลายตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ทำแบลงค์ (blank) ควบคู่กันไป ด้วยโดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างเป็นตัวเปรียบเทียบ
2. เติมสารละลายเฟอริกคลอไรด์ที่เตรียมไว้ลงไป 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับแบลงค์ ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร
4. ทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายกรดโคจิกมาตรฐานความเข้มข้น 50 – 550 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของกรดโคจิก
5. นำค่าการดูดกลืนแสง (A_{505}) ที่วัดได้จากตัวอย่างมาคำนวณหาปริมาณกรดโคจิกจากสูตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol – sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956) โดยใช้กรดเข้มข้นย่อยพอลิแซ็กคาไรด์เป็นโมเลกุลเดี่ยวซึ่งสามารถวัดปริมาณน้ำตาลได้ประมาณ 1 – 100 ไมโครกรัม และเป็นวิธีการที่รวดเร็วสามารถวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอย่างไม่เฉพาะเจาะจงโดยที่น้ำตาลนั้นอาจจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิวซ์หรือ neutral sugar ทั้งชนิดที่เป็นโมโนแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอลเข้มข้นร้อยละ 5

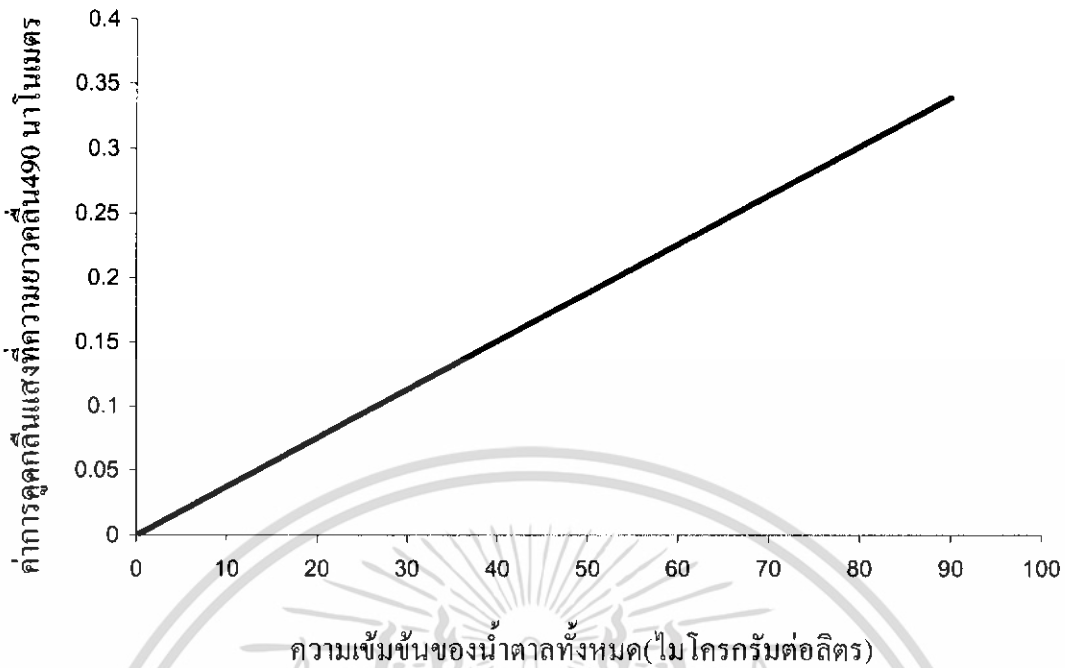
ละลายฟีนอล (C_6H_5OH) 5 กรัมด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น
3. สารละลายซูโครสมาตรฐาน

วิธีการ

1. นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายฟีนอลร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองในข้อ 1 ผสมให้เข้ากัน แล้วนำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำเย็น
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองในข้อ 2 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที
4. นำไปวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
5. ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นแทน และดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1 – 4
6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลทั้งหมด
7. นำสารละลายซูโครสความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 10 20 30 40 50 60 70 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาวิเคราะห์โดยดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1 – 4
8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ และความเข้มข้นของสารละลายซูโครส มาเขียนกราฟมาตรฐานของน้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโทส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้