

การผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1

นางสาว จันทน์ สติรสสถาพร
นางสาว ปรียาภัทร แก้วภู

264.
จ 24617
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

83763

15 ก.ย. 2551

b. 119 7753x
i.

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชา จีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ในเพียงการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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



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

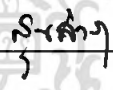
Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษ การผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1

นักศึกษา นางสาว จันทน์ สติรสถาพร ชั้นปีที่ 4 รหัส 47050876
 นางสาว ปรียาภัทร แก้วภู ชั้นปีที่ 4 รหัส 47050885
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลงมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ. ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	 
กรรมการ ผศ. ถิ่นจง สุขคำกู	 


(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาค

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	การผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งโดยเชื้อ <i>Aspergillus</i> sp. BR1
นักศึกษา	นางสาว จันทน์ สติรสตาพร นางสาว ปรียาภัทร แก้วภู
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. ดร. นวตพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

Aspergillus sp. BR 1 เป็นราที่ผลิตกรดโคจิกเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน เลือกใช้ปลายข้าว ข้าวโพดบด รำข้าว และกากถั่วเหลือง เป็นสับสเตรทเพื่อผลิตกรด โคจิกในอาหาร แข็ง พบว่าเมื่อใช้ปลายข้าวและรำข้าวในอัตราส่วน 80:20 เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ 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

Special Project Title	Kojic acid production by <i>Aspergillus</i> 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.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ผู้ที่ให้คำแนะนำแนวทางในการค้นคว้าและจัดทำงานวิจัย รวมทั้งช่วยในการแก้ไขและตรวจทาน โครงการพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ลินจง สุขคำภู ที่ได้ช่วยตรวจทานแก้ไขในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการทุกท่าน สำหรับการสอบวิชาโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือในการเบิกอุปกรณ์ สารเคมี และ ให้คำแนะนำวิธีการใช้เครื่องมือต่างๆในห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการที่ได้อำนวยความสะดวก ในการดำเนินงาน พี่ๆปริญญาโท ที่ช่วยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในทุกๆด้าน

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและคอยเป็นกำลังใจให้กัน

จันทน์ สติรสสถาพร
ปรียาภัทร แก้วภู

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 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการพิเศษ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ.....	2
1.4 ประโยชน์ที่ได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	
2.1 กรด โคจิก (Kojic acid).....	3
2.1.1 คุณสมบัติของกรดโคจิก.....	3
2.1.2 การสังเคราะห์กรด โคจิก.....	4
2.1.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรด โคจิก.....	6
2.1.4 ประโยชน์ของกรด โคจิก.....	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 วัสดุดิบ.....	20
3.1.2 สารเคมี.....	20
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์.....	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 วิธีการวิจัย.....	20
3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ.....	21
3.2.2 ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต กรดโคจิกบนอาหารแข็ง.....	21
3.2.3 ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง.....	21
3.2.4 ศึกษาปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกบน อาหารแข็ง.....	22
3.2.5 การสกัดกรดโคจิก.....	22
3.3 การวิเคราะห์.....	22
3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิก.....	22
3.3.2 การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัตถุดิบ.....	22
3.3.3 การนับจำนวนสปอร์.....	22
3.3.4 การวิเคราะห์ค่าพีเอช.....	22
3.3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	22
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
4.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิต กรดโคจิกบนอาหารแข็ง.....	23
4.2 ผลการศึกษาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารแข็ง ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก.....	29
4.3 ผลการศึกษาจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก.....	34
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	39
บรรณานุกรม.....	40

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 <i>Aspergillus flavus</i>	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
รูปที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (A_{505}) กับ ปริมาณความเข้มข้น ของกรดโคจิก.....	46
รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานกรดโคจิก.....	48

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิก.....	7
ตารางที่ 2 แสดงแหล่งแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์.....	9
ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างจุลินทรีย์และความเข้มข้นของกรดโคจิกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ นั้นได้สมบูรณ์	14
ตารางที่ 4 แสดงเชื้อราที่ผลิตกรดโคจิก.....	16
ตารางที่ 5 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวโพดบดและรำข้าว ที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20.....	24
ตารางที่ 6 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าว ที่อัตราส่วน 80:20	25
ตารางที่ 7 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวโพดบดและ กากถั่วเหลืองที่อัตราส่วน 80:20.....	26
ตารางที่ 8 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและ กากถั่วเหลือง ที่อัตราส่วน 80:20.....	27
ตารางที่ 9 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ต่างๆ กัน.....	28
ตารางที่ 10 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและ รำข้าวที่อัตราส่วน 70 ต่อ 30.....	30
ตารางที่ 11 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและ รำข้าวที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20.....	31
ตารางที่ 12 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและ รำข้าวที่อัตราส่วน 90 ต่อ 10.....	32
ตารางที่ 13 แสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากอัตราส่วนอาหารแข็งต่างๆ กัน.....	33
ตารางที่ 14 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและ รำข้าวเมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7	35
ตารางที่ 15 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าว เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^6	36

สารบัญตาราง(ต่อ)

หน้า

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงการพิเศษ

กรดโคจิก (Kojic acid) มีชื่อทางเคมีว่า 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-2-pyrone เป็นสารทุติยภูมิ (Secondary metabolism) ของเชื้อรา *Aspergillus* ในหลายตระกูล ซึ่งตรวจพบครั้งแรก ในปี ค.ศ.1907 โดย Saito ซึ่งสามารถแยกสารที่ลักษณะคล้ายกรด บีต้า-ริซอร์ซิลคาร์บอกซิลิก (β -resourcylcarboxylic acid) ต่อมาในปี 1913 Yabuta พบว่าสารนั้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเจริญเติบโตของเชื้อ *Aspergillus oryzae* บนข้าวหนึ่งในสภาพการหมักในอาหารแข็ง ปัจจุบันกรดโคจิกนั้นได้มีการนำกรดโคจิกมาใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง เช่น ด้านการแพทย์ ด้านอาหาร ด้านการเกษตร (Futamura และคณะ, 2001b) อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมฟอกหนัง และในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ที่ทำให้ผิวขาว และยังสามารถป้องกันแสงอัลตราไวโอเล็ตได้อีกด้วย (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 ข้าวฟ่าง เป็นต้น มาเลี้ยงเชื้อราในสภาพอาหารแข็ง จะช่วยลดต้นทุนการผลิตและให้ผลผลิตกรดโคจิกสูง

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

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษาการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็งที่ใช้ผลผลิตทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1. ทำการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน คือ ปลาช่อน เมล็ดข้าวโพดคั่ว และ แหล่งไนโตรเจน คือ รำข้าว ถากั่วเหลือง ที่เหมาะสมเพื่อผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการ เช่น อัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุด
3. ศึกษาปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยใช้สปอร์ที่ 10^6 10^7 10^8

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลิตกรดโคจิกโดยการหมักบนอาหารแข็งที่ใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนราคาถูก
2. ทราบสภาวะที่เหมาะสมบางประการในการผลิตกรดโคจิกโดยการหมักบนอาหารแข็ง
3. เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ในการศึกษาการผลิตในอาหารแข็งต่อไป

บทที่ 2

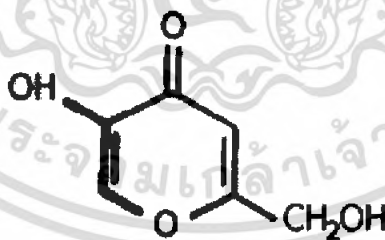
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 กรดโคจิก (Kojic acid)

กรดโคจิก (Kojic acid) มีชื่อทางเคมีว่า 5-hydroxy-2-hydroxymethyl- γ -pyrone เป็นกรดอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการสร้างผลสลายทุติยภูมิ (Secondary metabolite) การค้นพบกรดโคจิกมีรายงานครั้งแรกพบว่าผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ที่เจริญบนข้าวเหนียวโดย Saito (1907) ซึ่งเขาสามารถแยกผลึกสารที่ลักษณะคล้ายกรดปีต้า-รีซอร์ซิลคาร์บอกซิลิก (β -resourcylcarboxylic acid) หลังจากนั้นไม่นานได้ตรวจสอบสารนี้อย่างจริงจังแล้วตั้งชื่อว่า “กรดโคจิก” และกำหนดองค์ประกอบที่แน่นอนของกรดโคจิกในปี ค.ศ. 1924 (Yabuta, 1913) ตั้งแต่นั้นมา มีการทดลองเกี่ยวกับการสังเคราะห์กรดโคจิกทางชีวภาพ และมีการตีพิมพ์เผยแพร่คุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพของกรดโคจิกออกมาเป็นจำนวนมาก (Bajpai และคณะ, 1982)

2.1.1 คุณสมบัติของกรดโคจิก

กรดโคจิกเป็นสารประกอบไพโรน (pyrone) ที่ขาดกลุ่มคาร์บอกซิล โมเลกุลของกรดโคจิกประกอบด้วย 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)

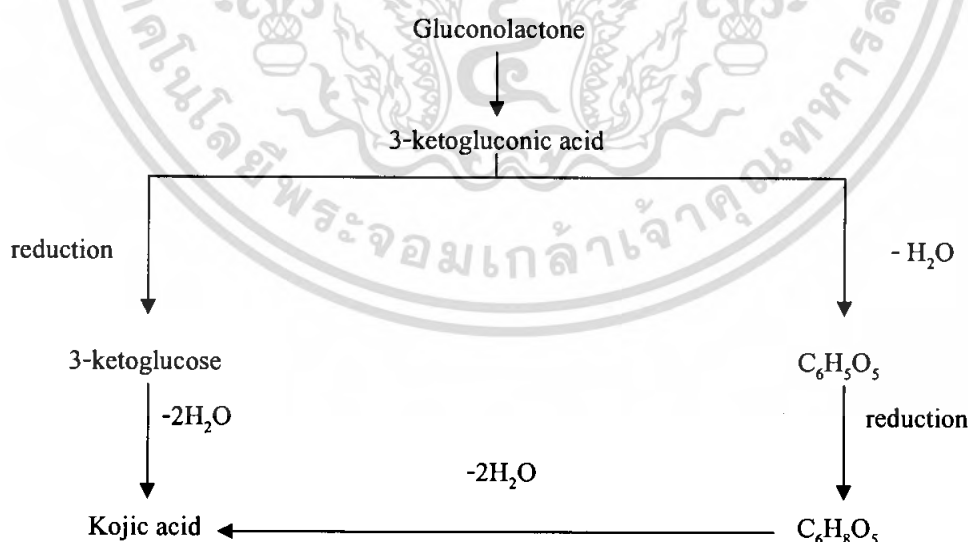
Bentley (1957) รายงานว่าผลจากการศึกษาทาง x-ray investigation ของกรดโคจิกบริสุทธิ์พบว่ามันมีลักษณะเป็นผลึกทรงปริซึมรูปเข็ม ไม่มีสี ผลึกละลายได้ง่ายในน้ำ (3.95 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ที่ 20 องศาเซลเซียส) เอทานอลและอะซิโตน ละลายได้เล็กน้อยในอีเทอร์ เอทิลอะซิเตด

กลูโคสและฟรุคโตส และละลายยากมากในของเหลวชนิดอื่นๆ กรดโคจิกมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 142.11 และมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 153 – 154 องศาเซลเซียส การทำให้กรดโคจิกบริสุทธิ์ทำได้โดยการตกผลึกซ้ำในอะซิโตน เอทานอล – อีเทอร์ เมทานอล และเอทิลอะซิเตต หรือการทำให้บริสุทธิ์ภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 150 – 200 องศาเซลเซียส

2.1.2 การสังเคราะห์กรดโคจิก

กรดโคจิกมีโครงสร้างคล้ายกับสาร โมโนแซคคาไรด์เนื่องจากสังเคราะห์ได้มาจากน้ำตาลกลูโคส (D - glucose) การสังเคราะห์เริ่มจากกลูโคสถูกออกซิไดซ์เป็นสารคีโตนิกอินเทอร์มีเดียต (ketonic intermediate) จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิกโดยการกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 2 โมเลกุล (Bajpai และคณะ, 1982)

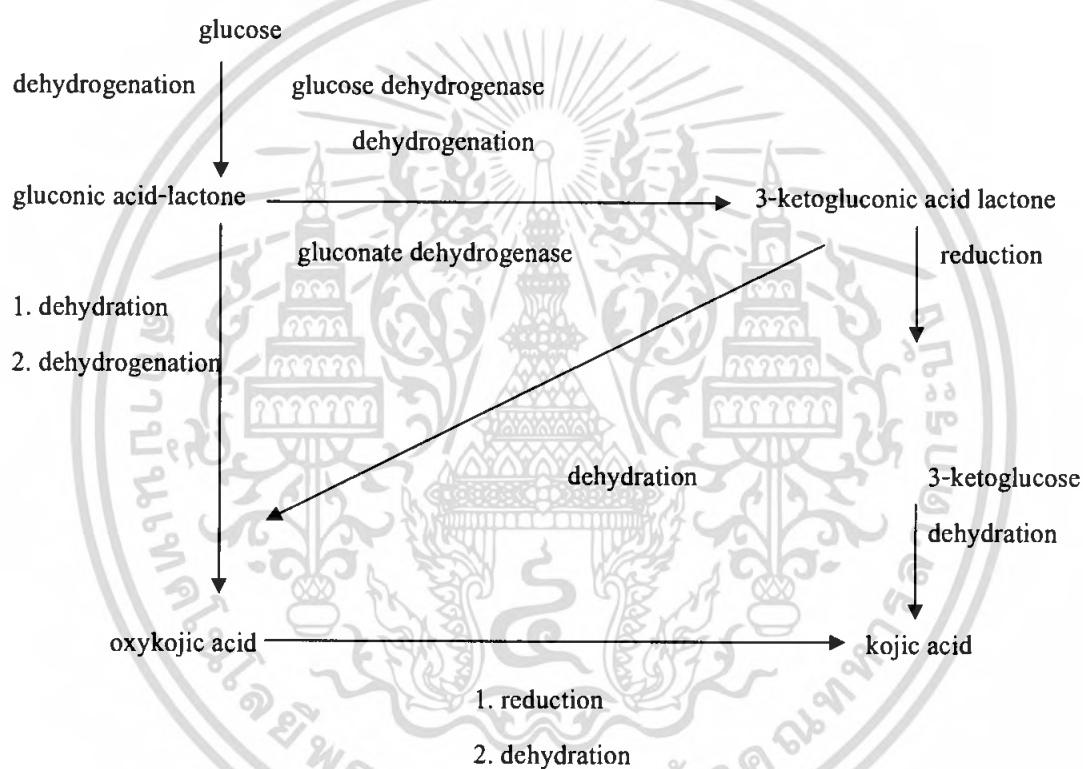
Arnteins และ Bently (1953) รายงานว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นสารเริ่มต้นในการผลิตกรดโคจิกจากการเปลี่ยนกลูโคสเป็นสาร 3 - คีโตกลูโคส (3 - ketoglucose) โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็นกรดโคจิกโดยการกำจัดโมเลกุลของน้ำออกไป 2 โมเลกุล นอกจากนี้ยังพบว่ากลูโคโนแลกโตน (gluconolactone) เป็นสารเริ่มต้นในกระบวนการผลิตกรดโคจิกได้โดยการเปลี่ยนไปเป็น 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโตน (3-ketogluconic acid lactone) แล้วจึงเปลี่ยนเป็นกรดโคจิก วิธีที่ 2 คือสาร 3-คีโตกลูโคนิกแอซิดแล็กโตนจะถูกกำจัดโมเลกุลของน้ำไป 1 โมเลกุล โดยการรีดักชันและเกิดการกำจัดโมเลกุลของน้ำอีก 1 โมเลกุลตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงแผนภาพการผลิตกรดโคจิกจากกลูโคโนแลกโตน

ที่มา : Arnteins และ Bently (1953)

Bajpai และคณะ (1981) ได้ทำการศึกษาวิถีการสังเคราะห์กรดโคจิกเมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นจากเชื้อ *Aspergillus flavus* สายพันธุ์บี ซึ่งพบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในระหว่างกระบวนการผลิตกรดโคจิกได้แก่ เฮกโซไคเนส (hexokinase) กลูโคส - 6 - ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glucosephosphate dehydrogenase) 6 - ฟอสเฟตกลูโคนเต ดีไฮโดรจีเนส (6 - phosphategluconate dehydrogenase) กลูโคสออกซิเดส (glucoseoxidase) และกลูโคนเต ดีไฮโดรจีเนส (gluconatedehydrogenase) เอนไซม์ดังกล่าวสัมพันธ์กับการสร้างการผลิตกรดโคจิกดังแสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงแผนภาพการสังเคราะห์กรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus flavus*
ที่มา : Bajpai และคณะ (1981)

2.1.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก

2.1.3.1 แหล่งคาร์บอน

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

มีสารหลายชนิดสามารถใช้ในการสร้างกรดโคจิกซึ่งส่วนใหญ่ คือ กลูโคส ซูโครส ชิ-เตรด เอทานอล อะราบินอส และไซโลส ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดโคจิก เป็นที่รู้กันดีว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตกรดโคจิกเนื่องจากมีความคล้ายคลึงของโครงสร้าง (Rosfarizan และคณะ, 1998)

กรดโคจิกสามารถผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนหลายชนิด โดยมีการศึกษา ดังนี้

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

Bentley (1957) มีการนำอาหารดัดแปลงจาก Czapek – Dox liquid medium มาเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการผลิตกรดโคจิก โดยมีน้ำตาลซูโครสร้อยละ 10 เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน พบว่าการผลิตกรดโคจิก 7 – 10 กรัมต่อลิตร

May และคณะ (1931) ทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลเด็คซ์โทรสที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกของเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 10 15 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร ไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรด 1.125 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 วัน พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลเด็คซ์โทรส 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

ตารางที่ 1 แสดงแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิก

จำนวนคาร์บอน(อะตอม)	แหล่งคาร์บอน
2	เอทานอล, ไกลซีน, โซเดียมแอซีเตต
3	1,3 – ไดไฮดรอกซิล-2-โพรพานอล
4	กลีเซอรอลดีไฮด์
5	กลีเซอรอล
6	โซเดียมแลคเตต
7	โซเดียมไพรูเวต
12	กรดทาร์ทาลิก
18	ลิบิทอล, อะราบิโนส, โซโซล 2-ไดออกซิกูโคส กาแลกโทส กรดกลูโคนิก กลูโคส กลูโคโนแลคโตน แมนนิทอล ฟรักโทส, แมนโนส ซอร์บิทอล, ซอร์บิต กรดควินิก, กรดซิทมิก ทรีฮาโลส, 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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

2.1.3.2 แหล่งไนโตรเจน

ในการผลิตกรดโคจิกสามารถผลิตกรดโคจิกได้จากแหล่งไนโตรเจนหลายชนิด โดยมีการศึกษาดังนี้

ในการผลิตกรดโคจิกแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมาจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ ได้แก่ เปปโตน ยีสต์สกัด และทริปโตน แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ เกลือแอมโมเนียมไนเตรด แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นต้น เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์มีราคาสูง ดังนั้นจึงมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแทน จากการผลิตกรดโคจิกส่วนมากใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนหรืออาจมีการเสริมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์อื่น ในการผลิตกรดจากอาหารสูตรดัดแปลงจาก Czapek – Dox liquid medium ซึ่งมีส่วนประกอบของยีสต์สกัดร้อยละ 0.1 และแอมโมเนียมไนเตรดร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งไนโตรเจน (Bently, 1957)

May และคณะ (1931) ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus flavus* โดยใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันคือ แอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$ แอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) และโซเดียมไนเตรด (NaNO_3) ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 14 วัน พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.75 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรด 0.7 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดคือ 18.6 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรด 7 ระดับคือ 0.142 0.281 0.563 0.75 1.125 2.250 และ 4.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 13 วัน ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรดเข้มข้น 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

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 กากถั่วเหลืองบด จมูกข้าวสาลี และเมล็ดทานตะวัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน พบว่าเมื่อใช้จมูกข้าวสาลี 7 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 30 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังแปรผันความเข้มข้นของจมูกข้าวสาลีที่ทำการศึกษายู่ระหว่าง 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) นอกจากนี้ยังมีโคบอลต์ (Co) ทองแดง (Cu) เหล็ก (Fe) แมงกานีส (Mn) โมลิบดีนัม (Mo) และสังกะสี (Zn) และแร่ธาตุที่เติมลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในรูปสารอนินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิก ดังแสดงในตารางที่ 4 (Stanbury และคณะ, 1995)

ตารางที่ 2 แสดงแหล่งแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์

แร่ธาตุ	ปริมาณที่ใช้(กรัมต่อลิตร)
KH_2PO_4	1.0-4.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25-3.0
KCl	0.5-12.0
CaCO_3	5.0-17.0
$\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.01-0.1
$\text{ZnSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	0.1-1.0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.01-0.1
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.003-0.01
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01-0.1

ที่มา : Stanbury และคณะ (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

May และคณะ (1931) มีการใช้แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดร้อยละ 48.2

Tadera และคณะ (1985) ได้ศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวที่มีการเสริมแร่ธาตุคือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) และเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl_3) ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 17.7 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 14

Kwak และ Rhee (1992 a) ได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีการเสริมแร่ธาตุพวกไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) กรดไฮโดรคลอริก (HCl) เฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) และซิงก์ซัลเฟต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) พบว่าสามารถผลิตกรดโคจิกสูงสุด 3.8 กรัมต่อลิตรต่อวัน ต่อมาได้ทำการผลิตกรดโคจิกจากการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเสริมแร่ธาตุพวกไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) และเฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) พบว่าได้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Ogawa และคณะ, 1995)

2.1.3.4 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกนั้น ต้องทำการทดลองจึงจะทราบว่าสายพันธุ์ใดต้องการเท่าใด ซึ่งปกติค่าความเป็นกรดด่างนั้นมีค่าอยู่ในช่วงประมาณ 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) ได้พบว่าช่วงค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลไซโลสโดยรา *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

วรรณิ (2546) จากการศึกษพบว่าช่วงค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการในการผลิตกรดโคจิกจากน้ำอ้อยโดยเชื้อรา *Aspergillus oryzae* NRRL 484 คือ 4.4 – 4.8

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 และเขย่าด้วยความเร็ว 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

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

2.1.4 ประโยชน์ของกรดโคจิก

2.1.4.1 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

กรดโคจิกจะช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์มาเกี่ยวข้อง เช่น เมื่อมีผักและผลไม้มีรอยตำหนิเสียหายซึ่งเกิดจากรอยขีด รอยปอก หั่น แฉะแห้งหรือเป็นโรค ส่วนของเนื้อเยื่อที่มีเอนไซม์อยู่เมื่อถูกอากาศจะเกิดเป็นสีน้ำตาลขึ้น 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) และสามารถป้องกันแสงอัลตราไวโอเล็ตจากแสงแดด (Ohyama และ mishima, 1990) ต่อมาได้มีการศึกษาการใช้กรดโคจิกในผลิตภัณฑ์รักษาผิว (skin care products) โดยใช้กรดโคจิกร้อยละ 1 เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ ทำหน้าที่เป็นตัวเปลี่ยนเม็ดสีผิว (skin - depigmenting) ทำให้ผิวขาวขึ้น ในทางการค้ามีการนำกรดโคจิกมาใช้ในผลิตภัณฑ์รักษาผิวดังแต่ปี 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) ซึ่งมีอยู่ทั้งในพืชและส่วนใหญ่เป็นพืชพวกไกลโคไซด์ (glycosides) มีมากในเปลือกต้นโอ๊คและฝาง มีความสามารถในการฟอกหนังสัตว์ได้ โดยทำหน้าที่ในการตกตะกอนโปรตีนและแอลคาลอยด์ (Bajpai และคณะ, 1982)

2.1.4.4 เป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

Kayahara และคณะ (1990) มีรายงานว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรียพวก *Staphylococcus aureus* 209P. ต่อมาพบว่ากรดโคจิกด้านการเจริญของเชื้อราพวก *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

กรดโคจิกสามารถช่วยลดระดับของแอกทีฟออกซิเจนหรืออนุมูลอิสระที่เป็นพิษกับเนื้อเยื่อของร่างกาย ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) อนุมูลอิสระของซูเปอร์ออกไซด์ (O_2) และอนุมูลอิสระของไฮดรอกไซด์ (OH) ซึ่งกรดโคจิกจะไปช่วยลดความเป็นพิษของอนุมูลอิสระจนไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อเนื้อเยื่อในร่างกาย (Niwa และ Akamatsu, 1991)

กรดโคจิกจะช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์และสัตว์ ซึ่งกรดโคจิกจะช่วยให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลล์ (Neutrophils) มีการสะสมของแคลเซียมไอออน (Ca^{++}) มากขึ้นทำให้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้ดีขึ้น (Niwa และ Akamatsu, 1991)

ได้มีการใช้อนุพันธ์ของกรดโคจิกบางชนิด เช่น 5-เมทออกซี-2-ไฮดรอกซีเมทิล-แกมมาไพโรน และ 5-เมทออกซี-2-เมทออกซีเมทิล-แกมมาไพโรน เพื่อนำมาใช้ทำเป็นยาเฉพาะที่ (Armit และ Nolan, 1931; Bhat และ Hadi, 1994)

กรดโคจิกสามารถช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดโรคไขข้ออักเสบและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เนื่องจากอนุพันธ์ของกรดโคจิกพวกอะไซลออกซี-4-ไพโรน สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวโทรฟิลล์เอสเทส (Neutrophils elastase) ในร่างกายมนุษย์ ซึ่งเอนไซม์นี้จะไปกระตุ้นการสร้างสารที่เป็นปัจจัยในการก่อให้เกิดโรคไขข้ออักเสบ (Rheumatoid arthritis) และทำให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์เม็ดเลือดในร่างกาย (Masateru และ Shone, 1989)

การนำกรดโคจิกมาใช้แทนฮอร์โมนอินซูลินเพื่อรักษาโรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน และโรคอ้วนโดย Caravan และคณะ (1995) ได้รายงานว่าการโคจิกและมอลทอลสามารถใช้เป็นลิแกนด์ (Ligand) ที่จะไปติดกับสารในกลุ่มออกโซวานาเดียมทรีเลต (Oxovanadium IV chelates) เพื่อใช้แทนฮอร์โมนอินซูลินได้

กรดโคจิกสามารถใช้เป็นสารปฏิชีวนะ โดย Yabuta (1913) ได้มีการรายงานว่าการโคจิกปริมาณร้อยละ 0.5 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกได้ และในปีต่อมาได้มีการค้นพบว่ากรดโคจิกสามารถยับยั้งการสังเคราะห์กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) หรือวิตามินซีในสัตว์ทดลอง ทำให้หลอดเลือดเปราะและเกิดโรคลักปิดลักเปิด (scurvy) เพราะไม่มีเอนไซม์กลูโคโนแล็กโทนออกซิเดส (L-gluconolactoneoxidase) ที่ใช้ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแอสคอร์บิก (Bajpai และคณะ, 1982)

ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างจุลินทรีย์และความเข้มข้นของกรดโคจิกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์นั้นได้
สมบูรณ์

จุลินทรีย์	ความเข้มข้นของกรดโคจิกที่ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ สมบูรณ์ (น้ำหนักกรดต่อปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1 : 500
<i>Bacillus anthracis</i>	1 : 500 – 1 : 1,000
<i>Bacillus subtilis</i>	> 1 : 500
<i>Brucella abortus</i>	1 : 4,000
<i>Brucella melitensis</i>	1 : 2,000
<i>Clostridium cotulinum</i>	1 : 500 – 1 : 1,000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 : 500 – 1 : 1,000
<i>Leptospira canicola</i>	1 : 1,000,000
<i>Leptospira icterohemorrhagiae</i>	1 : 100,000
<i>Micrococcus roseus</i>	1 : 500
<i>Pasteurella pestis</i>	1 : 4,000

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงในตารางนี้เป็นเพียงค่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของกรดโคจิก

เท่านั้น ซึ่งมีได้ระบุอย่างชัดเจนว่าเป็น Bactericidal หรือ Bacteriostatic

ที่มา : (Morton และคณะ, 1945)

2.1.4.7 ด้านการเกษตร

กรดโคจิกสามารถยับยั้งโรคพืชจากเชื้อรา (Fungal diseases of plants) หลายชนิดโดยอยู่ในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนของกรดโคจิกกับโลหะหนักที่มีอิเล็กตรอนวงนอกเป็นสอง (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.) และหนอนกระทุ้ (*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* มีรายงานว่ามีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกสูงสุด (Aniff และคณะ, 1996)

Bajpai และคณะ (1982) รายงานว่ากรดโคจิกเริ่มผลิตครั้งแรกจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* จากนั้นได้ศึกษาการผลิตจากเชื้อ *Aspergillus* สายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้ *A. oryzae*, *A. flavus*, *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. giganteus*, *A. albus*, *A. nidulan*, *A. paraciticus*, *A. effutus*, *A. tamari*, *A. luteovirescens*, *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 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เปปโตน 6 กรัมต่อลิตร

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1 กรัมต่อลิตร และไซคาซีน 2 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 4.5

Kwak และ Rhee (1992 b) ได้ทำการเปรียบเทียบระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยการตรึงเซลล์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ด้วยแคลเซียมอัลจินเตกับการเพาะเลี้ยงเส้นใยโดยตรงในอาหารเหลว พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบตรึงเซลล์สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงเส้นใยโดยตรงในอาหารเหลว โดยการเพาะเลี้ยงแบบตรึงเซลล์จะผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 22 วัน ขณะที่การเพาะเลี้ยงเส้นใยโดยตรงในอาหารเหลวผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 25 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 25 วัน

Futamura และคณะ (2001 a) ได้มีการนำเชื้อ *Aspergillus oryzae* ATCC 22788 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยใช้ N-Methyl-N-nitro-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
<i>Aspergillus oryzae</i> (19 isolate)	Manabe และคณะ 1984
<i>A. paraciticus</i> SRRC 162 mutant	Anasari and Shivasta 1991
<i>A. flavus</i> (46 isolate)	Manabe และคณะ 1984
<i>A. tamari</i> (9 isolate)	Manabe และคณะ 1984
<i>A. sojae</i> (3 isolate)	Manabe และคณะ 1984
<i>A. flavus</i> link	Lin และคณะ 1976
<i>A. paraciticus</i> (UNBF A12)	EI – Khadm และคณะ 1976
<i>A. flavus</i>	Kharchenko และคณะ 1993; Moubasher และคณะ 1997
<i>A. fumigatus</i>	Kharchenko และคณะ 1993; Moubasher และคณะ 1997
<i>A. luteo – virescens</i>	Manabe และคณะ 1984b
<i>A. albus</i>	Manabe และคณะ 1984b
<i>A. effusus</i>	Manabe และคณะ 1984b
<i>A. lutesens</i>	Manabe และคณะ 1984b
<i>A. alliaceus</i>	Manabe และคณะ 1984b

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 วิธีการผลิตกรดโคจิกโดยการหมักในอาหารเหลว

ตุกัญญา (2541) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในน้ำมะพร้าวโดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอาหารสูตรดัดแปลงที่เหมาะสมที่สุด ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 175 กรัม แอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) 2 กรัม ยีสต์สกัด (yeast extract) 1 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 1 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.25 กรัม และน้ำมะพร้าว 1 ลิตร ทำการเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่าให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 34 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 และทำการศึกษาในถังหมักแบบเบซให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด 37 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 เมื่อทำการเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีสภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้ความเร็วรอบในการกวน 500 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.5 วีวีเอ็ม จากนั้นทำการแยกกรดโคจิกจากน้ำหมักพบว่าผลิตผลที่ได้ หลังจากการสกัดคิดเป็นร้อยละ 60.2

วรรณิ (2546) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 เมื่อนำน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกประกอบด้วย น้ำอ้อย 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

ณัฐธาดา และคณะ (2548) ได้ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกจากเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 พบว่าเชื้อราให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งข้าวโพดและเปปโดน สำหรับสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกประกอบด้วย แป้งข้าวโพด 50 กรัมต่อลิตร เปปโดน 4 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 1 กรัมต่อลิตร และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัมต่อลิตร โดยผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 14 กรัมต่อลิตรในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 3.46 กรัมต่อลิตรต่อวัน เมื่อนำเชื้อรามาเลี้ยงในถังหมักแบบใบพัดกวนขนาด 2 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารเดียวกันในสภาวะที่มีอัตราการกวนของใบพัด 400 รอบต่อนาที และอัตรา

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

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

Shankar และ Mulimani (2006) ได้ทำการเปรียบเทียบการผลิต α -galactosidase โดยใช้ส่วนเหลือจากพืชเรดแกรนกับรำข้าวสาลี และสับสเตรทในท้องถิ่นที่หาได้อื่นโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* ภายใต้การหมักด้วยอาหารแข็ง พบว่าเมื่อใช้ส่วนเหลือจากพืชเรดแกรนกับรำข้าวสาลี ในอัตราส่วน 1:1 (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

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 oven) ; Memmert รุ่น Model 600
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Contrifuge) ; Sanyo รุ่น 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 (Laminar air flow) ; ISSCO Laminar air flow รุ่น BVT 123
11. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (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 (Haemocytometer) ; Boeco รุ่น Neubauer BrightLine
18. ปีกเกอร์ขนาด 100, 500 มิลลิลิตร
19. ฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร
20. หลอดทดลอง
21. แท่งแก้ว
22. กระดาษกรอง
23. ผ้าขาวบาง
24. ถ้วยหาความชื้น (moisture can)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 วัตถุดิบ

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

3.1.2 สารเคมี

1. กรดโคจิก ; Sigma
2. ทวิน 80 ; Labchem
3. อาหาร PDA
4. เฟอริกคลอไรด์ ; Unilab
5. แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
6. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
7. โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย ได้แก่ เชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บนอาหารวุ้นเยือก 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 เต็มน้ำกลั่นที่ผสมทวิน 80 (0.05 เปอร์เซ็นต์) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีสปอร์ราเจริญอยู่บนอาหาร PDA ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ใช้ช้อนสแตนเลสขูดสปอร์ออกให้หลุดจากเส้นใยต้องทำในสภาวะที่ปลอดเชื้อ กรองสารละลายสปอร์ด้วยสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นดูดสารละลายสปอร์มาตรวจนับจำนวนสปอร์ด้วยเฮมาไซโตมิเตอร์

3.2.2 ศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง

อาหารแข็งสำหรับผลิตกรดโคจิก ประกอบด้วย แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ในอัตราส่วน 80:20 โดยแบ่งออกเป็น 4 สูตร คือ ปลายข้าวและรำข้าว ปลายข้าวและกากถั่วเหลือง ข้าวโพดคุดและรำข้าว ข้าวโพดคุดและกากถั่วเหลือง นำอาหารแต่ละสูตรมาผสมกับสารละลายแร่ธาตุที่ประกอบด้วยแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมคลไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะทำให้การเติมสารละลายแร่ธาตุปริมาณ 2 มิลลิลิตรต่ออาหาร 100 กรัม ลงในอาหารแต่ละสูตรทำการผสมให้เข้ากัน และทำการปรับความชื้นเริ่มต้นเท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นทำการแบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ในปริมาณฟลาสก์ละ 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

3.2.5 การสกัดกรดโคจิก

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

3.3 การวิเคราะห์

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

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตกรดโคจิกบนอาหารแข็ง

ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่างกัน คือ ข้าวโพดบดและรำข้าว ปลายข้าวและรำข้าว ข้าวโพดบดและกากถั่วเหลือง ปลายข้าวและกากถั่วเหลือง

ในการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งที่นำปลายข้าวผสมกับรำข้าวในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม ที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ผลิตภัณฑ์โคจิกได้สูงสุด 3.10 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัม ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง โดยอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 1.55 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน และมีค่าพีเอช 4.4 จากนั้นการผลิตกรดโคจิกจะเริ่มลดลงเรื่อยๆจนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ซึ่งค่าพีเอชของการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 4.4 - 6.2 (ดังแสดงในตารางที่ 5 และรูปที่ 4)

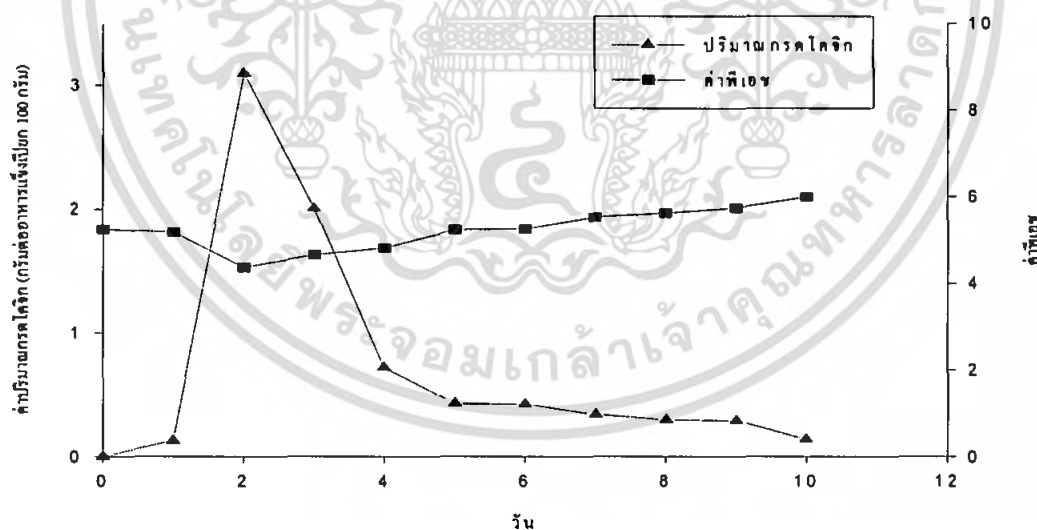
เมื่อนำข้าวโพดบดผสมกับรำข้าวในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม ที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ผลิตภัณฑ์โคจิก 2.54 กรัมต่ออาหาร 100 กรัม ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง โดยอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 1.29 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน และมีค่าพีเอช 4.3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

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

การผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งโดยนำปลายข้าวมาผสมกับกากถั่วเหลืองในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม ที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ผลิตภัณฑ์โคจิก 1.54 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัม ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง โดยอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 0.22 กรัมต่ออาหาร 100 กรัมต่อวัน และมีค่าพีเอช 3.5 จากนั้นการผลิตกรดโคจิกจะเริ่มลดลงเรื่อยๆจนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ซึ่งค่าพีเอชของการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 3.5 - 4.7 (ดังแสดงในตารางที่ 8 และรูปที่ 7)

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณกรด โคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 80:20

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด - ค่าของ อาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ อาหารแข็งเปียก 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

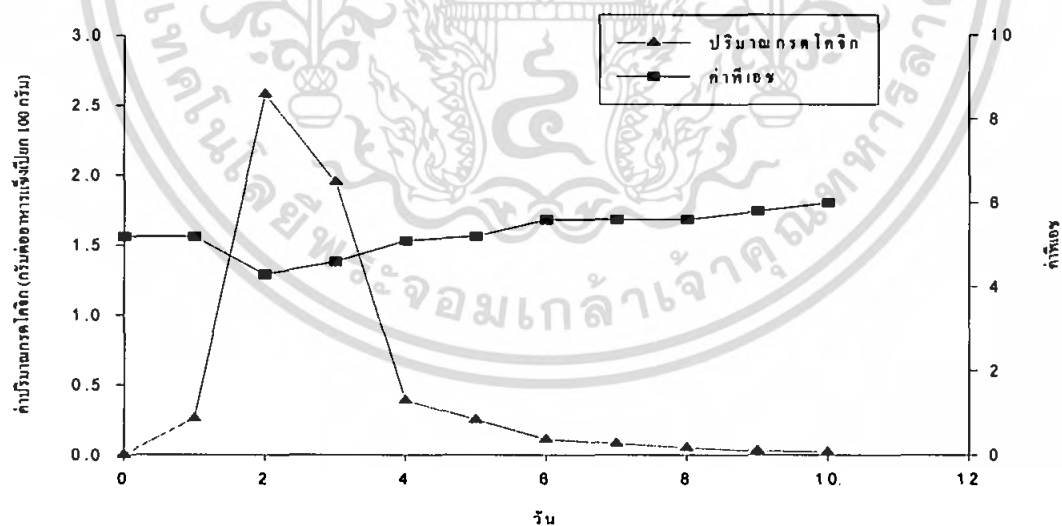


รูปที่ 4 กราฟแสดงปริมาณกรด โคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 80:20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวโพดคดและรำข้าวที่
อัตราส่วน 80 ต่อ 20

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด - ค่าของ อาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ อาหารแข็งเปียก 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

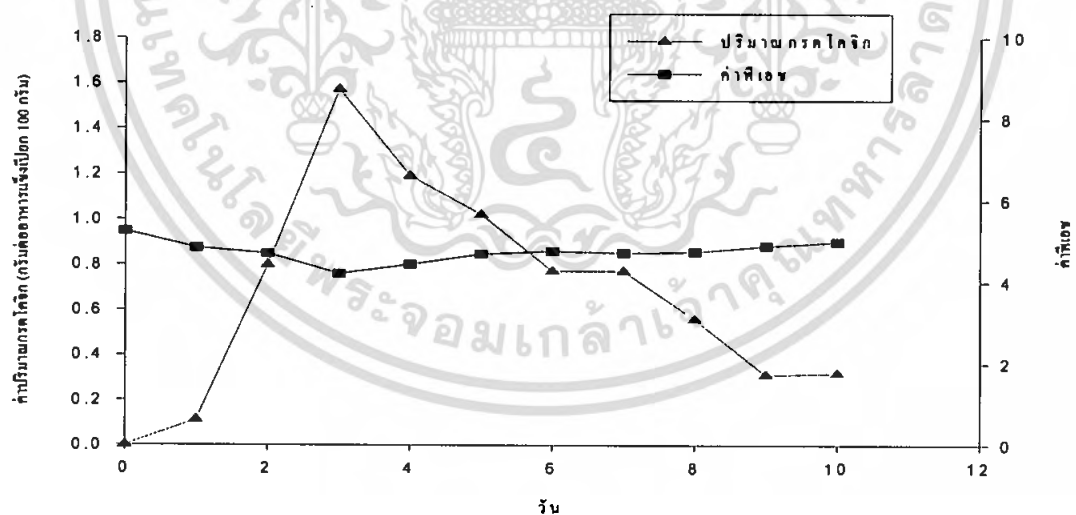


รูปที่ 5 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวโพดคดและรำข้าว
ที่อัตราส่วน 80:20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวโพดบดและกากถั่วเหลือง
ที่อัตราส่วน 80:20

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด - ค่าของ อาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อ อาหารแข็งเปียก 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

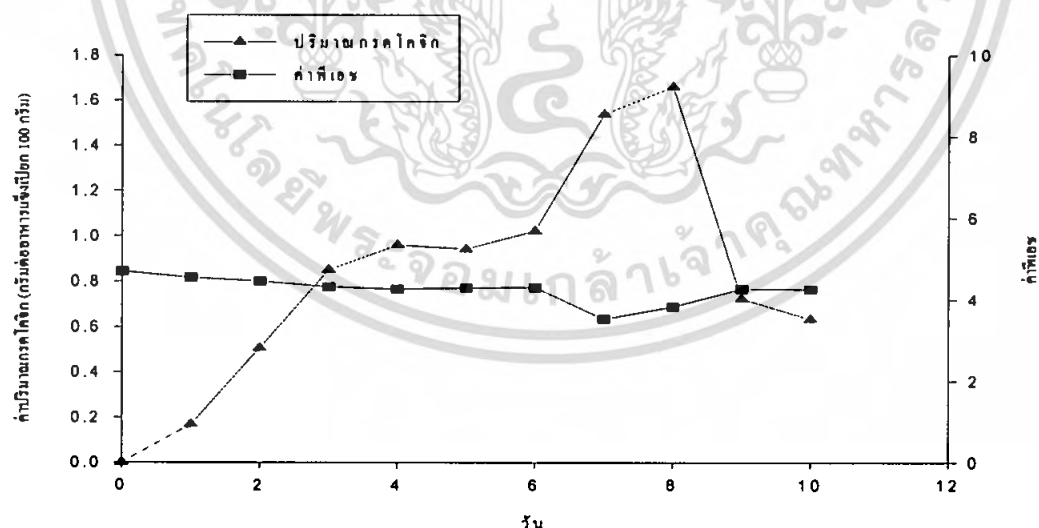


รูปที่ 6 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ข้าวโพดบดและกากถั่ว
เหลืองที่อัตราส่วน 80:20

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 ตัวอักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความ

เชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 9 เป็นผลจากการคำนวณค่าทางสถิติโดยแสดงปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันซึ่งปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้มีความแตกต่างกันโดยมีนัยสำคัญ ที่ความเชื่อมั่นที่ระดับความเป็นไปได้ที่ 0.05

ผลการศึกษาจากการศึกษาการผลิตกรดโคจิกของ *Aspergillus* sp. BR1 โดยเฉพาะเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันคือ เมล็ดข้าวโพดบดและรำข้าว ปลายข้าวและรำข้าว เมล็ดข้าวโพดบดและกากถั่วเหลือง ปลายข้าวและรำข้าว พบว่าอาหารแข็งที่นำปลายข้าวผสมกับรำข้าวสามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุดคือ คือ 3.10 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมซึ่งมีอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 1.55 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน เนื่องจากปลายข้าวทำให้เกิดช่องว่างระหว่างอาหารแข็งซึ่งมีผลให้การเจริญของเส้นใยเชื้อราสามารถเจริญแทรกเข้าไปในอาหารได้อย่างทั่วถึง จึงทำให้เชื้อรามีอากาศพอเพียงต่อการเจริญได้ดี นอกจากนี้ปลายข้าวยังมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นแป้งซึ่งประกอบด้วย อะไมโลเพคติน อะไมโลส เป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

4.2 ผลการศึกษาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

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

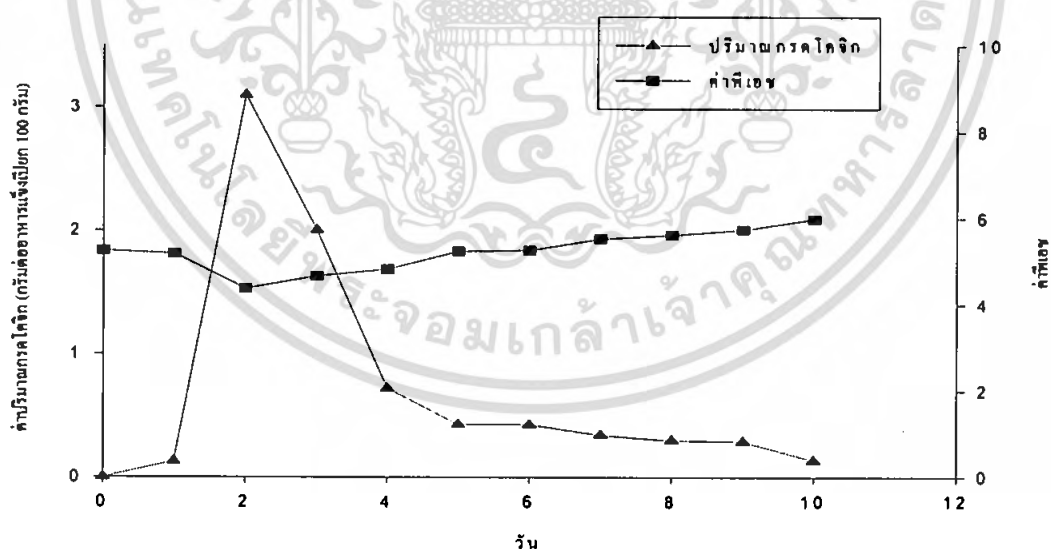
ในการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งที่นำปลายข้าวผสมกับรำข้าวในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม ที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 3.10 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัม ซึ่งอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 1.55 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวันในวันที่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

จากการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งที่นำปลายข้าวผสมกับรำข้าวในอัตราส่วน 70 ต่อ 30 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่ออาหารแห้งเปียก 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)

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแห้งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่ อัตราส่วน 80 ต่อ 20

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด - ค่าของ อาหารแห้ง	ปริมาณกรดโคจิก(กรัมต่อ อาหารแห้งเปียก 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

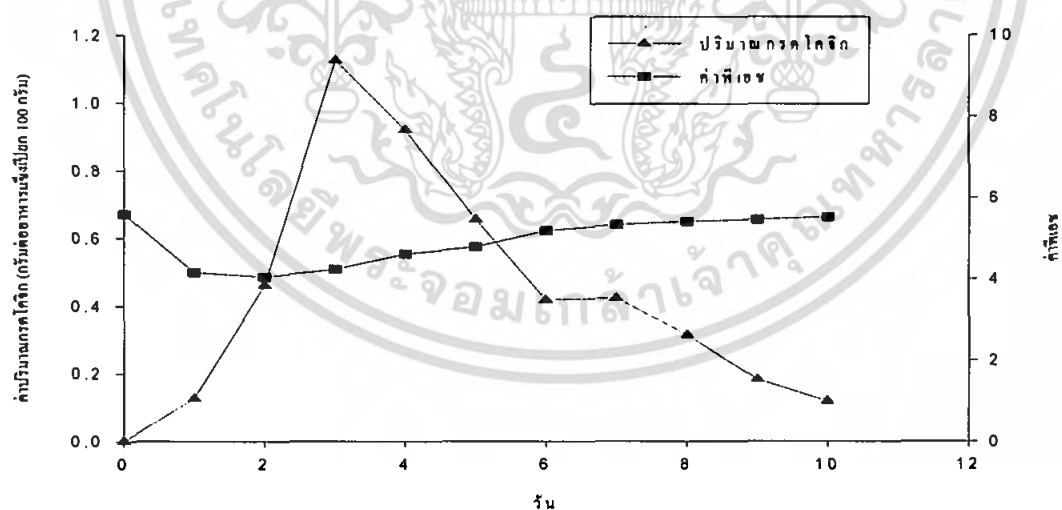


รูปที่ 8 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแห้งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่ อัตราส่วน 80 ต่อ 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่ อัตราส่วน 70 ต่อ 30

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด - ด่างของ อาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก(กรัมต่อ อาหารแข็งเปียก 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

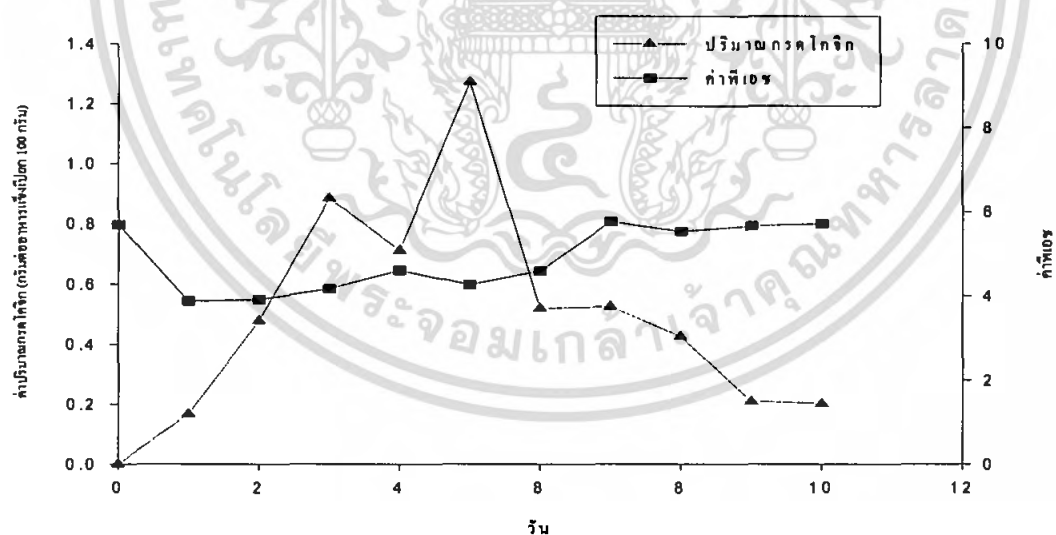


รูปที่ 9 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่ อัตราส่วน 70 ต่อ 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่ อัตราส่วน 90 ต่อ 10

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด - ค่าของ อาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก(กรัมต่อ อาหารแข็งเปียก 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 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่ อัตราส่วน 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 ตัวอักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความ

เชื่อมั่นร้อยละ 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 10^7 สปอร์ต่ออาหารแข็งเปียก 1 กรัม เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 วัน พบว่าเมื่อใช้ปลายข้าวผสมกับรำข้าว มาทำการผสมในอัตราส่วน 80:20 สามารถผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุด คือ 3.10 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัม เนื่องจาก เชื้อรา มีเอนไซม์อะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งได้ดี ปลายข้าวจึงถูกย่อยเพื่อนำไปใช้ในการเจริญของเส้นใยเชื้อรา นอกจากนี้อัตราส่วนที่ 80 : 20 นี้มีสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนต่อแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อราที่สภาวะการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

4.3 ผลการศึกษาจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

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

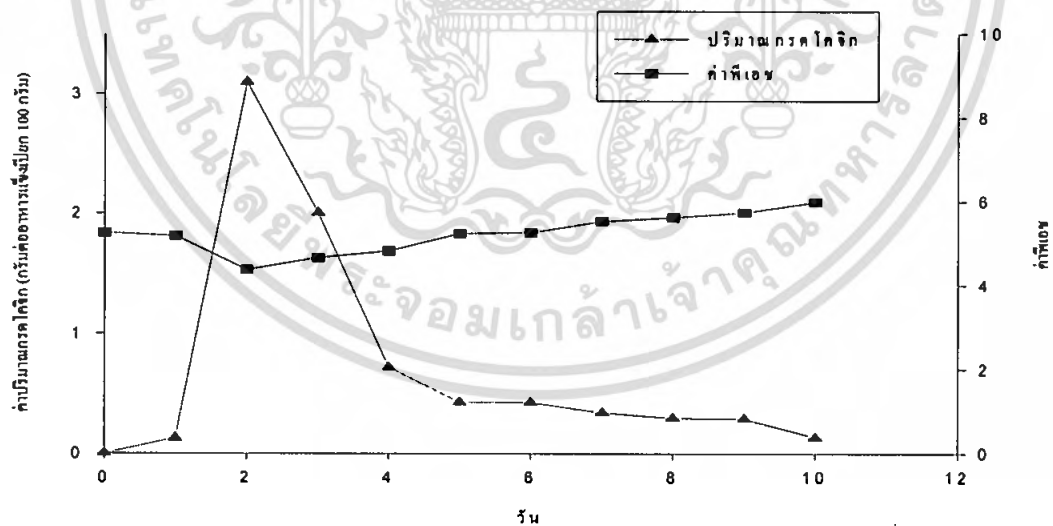
ผลการศึกษาการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งที่นำปลายข้าวผสมกับรำข้าวในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม ที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุด 3.10 กรัมต่ออาหารแห้งเปียก 100 กรัมในวันที่ 2 ซึ่งอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 1.55 กรัมต่ออาหารแห้งเปียก 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 พบว่าผลิตกรดโคจิกได้สูงสุด 1.68 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัม ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยอัตราการผลิตกรดโคจิกที่ได้เท่ากับ 0.56 กรัมต่อน้ำหนักเปียก 100 กรัมต่อวัน และมีค่าพีเอช 4.0 จากนั้นการผลิตกรดโคจิกจะเริ่มลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ซึ่งค่าพีเอชของการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 4.0 - 5.3 (ดังแสดงในตารางที่ 15 และรูปที่ 12)

ในการผลิตกรดโคจิกในอาหารแข็งที่นำปลายข้าวผสมกับรำข้าวในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 ใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^8 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม ที่ความชื้นเริ่มต้น 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าผลิตกรดโคจิก 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)

ตารางที่ 14 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าว เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^7

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด ต่างของ อาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก(กรัมต่อ อาหารแข็งเปียก 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

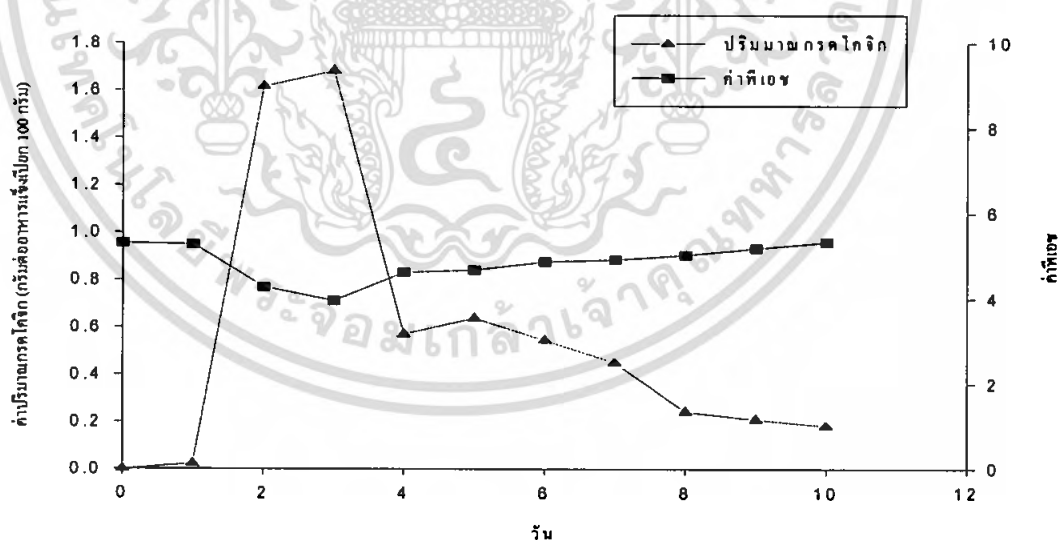


รูปที่ 11 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20 เมื่อจำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ 10^7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 15 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าว เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^6

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด ต่างของ อาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก(กรัมต่อ อาหารแข็งเปียก 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

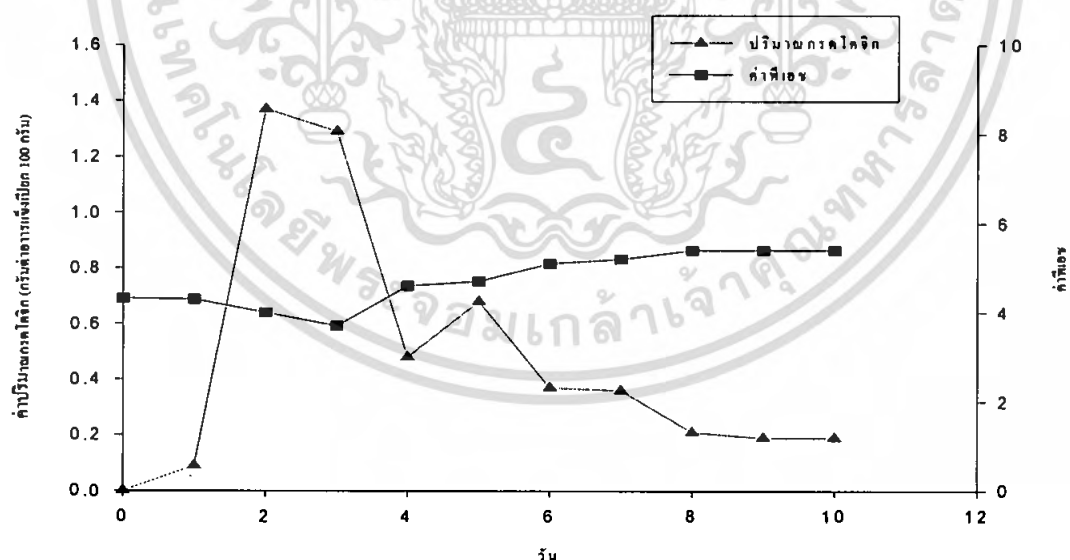


รูปที่ 12 กราฟแสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวที่อัตราส่วน 80 ต่อ 20 เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ 10^6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 16 แสดงปริมาณกรดโคจิกและค่าพีเอชของอาหารแข็งที่ใช้ปลายข้าวและรำข้าวเมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้น 10^8

ระยะเวลา (วัน)	ค่าความเป็นกรด ต่างของ อาหารแข็ง	ปริมาณกรดโคจิก(กรัมต่อ อาหารแข็งเปียก 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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ 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 โดยใช้เชื้อรา *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 พีเอช เริ่มต้น ความชื้นเริ่มต้น และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม เป็นต้น

บรรณานุกรม

- กิตติศักดิ์ แซ่จิว แกลทียา เสนีย์วงศ์ ณ. อุษยา และทัศนีย์ พินิจจรเฉา. 2537. ผลิตรกรดจิเบอเรลลิกด้วยการหมักในอาหารแข็งโดยเชื้อ *Gibberella fujikuroi*, ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ ฯ
- ทวีสิริ มาลาพันธุ์. 2546. ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aspergillus usarii* TISTR 3258 ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบอาหารแข็ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ณัฐดา พลแสน สุขมาส สุขโสม และสุภาภรณ์ ธีระรัมย์. 2548. การผลิตกรดโคจิกจากแป้งโดยเชื้อ *Aspergillus* sp. BR1 โครงการพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ดวงพร กันธิโชติ. 2530. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ ฯ : โอเดียนสโตร์.
- พรรณกร อิมขัฒมา. 2535. เชื้อราก่อโรคในคน. ภาควิชาพยาธิศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ ฯ : 148-151
- รพี โรจนอุไร. 2539. ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13ในระดับขวดเขย่า. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วรรณิ 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 นัยนาภกรณ์, สุกัญญา เจริญศิริชัยกุล และอรทัย เถลิงเกียรติลีลา. 2530. การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากกากเปลือกส้มโดยกระบวนการหมักในอาหารแข็งเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

- 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 Properties. 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 intermediates 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.

- 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 Woodward, 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 Hyperpigmentation 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 Akamatsu, 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.

ตารางที่ 17 แสดงปริมาณกรด โคจิกที่ได้จากปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่างๆ 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 ตัวอักษรต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความ

เชื่อมั่นร้อยละ 95

จากตารางที่ 14 เป็นผลจากการคำนวณค่าทางสถิติโดยแสดงปริมาณกรด โคจิกที่ผลิตได้โดยใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นที่แตกต่างกันซึ่งปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้มีความแตกต่างกันโดยมีนัยสำคัญ 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 จำนวนสปอร์มากเกินไปทำให้อาหารที่มีจำกัดไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จึง ทำให้เซลล์สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสลดลง จึงมีผลต่อการย่อยปลายข้าว ทำให้ปริมาณการผลิตกรดโคจิกลดลง และที่จำนวนสปอร์เริ่มต้นที่ 10^6 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัม มีปริมาณน้อยกว่าที่ 10^7 สปอร์ต่ออาหาร 1 กรัมจึงผลิตกรดโคจิกได้น้อยกว่า

- 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- producing 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 : Elsevier 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.
- Townsend, G.E. and Lindgren, A.A. 1953. Viable Yeast Count. *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 candidus* 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.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1 อาหาร PDA (Potato Dextrose Agar)

อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDA 39 กรัม ซึ่งประกอบด้วย

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

นำมันฝรั่งมาปอกเปลือก หั่นเป็นสี่เหลี่ยมลูกเต๋ารายขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มในน้ำกลั่น ปริมาณ 1000 มิลลิลิตร ต้มจนมันฝรั่งนิ่มเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองเอาน้ำใส เติมน้ำตาลเดกซ์โทรส และผงวุ้นที่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วลงไป ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์

ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิก ตามวิธีของ Bentley (1957)

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

สารเคมี

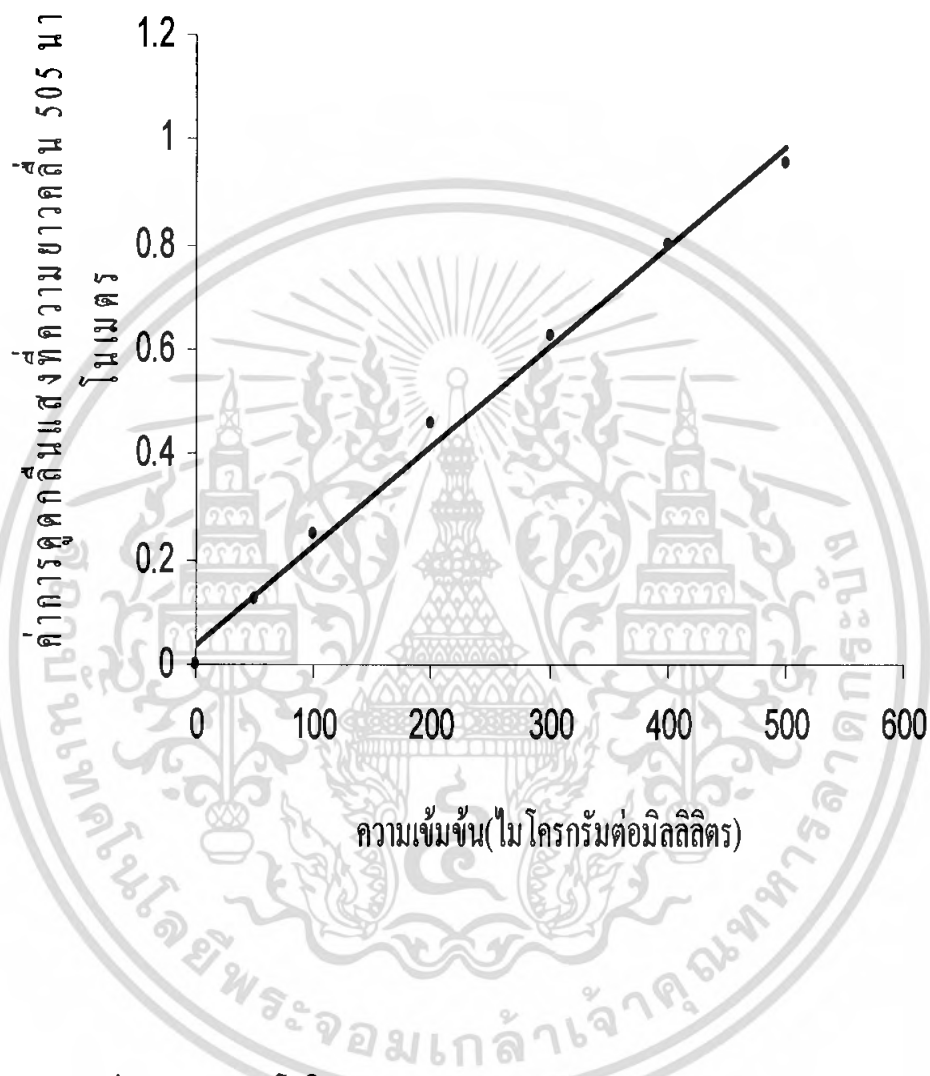
1. สารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์
ทำการละลายสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 1 กรัมด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 นอร์แมล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายกรดโคจิกมาตรฐาน
ทำการชั่งกรดโคจิกปริมาณ 0.05 กรัม จากนั้นนำมาทำการละลายในน้ำกลั่นและทำการปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานกรดโคจิกที่มีความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

- นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
- เติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองในข้อ 1 ผสมสารให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 นาที
- นำไปวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร
- ทำเบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นแทน และดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1-3
- นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดโคจิก
- นำสารละลายกรดโคจิกความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 50 100 200 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาวิเคราะห์โดยดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 1-3
- นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้และความเข้มข้นของกรดโคจิกมาเขียนกราฟมาตรฐานของกรดโคจิก
- การคำนวณปริมาณกรดโคจิก

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณกรดโคจิก} &= A_{505} \times \text{ความเจือจาง} \\ (\text{ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร}) &\quad \text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \end{aligned}$$



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานกรดโคจิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัตถุดิบ (กิตติศักดิ์และคณะ, 2537)

วิธีการ

1. ทำการอบด้วยหาคความชื้น (moisture can) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100-102 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งหาน้ำหนักถ้วยและฝา
2. นำตัวอย่างใส่ลงในถ้วยหาคความชื้นชั่งหาน้ำหนักทั้งหมด (น้ำหนักตัวอย่าง = น้ำหนักทั้งหมด - น้ำหนักถ้วยหาคความชื้น)
3. นำตัวอย่างในถ้วยหาคความชื้นไปอบที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส ตลอดคืน
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นใน โถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักนำค่าน้ำหนักของถ้วยหาคความชื้นมาหักออก ผลที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งของน้ำหนักตัวอย่าง
5. การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัตถุดิบ 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 บนซ้ายล่างซ้าย 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

ข.4 การวิเคราะห์ค่าพีเอช (กิตติศักดิ์และคณะ, 2537)

วัดค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแข็ง ทำได้โดยการชั่งอาหารแข็งในแต่ละสูตรให้ได้ปริมาณ 10 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมน้ำกลั่นลงไปปริมาณ 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



Duncan

สูตรอาหาร	จำนวนครั้งการทดลอง	ค่าความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์		
		1	2	3
ปลายข้าวหอมมะลิ	2	1.5400		
ต่อกากถั่วเหลือง				
ข้าวโพดต่อกากถั่ว	2	1.5700		
เหลือง				
ข้าวโพดต่อรำข้าว	2		2.5400	
ปลายข้าวหอมมะลิ				
ต่อรำข้าว	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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้