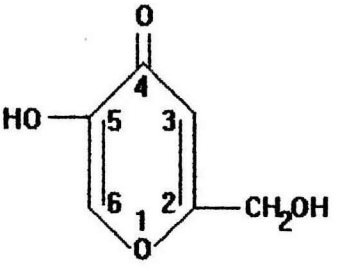
บทที่ 1
บทนำ

กรดโคจิก (kojic acid) มีสูตรทางเคมีคือ $C_6H_6O_4$ (Lokaj et. al. , 1991) มีชื่อทางเคมีหลายชื่อได้แก่ 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-γ-pyrone หรือ 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4H-pyran-4-one หรือ 2-hydroxymethyl-5-hydroxy-γ-pyrone หรือ 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4-pyrone (Beelik , 1956 ; Bajpai et. al. , 1982 ; Crueger and Crueger , 1990 ;)

มีการค้นพบกรดโคจิกครั้งแรกโดย Saito ในปี ค.ศ. 1907 โดยเขาสามารถแยกผลึกของกรดโคจิกได้จากสายใยของรา *Aspergills oryzae* ที่เติบโตบนข้าวนึ่ง (koji) และจำแนกกรดนี้ไว้ในกลุ่มกรดเบตารีโซซิลคาร์บอกซิลิก (β-resorcyl carboxylic acid) ต่อมาในปี ค.ศ. 1913 Yabuta นักเคมีชาวญี่ปุ่นได้ตั้งชื่อกรดนี้ว่ากรด "โคจิก" และอีก 12 ปีต่อมาคือในปี ค.ศ.1924 Yabuta ก็สามารถศึกษาจนทราบถึงโครงสร้างทั้งหมดของกรดนี้เป็นผลสำเร็จ โดยพบว่าองค์ประกอบที่สำคัญของกรดคือวงแกรมม่าไพโรน (γ-pyrone) ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างกรดโคจิก

สมบัติทางเคมีและกายภาพของกรดโคจิก

กรดโคจิกมีน้ำหนักโมเลกุล 142.11 ในกรด 1 โมเลกุลประกอบด้วยธาตุคาร์บอน 50.71 เปอร์เซนต์ ธาตุออกซิเจน 45.03 เปอร์เซนต์ และธาตุไฮโดรเจน 4.26 เปอร์เซนต์ (Merck , 1989) มีค่าการแตกตัวของกรด (pKa) เท่ากับ 7.90 - 8.03 หมู่ไฮดรอกซิลตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 (รูปที่ 1) มีผลทำให้กรดโคจิกมีสมบัติเป็นกรดอ่อน (Beelik , 1956) และจะเป็นตำแหน่งที่อิออนของโลหะต่างๆมาเกิดพันธะด้วยกลายเป็นเกลือของกรดดังกล่าว โดยโลหะที่สามารถทำปฏิกิริยากับกรดนี้ได้แก่ ทองแดง โซเดียม เหล็ก สังกะสี แคดเมียม แคลเซียม แบเรียมและอลูมิเนียม เป็นต้น (Bryant and Fernelius , 1954 ; Bajpai et. al. , 1982) นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมอนุพันธ์ของสารประกอบไฮดรอกซีได้จากกรดนี้ (Beelik, 1956) ส่วนสมบัติทางกายภาพของกรดโคจิกคือผลึกของกรดจะมีลักษณะเป็นรูปเข็มปลายแหลมทั้งด้านหัวและท้าย (prismatic needle) ใสไม่มีสี จุดหลอมเหลว 152 - 154 องศาเซลเซียส ละลายได้ดีในอะซีโตน เอทธานอล และน้ำ โดยที่อุณหภูมิสูงขึ้นการละลายของกรดโคจิกก็จะดีขึ้นด้วย เช่น ที่อุณภูมิ 20 องศาเซลเซียส กรดโคจิกจะมีค่าการละลายเท่ากับ 2.8 กรัมต่อน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กรดโคจิกจะมีค่าการละลายเพิ่มขึ้นเป็น 6.8 กรัมต่อน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร กรดโคจิกละลายได้เล็กน้อย ในอีเธอร์ เอทธิลอะซีเตต คลอโรฟอร์ม และไพริดีน (Yabuta , 1913 ; Morton et. al. ,1945 ; Beelik , 1956 ; Prescott and Dunn , 1959 ; Bajpai et. al. , 1982 ; Merck , 1989)

ประโยชน์ของกรดโคจิกและอนุพันธ์

กรดโคจิกใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางทั้งในทางการแพทย์ การเกษตร และอุตสาหกรรมต่างๆได้แก่

1. การแพทย์

ใช้เป็นยา เช่น 5-เมทธอกซี-2-ไฮดรอกซีเมทธิลแกรมม่าไพโรน (5-methoxy-2-hydroxymethyl-γ-pyrone) และ 5-เมทธอกซี-2-เมทธอกซีเมทธิลแกรมม่าไพโรน (5-methoxy-2-methoxymethyl-γ-pyrone) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของกรดโคจิกใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ (local anaesthetic) (Bhat and Hadi , 1994 ; Armit and Nolan , 1931)

กรดโคจิกสามารถลดระดับของรีแอคทีฟออกซิเจนสปีชีส์ [reactive oxygen species (ROS)] โดยจะไปรีดิวซ์ ROS ที่ร่างกายสร้างออกมาและเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อในร่างกาย ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) อนุมูลอิสระของซุปเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) และอนุมูลอิสระของไฮดรอกไซด์ (OH^-) ทำให้ไม่เกิดอนุมูลอิสระมากจนถึงขีดอันตรายต่อเนื้อเยื่อในร่างกาย (Halliwell and Gutteridge , 1984 ; Niwa and Akamatsu , 1991)

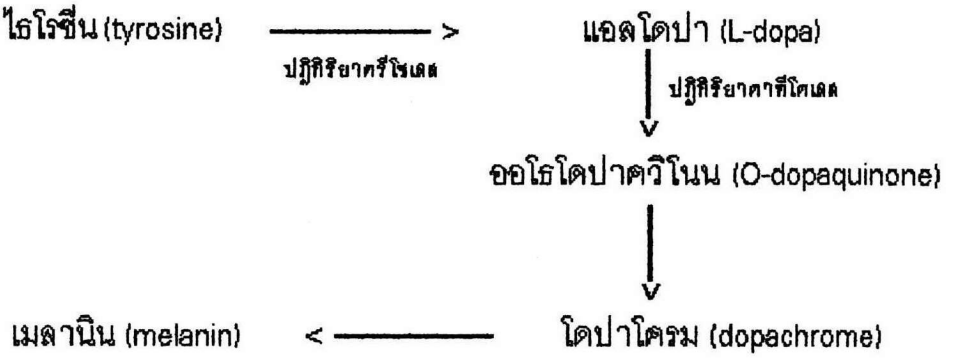
กรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด เช่น phenylmercurykojic acid p-hydroxy-phenylmercurykojic acid glucopyranosyl-α-O-2-methyl-5hydroxy-γ-pyrone และเกลือของกรดได้แก่ เกลือไอโอไดด์ เกลือโบรไมด์ และเกลือคลอไรด์ มีสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งการเจริญและ/หรือทำลายจุลินทรีย์และจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *Bacillus subtilis* *Bacillus mycoides* *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* *Klebsiella pneumoniae* *Pseudomonas aeruginosa* *Pseudomonas fischeri* *Mycobacterium phlei* *Mycobacterium smegma* *Brucella abortus* *Clostridium botulinum* *Pasteurella pestis* *Salnonella paratyphi* *Shigella disenteriae* (Morton et. al. , 1945 ; Kavanagh , 1947 ; Kotani et. al. , 1973 ; Obata et. al. , 1984 ; Bhatia et. al. , 1988 ; Nishimura et. al. , 1994)

กรดโคจิกส่งเสริมให้ระบบภูมิคุ้มกันดีเนื่องจากไปส่งเสริมการสะสมของแคลเซียมอิออน (Ca^{++}) ในนิวโทรฟิลด์ ทำให้นิวโทรฟิลด์มีประสิทธิภาพในการทำงานดี (Niwa and Akamatsu , 1991)

อะไซลอกซี-4-ไพโรน [(Acyloxy)-4-pyrones] ซึ่งเป็นอนุพันธ์หนึ่งของกรดโคจิกสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นิวโทรฟิวล์อีลาสเทสในร่างกายมนุษย์ซึ่งเอนไซม์นี้จะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารต่างๆที่เป็นปัจจัยในการก่อให้เกิดโรคไขข้ออักเสบ (rheumatoid arthritis) และกระตุ้นให้เกิดการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในร่างกาย (Miyano et. al. , 1988)

2. อุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์

นักวิทยาศาสตร์พบว่ากรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรดเช่น กรดฟอสฟาติดิลโคจิก (phosphatidyllkojic acid) กรด1,2-ไดปามิโตอิล-3-เอสเอ็น-ฟอสฟาติดิลโคจิก (1,2-dipamitoyl-3-sn-phosphatidylkojic acid) กรดโคจิก-5-ออโธ-แอลฟา-ดี-กลูโคไพรา-โนไซด์ (kojic acid-5-O-α-D-glucopyranoside) กรดโคจิก-7-ออโธ-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (kojic acid-7-O-α-D-glucopyranoside) สามารถยับยั้งขบวนการสร้างเมลานิน โดยกรดโคจิกหรืออนุพันธ์ของกรดจะไปยับยั้งปฏิกิริยาคาทีโคเลสของเอนไซม์ไธโรซิเนส (E.C.1.14.18.1) ทำให้แอลโดปา (L-dopa) ไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็นออโธโดปาควิโนน (O-dopaquinone) ขบวนการสร้างเมลานิน (รูปที่ 2) จึงถูกยับยั้งดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการนำกรดโคจิกหรืออนุพันธ์ของกรดไปเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางค์อย่างแพร่หลายเพื่อวัตถุประสงค์ ในการทำให้ผิวขาวนวล (Pomerantz , 1966 ; Cabanes et. al. ,1987; Tanaka et. al. , 1989 ; Niwa and Akamatsu , 1991 ; Kitoa and Sekine , 1994 ; Nishimura et. al. , 1994 ; Takami et. al. , 1994 ; Hassan et. al. , 1995 ; Kahn et. al. , 1995)



รูปที่ 2 กระบวนการสร้างเมลานินในร่างกายมนุษย์

(Pomerantz , 1966 ; Cabanes et.al. , 1987)

3. อุตสาหกรรมเคมี

กรดโคจิกใช้ในอุตสาหกรรมผลิตพลาสติกโดยกรดโคจิกเป็นส่วนประกอบที่ทำให้พลาสติกมีความยืดหยุ่นดี (Crueger and Crueger , 1990)

กรดโคจิกใช้เป็นส่วนประกอบในกระบวนการสังเคราะห์พอลิเมอร์ เพื่อใช้ผลิต ถังเก็บเชื้อเพลิง บ่อเก็บกักน้ำขนาดใหญ่ ตู้คอนเทนเนอร์ และวัสดุก่อสร้าง (McCulloch , 1961)

4. อุตสาหกรรมอาหาร

กรดโคจิกใช้ผสมลงในขั้นตอนการผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยวอบแห้ง เพื่อป้องกันการเกิดจุดสีน้ำตาลเนื่องจากเอนไซม์ไธโรซิเนสในเส้นก๋วยเตี๋ยวระหว่างรอจำหน่าย โดยใช้กรดโคจิกในอัตราส่วน 0.04 กรัมต่อแป้งสาลี 1 กิโลกรัม (Uchino et. al. , 1988)

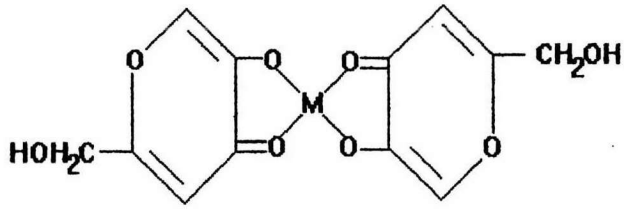
กรดโคจิกใช้เติมลงในเหล้าสาเกเพื่อไม่ให้เหล้าเปรี้ยวโดยกรดโคจิกมีสมบัติเป็นสารปฏิชีวนะทำลายแบคทีเรียที่ผลิตกรดจากแอลกอฮอล์ในเหล้าสาเก (Teramoto et. al. , 1953)

กรดโคจิกใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตมอลทอล เอทธิลมอลทอล และอัลโลมอลทอล ซึ่งเป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ของกรดโคจิก เพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารและใช้ถนอมอาหาร (Kwak and Rhee , 1992 ; Yabuta , 1923 ; Obata et. al. ,1984)

5. การเกษตร

คาร์โบเบนซอกซี-อะลานีน-โคเจต (Cabobenzoxy-Alanine-Kojate) คาร์โบเบนซอกซี-ลูซีน-อะลานีน-โคเจต (Carbobenzoxy-Leucine-Alanine-Kojate) และ คาร์โบเบนซอกซี-ฟีนิลอะลานีน-ไกลซีน-โคเจต (Carbobenzoxy-Phenylalanine-Glycine-Kojate) ซึ่งเป็นอนุพันธ์เปปไตด์ของกรดโคจิก มีสมบัติยับยั้งการเจริญของรา *Pythium graminicola* *Fusarium oxysporum* และ *Rhizoctonia solani* ซึ่งก่อโรค ต้นอ่อนไหม้ (seeding blight) โรคใบเหี่ยวจากฟูซาเรียม (fusarium wilt) และ ใบไหม้ (sheath blight) ตามลำดับ (Kayahara et. al. , 1990)

อนุพันธ์ที่เกิดจากกรดโคจิก 2 โมเลกุลกับโลหะหนัก (รูปที่ 3) เช่น ทองแดง และเหล็กสามารถทำลายราก่อโรคพืชได้ เช่น *Scerotina fructicola* *Venturia inaequalis* *Alternaria solani* และ *Phytophthora infestans* ซึ่งก่อโรค จุดเน่าสีน้ำตาล (brown rot) แผลเน่าของแอ็ปเปิ้ล (apple scab) โรคต้นไหม้ระยะต้น (early blight) และ โรคต้นไหม้ระยะหลัง (late blight) ตามลำดับ และข้อดีที่สำคัญของอนุพันธ์กรดโคจิกเหล่านี้ คือใช้สะดวกเนื่องจากละลายได้ดีในน้ำ ย่อยสลายอย่างรวดเร็วจึงไม่ตกค้างในระบบนิเวศน์และไม่เป็นอันตรายต่อต้นพืช (O'Kane and Morey , 1949)



รูปที่ 3 อนุพันธ์ที่เกิดจากกรดโคจิก 2 โมเลกุลกับโลหะหนัก
M คือตำแหน่งที่โลหะเข้าไปเกิดพันธะ

นอกจากนี้ Patrick (1990) ยังได้รายงานว่ากรดโคจิกและเอสเทอร์ของกรดโคจิกเมื่อรวมตัวกับสารฆ่าแมลงไพรีทรอยด์ และคาร์บาเมต จะทำให้ได้สารที่มีประสิทธิภาพสูงในการใช้เป็นยาฆ่าแมลง

การผลิตกรดโคจิก

การผลิตกรดโคจิกทำได้ทั้งวิธีทางเคมีและการผลิตโดยการหมักด้วยจุลินทรีย์ แต่วิธีที่นิยมใช้ในปัจจุบันคือการผลิตโดยจุลินทรีย์เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกในการผลิต ในขณะที่การผลิตโดยวิธีทางเคมีนั้นต้องใช้สารตั้งต้นที่มีราคาแพงคือ กลูโคส หรืออนุพันธ์ของกลูโคสเท่านั้น (Beelik , 1956 ; Stacey and Turton , 1946) และการผลิตระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบันจะผลิตโดยการหมักด้วยราในวงศ์ *Aspergillus* (อ้างถึงใน Prescott and Dunn , 1959 ; อ้างถึงใน Ariff et. al. , 1996) ตัวอย่างจุลินทรีย์และแหล่งคาร์บอนที่สามารถผลิตกรดโคจิกแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตกรดโคจิก

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
รา	
Aspergillus oryzae	Yabuta , 1912 ; Challenger et. al. , 1929 ; Tamiya , 1928 ; Katagiri and Kitahara , 1933 ; Stacey and Turton , 1946 ; Sakagushi et. al. , 1948 ; Ohara , 1951 ; Arnstein and bentley , 1951 ; Verona and Agelli , 1954 ; Bentley , 1957 ; Parrish et. al. , 1966 ; Ichishima et. al. , 1984 ; Ushijima et. al. , 1990 ; Kwak and Rhee , 1992 ; Ogawa et. al. , 1995
A. flavus	May et. al. , 1931 ; Hurd and Sims , 1949 ; Bentley , 1957 ; Heathcote et. al. , 1965 ; Parrish et. al. , 1966 ; Basappa et. al. , 1970 ; Gupta et. al. , 1971 ; Bajpai et. al. , 1982
A. sojae	Uchino et. al. , 1988 ; Ushijima et. al. , 1990
A. candidus	Yabuta , 1912 ; Tamiya and Hida , 1928
A. parasiticus	Parrish et. al. , 1966 ; Lin et. al. , 1976 ; Bajpai et. al. , 1982 ; Coupland and Niehaus , 1987
A. nidulans	Yabuta , 1912 ; Parrish et. al. , 1966
A. glaucus	Bajpai et. al. , 1982
A. luteovirescens	Morton et. al. , 1945
A. gymnosardae	Parrish et. al. , 1966

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตกรดโคจิก (ต่อ)

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
รา	
A. lutescens	Tamiya and Hida , 1930
A. tamarii	Bajpai et. al. , 1982
แบคทีเรีย	
Gluconoacetobactor roseus	Ikeda , 1954
Gluconobactor opacus	Sakagushi et. al. , 1948
กลุ่ม Acetic acid bacteria	Takahashi and Asia , 1933

ตารางที่ 2 แหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้ผลิตกรดโคจิก

แหล่งคาร์บอน	เอกสารอ้างอิง
ซูโครส	Katagiri and Kitahara , 1933 ; Ohara , 1954 ; Gupta et. al. , 1971 ; Lin et. al. , 1976 ; Bajpai et. al. , 1982 ; Ichishima et. al. , 1984
กลูโคส	Challenger et. al. , 1929 ; Hurd and Sims , 1949 ; Bentley ,1957 ; Parrish et. al. , 1966 ; Basappa et. al. , 1970 ; Gupta et. al. , 1971 ; Bajpai et. al. , 1982 ; Coupland and Niehaus , 1987 ; Ogawa et. al. , 1995
ไซโลส	Challenger et. al. , 1929 ; Ohara , 1954 ; Basappa et. al. , 1970
เอทธานอล	Sakagushi et. al. , 1948 ; Ohara , 1954 ; Basappa et. al. , 1970

ตารางที่ 2 แหล่งคาร์บอนที่สามารถใช้ผลิตกรดโคจิก (ต่อ)

แหล่งคาร์บอน	เอกสารอ้างอิง
อะราบิโนส	Challenger et. al. , 1929 ; Ohara , 1954
ฟรุคโตส	Takahashi and Asia , 1933 ; Ohara , 1954 ; Ikeda , 1954
ไดไฮดรอกซีอะซีโตน	Katagiri and Kitahara , 1933
แลคโตส	Ohara , 1954
มอลโตส	Katagiri and Kitahara , 1933 ; Ohara , 1954
กลีเซอรอล	Sakagushi et. al. , 1948
กาแลคโตส	Sakagushi et. al. , 198 ; Ohara , 1954
แมนนิทอล	Tamiya , 1928 ; Takahashi and Asia , 1933

สิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด

เนื่องจากกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรดมีประโยชน์มากมายดังกล่าวข้างต้น จึงมีผู้สนใจทำการวิจัยเกี่ยวกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรดซึ่งมีคุณค่าและขึ้นทะเบียนสิทธิบัตรไว้ ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างสิทธิบัตรเกี่ยวกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด

ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
O'Kane และ Morey (1949)	US 2,460,188	Fungicidal compositions
McCulloch (1961)	US 2,986,553	Polyurethane chelates from kojic acid

ตารางที่ 3 ตัวอย่างสิทธิบัตรเกี่ยวกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด (ต่อ)

ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
Sumiyoshi และ Tokio (1981)	US 4,278,656	Cosmetic composition containing kojic acid ester
Sumiyoshi และ Tokio (1983)	US 4,369,174	Cosmetic composition containing kojic acid ester
Arther และ Masateru (1986)	US 4,603,144	Kojic acid ether-ester derivatives
Miyano และ Robert (1987)	US 4,644,071	Arakoxy and aryloxyalkoxy kojic acid derivatives
Kazumi (1987)	US 4,689,039	Electrotherapeutic apparatus for iontophoresis
Yoshitaka (1987)	US 4,696,813	Melanin inhibiting cosmetic composition
Miyano และ Robert (1987)	US 4,705,871	Aralkoxy and aryloxyalkoxy kojic acid derivatives
Arther และ Masateru (1988)	US 4,735,964	Kojic acid ether-ester derivatives
Kazumi (1988)	US 4,786,278	Therapeutic device for iontophoresing cation and anion
Arther และ Masateru (1989)	US 4,812,474	Kojic acid ether-ester derivatives

ตารางที่ 3 ตัวอย่างสิทธิบัตรเกี่ยวกับกรดโคจิกและอนุพันธ์ของกรด (ต่อ)

ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
Miyano และ Robert (1989)	US 4,812,584	Aralkoxy and aryoxyalkoxy kojic acid derivatives
Shinkichi และ Kazuo (1989)	US 4,847,074	Whitening cosmetic
Shinkichi (1990)	US 4,891,361	Method of minimizing erythema and elastosis
Shinkichi (1990)	US 4,919,921	Compositions for topical use having melanin synthesis inhibiting activity
Kenichi (1990)	US 4,948,577	Composition for external application
Patrick (1990)	US 4,956,353	Kojic acid and esters as insecticide synergists
Yoshitaka (1991)	US 4,985,255	External preparations of melanogenesis-inhibitory agent
Masahiro (1991)	US 4,985,455	External preparations free of discoloration
Shinji (1991)	US 4,990,532	External preparations

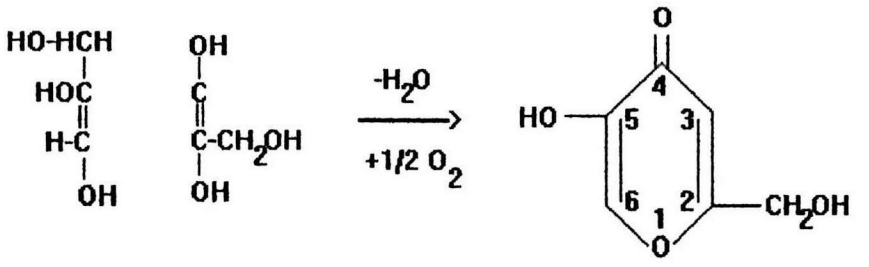
กระบวนการชีวสังเคราะห์ของกรดโคจิก

ตั้งแต่มีการค้นพบกรดโคจิกเป็นครั้งแรกในปีค.ศ. 1914 เป็นต้นมาจนถึงปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ได้พยายามที่จะศึกษาถึงวิถีการผลิตของกรดนี้และได้เสนอทฤษฎีต่างๆ ดังต่อไปนี้

Traetta - Mosca (1914) เสนอว่าการผลิตกรดโคจิกเป็นกระบวนการแรกที่เกิดขึ้นในวิถีการผลิตอัลกอฮอล์จากการหมักน้ำตาลแต่ในขณะนั้นยังไม่ทราบถึงโครงสร้างของกรดนี้จึงทำให้ข้อเสนอนี้ไม่เป็นที่ยอมรับ แต่ภายหลังจากที่ Yabuta (1924) ได้ศึกษาและทราบถึงโครงสร้างของกรดดังกล่าวแล้วนักวิทยาศาสตร์จึงศึกษาถึงวิถีการสร้างกรดโคจิกอย่างจริงจังและเสนอแบบแผนของวิถีการผลิตกรดโคจิกซึ่งสามารถแบ่งได้ เป็น 3 แบบแผน คือ

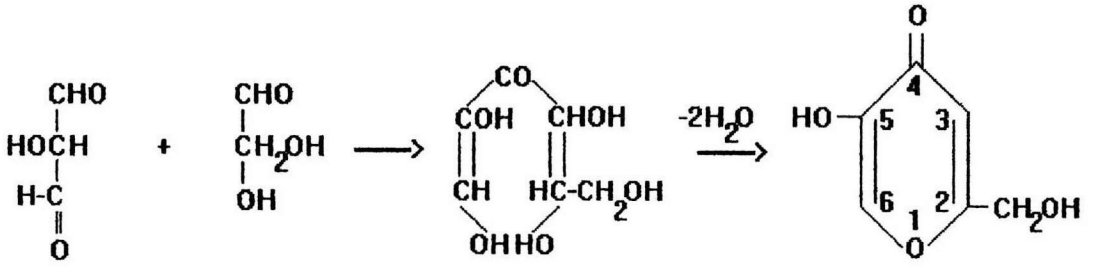
1. แบบแผนที่เสนอว่ากรดโคจิกเกิดจากสารตัวกลางที่ประกอบด้วยคาร์บอน 3 อะตอมใน 1 โมเลกุล (Traetta-Mosca and Preti , 1921 ; Challenger et. al. , 1929 ; Birkinshaw et. al. , 1931 ; May et. al. , 1931 ; Corbellini and Gregorini , 1933 ; Katagiri and Kitahara , 1933)

แบบแผนนี้กล่าวว่าไม่ว่าจะใช้แหล่งคาร์บอนใดก็ตามเป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตกรดโคจิก ราจะใช้แหล่งคาร์บอนนั้นๆเพื่อสร้างสารตัวกลางที่ใน 1 โมเลกุล ประกอบด้วยคาร์บอน 3 อะตอม ซึ่งได้แก่ ไดไฮดรอกซีอะซีโตน (dihydroxyacetone) กลีเซอรัลดีไฮด์ (glyceraldehyde) และ กลีเซอริกไดอัลดีไฮด์ (glyceric dialdehyde) หลังจากนั้นสารตัวกลางจะรวมตัวกันกลายเป็นกรดโคจิกดังแสดงในรูปที่ 4 และ 5



ไดไฮดรอกซีอะซีโตน กรดโคจิก

รูปที่ 4 แบบแผนการเกิดกรดโคจิกจากไดไฮดรอกซีอะซีโตน



กลีเซอริกไดอัลดีไฮด์ กลีเซอรอลดีไฮด์ อะไซคลิกโพลีคีโตน กรดโคจิก

รูปที่ 5 แบบแผนการเกิดกรดโคจิกจากกลีเซอริกไดอัลดีไฮด์และกลีเซอรอลดีไฮด์

2. แบบแผนที่เสนอว่ากรดโคจิกเกิดจากสารคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่

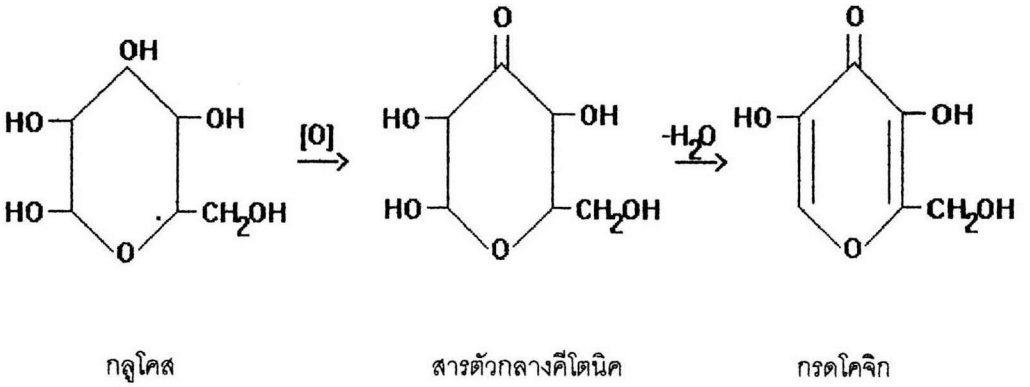
(Tamiya , 1928 ; Birkinshaew et. al. , 1931 ; May et. al. , 1931)

แบบแผนนี้กล่าวว่าไม่ว่าจะใช้แหล่งคาร์บอนใดเป็นสารตั้งต้นผลิตกรดโคจิก ราจะใช้แหล่งคาร์บอนนั้นๆสร้างเป็นสารคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ขึ้นมาก่อน หลังจากนั้นราจะย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตนั้นให้กลายเป็นกลูโคสเพื่อใช้ในการผลิตกรดโคจิก แต่แบบแผนนี้ถูกล้มล้างโดย Gould ในปีค.ศ. 1938 ซึ่ง Gould ได้ทดลองเลี้ยงรา *A. tamarii* จากแหล่งคาร์บอนต่างๆที่มีรายงานว่าสามารถผลิตกรดโคจิกได้ หลังจากนั้น

นำเส้นใยรามาทำให้แห้งแล้วบดให้ละเอียดเพื่อนำไปใช้แทนแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก ผลปรากฏว่าไม่มีการผลิตกรดโคจิกขึ้น เขาจึงได้ข้อสรุปว่าราไม่ได้สร้างสารคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ขึ้นมาสำหรับใช้ผลิตกรดโคจิก

3. แบบแผนที่เสนอว่ากรดโคจิกเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยตรงมาจากกลูโคส (Yabuta , 1923 ; Kinoshita , 1927 ; Tamiya , 1928 ; Harworth , 1929 ; Gould , 1938)

แบบแผนนี้กล่าวว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนตั้งต้นเพื่อผลิตกรดโคจิก ราจะผลิตกรดดังกล่าวจากกลูโคสโดยตรงโดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและดีไฮเดรชั่นโดยไม่มีการแตกวงของกลูโคสดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แบบแผนการเกิดกรดโคจิกจากน้ำตาลกลูโคสโดยตรง

จากที่กล่าวมาทั้งหมด 3 แบบแผน จะเห็นได้ว่าแบบแผนที่ 1 และ 3 ต่างก็มีความเป็นไปได้สำหรับการผลิตกรดโคจิก แต่นักวิทยาศาสตร์ก็ไม่สามารถชี้ชัดลงไปได้ว่าทฤษฎีใดถูกต้องที่สุดหรือน่าเชื่อถือมากที่สุด จนกระทั่งปีค.ศ. 1951 Arnstein และ Bentley ได้ศึกษาวิถีการผลิตกรดโคจิกจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ โดยการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นคาร์บอนไอโซโทป (^{14}C) แทนคาร์บอนปกติ (^{12}C) แล้วศึกษาการ

แพร่กระจายของคาร์บอนไอโซโทปในโมเลกุลของกรดโคจิก ทำให้เขาได้ข้อสรุปออกมา 3 ข้อซึ่งเป็นที่ยอมรับมากที่สุดจนถึงปัจจุบัน คือ

1.วิถีหลักของการผลิตกรดโคจิกคือเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยตรงมาจากน้ำตาลกลูโคสโดยไม่มีการแตกวงของสายคาร์บอนในโมเลกุลของกลูโคส ซึ่งเป็นแบบแผนเดียวกับแบบแผนที่ 3 (รูปที่ 6)

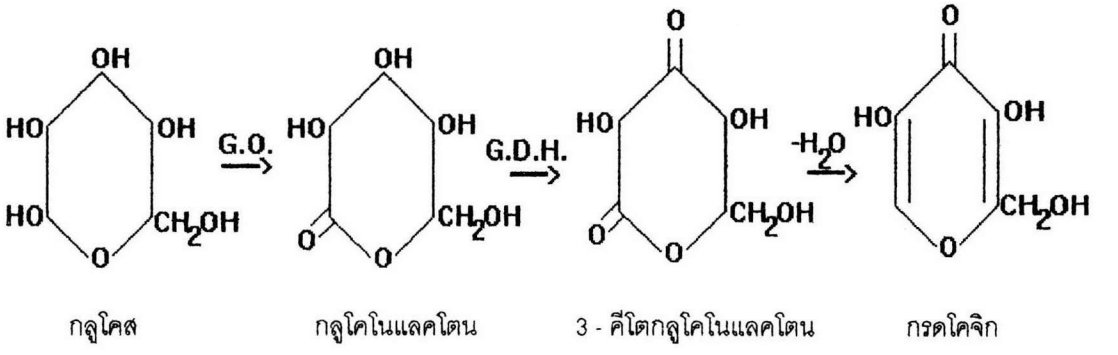
2.นอกจากวิถีที่ 1 แล้วกรดโคจิกสามารถสร้างได้จากวิถีอื่น โดยสร้างจากสารตัวกลางที่ประกอบด้วยคาร์บอน 3 อะตอมใน 1 โมเลกุลคือไดไฮดรอกซีอะซีโตน และกลีเซอรัลดีไฮด์ โดยเอนไซม์ที่สำคัญคือ อัลโดเลส และไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส ซึ่งเอนไซม์อัลโดเลส จะเร่งปฏิกิริยาการผลิตไดไฮดรอกซีอะซีโตนและกลีเซอรอลดีไฮด์ ส่วนเอนไซม์ไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรสจะเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดความสมดุลย์ของสารตัวกลาง 2 ชนิดนี้โดยที่สมดุลย์จะมีปริมาณของไดไฮดรอกซีอะซีโตน 95 เปอร์เซนต์ และกลีเซอรอลดีไฮด์ 5 เปอร์เซนต์ หลังจากนั้นไดไฮดรอกซีอะซีโตนก็จะรวมตัวกันกลายเป็นกรดโคจิก

3. กรณีที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนโมเลกุลเล็กๆ ราจะใช้แหล่งคาร์บอนนั้นๆผ่านวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิกหรือไดคาร์บอกซิลิกเพื่อผลิตสารตัวกลางที่ประกอบด้วยคาร์บอน 3 อะตอมใน 1 โมเลกุล หลังจากนั้นสารตัวกลางที่เกิดขึ้นจะรวมตัวกันกลายเป็นกรดโคจิก

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นได้ว่ากรดโคจิกสามารถผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนหลายชนิด โดยมีแบบแผนการผลิตแตกต่างกันไปตามชนิดของสารตั้งต้น แต่อย่างไรก็ตามวิถีที่สำคัญต่อการผลิตกรดโคจิกมากที่สุดคือ เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยตรงมาจากกลูโคส ซึ่ง Arnstein และ Bentley ไม่ได้ศึกษาถึงเอนไซม์ต่างๆที่เกี่ยวข้อง

ต่อมาในปีค.ศ. 1978 Bajpai ได้ทำการวิจัยเพื่อการศึกษาในระดับปริญญาดุษฎีบัณฑิตในหัวข้อเรื่องการศึกษาชีวสังเคราะห์ของกรดโคจิกเขาตรวจพบเอนไซม์ เฮกโซไคเนส (hexokinase) กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 6-ฟอสโฟกลูโคนิกแอซิดดีไฮโดรจีเนส (6-phospho-gluconic acid -

dehydrogenase) กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) กลูโคสดีไฮโดรจีเนส (glucose dehydrogenase) และ กลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส (gluconate dehydrogenase) จากสายใยของรา *Aspergillus flavus* ที่มีความสามารถผลิตกรดโคจิก และพบว่าในขณะที่รามีการผลิตกรดโคจิกสูงจะตรวจพบปริมาณเอนไซม์ กลูโคสดีไฮโดรจีเนส และ กลูโคเนตออกซิเดสสูงมาก ทำให้เขาเสนอแบบแผนการผลิตกรดโคจิกดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 การสังเคราะห์กรดโคจิกจากการเสนอของ Bajpai

G.O. = กลูโคสออกซิเดส , G.D.H. = กลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส

การเก็บเกี่ยวผลผลิตกรดโคจิก

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดโคจิกแล้ว จะทำการแยกกรดโคจิกที่อยู่ในน้ำหมัก ซึ่งอาจอยู่ในรูปสารละลายหรืออาจมีผลึกของกรดปนอยู่ด้วย โดยนำน้ำหมักมาทำการกรองแยกสายใยแล้วทำการแยก ซึ่งทำได้หลายวิธีดังนี้ (Bajpai et. al. , 1982 ; Beelik , 1956 ; Yabuta , 1913)

1. ตกตะกอนในรูปเกลือทองแดง
2. สกัดด้วยเอทธิลอะซีเตต
3. สกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้อีเธอร์
4. ตกผลึกโดยลดปริมาตรน้ำหมัก
5. ตกผลึกที่อุณหภูมิเยือกแข็งของน้ำ (0 องศาเซลเซียส)
6. ใช้ผงถ่านดูดซับแล้วชะด้วยบิวทิลอะซีเตตที่อิ่มตัวด้วยแอมโมเนียแห้ง

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิก

1. ชนิดของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดโคจิกได้มีทั้งราและแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นการคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์ให้มีสมบัติเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมจะต้องมีความสามารถในการผลิตกรดโคจิกสูง ให้ผลผลิตสม่ำเสมอ ไม่กลายพันธ์ง่าย โดยในระดับอุตสาหกรรมจะใช้การผลิตโดยหมักด้วยรา (Prescott and Dunn , 1959 ; อ้างถึงใน Ariff et. al. , 1996) ซึ่งราที่นิยมใช้ได้แก่ *A. oryzae* (อ้างถึงใน Kwak and Rhee , 1992 ; อ้างถึงใน Ogawa et. al. , 1995)

2. แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตกรดโคจิก ซึ่งต้องคำนึงถึงชนิดและปริมาณที่ทำให้ได้ผลผลิตกรดสูงสุด ใช้เวลาในการผลิตสั้น และมีราคาถูกเพื่อลดต้นทุนการผลิต แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิกได้มีหลายชนิดดังกล่าวข้างต้น โดยเฉพาะกลูโคสและซูโครสจะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูง (Bajpai et. al. , 1982 ;

Ichishima et. al. , 1984 ; Ogawa et. al. , 1995) ในขณะที่ซูโครสจะมีราคาต่ำกว่ากลูโคสมาก นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้วยังต้องพิจารณาถึงปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนอีกด้วย โดยปกติความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* มีค่าประมาณ 100 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Kwak and Rhee , 1992 ; Ogawa , 1995) ส่วนความเข้มข้นของซูโครสที่ใช้ผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus flavus* จะมีค่าประมาณ 200 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Lin et. al. , 1976 ; Bajpai et. al. , 1982) สำหรับแหล่งคาร์บอนอื่นที่มีรายงานว่าสามารถผลิตกรดโคจิกได้แสดงไว้ในตารางที่ 2 ดังกล่าวข้างต้น

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าการพิจารณาเลือกใช้แหล่งคาร์ บอนที่หาง่าย มีตลอดทั้งปี ราคาถูก และให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงจึงมีความสำคัญยิ่งต่อการผลิตในระดับการค้าเพื่อให้ต้นทุนต่ำที่สุด

3. แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญเพื่อการเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ของรา ซึ่งราโดยทั่วไปสามารถใช้ได้ทั้งสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์ของไนโตรเจน แหล่งไนโตรเจนที่สามารถใช้ในการผลิตกรดโคจิกมีหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แหล่งไนโตรเจนที่สามารถใช้ผลิตกรดโคจิก

แหล่งไนโตรเจน	เอกสารอ้างอิง
NH_4NO_3	Challenger et. al. , 1929 ; May et. al. , 1931 ; Kwak and Rhee , 1992
peptone	Coupland and Niehaus , 1987
$(NH_4)_2SO_4$	May et. al. , 1931 ; Coupland and Niehaus , 1987

ตารางที่ 4 แหล่งไนโตรเจนที่สามารถใช้ผลิตกรดโคจิก (ต่อ)

แหล่งไนโตรเจน	เอกสารอ้างอิง
Yeast extract	Gupta et. al. , 1971 ; Bajpai et. al. , 1982 ; Kwak and Rhee , 1992 ; Ogawa et. al. , 1995
$NaNO_3$	May et. al. , 1931
$(NH_4)_2HPO_4$	May et. al. , 1931
arginine	Coupland and Niehaus , 1987
glycine	Coupland and Niehaus , 1987

แหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูง ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมไนเตรต และแอมโมเนียมซัลเฟต นอกจากชนิดแล้วปริมาณของไนโตรเจนที่ใช้ก็มีผลต่อการผลิตกรดโคจิก โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดควรมีแหล่งไนโตรเจนเพียงพอต่อการเติบโตแต่ต้องไม่มากเกินไป เนื่องจากถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณไนโตรเจนมากจะทำให้รามีการเติบโตมากมีผลทำให้การผลิตกรดโคจิกลดลง (Coupland and Niehaus , 1987 ; Kwak and Rhee , 1992 ; Ogawa et. al. , 1995 ; May et. al. , 1931) Bentley (1957) พบว่าสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตรเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* เมื่อใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับการเติบโตของรา (อ้างถึงใน Prescott และ Dunn , 1959) Kwak และ Rhee (1992) รายงานว่าการใช้ yeast extract 0.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 0.75 กรัมต่อลิตรจะมีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา

Aspergillus oryzae เมื่อใช้กลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ Ariff และคณะ (1996) ทำการทดลองพบว่าถ้าให้สารสกัดจากยีสต์ในช่วงที่มีการผลิตกรดโคจิก จะทำให้มีการเติบโตเพิ่มขึ้นแต่การผลิตและสะสมกรดโคจิกจะลดลง

4. แร่ธาตุ

การผลิตและสะสมกรดโคจิกของรานั้น ชนิดและปริมาณของเกลืออินทรีย์และโลหะธาตุจะมีผลกระทบต่อการผลิต (Prescott และ Dunn , 1959) ดังนั้นแร่ธาตุจึงเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงโดยมีรายงานว่าฟอสเฟตจะส่งเสริมให้การเติบโตของสายใยดีมีผลทำให้ผลผลิตกรดโคจิกสูง (Bajpai และคณะ , 1982) Sakagushi และคณะ (1948) พบว่าโซเดียมแลคเตต และโซเดียมอาซีเนตจะยับยั้งการผลิตกรดโคจิกของรา *Aspergillus oryzae* เนื่องจากไปยับยั้งขบวนการฟอสโฟรีเลชั่นของเซลล์ Kitada และ Fukimbara (1970) พบว่าโซเดียมฟลูออไรด์ ความเข้มข้น 0.0005 โมลาร์ โมโนไอโอโดอะซีติกความเข้มข้น 0.0005 โมลาร์ โซเดียมอาซีเนตความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ มาโลเนตความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ โพแทสเซียมไซยาไนด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์และโซเดียมซัลไฟต์ความเข้มข้น 0.001 โมลาร์เป็นสารยับยั้งขบวนการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* โดยจะไปยับยั้งขบวนการนำกลูโคสไปใช้ของเซลล์ Tamiya (1928) รายงานว่า เกลือของกรดอิสระ เช่นเกลือซิเตรตและเกลือออกซาเลตจะเร่งการเติบโตของรามีผลทำให้ผลผลิตกรดโคจิกสูง Couplan and Niehaus (1987) พบว่าโซเดียมคลอไรด์ และโซเดียมออกซาโลอะซีเตตที่ความเข้มข้น 600 มิลลิโมลและ 200 มิลลิโมลตามลำดับจะยับยั้งการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* โดยไปยับยั้งการเติบโตของรา

5. ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ช่วงของความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกมีค่าประมาณ 2 - 5 และมีรายงานว่าถ้าเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกจะมีผลทำให้การผลิตกรดโคจิกโดยราลดลงเนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ลดลงเนื่องจากแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารบัฟเฟอร์ (Prescott และ Dunn , 1959) นอกจากนี้ Katgiri และ Kitahara (1933) รายงานว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเติบโตของรา *A. oryzae* คือ 5 แต่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 2.4 Barham and Smiths (1936) พบว่าช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกจากน้ำตาลไซโลสโดยรา *A. oryzae* มีค่าระหว่าง 2 - 3.5 จะเห็นได้ว่าช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกมีค่าต่ำ ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นต้องใส่สารบัฟเฟอร์ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตในขั้นนี้ไปได้และทำให้การผลิตง่ายขึ้น

6. อุณหภูมิ

ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักเพื่อผลิตกรดโคจิกจะอยู่ในช่วง 29 - 35 องศาเซลเซียส (Prescott และ Dunn , 1959) นอกจากนี้ Katgiri และ Kitahara (1933) ทดลองผลิตกรดโคจิกโดยรา *A. oryzae* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะต่อการผลิตจะอยู่ในช่วง 29-31 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่มีรายงานจากหลายการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 30 องศาเซลเซียส (May et. al. , 1931 ; Bajpai et. al. , 1982 ; Kwak and Rhee , 1992 ; Ogawa et. al. , 1995)

7. ปริมาณออกซิเจน

ในกระบวนการผลิตกรดโคจิกโดยการหมักด้วยรา มีความต้องการออกซิเจนเนื่องจากเป็นกระบวนการหมักแบบใช้อากาศและที่สำคัญคือเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนสและเอนไซม์กลูโคเนตดีไฮโดรจีเนสมีออกซิเจนเป็นตัวกระตุ้นให้สร้าง

เอนไซม์ 2 ชนิดนี้ (Ariff et. al. , 1996) ดังนั้นปริมาณออกซิเจนจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่จะต้องพิจารณา May และคณะ (1931) ทดลองผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่าและแปรผันอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในช่วง 0.22 : 1 - 1 : 1 พบว่าค่าอัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 0.5 : 1 Kwak และ Rhee (1992) ทดลองผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่า พบว่าถ้าใช้ขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตรควรใส่ปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ 120 มิลลิลิตร และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีจะมีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก นอกจากนี้ Ariff และคณะ (1996) ทดลองผลิตกรดโคจิกในถังหมักขนาด 2 ลิตรซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1.35 ลิตรพบว่าถ้าให้อัตราการกวนเท่ากับ 600 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อนาทีจะมีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus Flavus* ในอาหารที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

8. ขนาดของหัวเชื้อ

ขนาดของหัวเชื้อโดยทั่วไปที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกที่นักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาและวิจัยพบว่าปริมาณที่เหมาะสมของหัวเชื้อจะมีค่าประมาณ 10^5 - 10^6 สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร (Bajpai et. al. , 1982 ; Lin et. al. , 1976 ; Ogawa et. al. , 1995)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก

May และคณะ (1931) ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่าโดยรา *A. flavus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์ (Modified Czapex-dox) ที่มีกลูโคสเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วแปรผันปริมาณไนโตรเจน พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ แอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 2.25 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส ใช้เวลาผลิต 12-17 วัน ให้ผลผลิตกรดประมาณ 170 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Katagiri และ Kitahara (1933) ทดลองผลิตกรดโคจิกโดยรา *A. oryzae* โดยทำการหมักแบบผิวหน้าอาหารเหลว (surface culture) พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 2.1 และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าเท่ากับ 6.0 จะไม่มีการผลิตกรดโคจิก

Takahashi และ Asia (1933) ทดลองผลิตกรดโคจิกจากจุลินทรีย์ในกลุ่มอะซีติกแอซิดแบคทีเรียในระดับขวดเขย่า โดยใช้แมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าต้องเติมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกด้วยเพื่อรักษาระดับความเป็นกรด-ด่างให้คงที่อยู่ในช่วง 6.95 - 7.54 ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยแบคทีเรียกลุ่มนี้

Sakagushi และคณะ (1948) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยรา *A. oryzae* จากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส กาแลคโตส และกลีเซอรอล พบว่าถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกมี โมโนไอโอโดอะซีเตต โซเดียมอาซีเนต โซเดียมอาซีไนต์ หรือ โซเดียมฟลูออไรด์ จะทำให้ผลผลิตกรดโคจิกลดลงเนื่องจากสารเหล่านี้จะไปยับยั้งขบวนการฟอสโฟรีเลชั่นของเซลล์

Basappa และคณะ (1970) ผลิตกรดโคจิกโดยรา *A. flavus* ในอาหารซาเพ็กซ์ดอกซ์เคซีนไทอามีน (Czapex-Dox-casine-thiamine) ที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการหมักแบบผิวหน้าอาหารเหลว พบว่าการผลิตกรดโคจิกจะขึ้นกับอุณหภูมิที่ใช้หมัก ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6-7 และอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4 : 1 จะเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตกรดโคจิก โดยจะให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 0.17 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อในวันที่ 5 ของการผลิต

Kitada และ Fukimbara (1970) ศึกษาผลกระทบของสารต่างๆที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *A. oryzae* เมื่อใช้กลูโคสปริมาณ 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าโซเดียมฟลูออไรด์ความเข้มข้น 0.0005 โมลาร์ โมโนไอโอโดอะซีติกความเข้มข้น 0.0005 โมลาร์ โซเดียมอาซีเนตความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ มาโลเนตความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ โปตัสเซียมไซยาไนด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ โซเดียมเอไซด์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ไดไนโตรฟีนอลความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ เพนตะคลอโรฟีนอลความเข้มข้น 0.001 โมลาร์จะยับยั้งการนำกลูโคสไปใช้ ทำให้การผลิตกรดโคจิกถูกยับยั้ง

Lin และคณะ (1976) ทดลองผลิตกรดโคจิกโดยรา *A. parasiticus* UNBFA 12 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครส ซึ่งมีซูโครสปริมาณ 200 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและทดลองแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 3.0 - 8.2 พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 4.5 จะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด คือ 23.23 กรัมต่อลิตร ในเวลา 7 วัน

Bajpai และคณะ (1982) ศึกษาการผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำของรา *A. oryzae* โดยทำการผลิต 2 ซ้ำ เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครส ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 และทำการผลิตแบบผิวหน้าในขวดขนาด 250 มิลลิลิตรที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 50 มิลลิลิตร แล้วแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน 2 ชนิดคือ กลูโคสและซูโครส 200 กรัมต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน พบว่าน้ำตาลทั้ง 2 ชนิด ให้ผลผลิตกรดโคจิกใกล้เคียงกันคือประมาณ 81.5 กรัมต่อลิตรในซ้ำแรก และพบว่าหลังจากถ่ายสายใยไปเพาะเลี้ยงในอาหารใหม่พบว่าผลผลิตยังคงสูงเท่าเดิมคือประมาณ 80 กรัมต่อลิตรในซ้ำที่สอง

Coupland และ Niehaus (1987) ศึกษาผลของไนโตรเจน สังกะสี และเกลือแกง ต่อการผลิตกรดโคจิกและเวอซิคัลเลอรินซึ่งเป็นสารจำพวกโพลีคีไตด์โดย *A. parasiticus* ในระดับขวดเขย่าโดยใช้กลูโคสปริมาณ 36 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 10^6 สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน ได้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 8.53 กรัมต่อลิตร พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ เปปโตน 2 กรัมต่อลิตร ส่วนความเข้มข้นของสังกะสีอิออน และเหล็กอิออนไม่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิกแต่เกลือแกงและกรดโซเดียมออกซาโลอะซีติกที่ความเข้มข้น 0.8 และ 0.05 โมลต่อลิตร จะยับยั้งการเติบโตของราทำ ให้การผลิตกรดโคจิกลดลง

Kwak และ Rhee (1992a) ทำการทดลองผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่าโดยรา *A. oryzae* ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนมีสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.75 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนรวมกัน ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 6.0 ด้วย 3 *N* NaOH ใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 120 มิลลิลิตรในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร ใช้ขนาดปริมาตรหัวเชื้อสปอร์ตรึงต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดเท่ากับ 1 : 3 (ปริมาตรต่อปริมาตร) หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็วในการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ใช้เวลาเพาะเลี้ยงประมาณ 23 วัน ได้ผลผลิตกรด 83 กรัมต่อลิตร กรดโคจิกก็จะเริ่มตกตะกอนลงมา หลังจากนั้นจะนำเซลล์ตรึงไปถ่ายใส่อาหารเลี้ยงเชื้อในขวดทดลองใหม่ พบว่าใน 2 กะแรกเชื้อจะผลิตกรดโคจิกได้สูง คือประมาณ 80 กรัมต่อลิตรและจะลดลงหลังหลังจากวันที่ 12 ในกะที่ 3 โดยได้ผลผลิตกรด 70 กรัมต่อลิตร เนื่องจากมีการสลายตัวของโครงสร้างเจลบริเวณศูนย์กลางของเม็ดเจลซึ่งล้อมสายใยราไว้ ทำให้ไม่สามารถตรึงเซลล์ของราไว้ได้

Kwak และ Rhee (1992b) ผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่าโดยรา *A. oryzae* ที่ตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน 100 กรัมต่อลิตรมีสารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกัน ใช้หัวเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 5 x 10^4 สปอร์ต่อสารละลายอัลจิเนตปริมาตร 1 มิลลิลิตร และใช้อัตราส่วน ระหว่างปริมาตรเซลล์ตรึงต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1 : 3 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที โดยแปรผันขนาดของเม็ดเจลแคลเซียมอัลจิเนตให้มีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 1.0 - 3.0 มิลลิเมตร และแปรผันปริมาณของแหล่งไนโตรเจน (yeast extract + amonium sulphate) 5 ค่าคือ 0.138 , 0.183 , 0.275 , 0.367 และ 0.57 พบว่าขนาดของเม็ดเจลอัลจิเนตและความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.25 มิลลิเมตรและ 0.275 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 22 กรัมต่อลิตรในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 2.91

Ogawa และคณะ (1995) ทดลองผลิตกรดโคจิกจาก *A. oryzae* NRRL 484 โดยวิธีเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าของอาหารเหลว โดยมีเยื่อบางๆเป็นพาหะสำหรับยึดเหนี่ยว (membrane surface liquid cultivation "MSLC") โดยพาหะที่ใช้ยึดเหนี่ยวคือ polysulfone SE 20 เปรียบเทียบกับวิธีเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (submerged cultivation) โดยใช้น้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าวิธีเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าพาหะจะให้ผลผลิตกรดสูงกว่าเป็นสองเท่าของการเลี้ยงในอาหารเหลว โดยให้ผลผลิตกรด 20 กรัมต่อลิตรในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง และเมื่อทดลองเปลี่ยนวิธีผลิตจากแบบกะเอ็มเอสแอลซีมาเป็นการผลิตแบบเอ็มเอสแอลซีที่มีการเติมสารอาหารระหว่างการผลิตโดยใช้สายใยซ้ำ (repeated fed batch) พบว่าจะให้ผลผลิตสูงขึ้นโดยเมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตของทั้ง 3 วิธี ซึ่ง ได้แก่ การผลิตในอาหารเหลว (liquid medium) การผลิตแบบกะเอ็มเอสแอลซี (batch MSLC)และ repeated fed batch MSLC ให้ผลผลิตเป็น 1.6 , 2.9 และ 14.2

กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ และพบว่าปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกทั้ง 3 วิธี มีค่าเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตร

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิก ในระดับขวดเขย่าโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13

ขอบเขตของการวิจัย

1. หาอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่า
2. หาชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก
3. หาภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้น และระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูง
4. เตรียมกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดโคจิก