สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

1,5,17

การผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1

นางสาว จันทนี สถิรสถาพร

นางสาว ปริยาภัทร แก้วภู่

วท.
จ 2467
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....83763
วัน,เดือน,ปี.....15 ก.ย. 2551

.b.....119 7753x.....
.i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kojic acid production by *Aspergillus* sp. BR1 on solid-state culture

Miss Janthanee Sathirasathaporn

Miss Pariyapat Kaewpu

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ	การผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1
นักศึกษา	นางสาว จันทนี สถิรสถาพร ชั้นปีที่ 4 รหัส 47050876
	นางสาว ปริยาภัทร แก้วภู่ ชั้นปีที่ 4 รหัส 47050885
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขา	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 ผศ. ลินจง สุขลำภู	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาค

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1
นักศึกษา นางสาว จันทนี สถิรสถาพร
นางสาว ปริยาภัทร แก้วภู่
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2550
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

Aspergillus sp. BR 1 เป็นราที่ผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน เลือกใช้ปลายข้าว ข้าวโพดบด รำข้าว และกากถั่วเหลือง เป็นสับสเตรทเพื่อผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็ง พบว่าเมื่อใช้ปลายข้าวและรำข้าวในอัตราส่วน 80:20 เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด อาหารแข็งที่เหมาะสมประกอบด้วย ปลายข้าว 8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) รำข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และสารละลายเกลือแร่ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^7 สปอร์ต่อกรัมอาหาร และอาหารมีความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลิตกรดโคจิกสูงสุด 3.10 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัม อัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 1.55 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Kojic acid production by *Aspergillus* sp. BR1 on solid state culture
Name	Miss Janthanee Sathirasathaporn
	Miss Pariyapat Kaewpu
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2007
Special Project Advisor	Assoc. Prof. Dr. Naunphan Naranong

Abstract

Aspergillus sp. BR1 was found to produce kojic acid in a medium containing cassava starch as carbon source. Broken rice, broken corn, rice bran and soybean meal were chosen as substrate in solid state fermentation for kojic acid production. The highest kojic acid concentration was obtained when broken rice and rice bran in the ratio of 80:20 were found to be suitable for carbon and nitrogen sources, respectively. The optimal solid medium containing 8 % (w/w) broken rice, 2 % (w/w) rice bran and 2 % (v/w) mineral salt solution. An initial spore concentration was 10^7 spores/g substrate with moisture content of 60 %. The maximum kojic acid was 3.10 g/100 g wet weight and the productivity of 1.55 g/ 100 g wet weight/day were produced on day 2 of cultivation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผู้ที่ให้คำแนะแนวทางในการค้นคว้าและจัดทำงานวิจัย รวมทั้งช่วยในการแก้ไขและตรวจทานโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ลินจง สุขลำภู ที่ได้ช่วยตรวจทานแก้ไขในการทำโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการทุกท่าน สำหรับการสอบวิชาโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือในการเบิกอุปกรณ์ สารเคมี และให้คำแนะนำวิธีการใช้เครื่องมือต่างๆในห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการที่ได้อำนวยความสะดวกในการดำเนินงาน พี่ๆปริญญาโท ที่ช่วยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในทุกๆด้าน

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจให้กัน

จันทนี สถิรสถาพร

ปริยาภัทร แก้วภู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ข

กิตติกรรมประกาศ ค

สารบัญ ง

สารบัญรูป ช

สารบัญตาราง ซ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ....1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ....2

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ....2

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ

2.1 กรดโคจิก (Kojic acid)....3

2.1.1 คุณสมบัติของกรดโคจิก....3

2.1.2 การสังเคราะห์กรดโคจิก....4

2.1.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก....6

2.1.4 ประโยชน์ของกรดโคจิก....12

2.1.5 เชื้อจุลินทรีย์....15

2.2 วิธีการผลิตกรดโคจิกโดยการหมักในอาหารเหลว....17

2.3 การผลิตสารต่างๆ โดยการหมักในอาหารแข็ง....18

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี....19

3.1.1 อุปกรณ์....19

3.1.2 วัตถุดิบ....20

3.1.2 สารเคมี....20

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์....20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2 วิธีการวิจัย.....20
3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ.....21
3.2.2 ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง.....21
3.2.3 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง.....21
3.2.4 ศึกษาปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง.....22
3.2.5 การสกัดกรดโคจิก.....22

3.3 การวิเคราะห์.....22
3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิก.....22
3.3.2 การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัตถุหมัก.....22
3.3.3 การนับจำนวนสปอร์.....22
3.3.4 การวิเคราะห์ค่าพีเอช.....22
3.3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....22

บทที่ 4 ผลการวิจัย
4.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง.....23
4.2 ผลการศึกษาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก.....29
4.3 ผลการศึกษาจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก.....34

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....39

บรรณานุกรม.....40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....44
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์.....45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก....3
รูปที่ 2 แสดงแผนภาพการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแลกโตน....4
รูปที่ 3 แสดงแผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus flavus*....5
รูปที่ 4 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าว และรำข้าวที่อัตราส่วน 80:20.... 24
รูปที่ 5 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอช ของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวโพดบด หยาบและรำข้าวที่อัตราส่วน 80:20.... 25
รูปที่ 6 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวโพด บดหยาบและกากถั่วเหลือง ที่อัตราส่วน 80:20....26
รูปที่ 7 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและ กากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 80:20....27
รูปที่ 8 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและ รำข้าวที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20....30
รูปที่ 9 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็ง ที่ใช้ปลายข้าวและ รำข้าวที่อัตราส่วน 70 ต่อ 30....31
รูปที่ 10 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็ง ที่ใช้ปลายข้าวและ รำข้าวที่อัตราส่วน 90 ต่อ 10....32
รูปที่ 11 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็ง ที่ใช้ปลายข้าวและ รำข้าวที่อัตราส่วน 80:20เมื่อจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ 10^7 35
รูปที่ 12 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็ง ที่ใช้ปลายข้าวและ รำข้าวที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20 เมื่อจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ 10^6 36
รูปที่ 13 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็ง ที่ใช้ปลายข้าวและ รำข้าวที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20 เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ 10^8 37
รูปที่14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (A_{505}) กับ ปริมาณความเข้มข้น ของกรดโคจิก....46
รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานกรดโคจิก....48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิก....7
ตารางที่ 2 แสดงแหล่งแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์....9
ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างจุลินทรีย์และความเข้มข้นของกรดโคจิกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์นั้นได้สมบูรณ์....14
ตารางที่ 4 แสดงเชื้อราที่ผลิตกรดโคจิก....16
ตารางที่ 5 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวโพดบดและรำข้าวที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20....24
ตารางที่ 6 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 80:20....25
ตารางที่ 7 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวโพดบดและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 80:20....26
ตารางที่ 8 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลือง ที่อัตราส่วน 80:20....27
ตารางที่ 9 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่างๆ กัน....28
ตารางที่10 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 70 ต่อ 30....30
ตารางที่11 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20....31
ตารางที่12 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 90 ต่อ 10....32
ตารางที่13 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอัตราส่วนอาหารแข็งต่างๆ กัน....33
ตารางที่14 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวเมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น10^7....35
ตารางที่15 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวเมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น10^6....36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

หน้า

ตารางที่16 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าว
เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^8 37
ตารางที่17 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ได้จากปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่างๆ กัน.....38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

กรดโคจิก (Kojic acid) มีชื่อทางเคมีว่า 5-hydoxy-2-hydroxymethyl-Y-pyrone เป็นสารทุติยภูมิ (Secondary metabolism) ของเชื้อรา *Aspergillus* ในหลายตระกูล ซึ่งตรวจพบครั้งแรก ในปี ปี ค.ศ.1907 โดย Saito ซึ่งสามารถแยกสารที่ลักษณะคล้ายกรด บีต้า-รีซอร์ซิลคาร์บอกซิลิก (β-resourcylcarbuxylic acid) ต่อมาในปี 1913 Yabuta พบว่าสารนั้นเป็นผลิตผลพลอยได้จากการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aspergillus oryzae* บนข้าวนึ่งในสภาพการหมักในอาหารแข็ง ปัจจุบันกรดโคจิกนั้นได้มีการนำกรดโคจิกมาใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง เช่น ด้านการแพทย์ ด้านอาหาร ด้านการเกษตร (Futamura และคณะ, 2001b) อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมฟอกหนัง และในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ที่ทำให้ผิวขาว และยังสามารถป้องกันแสงอัลตร้าไวโอเลตได้อีกด้วย (Ohyama และ Mishima, 1990)

เนื่องจากเชื้อรา *Aspergillus* spp. มีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกและเป็นเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหารหมัก (Bennett, 1985) โดยในการผลิตกรดโคจิกส่วนใหญ่เชื้อราพวก *Aspergillus* จะใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (Ogawa และคณะ, 1995) แต่เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาแพง นอกจากนี้ยังพบว่าราในสกุล *Aspergillus* spp. ผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่ย่อยแป้งเป็นน้ำตาลได้ การใช้แป้งที่ความเข้มข้นสูงๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวทำให้อาหารมีความหนืดสูง เชื้อราเจริญได้ช้า ถ้าเพาะเลี้ยงเชื้อราโดยใช้ผลผลิตจากการเกษตรที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ เช่น ถั่ว ข้าว ข้าวโพด ข้าวฝ่าง เป็นต้น มาเลี้ยงเชื้อราในสภาพอาหารแข็ง จะช่วยลดต้นทุนการผลิตและให้ผลผลิตกรดโคจิกสูง

สำหรับประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีการผลิตธัญญาพืชต่างๆ เป็นจำนวนมาก และมีราคาถูก ถ้านำมาใช้เป็นแหล่งอาหารของเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1 เพื่อผลิตกรดโคจิก เป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตผลทางการเกษตรให้สูงขึ้น ดังนั้นการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ปลายข้าว เมล็ดข้าวโพดบด กากถั่วเหลือง และรำข้าว มาเป็นวัตถุดิบในการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็ง เพื่อเป็นทางเลือกในการผลิตกรดโคจิกอีกทางหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งที่ใช้ผลผลิตทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ทำการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน คือ ปลายข้าว เมล็ดข้าวโพดบด และ แหล่งไนโตรเจน คือ รำข้าว กากถั่วเหลือง ที่เหมาะสมเพื่อผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการ เช่น อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุด
3. ศึกษาปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิกรดโคจิกโดยใช้สปอร์ที่ 10^6 10^7 10^8

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลิตกรดโคจิกโดยการหมักบนอาหารแข็งที่ใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนราคาถูก
2. ทราบสภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดโคจิกโดยการหมักบนอาหารแข็ง
3. เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ในการศึกษาการผลิตในอาหารแข็งต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

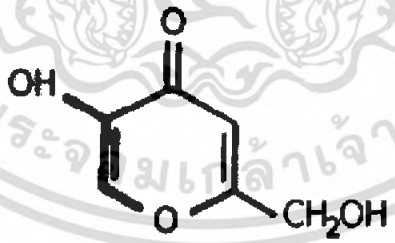
บทที่2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 กรดโคจิก (Kojic acid)

กรดโคจิก (Kojic acid) มีชื่อทางเคมีว่า 5 – hydoxy – 2 hydroxymethyl – γ – pyrone เป็นกรดอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการสร้างละสลายทุติยภูมิ (Secondary metabolite) การค้นพบกรดโคจิกมีรายงานครั้งแรกพบว่าผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ที่เจริญบนข้าวนึ่งโดย Saito (1907) ซึ่งเขาสามารถแยกผลึกสารที่ลักษณะคล้ายกรดบีต้า – รีซอร์ซิลคาร์บอกซิลิก (β – resourcylcarboxylic acid) หลังจากนั้นไม่นานได้ตรวจสอบสารนี้อย่างจริงจังแล้วตั้งชื่อว่า " กรดโคจิก " และกำหนดองค์ประกอบที่แน่นอนของกรดโคจิกในปี ค.ศ. 1924 (Yabuta, 1913) ตั้งแต่นั้นมามีการทดลองเกี่ยวกับการสังเคราะห์กรดโคจิกทางชีวภาพ และมีการตีพิมพ์เผยแพร่คุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพของกรดโคจิกออกมาเป็นจำนวนมาก (Bajpai และคณะ, 1982)

2.1.1 คุณสมบัติของกรดโคจิก

กรดโคจิกเป็นสารประกอบไพโรน (pyrone) ที่ขาดกลุ่มคาร์บอกซิล โมเลกุลของกรดโคจิกประกอบขึ้นด้วย คาร์บอน 6 ตัว ไฮโดรเจน 6 ตัว และออกซิเจน 4 ตัว ดังนั้นกรดโคจิกจึงมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_6H_6O_4$ (Bajpai และคณะ, 1982) ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของกรดโคจิก
ที่มา Bajpai และคณะ (1982)

Bently (1957) รายงานว่าผลจากการศึกษาทาง x – ray investigation ของกรดโคจิกบริสุทธิ์พบว่ามีลักษณะเป็นผลึกทรงปริทรึมรูปเข็ม ไม่มีสี ผลึกละลายได้ง่ายในน้ำ (3.95 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 20 องศาเซลเซียส) เอทานอลและอะซีโตน ละลายได้เล็กน้อยในอีเทอร์ เอทิลอะซิเตด

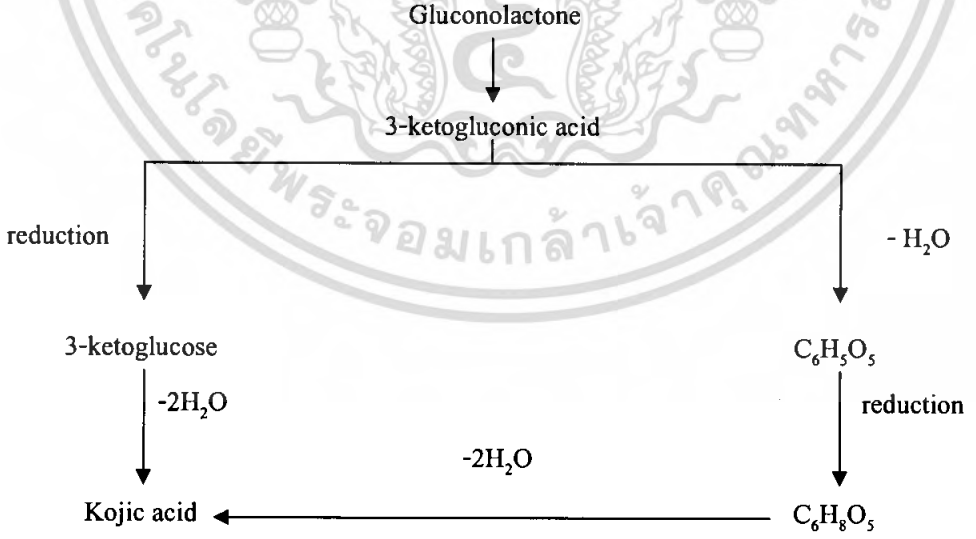
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คลอโรฟอร์มและไพริดีน และละลายยากมากในของเหลวชนิดอื่นๆ กรดโคจิกมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 142.11 และมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 153 – 154 องศาเซลเซียส การทำให้กรดโคจิกบริสุทธิ์ทำได้โดยการตกผลึกซ้ำในอะซีโตน เอทานอล – อีเทอร์ เมทานอล และเอทิลอะซีเตต หรือการทำให้บริสุทธิ์ภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 150 – 200 องศาเซลเซียส

2.1.2 การสังเคราะห์กรดโคจิก

กรดโคจิกมีโครงสร้างคล้ายกับสารโมโนแซคคาไรด์เนื่องจากสังเคราะห์ได้มาจากน้ำตาลกลูโคส (D - glucose) การสังเคราะห์เริ่มจากกลูโคสถูกออกซิไดซ์เป็นสารคีโตนิกอินเทอร์มิเดียต (ketonic intermideate) จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิกโดยการกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 2 โมเลกุล (Bajpai และคณะ, 1982)

Arnteins และ Bently (1953) รายงานว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นสารเริ่มต้นในการผลิตกรดโคจิกจากการเปลี่ยนกลูโคสเป็นสาร 3 – คีโตกลูโคส (3 - ketoglucose) โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น จากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็นกรดโคจิกโดยการกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 2 โมเลกุลนอกจากนี้ยังพบว่ากลูโคโนแลคโตน (gluconolactone) เป็นสารเริ่มต้นในกระบวนการผลิตกรดโคจิกได้โดยการเปลี่ยนไปเป็น3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทน (3-ketogluconic acid lactone) แล้วจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิก วิถีที่ 2 คือสาร 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโทนจะถูกกำจัดโมเลกุลของน้ำไป 1 โมเลกุล โดยการรีดักชันและเกิดการกำจัดโมเลกุลของน้ำอีก 1 โมเลกุลตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 2

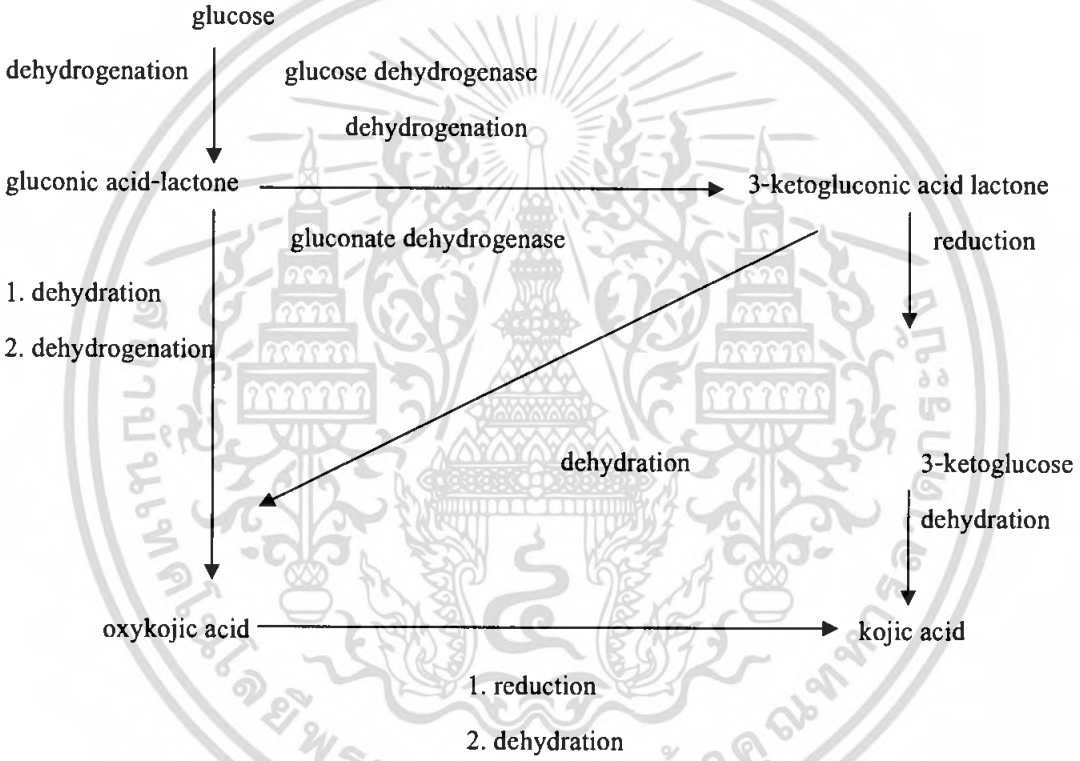


รูปที่ 2 แสดงแผนภาพการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแลกโตน

ที่มา : Arnteins และ Bently (1953)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bajpai และคณะ (1981) ได้ทำการศึกษาวิถีการสังเคราะห์กรดโคจิกเมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นจากเชื้อ *Aspergillus flavus* สายพันธุ์บี ซึ่งพบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างกระบวนการผลิตกรดโคจิกได้แก่ เฮกโซไคเนส (hexokinase) กลูโคส – 6 – ฟอสเฟตดีไฮไดรจีเนส (glucosephosphate dehydrogenase) 6 – ฟอสเฟตกลูโคเนต ดีไฮโดรจีเนส (6 – phosphategluconate dehydrogenase) กลูโคสออกซิเดส (glucoseoxidase) และกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส (gluconatedehydrogenase) เอนไซม์ดังกล่าวสัมพันธ์กับการสร้างการผลิตกรดโคจิกดังแสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงแผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus flavus*

ที่มา : Bajpai และคณะ (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก

2.1.3.1 แหล่งคาร์บอน

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

มีสารหลายชนิดสามารถใช้ในการสร้างกรดโคจิกซึ่งส่วนใหญ่ คือ กลูโคส ซูโครส ซิ-เตรต เอทานอล อะราบิโนส และไซโลส ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดโคจิก เป็นที่รู้กันดีว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตกรดโคจิกเนื่องจากมีความคล้ายคลึงของโครงสร้าง (Rosfarizan และคณะ, 1998)

กรดโคจิกสามารถผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนหลายชนิด โดยมีการศึกษาดังนี้

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 พบว่ามีการผลิตกรดโคจิก 7 – 10 กรัมต่อลิตร

May และคณะ (1931) ทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลเด็กซ์โทรสที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 10 15 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร ไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรท 1.125 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลเด็กซ์โทรส 20 เปอร์เซ็นต์ ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 48.2 เปอร์เซ็นต์ Bentley (1957) ได้นำสูตรอาหารดัดแปลงจาก Czapek – Dox liquid medium มาเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* เพื่อผลิตกรดโคจิกโดยมีน้ำตาลกลูโคส 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน พบว่ามีกรดโคจิกเกิดขึ้น 7 – 12 กรัมต่อลิตร

กรดโคจิกสามารถผลิตได้จากเชื้อรา และสามารถผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนหลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 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
	อินซูลิน,เพคติน,แป้ง

ที่มา : Bajpai และคณะ(1981)

Rosfarizan และคณะ(1998) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน จากการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยแป้งจากแหล่งต่างๆดังนี้ คือ ดอกไม้ อาหารหมัก ผลไม้ น้ำพุร้อนและดิน แต่พบว่าเชื้อที่แยกจากดอกไม้ morning glory flower ซึ่งเป็นไม้เถาชนิดหนึ่งตระกูลผักบุ้งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Bixa orellana* สามารถย่อยแป้งได้ดีที่สุด เมื่อทำการจัดจำแนกพบว่าเชื้อราหมายเลข S33-2 มีลักษณะเหมือนกับเชื้อ *Aspergillus flavus* จากนั้นนำมาเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารที่ประกอบด้วยยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่างๆกันคือ แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าวโพด แป้งสาคู ละน้ำตาลกลูโคส พบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวโพด 75 กรัมต่อลิตร ให้กรดโคจิก 12.1 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 16 และแป้งสาคู 50 กรัมต่อลิตร ให้กรดโคจิกต่ำสุดเท่ากับ 0.3 กรัมต่อลิตรจะเห็นได้ว่าเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus flavus* S33-2 สามารถผลิตกรดโคจิกได้เนื่องจากเชื้อมีการสร้างเอนไซม์แอลฟา – อะไมเลสและกลูโคอะไมเลสมาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป

2.1.3.2 แหล่งไนโตรเจน

ในการผลิตกรดโคจิกสามารถผลิตกรดโคจิกได้จากแหล่งไนโตรเจนหลายชนิด โดยมีการศึกษาดังนี้

ในการผลิตกกรดโคจิกแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมาจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัด และทริปโตน แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ เกลือแอมโมเนียมไนเทรต แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นต้น เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มีราคาสูง ดังนั้นจึงมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแทน จากการผลิตกรดโคจิกส่วนมากใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนหรืออาจมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์อื่น ในการผลิตกรดจากอาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapex – Dox liquid medium ซึ่งมีส่วนประกอบของยีสต์สกัดร้อยละ 0.1 และแอมโมเนียมไนเทรตร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งไนโตรเจน (Bently, 1957)

May และคณะ (1931) ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($(NH_4)_2HPO_4$) แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) และโซเดียมไนเทรต ($NANO_3$) ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.75 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเทรต 0.7 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดคือ 18.6 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเทรต 7 ระดับคือ 0.142 0.281 0.563 0.75 1.125 2.250 และ4.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเทรตเข้มข้น 0.563 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 30.2 เปอร์เซ็นต์

Ogawa และคณะ (1995) ทำ การศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนเมมเบรนหรือวิธี MSLC เปรียบเทียบกับการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า เมื่อใช้ยีสต์สกัดที่มีความเข้มข้นต่างกันดังนี้คือ 0.05 0.10 0.25 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเลี้ยงเชื้อราบนเมมเบรนให้กรดโคจิกสูงสุด 29 มิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 10 จากการเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้น 0.05 – 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในอาหารที่มียีสต์สกัด 1.0 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 20.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 12

Futamura และคณะ (2001a) ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* MK107-39 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันคือ เมล็ดฝ้ายบด กลูเทน ถั่วเหลืองบด จมูกข้าวสาลี และเมล็ดทานตะวัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน พบว่าเมื่อใช้จมูกข้าวสาลี 7 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 30 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังแปรผันความเข้มข้นของจมูกข้าวสาลีที่ทำการศึกษาอยู่ระหว่าง 0 – 3.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้น 1.3 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลได้ของกรดโคจิกสูงสุด

2.1.3.3 แหล่งแร่ธาตุ

แร่ธาตุที่มีความสำคัญที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในรูปสารอินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิก ได้แก่ แมกนีเซียม (Mg) ฟอสฟอรัส (P) โพแทสเซียม (K) ซัลเฟอร์ (S) แคลเซียม (Ca) และคลอรีน (Cl) นอกจากนี้ยังมีโคบอล (Co) คอปเปอร์ (Cu) เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) โมลิบดินัม (Mo) และสังกะสี (Zn) และแร่ธาตุที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในรูปสารอนินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิก ดังแสดงในตารางที่ 4 (Stanbury และคณะ, 1995)

ตารางที่ 2 แสดงแหล่งแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์

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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Tadera และคณะ (1985) ได้ศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวที่มีการเสริมแร่ธาตุคือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) แมกนีเวียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) และเฟอริกคลอไรด์($FeCl_3$)ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 17.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 14

Kwak และ Rhee (1992 a) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีการเสริมแร่ธาตุพวกไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSo_4.7H_2O$) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSo_4.7H_2O$) และซิงก์ซัลเฟต ($ZnSO_4.7H_2O$) พบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกสูงสุด 3.8 กรัมตอลิตรต่อวัน ต่อมาได้ทำการผลิตกรดโคจิกจากการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเสริมแร่ธาตุพวกไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และเฟอรัลซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) พบว่าได้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Ogawa และคณะ, 1995)

2.1.3.4 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกนั้น ต้องทำการทดลองจึงจะทราบว่าสายพันธุ์ใดต้องการเท่าใด ซึ่งปกติความเป็นกรดด่างนั้นมีค่าอยู่ในช่วงประมาณ 2 – 5 โดย Katagiri และ Kitahara (1933) รายงานว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา *Aspergillus oryzae* คือ 5.0 แต่ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 2.4 และยังมีรายงานอีกว่าค่าความเป็นกรดด่างที่ 5.5 เป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราด้วยน้ำตาลซูโครส (Tamiya, 1928)

Barham และ Smith (1936) ได้พบว่าช่วงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลไซโลสโดยรา *Aspergillus flavus* คือ 2.0 - 3.5 ซึ่งจะเห็นว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดยราจะมีค่าต่ำ ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเติมสารบัฟเฟอร์ เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง

สุกัญญา (2541) ได้ทำการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 จากน้ำมะพร้าว ซึ่งจะพบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 4.7

วรรณี (2546) จากการศึกษาพบว่าช่วงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการในการผลิตกรดโคจิกจากน้ำอ้อยโดยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* NRRL 484 คือ 4.4 – 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.5 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกด้วยรา *Aspergillus flavus* อยู่ในช่วงประมาณ 29 – 35 องศาเซลเซียส (May และคณะ, 1931) ส่วนอุณหภูมิในช่วง 29 – 35 องศาเซลเซียสจะเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* (Katagiri และ Kitahara, 1933) ซึ่งจากรายงานการทดลองหลายการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 30 องศาเซลเซียส (รพี, 2539; May และคณะ, 1931; Bajpai และคณะ, 1982; Kwak และ Rhee, 1992a; Ogawa และคณะ, 1995)

2.1.3.6 ปริมาณออกซิเจน

ความต้องการออกซิเจนในกระบวนการผลิตก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญซึ่งจำเป็นต้องพิจารณา เนื่องจากการผลิตกรดโคจิกโดยราเป็นกระบวนการหมักแบบใช้อากาศ โดยในปีค.ศ.1931 May และคณะ ทดลองผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่า และแปรผันอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในช่วง 0.22:1 ถึง 1:1 พบว่าค่าอัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 0.5:1

Kwak และ Rhee (1992 b) ได้ทำการผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่า พบว่าถ้าใช้ขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร ควรใส่ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 120 มิลลิลิตร และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จะมีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

Ariff และคณะ (1996) ได้ทำการผลิตกรดโคจิกจากรา *Aspergillus flavus* ในอาหารที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อนาที จะมีความเหมาะสมในการผลิตกรดโคจิก

สุกัญญา (2541) ทำการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 จากน้ำมะพร้าว โดยทำการเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีสภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้ความเร็วในการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.5 วีวีเอ็ม

ณัฐลดา และคณะ (2548) ทำการผลิตกรดโคจิกจากแป้งโดยเชื้อ *Aspergillus sp.* BR1 โดยทำการเลี้ยงเชื้อราในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร ที่มีอัตราการกวนของใบพัด 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 ประโยชน์ของกรดโคจิก

2.1.4.1 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

กรดโคจิกจะช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์มาเกี่ยวข้อง เช่น เมื่อมีผักและผลไม้มีรอยตำหนิเสียหายซึ่งเกิดจากรอยช้ำ รอยปอก หั่น แช่แข็งหรือเป็นโรค ส่วนของเนื้อเยื่อที่มีตำนิมีเอนไซม์อยู่เมื่อถูกอากาศจะเกิดเป็นสีน้ำตาลขึ้น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีน้ำตาลในผักผลไม้เป็นกลุ่มของเอนไซม์ซึ่งเรียกชื่อรวมว่าฟีนอลเลส (phenolase) ในประเทศญี่ปุ่นมีการใช้กรดโคจิก กรดแอสคอร์บิก และกรดซิตริกเพื่อยับยั้งเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (Polyphenoloxidase : PPO) ในเห็ด มันฝรั่ง และแอปเปิ้ล (Wei และคณะ, 1991)

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

2.1.4.2 ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

กรดโคจิกใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ซึ่งทำหน้าที่ขัดผิวหรือทำให้ผิวขาวขึ้น(whitening) และสามารถป้องกันแสงอัตราไวโอเลตจากแสงแดด (Ohyama และ mishima, 1990) ต่อมาได้มีการศึกษาการใช้กรดโคจิกในผลิตภัณฑ์รักษาผิว (skin care products) โดยใช้กรดโคจิกร้อยละ 1 เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ ทำหน้าที่เป็นตัวเปลี่ยนเม็ดสีผิว (skin - depigmenting) ทำให้ผิวขาวขึ้น ในทางการค้ามีก่รนำกรดโคจิกมาใช้ในผลิตภัณฑ์รักษาผิวตั้งแต่ปี 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

2.1.4.3 ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง

กรดโคจิกมีคุณสมบัติคล้ายแทนนิน (tannin) ซึ่งมีอยู่ทั่งไปในพืชและส่วนใหญ่เป็นพืชพวกไกลโคไซด์ (glycosides) มีมากในเปลือกต้น โอ๊คและฝาง มีความสามารถในการฟอกหนังสัตว์ได้ โดยทำหน้าที่ในการตกตะกอนโปรตีนและแอลคาลอยด์ (Bajpai และคณะ, 1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4.4 เป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

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

2.1.4.5 ทางอุตสาหกรรมเคมี

ใช้กรดโคจิกเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารต่างๆ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมพลาสติก เนื่องจากกรดโคจิกจะทำให้พลาสติกมีความยืดหยุ่นดี (Crueger และ Crueger, 1990) และยังใช้กรดโคจิกเป็นส่วนผสมในสีย้อมของบริษัท Wako Pure Chemical Industry Ltd. (Kouno และ Suzuki, 1994)

2.1.4.6 ทางการแพทย์

กรดโคจิกสามารถช่วยลดระดับของแอคทีฟออกซิเจนหรืออนุมูลอิสระที่เป็นพิษกับเนื้อเยื่อของร่างกาย ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) อนุมูลอิสระของซุปเปอร์ออกไซด์ (O_2) และอนุมูลอิสระของไฮดรอกไซด์ (OH) ซึ่งกรดโคจิกจะไปช่วยลดความเป็นพิษของอนุมูลอิสระจนไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อในร่างกาย (Niwa และ Akamatsu, 1991)

กรดโคจิกจะช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์และสัตว์ ซึ่งกรดโคจิกจะช่วยให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ (Neutrophills) มีการสะสมของแคลเซียมอิออน (Ca^{++}) มากขึ้นทำให้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้ดีขึ้น (Niwa และ Akamastsu, 1991)

ได้มีการใช้อนุพันธ์ของกรดโคจิกบางชนิด เช่น 5-เมทธอกซี-2-ไฮดรอกซีเมทธิล-แกมมาไพโรน และ 5-เมทธอกซี-2-เมทธอกซีมทธิล-แกมมาไพโรน เพื่อนำมาใช้ทำเป็นยาชาเฉพาะที่ (Armit และ Nolan, 1931; Bhat และ Hadi, 1994)

กรดโคจิกสามารถช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคไขข้ออักเสบและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เนื่องจากอนุพันธ์ของกรดโคจิกพวกอะไซลอกซี-4-ไพโรน สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวโทรฟิลล์ลาสเทส (Neutrophills elastase) ในร่างกายมนุษย์ ซึ่งเอนไซม์นี้จะไปกระตุ้นการสร้างสารที่เป็นปัจจัยในการก่อให้เกิดโรคไขข้ออักเสบ (Rheumatoid arthritis)และทำให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์เม็ดเลือดในร่างกาย (Masateru และ Shone, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การนำกรดโคจิกมาใช้แทนฮอร์โมนอินซูลินเพื่อรักษาโรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน และโรคอ้วนโดย Caravan และคณะ (1995) ได้รายงานว่ากรดโคจิกและมอลทอล สามารถใช้เป็นลิแกนด์ (Ligand) ที่จะไปติดกับสารในกลุ่มออกโซวานาเดียมคีเลต (Oxovanadium IV chelates) เพื่อใช้แทนฮอร์โมนอินซูลินได้

กรดโคจิกสามารถใช้เป็นสารปฏิชีวนะ โดย Yabuta (1913) ได้มีการรายงานว่ากรดโคจิก ปริมาณร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคเรียแกรมบวกได้ และในปีต่อมาได้มีการค้นพบว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งการสังเคราะห์กรดแอสคอร์บิก(ascorbic acid) หรือวิตามินซีในสัตว์ทดลอง ทำให้หลอดเลือดเปราะและเกิดโรคลักปิดลักเปิด(scurvy) เพราะไม่มีเอนไซม์กลูโคโนแล็กโทนออกซิเดส (L-gluconolactoneoxidase) ที่ใช้ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแอสคอร์บิก (Bajpaiและคณะ, 1982)

ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างจุลินทรีย์และความเข้มข้นของกรดโคจิกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์นั้นได้สมบูรณ์

จุลินทรีย์	ความเข้มข้นของกรดโคจิกที่ยับยั้งจุลินทรีย์ได้สมบูรณ์ (น้ำหนักกรดต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ)
Alcaligenes faecalis	1 : 500
Bacillus anthracis	1 : 500 – 1 : 1,000
Bacillus subtilis	> 1 : 500
Brucella abortus	1 : 4,000
Brucell melitensis	1 : 2,000
Clostridium cotulinum	1 : 500 – 1 : 1,000
Klebsiella pneumoniae	1 : 500 – 1 : 1,000
Leptospira canicola	1 : 1,000,000
Leptospira icterochemorrhagiae	1 : 100,000
Micrococcus roseus	1 : 500
Pasteurella pestis	1 : 4,000

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงในตารางนี้เป็นเพียงค่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของกรดโคจิกเท่านั้น ซึ่งมิได้ระบุอย่างชัดเจนว่าเป็น Bactericidal หรือ Bacteriostatic

ที่มา : (Morton และคณะ, 1945)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4.7 ด้านการเกษตร

กรดโคจิกสามารถยับยั้งโรคพืชจากเชื้อรา (Fungal diseases of plants) หลายชนิดโดยอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนของกรดโคจิกกับโลหะหนักที่มีอิเล็คทรอนวงนอกเป็นสอง (Bivalent heavy metals) เช่น Cu^{2+}, Hg^{2+}, Cd^{2+}, Pd^{2+} และ Sn^{2+} (Kane and Morey, 1949) นอกจากนี้กรดโคจิกยังสามารถกระตุ้นการทำงานของยาฆ่าแมลงในกลุ่มที่มีนิโคติน (Nicotine insecticides) เป็นองค์ประกอบที่ใช้ต่อต้านหนอนฟัก (*Diaphania hyalinata* L.) และหนอนกระทู้ (*Prodenia eriania* Cram.) (Mayer และคณะ, 1947)

อนุพันธ์กรดอะมิโนและเปปไทด์ (Peptide) ของกรดโคจิก เช่น คาร์โบเบนซอกซี-อะลานีน-โคเจต, คาร์โบเบนซอกซี-ลูซีน-อะลานีน-โคเจต และคาร์โบเบนซอกซี-ฟีนิลอะลานีน-ไกลซีน-โคเจต สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคพืช เช่น *Pythium graminicola, Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* ซึ่งก่อโรคต้นอ่อนไหม้ (Seeding blight) โรคเหี่ยวจากฟูซาเรียม (Fusarium wilt) และใบไหม้ (Sheath blight) ตามลำดับ (Kayahara และคณะ, 1990) และมีรายงานว่ากรดโคจิกและอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดเมื่อใช้ร่วมกับยาฆ่าแมลงในกลุ่มไพรีทรอยด์ หรือคาร์บาเมต จะทำให้ได้สารประกอบที่มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าแมลง (Dowd, 1990) ทำให้สามารถลดปริมาณการใช้สารฆ่าแมลงทั้งสองกลุ่มลงได้ โดยยังคงประสิทธิภาพเท่าเดิม ทำให้พบสารฆ่าแมลงตกค้างในธรรมชาติน้อยลง สำหรับกรดโคจิกนั้นสามารถสลายได้ในธรรมชาติ

2.1.5 เชื้อจุลินทรีย์

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

Bajpai และคณะ (1982) รายงานว่ากรดโคจิกเริ่มผลิตครั้งแรกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* จากนั้นได้ศึกษาการผลิตจากเชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ต่างๆดังนี้ *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*

Tadere และคณะ (1985) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อราสกุล *Aspergillus* สายพันธุ์ *A. oryzae* KA. *A. oryzae* IAM 2024 *A. oryzae* IFO 5239 *A. flavus* IAM 2001 และ *A. tamarii* IFO 4099 พบว่า *A. flavus* IAM 2001 สามารถผลิตกรดโคจิกได้มากที่สุดเท่ากับ 17.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เปปโตน 6 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร และไซคาซิน 2 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 4.5

Kwak และ Rhee (1992 b) ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต กับการเพาะเลี้ยงเส้นใยโดยตรงในอาหารเหลว พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบตรึงเซลล์สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงเส้นใยราโดยตรงในอาหารเหลว โดยการเพาะเลี้ยงแบบตรึงเซลล์จะผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 22 วัน ขณะที่การเพาะเลี้ยง เส้นใยราโดยตรงในอาหารเหลวผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 25 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน

Futamura และคณะ (2001 a) ได้มีการนำเชื้อ *Aspergillus oryzae* ATCC 22788 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้ N-Methyl-N-nitoro-N-nitrosoguanidine พบว่าเชื้อกลายพันธุ์ *A. oryzae* สายพันธุ์ MK 107-39 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 28 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์แบบเขย่าที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้กรดโคจิกสูงกว่าสายพันธุ์เดิม 7.7 เท่า

ตารางที่ 4 แสดงเชื้อราที่ผลิตกรดโคจิก

เชื้อจุลินทรีย์ (organism)	อ้างอิง
Aspergillus oryzae (19 isolate)	Manabe และคณะ 1984
A. paraciticus SRRC 162 mutant	Anasari and Shivasta 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 และคระ 1976
A. paraciticus (UNBF A12)	EI – Khadm และคณะ 1976
A. flavus	Kharchenko และคณะ 1993; Moubasher และคณะ 1997
A. fumigatus	Kharchenko และคณะ 1993; Moubasher และคณะ 1997
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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 วิธีการผลิตกรดโคจิกโดยการหมักในอาหารเหลว

สุกัญญา (2541) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในน้ำมะพร้าวโดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอาหารสูตรดัดแปลงที่เหมาะสมที่สุดประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 175 กรัม แอมโมเนียมไนเทรต (NH_4NO_3) 2 กรัม ยีสต์สกัด (yeast extract) 1 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 1 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.25 กรัม และน้ำมะพร้าว 1 ลิตร ทำการเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่าให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 34 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 และทำการศึกษาในถังหมักแบบแบชให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 37 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 เมื่อทำการเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีสภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้ความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.5 วีวีเอ็ม จากนั้นทำการแยกกรดโคจิกจากน้ำหมักพบว่าผลิตผลที่ได้หลังจากการสกัดคิดเป็นร้อยละ 60.2

วรรณี (2546) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 เมื่อใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกประกอบด้วยน้ำอ้อย 1 ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 โดยทำการผลิตกรดโคจิกในฟลาสก์เขย่าจะได้กรดโคจิก 24.32 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการผลิตจำเพาะเท่ากับ 0.07 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตกรดโคจิก 1.87 กรัมต่อลิตร.วัน และผลได้ของกรดโคจิกจากน้ำตาลเท่ากับ 0.36 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตรพบว่าผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดเท่ากับ 45.15 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ที่ความเร็วของการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.11 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตกรดโคจิก 4.10 กรัมต่อลิตร.วัน และผลได้ของกรดโคจิกจากน้ำตาลเท่ากับ 0.57 กรัมกรดโคจิกต่อกรัมน้ำตาล

ณัฐลดา และคณะ (2548) ได้ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 พบว่าเชื้อราให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งข้าวโพดและเปปโตน สำหรับสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกประกอบด้วย แป้งข้าวโพด 50 กรัมต่อลิตร เปปโตน 4 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 1 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร โดยผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 14 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 3.46 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อนำเชื้อรามาเลี้ยงในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารเดียวกันในสภาวะที่มีอัตราการกวนของใบพัด 400 รอบต่อนาที และอัตรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

83763

2.3 การผลิตสารต่างๆ โดยการหมักในอาหารแข็ง

สมศิริ และคณะ (2539) ได้ทำการศึกษาการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากกากเปลือกส้มโดยกระบวนการหมักในอาหารแข็งเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยใช้กากส้มที่ผ่านการบดและอบแห้งแล้วเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อรา 2 ชนิด คือ *Aspergillus niger* และ *Penicillium* sp. พบว่า *Aspergillus niger* สามารถผลิตโปรตีนเซลล์เดียวได้มากกว่า *Penicillium* sp. คือผลิตโปรตีนได้ 6 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *Penicillium* sp. ผลิตโปรตีนได้เพียง 4.4 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของอาหารที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวของ *Aspergillus niger* คือ กากส้ม : KH_2PO_4 : ยูเรีย ในอัตราส่วน 100: 1.4 : 0.4 ซึ่งจะให้ค่าโปรตีนเซลล์เดียว 8.05 เปอร์เซ็นต์

ทวีสิริ (2540) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus usamii* TISTR 3258 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วยจมูกข้าวสาลีเป็นสับสเตรทเนื้อสกัดร้อยละ 1 แอมโมเนียมไนเทรตร้อยละ 0.3 และสารลดแรงตึงผิว (SDS) ร้อยละ 0.1 ปรับพีเอชและความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 และร้อยละ 70 ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus usamii* TISTR 3258 ในระดับฟลาสก์พบว่าเชื้อจะให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 75.29 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ในวันที่ 2 ของการหมัก สำหรับการเพาะเลี้ยงในถาด พบว่าเชื้อจะให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 85.51 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ในวันที่ 2 ของการหมัก

Shankar และ Mulimani (2006) ได้ทำการเปรียบเทียบการผลิต α-galactosidase โดยใช้ส่วนเหลือจากพืชเรดแกรมกับรำข้าวสาลี และสับสเตรทในท้องถิ่นที่หาได้อื่นโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* ภายใต้การหมักด้วยอาหารแข็ง พบว่าเมื่อใช้ส่วนเหลือจากพืชเรดแกรมกับรำข้าวสาลี ในอัตราส่วน1:1 (โดยน้ำหนัก) ทำการปรับความชื้นเริ่มต้นในอัตราส่วน 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และปรับพีเอชเริ่มต้น 5.5 จากนั้นทำการเติมกล้าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร (1×10^6 สปอร์) แล้วทำการบ่มเป็นเวลา 4 วัน จะให้ค่าความเข้มข้นของ α-galactosidase เท่ากับ 3.4 หน่วยต่อกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) ; New Burnwick Scientific
2. รุ่น INNOVA 4230
3. ตู้อบลมร้อน (Hot air owen) ; Memmert รุ่น Model 600
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Contrifuge) ; Sanyoรุ่น Falcon 6/300
5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ; Shimazu รุ่น UV – 1601
6. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ; Shimazu รุ่น Libror EB-4000H
7. เครื่องชั่งละเอียด 3 ตำแหน่ง ; Sartorius analytic รุ่น A200S
8. เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) ; vortex Genie 2 รุ่น G-560E
9. เครื่องวัดความเป็นกรด- ด่าง (pH meter) ; Denver Instrument รุ่น 215
10. ตู้เขี่ยเชื้อ (Larminar air flow) ; ISSCO Laminar air flow รุ่น BVT 123
11. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave) ; รุ่น Hydroclave MC 10
12. ชุดกรองสุญญากาศ ; Millipore Bedford รุ่น MA 01730
13. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) ; Olympus รุ่น CHS
14. โถดูดความชื้น
15. ไมโครปิเปต (Micropipette) ; Labsystem รุ่น A85810
16. หลอดหมุนเหวี่ยงขนาด 10 มิลลิลิตร
17. แผ่นนับเลือด (Haemacytometer) ; Boeco รุ่น Neubauer BrightLine
18. บีกเกอร์ขนาด 100, 500 มิลลิลิตร
19. ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
20. หลอดทดลอง
21. แท่งแก้ว
22. กระดาษกรอง
23. ผ้าขาวบาง
24. ถ้วยหาความชื้น (moisture can)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 วัตถุดิบ

1. ปลายข้าว
2. ข้าวโพดบด
3. รำข้าว
4. กากถั่วเหลือง

3.1.2 สารเคมี

1. กรดโคจิก ; Sigma
2. ทวีน 80 ; Labchem
3. อาหาร PDA
4. เฟอริกคลอไรด์ ; Unilab
5. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)
6. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl_2)
7. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ เชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บนอาหารวุ้นเอียง PDA ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 4 เดือน

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 ในอาหาร PDA ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน จนเชื้อราสร้างสปอร์ เติมน้ำกลั่นที่ผสมทวีน 80 (0.05 เปอร์เซ็นต์)ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีสปอร์ราเจริญอยู่บนอาหาร PDA ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ใช้ช้อนสแตนเลสขูดสปอร์ออกให้หลุดจากเส้นใยต้องทำในสภาวะที่ปลอดเชื้อ กรองสารละลายสปอร์ด้วยสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นดูดสารละลายสปอร์มาตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วยเฮมาไซโตมิเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง

อาหารแข็งสำหรับผลิตกรดโคจิก ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ในอัตราส่วน 80:20 โดยแบ่งออกเป็น 4 สูตร คือ ปลายข้าวและรำข้าว ปลายข้าวและกากถั่วเหลือง ข้าวโพดบดและรำข้าว ข้าวโพดบดและกากถั่วเหลือง นำอาหารแต่ละสูตรมาผสมกับสารละลายแร่ธาตุที่ประกอบด้วยแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลไรด์ (KCl_2) ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะทำการเติมสารละลายแร่ธาตุปริมาณ 2 มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 กรัม ลงในอาหารแต่ละสูตรทำการผสมให้เข้ากัน และทำการปรับความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นทำการแบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรในปริมาณฟลาสก์ละ 10 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นเติมสารละลายสปอร์ลงไปโดยให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อหาปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็ง

3.2.3 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง

นำแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.2 มาทำการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งที่มีอัตราส่วน 70:30 80:20 90:10 ทำการเติมสารละลายแร่ธาตุปริมาณ 2 มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 กรัม ลงในอาหารแข็งที่อัตราส่วนต่างๆทำการผสมให้เข้ากัน และทำการปรับความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นทำการแบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในปริมาณฟลาสก์ละ 10 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการเติมสปอร์ลงไปซึ่งจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ใช้เท่ากับ 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อหาปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็ง

3.2.4 ศึกษาปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง

ทำการนำแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.2 และอัตราส่วนที่เหมาะสมจากข้อ 3.2.3 มาทำการเติมปริมาณสปอร์เริ่มต้น 10^6 10^7 10^8 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อหาปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.5 การสกัดกรดโคจิก

นำอาหารแข็งมา 10 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ผสมทวีน 80 (0.05 เปอร์เซ็นต์) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปกรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกเอาสารละลายและอาหารแข็งออกจากกัน แล้วนำอาหารแข็งที่ได้ไปสกัดซ้ำจนกระทั้งกรดโคจิกถูกสกัดออกหมด หลังจากนั้นก็นำสารละลายที่แยกได้ทั้งหมดมารวมกัน แล้วนำไปวิเคราะห์หากรดโคจิก (ภาคผนวก ข.1)

3.3 การวิเคราะห์

3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิก (ภาคผนวก ข.1)
3.3.2 การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัตถุหมัก (ภาคผนวก ข.2)
3.3.3 การนับจำนวนสปอร์ (ภาคผนวก ข.3)
3.3.4 การวิเคราะห์ค่าพีเอช (ภาคผนวก ข.4)
3.3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ (ภาคผนวก ข.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง

ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่างๆกัน คือ ข้าวโพดบดและรำข้าว ปลายข้าวและรำข้าว ข้าวโพดบดและกากถั่วเหลือง ปลายข้าวและกากถั่วเหลือง

ในการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งที่นำปลายข้าวผสมกับรำข้าวในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม ที่ความชื้นเริ่มต้น60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 3.10 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัม ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง โดยอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 1.55 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน และมีค่าพีเอช 4.4 จากนั้นการผลิตกรดโคจิกจะเริ่มลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ซึ่งค่าพีเอชของการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 4.4 - 6.2 (ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 4)

เมื่อนำข้าวโพดบดผสมกับรำข้าวในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม ที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ผลิตกรดโคจิก 2.54 กรัมต่ออาหาร 100 กรัม ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง โดยอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 1.29 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน และมีค่าพีเอช 4.3 จากนั้นการผลิตกรดโคจิกจะเริ่มลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ซึ่งค่าพีเอชของการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 4.3 - 5.8 (ดังแสดงในตารางที่ 6 และรูปที่ 5)

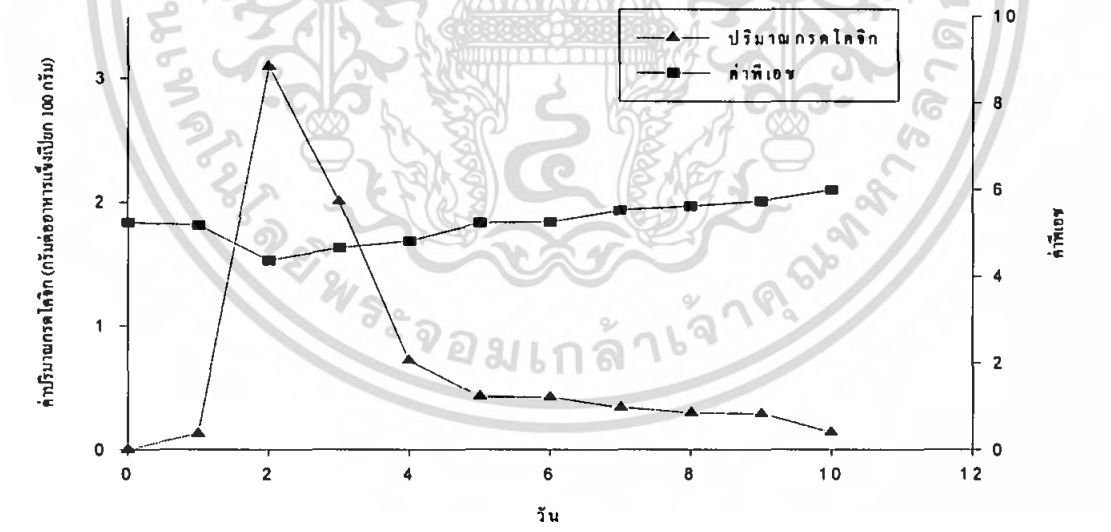
จากการศึกษาผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งที่นำข้าวโพดบดผสมกับกากถั่วเหลืองในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม ที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ผลิตกรดโคจิก 1.57 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 0.52 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน และมีค่าพีเอช 4.2 จากนั้นการผลิตกรดโคจิกจะเริ่มลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ซึ่งค่าพีเอชของการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 4.2 - 5.3 (ดังแสดงในตารางที่ 7 และรูปที่ 6)

การผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งโดยนำปลายข้าวมาผสมกับกากถั่วเหลืองในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม ที่ความชื้นเริ่มต้น60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ผลิตกรดโคจิก 1.54 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัม ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง โดยอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 0.22 กรัมต่ออาหาร 100 กรัมต่อวัน และมีค่าพีเอช 3.5 จากนั้นการผลิตกรดโคจิกจะเริ่มลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ซึ่งค่าพีเอชของการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 3.5 – 4.7 (ดังแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 80:20

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด - ด่างของอาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่ออาหารแข็งเปียก 100 กรัม)
0	5.3	0.00
1	5.2	0.13
2	4.4	3.10
3	4.7	2.00
4	4.8	0.72
5	5.2	0.43
6	5.3	0.43
7	5.4	0.34
8	5.6	0.30
9	5.7	0.29
10	6.0	0.14

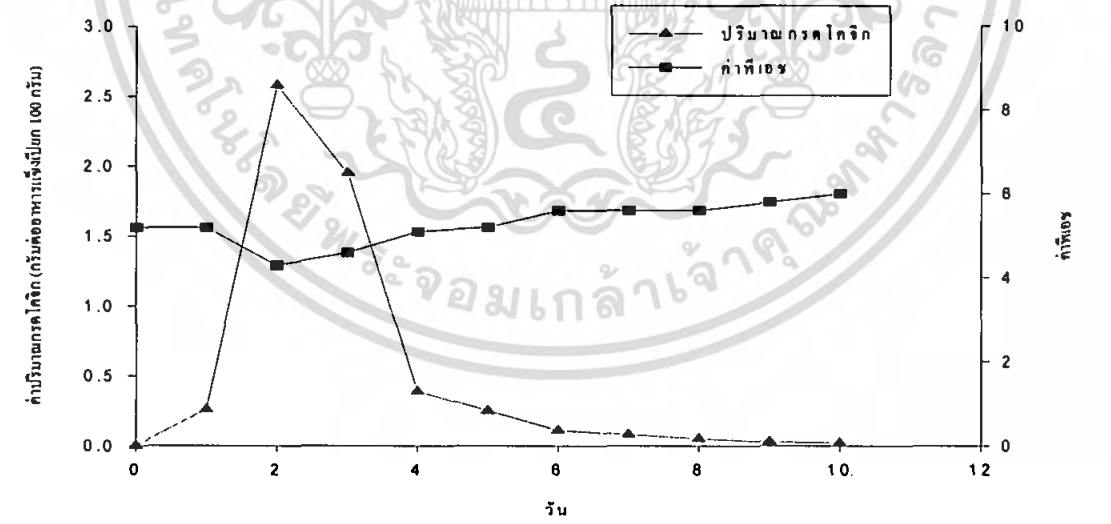


รูปที่ 4 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 80:20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวโพดบดและรำข้าวที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด - ด่างของอาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่ออาหารแข็งเปียก 100 กรัม)
0	5.2	0.00
1	5.2	0.26
2	4.3	2.58
3	4.6	1.95
4	5.1	0.39
5	5.2	0.25
6	5.6	0.11
7	5.6	0.08
8	5.6	0.05
9	5.8	0.03
10	6.0	0.02

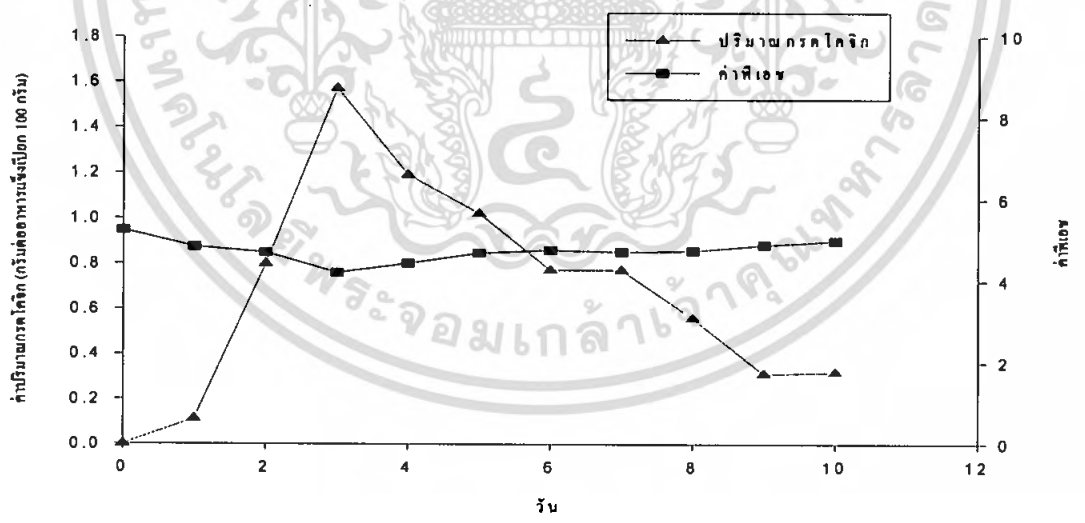


รูปที่ 5 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวโพดบดและรำข้าวที่อัตราส่วน 80:20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวโพดบดและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 80:20

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด - ด่างของอาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่ออาหารแข็งเปียก 100 กรัม)
0	5.3	0.00
1	4.9	0.11
2	4.7	0.80
3	4.2	1.57
4	4.5	1.19
5	4.6	1.02
6	4.8	0.77
7	4.7	0.77
8	4.8	0.56
9	4.9	0.31
10	5.0	0.32

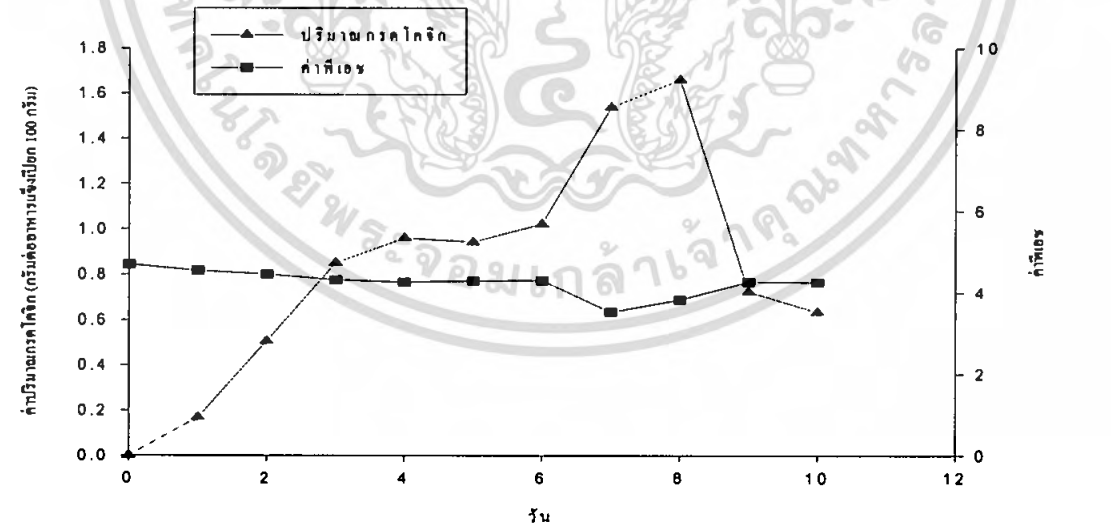


รูปที่ 6 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวโพดบดและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 80:20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 80:20 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด - ด่างของอาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก(กรัมต่ออาหารแข็งเปียก 100 กรัม)
0	4.7	0.00
1	4.5	0.17
2	4.7	0.51
3	4.3	0.85
4	4.3	0.96
5	4.3	0.94
6	4.3	1.02
7	3.5	1.54
8	3.8	1.17
9	4.3	0.72
10	4.5	0.64



รูปที่ 7 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและกากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 80:20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่างๆ กัน

สูตรอาหาร	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่ออาหารแข็งเปียก 100 กรัม)
ปลายข้าวหอมมะลิต่อกากถั่วเหลือง	1.5400[c]
ข้าวโพดบดต่อกากถั่วเหลือง	1.5700[c]
ข้าวโพดบดต่อรำข้าว	2.5400[b]
ปลายข้าวหอมมะลิต่อรำข้าว	3.1000[a]

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05
ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 9 เป็นผลจากการคำนวณค่าทางสถิติโดยแสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันซึ่งปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้มีความแตกต่างกันโดยมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่นที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05

ผลการศึกษาจากการศึกษาการผลิตกรดโคจิกของ *Aspergillus* sp. BR1 โดยเพาะเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันคือ เมล็ดข้าวโพดบดและรำข้าว ปลายข้าวและรำข้าว เมล็ดข้าวโพดบดและกากถั่วเหลือง ปลายข้าวและรำข้าว พบว่าอาหารแข็งที่นำปลายข้าวผสมกับรำข้าวสามารถผลิตกรดได้สูงที่สุดคือ คือ 3.10 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมซึ่งมีอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 1.55 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน เนื่องจากปลายข้าวทำให้เกิดช่องว่างระหว่างอาหารแข็งซึ่งมีผลให้การเจริญของเส้นใยเชื้อราสามารถเจริญแทรกเข้าไปในอาหารได้อย่างทั่วถึง จึงทำให้เชื้อรามีอากาศพอเพียงต่อการเจริญได้ดี นอกจากนี้ปลายข้าวยังมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแป้งซึ่งประกอบด้วย อะไมโลแพคติน อะไมโลส เป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่าอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวผสมกับรำข้าวให้ผลผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุด มาศึกษาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสม คือ ที่ 70 ต่อ 30, 80 ต่อ 20, 90 ต่อ 10

ในการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งที่นำปลายข้าวผสมกับรำข้าวในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม ที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 3.10 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัม ซึ่งอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 1.55 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวันในวันที่ 2 และมีค่าพีเอช 4.4 จากนั้นการผลิตกรดโคจิกจะเริ่มลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง และค่าพีเอชของการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 4.4 - 6.2 (ดังแสดงในตารางที่ 10 และรูปที่ 8)

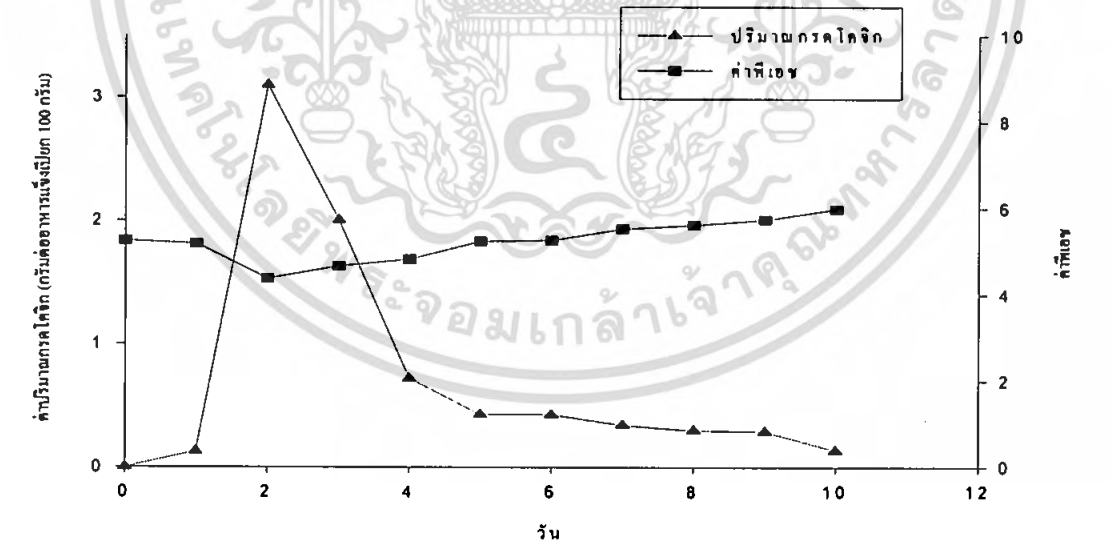
จากการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งที่นำปลายข้าวผสมกับรำข้าวในอัตราส่วน 70 ต่อ 30 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่ออาหารแข็งเปียก 1 กรัม ที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ผลิตกรดโคจิกได้ 1.13 กรัมต่ออาหารน้ำหนัก 100 กรัมในวันที่ 3 ซึ่งอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 0.38 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน และมีค่าพีเอช 4.2 จากนั้นการผลิตกรดโคจิกจะเริ่มลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง และค่าพีเอชของการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 4.1 - 5.6 (ดังแสดงในตารางที่ 11 และรูปที่ 9)

และทำการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งโดยการนำปลายข้าวผสมกับรำข้าวในอัตราส่วน 90 ต่อ 10 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม ที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ผลิตกรดโคจิก 1.27 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมในวันที่ 5 ซึ่งอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 0.25 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน และมีค่าพีเอช 4.3 จากนั้นการผลิตกรดโคจิกจะเริ่มลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง และค่าพีเอชของการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 3.9 – 5.8 (ดังแสดงในตารางที่ 12 และรูปที่ 10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด - ด่างของอาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก(กรัมต่ออาหารแข็งเปียก 100 กรัม)
0	5.3	0.00
1	5.2	0.13
2	4.4	3.10
3	4.7	2.00
4	4.8	0.72
5	5.2	0.43
6	5.3	0.43
7	5.4	0.34
8	5.6	0.30
9	5.7	0.29
10	6.0	0.14

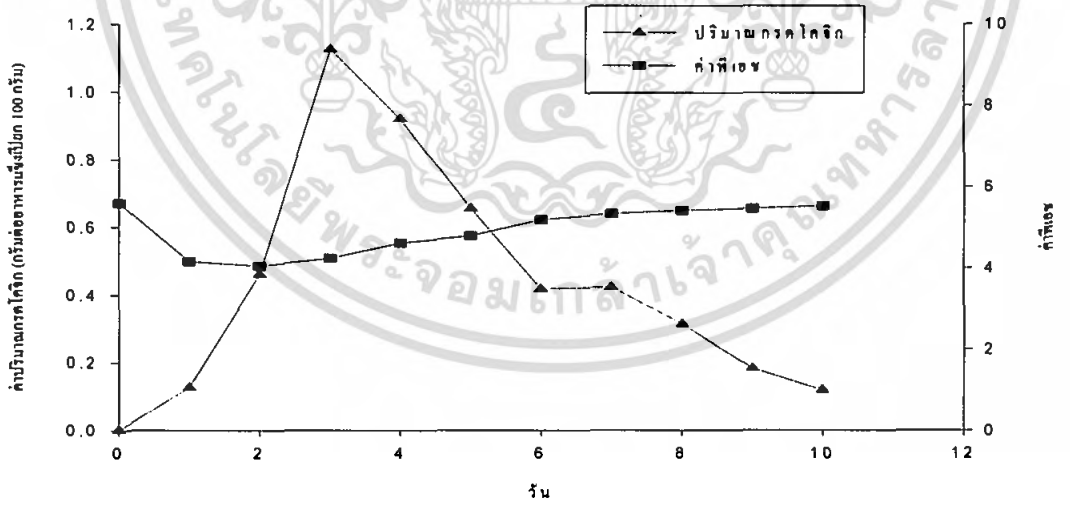


รูปที่ 8 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 70 ต่อ 30

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด - ด่างของอาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก(กรัมต่ออาหารแข็งเปียก 100 กรัม)
0	5.6	0.00
1	4.2	0.13
2	4.1	0.46
3	4.2	1.13
4	4.6	0.92
5	4.8	0.65
6	5.2	0.42
7	5.3	0.42
8	5.4	0.31
9	5.5	0.18
10	5.5	0.12

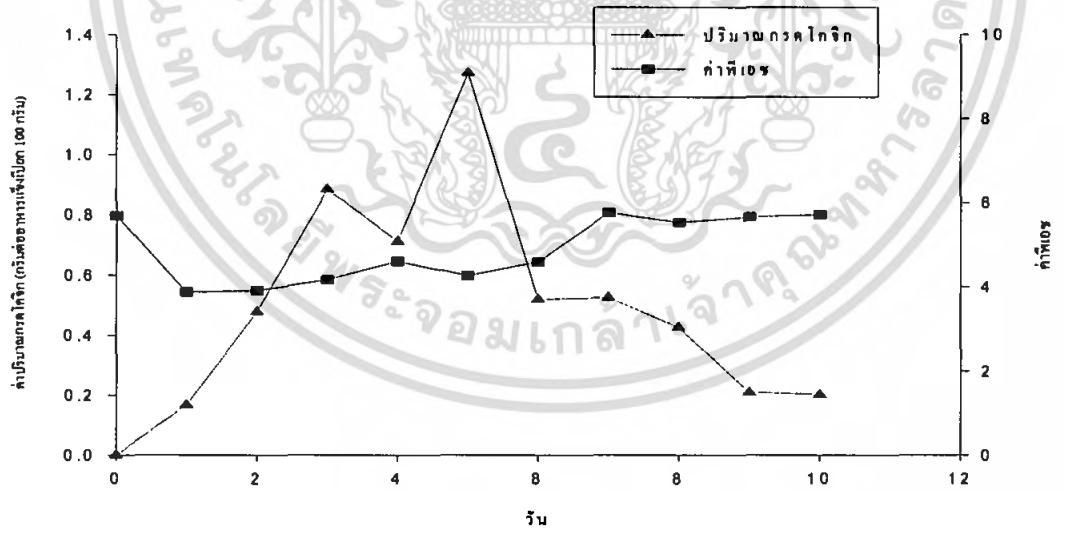


รูปที่ 9 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 70 ต่อ 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 90 ต่อ 10

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด - ด่างของอาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก(กรัมต่ออาหารแข็งเปียก 100 กรัม)
0	5.7	0.00
1	3.9	1.17
2	3.9	0.48
3	4.2	0.88
4	4.6	0.71
5	4.3	1.27
6	4.6	0.52
7	5.8	0.52
8	5.5	0.43
9	5.7	0.21
10	5.7	0.20



รูปที่ 10 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 90 ต่อ 10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 13 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอัตราส่วนอาหารแข็งต่างๆ กัน

อัตราส่วนอาหารแข็ง (ปลายข้าวต่อรำข้าว)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่ออาหารแข็งเปียก 100 กรัม)
70:30	1.1250[b]
90:10	1.2700[b]
80:20	3.1000[a]

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05
ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 13 เป็นผลจากการคำนวณค่าทางสถิติโดยแสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีอัตราส่วนที่แตกต่างกันซึ่งปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้มีความแตกต่างกันโดยมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่นที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05

ผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกของ *Aspergillus* sp. BR1 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง ที่นำปลายข้าวผสมกับรำข้าว มาทำการผสมในอัตราส่วนต่างๆกันคือที่อัตราส่วน 70 ต่อ 30, 80 ต่อ 20, 90 ต่อ 10 ซึ่งเพาะเลี้ยงที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ และใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ 10^7สปอร์ต่ออาหารแข็งเปียก 1 กรัม เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน พบว่าเมื่อใช้ปลายข้าวผสมกับรำข้าว มาทำการผสมในอัตราส่วน 80:20 สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุด คือ 3.10 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัม เนื่องจาก เชื้อรา มีเอนไซม์อะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งได้ดี ปลายข้าวจึงถูกย่อยเพื่อนำไปใช้ในการเจริญของเส้นใยเชื้อรา นอกจากนี้อัตราส่วนที่ 80 : 20 นี้มีสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อราที่สภาวะการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

จากการศึกษาอัตราส่วนของคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจึงได้นำอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวผสมกับรำข้าวที่มีอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ซึ่งสามารถผลิตกรดได้สูงที่สุดมาศึกษาจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกัน คือที่ 10^6, 10^7, 10^8

ผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งที่นำปลายข้าวผสมกับรำข้าวในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม ที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุด 3.10 กรัมต่ออาหารแข็งเปียก 100 กรัมในวันที่ 2 ซึ่งอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 1.55 กรัมต่ออาหารแข็งเปียก 100 กรัมต่อวัน และมีค่าพีเอช 4.4 จากนั้นการผลิตกรดโคจิกจะเริ่มลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง และค่าพีเอชของการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 4.4 - 6.0 (ดังแสดงในตารางที่ 14 และรูปที่ 11)

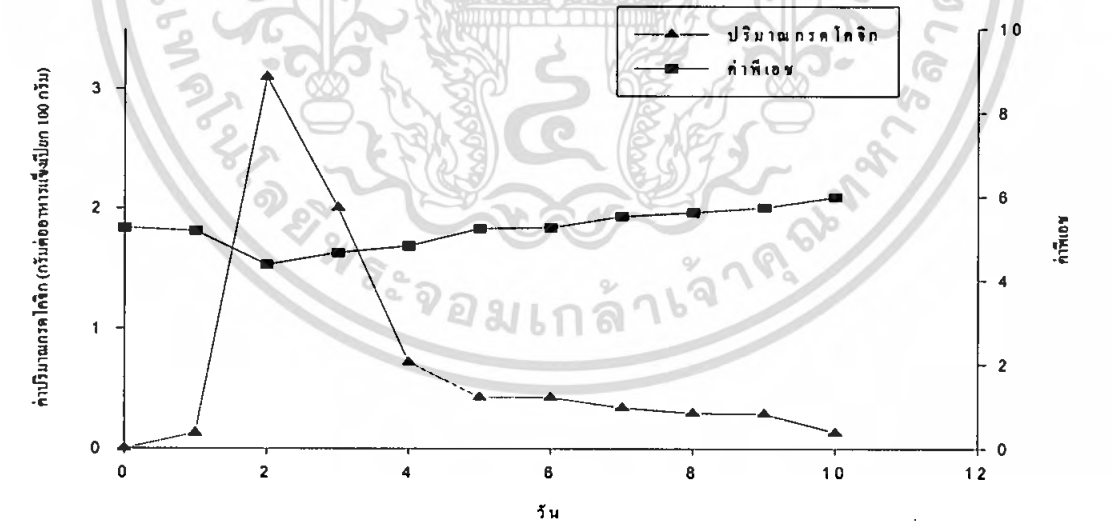
เมื่อนำปลายข้าวผสมกับรำข้าวมาใช้ในการผลิตกรดโคจิก ซึ่งใช้อัตราส่วน 80 ต่อ 20 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^6 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม ที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 1.68 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัม ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 0.56 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน และมีค่าพีเอช 4.0 จากนั้นการผลิตกรดโคจิกจะเริ่มลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการเพาะลี้ยง ซึ่งค่าพีเอชของการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 4.0 – 5.3 (ดังแสดงในตารางที่ 15 และรูปที่ 12)

ในการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งที่นำปลายข้าวผสมกับรำข้าวในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^8 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัมที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ผลิตกรดโคจิก 1.37 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมในวันที่ 2 มีค่าพีเอช 4.0 ซึ่งอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 0.69 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน จากนั้นการผลิตกรดโคจิกจะเริ่มลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง และค่าพีเอชของการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 3.7-5.4 (ดังแสดงในตารางที่ 16 และรูปที่ 13)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าว เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด ด่างของอาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก(กรัมต่ออาหารแข็งเปียก 100 กรัม)
0	5.3	0.00
1	5.2	0.13
2	4.4	3.10
3	4.7	2.00
4	4.8	0.72
5	5.2	0.43
6	5.3	0.43
7	5.4	0.34
8	5.6	0.30
9	5.7	0.29
10	6.0	0.14

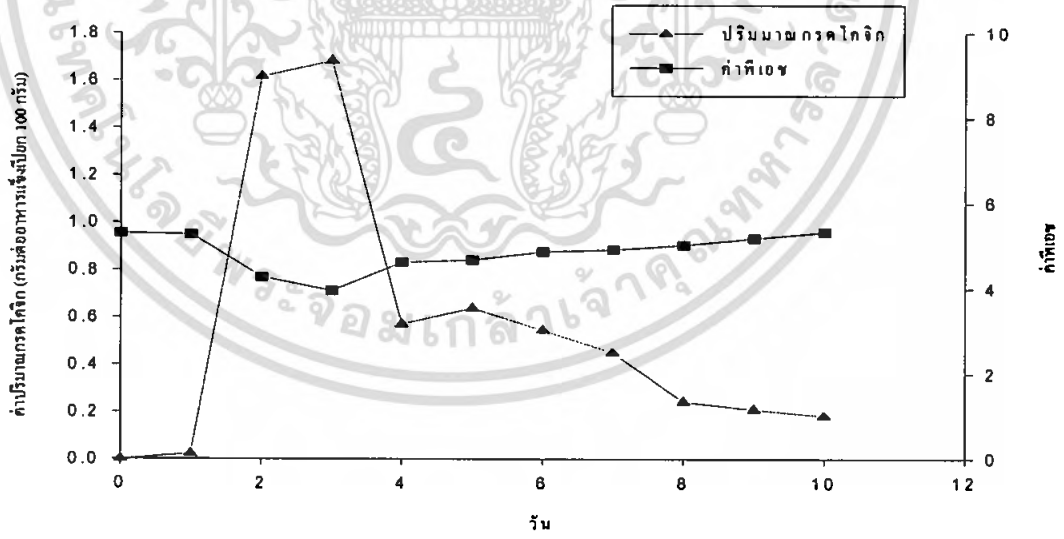


รูปที่ 11 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20 เมื่อจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ 10^7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 15 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าว เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^6

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด ด่างของอาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก(กรัมต่ออาหารแข็งเปียก 100 กรัม)
0	5.3	0.00
1	5.3	0.02
2	4.4	1.62
3	4.0	1.68
4	4.6	0.57
5	4.7	0.64
6	4.9	0.54
7	4.9	0.45
8	5.0	0.24
9	5.2	0.21
10	5.3	0.18

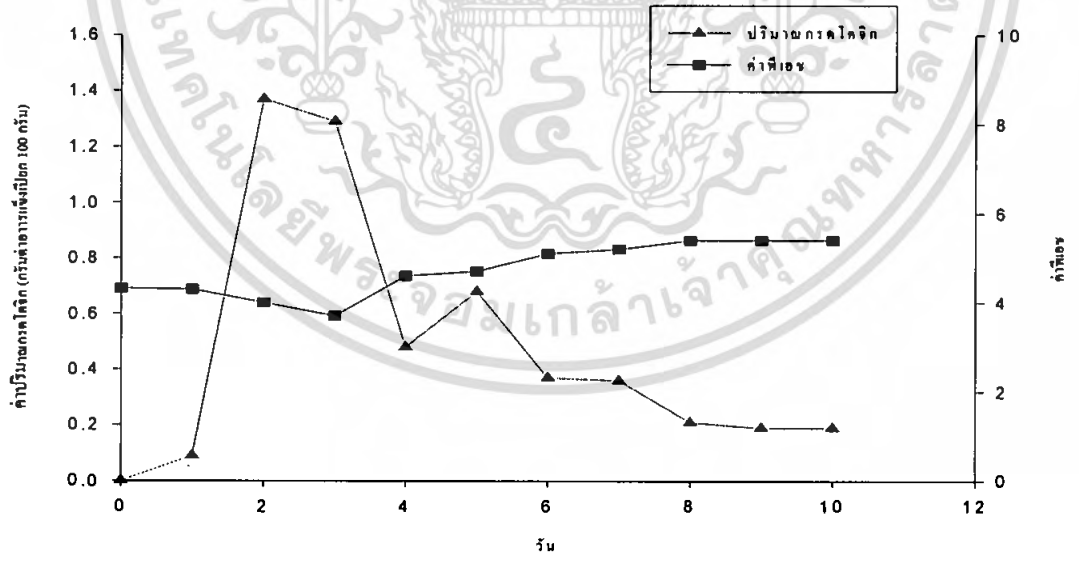


รูปที่ 12 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20 เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ 10^6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 16 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวเมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^8

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด ด่างของอาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก(กรัมต่ออาหารแข็งเปียก 100 กรัม)
0	4.3	0.00
1	4.3	0.09
2	4.0	1.37
3	3.7	1.29
4	4.6	0.48
5	4.7	0.68
6	5.1	0.37
7	5.2	0.36
8	5.4	0.21
9	5.4	0.19
10	5.4	0.19



รูปที่ 13 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20 เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ 10^8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

การผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus* sp. BR 1 โดยใช้อาหารแข็งจากแหล่งคาร์บอน 2 ชนิดคือ ปลายข้าว ข้าวโพดบด และแหล่งไนโตรเจนคือ รำข้าว กากถั่วเหลือง พบว่าอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกประกอบด้วย ปลายข้าวกับรำข้าวเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิก ทำการศึกษาจำนวนสปอร์เริ่มต้น โดยใช้ปริมาณสปอร์ตั้งแต่ 10^6-10^8 ที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งคือ 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม เมื่อศึกษาอัตราส่วนของปลายข้าวกับรำข้าวในอัตราส่วน 70:30 80:20 และ 90:10 พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมเมื่อใช้ปลายข้าวกับรำข้าว 80:20 โดยเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR1 จะผลิตกรดโคจิกได้มากที่สุดเท่ากับ 3.10 กรัมต่ออาหารเปียก 100 กรัม คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 1.55 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ที่พีเอช 4.4

ข้อเสนอแนะ

1. ควรใช้วัสดุทางการเกษตรชนิดอื่นหรือของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมมาผสมเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมและราคาถูก
2. ควรทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งเพิ่มเติม เช่น พีเอชเริ่มต้น ความชื้นเริ่มต้น และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กิตติศักดิ์ แซ่จิว แคทลียา เสนีย์วงศ์ ณ. อยุธยา และทัศนีย์ พินิจขจรเดชา. 2537. ผลิตกรดจิบเบอเรลลิกด้วยการหมักในอาหารแข็งโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi*, ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ ฯ

ทวีสิริ มาลาพันธุ์. 2546. ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus usamii* TISTR 3258 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

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

ดวงพร คันธโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. กรุงเทพ ฯ : โอเดียนสโตร์.

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

รพี โรจนอุไร. 2539. ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในระดับขวดเขย่า. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วรรณี สุวรรณเวช. 2546. การผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุกัญญา สายธิ. 2541. การผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 จากน้ำมะพร้าว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สมศิริ นัยนาภากรณ์, สุกัญญา เจริญศิริชัยกุล และอรทัย เถลิงเกียรติลีลา. 2530. การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากกากเปลือกส้มโดยกระบวนการหมักในอาหารแข็งเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

Armit, J. W. and Nolan, T.J. 1931. Derivatives of kojic acid. Journal of the Chemical Society Part II : 3023 - 3031.

Arnteins, H.R.V. and R. Bentley. 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.

Barham, H. N. and Smith, B. L. 1936. Production of kojic acid from xylose by *Aspergillus flavus*. Industrial and Engineering Chemistry 28 : 567 - 570. Cited in Beelik, A. 1956. Kojic acid. Advances in Carbohydrate Chemistry 11 : 145 – 183.

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

Bennett, J.W. 1985. Taxonomy of fungi and biology of the Aspergilli. California : Cummings Publishing.

Bhat, R. and Hadi, S. M. 1994. Photoinactivation of bacteriophage lambda by kojic acid and Fe(III): role of oxygen radical intermediateds in the reaction. Biochemistry and Molecular Biology International 32(4) : 731 - 735.

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

Crueger, W. and Crueger, A. 1990. Organic acid. In T. D. Brock (ed.). Biotechnology : A textbook of industrial microbiology. 2nd ed. p. 148. Sunderland: Sinauer Associates.

Dowd, P. F. 1990. Kojic acid and esters as insecticide synergists. U.S. Patent, 4,956,353.

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 product of kojic acid by a mutant strain *Aspergillus oryzae* MK 107 –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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kane, W. C. O. and Morey, G. H. 1949. Fungicidal compositions. U.S. Plant, 2,460,188. Chemical Abstracts 24 : 3813-3814.

Katagiri, H. and Kitahara, K. 1933. Formation of kojic acid by *Aspergillus oryzae*. Memoirs of the College Agriculture Kyoto University No. 26 (1933) : 1-29. Chemical Abstracts 27 : 3235-3236.

Kayahara, H., Ohashi, A., Tadasa, K. and Kato, S. 1990. N-protected tripeptide inhibitors of angiotensin converting enzyme. Agricultural and Biological Chemistry 54(5) : 1325-6.

Kouno, N. and Suzuki, J. 1994. Acid dye staining method. JPX Patent. 5,284560.

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

Kwak, M.Y. and J.S. Rhee. 1992 b. Cultivation characteristics of immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production. Biotech. Bioeng. 39 : 903 – 906.

Masateru, M. and Shone, E. L. 1989. Aralkoxy and aryloxyalkoxy kojic acid derivatives. US Patent. 4,644,071.

May, O. E., Moyer, A. J., Wells, P. A. and Herrick, H. T. 1931. The production of kojic acid by *Aspergillus flavus*. Journal of the American Chemical Society 53(1) : 774-782.

Mayer, E. L., Talley, F. B. and Woodword, C. F. 1947. Nicotine insecticides II: Search for activators. Bureau Entomological plant Quarantine E-709, 1946 : 1-16. Chemical Abstracts 41 : 2528 - 2529.

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

Morton, H. E., Kocholaty, W., Kocholaty, R. J. and Kelner, A 1945. Toxicity and antibiotic activity of kojic acid produced by *Aspergillus luteo-virescens*. Journal of Bacteriology 50 : 579-584.

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

Niwa, Y. and Akamastsu, H. 1991. Kojic acid scavenges free radicals while potentiating leukocyte functions including free radical generation. Inflammation 15(4) : 303-315.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 17 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ได้จากปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่างๆ กัน

ปริมาณสปอร์เริ่มต้น	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่ออาหารแข็งเปียก 100 กรัม)
10^8	1.3700[b]
10^6	1.6850[b]
10^7	3.1000[a]

กำหนดให้ ตัวอักษรต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05
ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ
ที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05

หมายเหตุ ตัวอักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 14 เป็นผลจากการคำนวณค่าทางสถิติโดยแสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้โดยใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกันซึ่งปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้มีความแตกต่างกันโดยมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่นที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05

ผลการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* sp. BR 1 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่นำปลายข้าวผสมกับรำข้าว ที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20 ซึ่งเพาะเลี้ยงที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเพาะเลี้ยงที่ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม สามารถให้การผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุด คือ 3.10 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัม เนื่องจากจำนวนสปอร์เหมาะสมกับปริมาณอาหาร ส่วนจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ 10^8 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม จำนวนสปอร์มากเกินไปทำให้อาหารที่มีจำกัดไม่เพียงพอกับการเจริญเติบโตของเซลล์จึง ทำให้เซลล์สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสลดลง จึงมีผลต่อการย่อยปลายข้าว ทำให้ปริมาณการผลิตกรดโคจิกลดลง และที่จำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ 10^6 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม มีปริมาณน้อยกว่าที่ 10^7สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัมจึงผลิตกรดโคจิกได้น้อยกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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.

Shankar, S.K. and Mulimani, V.H. 2007. α- Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. Bioresource Technology. 98 : 958.

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

Tadere, K., F. Yahi and A. Kobayashi. 1985. Effects of cycasin on kojic acid – producing molds. Agricultural and Biological Chemistry. 49 (1) : 203 – 205.

Tamiya, I. H. 1928. Metabolism of *Aspergillus oryzae* I. Acta Phytochim 3 (1927) : 51-173. Chemical Abstract 22 : 1990.

Townsed, G.E. and Lindgren, A.A. 1953. Viable Yeast Cound. Cytologia 18 : 183.

Uchino, K., Nagawa, M.,Tonosaki, Y., Oda, M. and Fukuchi, A. 1988. Kojic acid as an antispeck agent. Agricultural and Biological Chemistry.52(10) : 2609-2610.

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. agent. Agricultural and Biological Chemistry.52(10) : 2609-2610.

Yabuta, T. 1913. Kojic acid new organic acid formed by *Aspergillus oryzae*. Chemical Abstract. 7 : 2191 – 2192.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 อาหาร PDA (Potato Dextrose Agar)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDA 39 กรัม ซึ่งประกอบด้วย

(เด็กซ์โตรส) Dextose	20	กรัม
(ผงวุ้น) Agar Powder	15	กรัม
(มันฝรั่ง) Potato	200	กรัม

นำมันฝรั่งมาปลอกเปลือก หั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋าขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มในน้ำกลั่น ปริมาณ 1000 มิลลิลิตรต้มจนมันฝรั่งนิ่มเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาน้ำใส เติมน้ำตาลเด็กซ์โตรส และผงวุ้นที่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วลงไป ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์

ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิก ตามวิธีของ Bentley (1957)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกตามวิธีของ Bentley (1957) โดยการใช้สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ทำปฏิกิริยากับสารประกอบแอลฟาไฮดรอกซิล (α-Hydroxyl) และสารประกอบฟีนอลิก (Phenolic compounds) ในกรดโคจิกจะให้สารละลายสีแดงเกิดขึ้น

สารเคมี

1. สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์

ทำการละลายสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ($FeCl_3.6H_2O$) 1 กรัมด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์แมล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายกรดโคจิกมาตรฐาน

ทำการชั่งกรดโคจิกปริมาณ 0.05 กรัม จากนั้นนำมาทำการละลายในน้ำกลั่นและทำการปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานกรดโคจิกที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองในข้อ 1 ผสมสารให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 นาที

3. นำไปวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร

4. ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นแทน และดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1-3

5. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดโคจิก

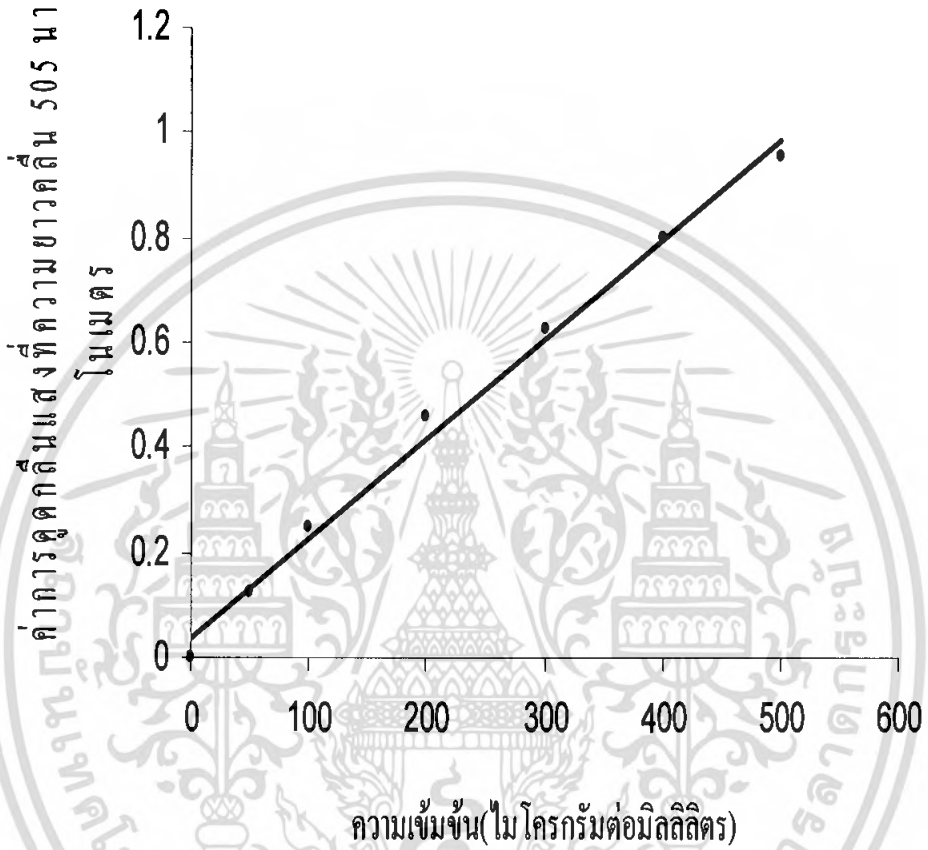
6. นำสารละลายกรดโคจิกความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 50 100 200 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาวิเคราะห์โดยดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1-3

7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้และความเข้มข้นของกรดโคจิกมาเขียนกราฟมาตรฐานของกรดโคจิก

8. การคำนวณปริมาณกรดจิก

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัตถุหมัก (กิติศักดิ์และคณะ,2537)

วิธีการ

1. ทำการอบถ้วยหาความชื้น (moisture can) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100-102 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งหาน้ำหนักถ้วยและฝา

2. นำตัวอย่างใส่ลงในถ้วยหาความชื้นชั่งหาน้ำหนักทั้งหมด (น้ำหนักตัวอย่าง = น้ำหนักทั้งหมด – น้ำหนักถ้วยหาความชื้น)

3. นำตัวอย่างในถ้วยหาความชื้นไปอบที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส ตลอดคืน

4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักนำค่าน้ำหนักของถ้วยหาความชื้นมาหักออก ผลที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งของน้ำหนักตัวอย่าง

5. การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัตถุหมัก โดยคำนวณได้จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่าง} - \text{น้ำหนักแห้ง}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

ข.3 การตรวจนับสปอร์ของเชื้อราโดยดัดแปลงมาจาก Townsed and Lindgren (1953)

วิธีการ

1. วางกระจกปิดสไลด์ (cover slip) บนแชมเบอร์ที่ใช้นับสปอร์ (counting chamber)

2. บรรจุสารละลายสปอร์ที่เจือจางให้เหมาะสมแล้วบนแชมเบอร์ด้วยปิเปต

3. นับสปอร์ 5 ช่องตรงตำแหน่ง บนซ้าย ล่างซ้าย บนขวา ล่างขวา และตรงกลางของช่องใหญ่ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า

4. เมื่อนับสปอร์ครบทั้ง 5 ช่องแล้ว ให้นำสปอร์ทั้ง 5 ช่องมารวมกันเพื่อคำนวณตามสูตร

$$\text{จำนวนสปอร์ทั้งหมด} = 5A \times 10^4 \times \text{ความเจือจาง}$$

กำหนดให้ A คือ จำนวนสปอร์ที่นับได้จาก 5 ช่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.4 การวิเคราะห์ค่าพีเอช (กิติศักดิ์และคณะ, 2537)

วัดค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแข็ง ทำได้โดยการชั่งอาหารแข็งในแต่ละสูตรให้ได้ปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมน้ำกลั่นลงไปในปริมาณ 100 มิลลิลิตร และทำการวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช (Denver Instrument รุ่น 215) ส่วนการวัดค่าพีเอชของสารละลายกรดโคจิกทำได้โดยการนำสารละลายสกัดกรดโคจิกมาวัดพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช

ข.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

โดยใช้วิธีการวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Duncan

สูตรอาหาร	จำนวนครั้งการทดลอง	ค่าความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์		
		1	2	3
ปลายข้าวหอมมะลิต่อกากถั่วเหลือง	2	1.5400		
ข้าวโพดต่อกากถั่วเหลือง	2	1.5700		
ข้าวโพดต่อรำข้าว	2		2.5400	
ปลายข้าวหอมมะลิต่อรำข้าว	2			3.1000
Sig.		.834	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

Duncan

สัดส่วนอาหารแข็ง(ปลายข้าวหอมมะลิต่อรำข้าว)	จำนวนครั้งการทดลอง	ค่าความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์	
		1	2
70:30	2	1.1250	
90:10	2	1.2700	
80:20	2		3.1000
Sig.		.345	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

Duncan

จำนวนสปอร์เริ่มต้น	จำนวนครั้งการทดลอง	ค่าความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์	
		1	2
10^8	2	1.3700	
10^6	2	1.6850	
10^7	2		3.1000
Sig.		.119	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้