

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

- เพชรรุ่ง พันธุ์พิริยะ. 2536. การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดโคจิก. รายงานการวิจัยโครงการส่งเสริมประสบการณ์การเรียนการสอนในเชิงวิทยาศาสตร์ ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- รพี โรจนอุไร. 2539. ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในระดับขวดเขย่า. วิทยานิพนธ์. ปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สมใจ สิริโชค. 2539. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับอุตสาหกรรมหมัก. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

### ภาษาอังกฤษ

- Ariff, A. B., Salleh, M. S., Ghani, B., Hassan, M. A., Rusul, G. and Karim, M. I. A. 1996. Aeration and yeast extract requirements for kojic acid production by *Aspergillus flavus* Link Enzyme Microb. Technol. 19(15): 545-550.
- Ariff, A. B., Rosfarizan, M., Heng, L. S., Madihah, S. and Karim, M. I. A. 1997. Kinetics and modelling of kojic acid production by *Aspergillus flavus* Link in batch fermentation and resuspended mycelial system World J. Microbiol. Biotech. 13: 195-201.
- Arnstein, H. R. V. and Bentley, R. 1953. The biosynthesis of kojic acid. Biochem. J. 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. 1982a. Kojic acid: synthesis and properties. J. Sci. Ind. Res. 41: 185-194.
- Bajpai, P., Agrawala, P. K. and Vishwanathan, L. 1982b. Production of kojic acid by resuspended mycelia of *Aspergillus flavus*. Can. J. Microbiol. 28: 1340-1346.

- Bajracharya, R. and Mudgett, R. E. 1980. Effects of controlled gas environments in solid-substrate fermentations of rice. Biotech. Bioeng. 22: 2219-2235.
- Barnard, D. and Challenger, F. 1949. The formation of kojic acid from ethyl alcohol by *Aspergillus oryzae*, and the action of this mold on some carbohydrate derivatives. J. Chem. Soc. 110: 110-117.
- Basappa, S. C., Screenivasamurthy, V. and Parpia, H. A. B. 1970. Aflatoxin and kojic acid production by resting cells of *Aspergillus flavus* Link. J. Gen. Microbiol. 61: 81-86.
- Beelik, A. 1956. Kojic acid. Adv. Carbohydr. Chem. 11:145-183.
- Bentley, R. 1957. Preparation and analysis of kojic acid. In S. P. Colowick and N. O. Kaplan (eds.), Methods in enzymology., pp. 238-241. New York: Academic Press.
- Bernfeld, P. 1955. Amylase  $\alpha$  and  $\beta$  In S. P. Colowick and N. O. Kaplan (eds.), Methods in enzymology., vol. 1., p. 149. New York: Academic Press.
- Bigelis, R. and Tsai, S. P. 1995. Microorganisms for organic acid production. In Y. H. Hui and G. G. Khachatourians (eds.), Food biotechnology: Microorganisms. pp. 264-265. New York :VCH Publishers.
- Bryant, B.E. and Fernelius, W.C. 1954. Some metal complexes of kojic acid. J. Chem. Soc. 76(5): 5351-5352.
- Cabanes, J. , Chazarra, S. and Garcia-Carmona, F. 1994. Kojic acid, a cosmetic skin Whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. J. Pharm.Pharmacol. 46: 982- 985.
- Cabanes, J. , Garcia-Canovas, F., Lozano, J. A. and Garcia-Carmona, F. 1987. A kinetic study of the melanization pathway between L-tyrosine and dopachrome. Biochimica et.Biophysica Acta. 923: 187-195
- Campbell, A. L. and Miyano, M. 1989. Kojic acid ether-ester derivatives. US Patent, 4812474.
- Carlile, M. J. and Watkinson, S. C. 1994. Fungal cells and vegetative growth. The fungi. London: Academic Press. pp.77-149.

- Casida, L.E. 1968. Organic acids. Industrial microbiology. New York: John Wiley and Sons. pp. 411-412.
- Challenger, F., Klein, L. and Walker, T. K. 1929. The production of kojic acid from pentoses by *Aspergillus oryzae*. J. Chem. Soc. 1499-1505.
- Challenger, F., Klein, L. and Walker, T. K. 1931. The formation of kojic acid from sugars by *Aspergillus oryzae*. J. Chem. Soc. 16-23.
- Chen, J. S., Wei, C. and Marshall, M. R. 1991a. Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. J. Agric. Food Chem. 39(11): 1897-1901.
- Chen, J. S., Wei, C., Rolle, R. S., Otwell, W. S., Balaban, M. O. and Marshall, M. R. 1991b. Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases. J. Agric. Food Chem. 39(11):1396-1401.
- Corbellini, A. and Gregorini, B. 1933. La formazione dell'acido kojico per mezzo di *Aspergillus flavus*. Gazz. Chim. Ital. 63: 296-302 cited in Bajpai, P., Agrawal, P. K. and Vishwanathan, L. 1982. Kojic acid: Synthesis and properties. J. Sci. Ind. Res. 41: 185-194.
- Coupland, K. and Niehaus, W. G. 1987. Effect of nitrogen supply,  $Zn^{2+}$ , and salt concentration on kojic acid and versicorin biosynthesis by *Aspergillus parasiticus*. Exper. Mycol. 11: 206-213.
- Crueger, W. and Crueger, A. 1990. Organic acids. In T. D. Brock (ed.), Biotechnology: A textbook of industrial microbiology, Sunderland: Sinauer Associates. p. 148.
- Dowd, P. E. 1990. Kojic acid and esters as insecticide synergists. US Patent, 4 956353.
- Drysdale, C.R. and McKay, A.M. 1995. Citric acid production by *Aspergillus niger* in surface culture on inulin. Lett. Appl. Microbiol. 20:252-254.
- Gray, W.D. 1959. Synthesis of kojic acid. The relation of fungi to human affairs. New York: Henry Holt And Company. pp. 248-257.
- Hansen, R. S. and Phillips, J. A. 1981. Chemical composition. In P. Gerhardt (ed.), Manual of methods for general bacteriology, pp. 328-336. Washington: American Society For Microbiology.

- Hara, K. 1990. Composition for external application. US Patent, 4948577.
- Hatae, S. 1990a. Compositions for topical use having melanin synthesis-inhibiting. US Patent, 4919921.
- Hatae, S. 1990b. Method of minimizing erythema and elastosis. US Patent, 4891361.
- Hatae, S. and Nakashima, K. 1989. Whitening cosmetic. US Patent, 4847074.
- Haworth, W. N. 1929. The constitute of sugars. London: Arnold, dward Publishers Ltd.  
 cited in Bajpai, P., Agrawal, P. K. and Vishwanathan, L. 1982. Kojic acid: Synthesis and properties. J. Sci. Ind. Res. 41: 185-194.
- Higa, Y. 1987. Melanin inhibiting cosmetic composition. US Patent, 4696813.
- Horn, B.W., Greene, R.L., Sobolev, V.S., Dorner, J.W. and Powell, J.H. 1996. Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. tamarii*. Mycologia. 88(4): 574-587.
- Ikeda, Y. 1954. Kojic acid fermentation. : III. Production of reductone like substance and its antibiotic activity. J. Agric. Chem. Soc. Japan. 26(1952): 90-95. Chem. Abst. 48: 10113.
- Imose, J., Nonomura, S. and Tatsumi, C. 1970. Studies on kojic acid metabolism by microorganisms: Part X kojic acid oxidase. Agric. Biol. Chem. 34(10): 1443-1456.
- Jenkins, D. and Medskr, L. L. 1964. Brucine method for dertermination of nitrate in ocean, estuarine, and fresh waters. Anal. Chem. 36(3): 610-612
- Junko, K., Yasushi, N. and Takahide, T. 1998. Synthetic medium for production of kojic acid. JP Patent, 10165172A
- Kahn, V. 1995. Effect of kojic acid on the oxidation of DL-DOPA, norepinephrine, and dopamine by mushroom tyrosinase. Pigment Cell Res. 8: 234-240.
- Kahn V., Ben-Shalom, N. and Zakin, V. 1997. Effect of kojic acid on the oxidation of N-acetyldopamine by mushroom tyrosinase. J. Agric. Food Chem. 45(11): 4460-4465.
- Kahn, V., Lindner, P. and Zakin, V. 1995. Effect of kojic acid on the oxidation of *o*- dihydroxyphenols by mushroom tyrosinase. J. Agric. Food. Chem. 45(11): 253-271.

- Katagiri, H. and Kitahara, K. 1933. Formation of kojic acid by *Aspergillus oryzae*. Mem. Coll. Agric. Kyoto Imp. Univ. 26(1933): 1-29. Chem. Abst. 27: 3235
- Kayahara, H., Shibata, N., Tadasa, K., Maeda, H., Kotani, T. and Ichimoto, I. 1990. Amino acid and peptide derivatives of kojic acid and their antifungal properties. Agric. Biol. and Chem. 54(9):2441-2442.
- Kinoshita, K. 1927. Uder die ernahrung der pilze mit dn kobaltaminkomplxsalzan. Acta. Phytochim. Japan. 3: 31-50. Cited in Prescott, S.C. and Dunn, C. G., 1959 Industrial microbiology. pp. 609-618. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Kitada, M., Ueyamma, H., Suzuki, E., Fukimbara, T. 1967. Studies on kojic acid fermentation: I. Cutral condition in submerged culture. J. Ferment. Technol. 45: 1101-1107. Biotech. Bioeng. 39: 903-906.
- Koji, S. and Akiyoshi, S. 1997. Cultivation of kojic acid – producing bacterium. JP Patent, 9220095A
- Kouno, N. and Suzuoki, J. 1994. Acid dye staining method. US Patent, 5284560.
- Kwak, M. Y. and Rhee, J. S. 1992a. Controlled mycelial growth for kojic acid production using Ca-alginate-immobilized fungal cells. Appl. Microbiol. Biotech. 36:578-583.
- Kwak, M. Y. and Rhee, J. S. 1992b. Cultivation characteristics of immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production. Biotech. Bioeng. 39(9): 903-906.
- LeBlanc, D. T. and Akers, H. A. 1989. Maltol and ethyl maltol: From the Larch tree to successful food additives. Food Tech. 26: 78-87.
- Lin, M. T., Mahajan, J. R., Dianese, J. C. and Takatsu, A. 1976. High production of kojic acid crystals by *Aspergillus parasiticus* UNBF A12 in liquid medium. Appl. Environ. Microbiol. 32(1):298-299.
- Lokaj, J. ,Kozisek, J. , Koren, B. , Uher, M. and Vrable, V. 1991. Structure of kojic acid. Acta.Cryst. C47: 193-194.
- Masateru, M. and Shone, R.L. 1989. Aralkoxy and Aryloxyalkoxy kojic acid derivatives. US Patent, 4812584.
- Mattey, M. 1992. The production of organic acids. Crit. Rev. Biotechnol. 12(1/2): 87-132.

- May, O. E. , Moyer, A. J. , Wells, P. A. and Herrick, H. T. 1931. The production of kojic acid by *Aspergillus flavus*. J. Am. Chem. Soc. 53: 774-782.
- McCulloch, C. R. 1961. Polyurethane chelates from kojic acid. US Patent, 2986553. (1961). Chem. Abst. 55: 19332.
- Merck. 1989. Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. In S. Budavari, M. J. O. Nell, A. Smith and P. E. Heckelmans. (eds.), The Merck index., p. 838. New Jersey: Merck and Co., Inc.
- Meybeck , A. 1994. Pharmaceutical or cosmetic composition containing hydroquinone and kojic acid. US Patent, 5279834.
- Moore-Landecker, E. 1996. Physiology and reproduction. Fundamentals of the fungi. London: Prentice Hall International (UK) Limited. pp. 246-336.
- Moo-Yung, M., Moreira, A. R. and Tengerdy, R. P. 1983. Principles of solid-substrate fermentation. In J. E. Smith, D. R. Berry and B. K. Kristiansen. (eds.), The filamentous fungi., pp. 117-214. London: Edward Arnold (publishers).
- Morton, H.E., Kocholaty, W., Junowicz, K. R. and Kelner, A. 1945. Toxicity and antibiotic activity of kojic acid produced by *Aspergillus luteo-virescens*. J. Bacteriol. 50: 579-584.
- Motono, M. 1991. External preparations free of discoloration. US Patent, 4985455.
- Murray, R. K., Grawner, D. K., Mayers, P. A. and Rodwell, V. W. 1993. Section II: Bioenergetics and the metabolism of carbohydrates and lipid; Section III: Metabolism of proteins and amino acid. Harper's biochemistry. New York: Appleton and Lange. pp. 152-334.
- Nagai, S. and Izumi, T. 1981. Cosmetic composition containing kojic acid ester. US patent, 4278656.
- Nagai, S. and Izumi, T. 1983. Cosmetic composition containing kojic acid ester. US patent, 4369174.
- Niwa, Y. and Akamatsu, H. 1991. Kojic Acid scavenges free radicals while potentiating leucocyte 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.
- Ohara, I. 1954. Classification of the *Aspergillus tamarii-oryzae* group.: I. The production of  
kojic acid from various compounds as aid in identification. Res. Bull. Fac. Agric. Gifu  
Univ. 1(1951): 71-85. Chem. Abst. 48: 12884
- Oyama, Y. 1991. Compositions for topical use having melanin synthesis-inhibiting activity.  
US Patent, 4990330.
- Parrish, F.W., Wiley, B.J., Simmons, E.G. and Long, L. 1966. Production of aflatoxins and  
kojic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillium*. Appl. Microbiol. 14(1): 139.
- Pirselova, K., Balaz, S., Ujhelyova, R. and Sturdik, E. 1996. Quantitative structure-time-  
activity relationships (QSTAR): Growth inhibition of *Escherichia coli* by  
nonionizable kojic acid derivatives. Quant. Struct.-Act. Relat. 15: 87-93.
- Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1959. The kojic acid fermentation. Industrial microbiology.  
New York: McGraw-Hill Book Company. pp. 609-618.
- Rosfarizan, M., Ariff, A. B., Hassan, M. A. and Karim, M. I. A. 1998a. Kojic acid production  
by *Aspergillus flavus* using gelatinized and hydrolyzed sago starch as carbon source.  
Folia Microbiol. 43(5): 459-464
- Rosfarizan, M., Madihah, S. and Ariff, A. B. 1998b. Isolation of kojic acid-producing fungus  
capable of using strach as a carbon source. Lett. Appl. Microbiol. 26: 27-30.
- Saito, K. 1907. Uber die saurebildung bei *Aspergillus oryzae*. Bot. Mag. Tokyo. 21: 7-11.  
cited in Gray, D. W. 1959. The relation of fungi to human affairs. pp. 248-257.  
New York: Henry Holt A and Company.
- Sakaguchi, K., Asia, I. and Ikeda, Y. 1948. Kojic acid fermentation. J. Agric. Chem. Soc.  
Japan. 19(1943): 711-718. Chem. Abst. 42: 55080
- Sakai, I., Satoh, K., Tanaka, T., Morita, Y., Hibi, T., Tanabe, Y., Osawa, S. and Tomita, Y.  
1995. Whitening embellisher. US Patent, 5427775.

- Sakurai, A., Imai, H., Ejiri, T., Endoh, K. and Usami, S. 1991. Citric acid production by surface culture using *Aspergillus niger*: Kinetics and simulation. J. Ferment. Bioeng. 72(1): 15-19.
- Shigetaka, O., Takashi, Y., Takahisa, N., Hiroshi, T. and Yoshinobu, T. 1995. Producing of kojic acid glucoside and production of kojic acid monoglucoside. JP Patent, 7236496A.
- Stanbury P. E. and Whitaker, A. 1984. Media for industrial fermentation. Principle of fermentation technology. New York: Pergamon Press. p. 79.
- Steyermark, A. 1951. Microdetermination of nitrogen by the Kjeldahl method. Quantitative organic microanalysis. New York: TheBlakiston company. pp. 134-135.
- Takahashi, T. and Asia, T. 1933. The productions of fructose and kojic acid from mannitol by acetic acid bacteria: II. Effects of pH of the culture solution and the addition of calcium carbonate. J. Agric. Chem. Soc. Japan. 9(1933): 369-374. Chem. Abst. 27: 3735.
- Takamizawa, K., Nakashima, S., Yahashi, Y., Kubata, K.B., Suzuki, T., Kawai, K. and Horitsu, H. 1996. Optimization of kojic acid production rate using the Box-Wilson method. J. ferment. Bioeng. 82(4): 414-416.
- Tamiya, I. H. 1928. Growth of molds on cobaltamine salts. Acta Phytochim. 3(1927): 51-67. Chem. Abst. 22: 1990.
- Tamiya, I. H. and Hida, T. 1930. Comparative studies on acid formation, respiration, oxidase reaction and dehydrogenating power of some *Aspergillus* species. Acta. Phytochim. (Japan). 4(1929): 343-361. Chem. Abst. 24: 2496.
- Tanaka, I., Takeuchi, M. and Ichishima, E. 1989. Inhibition study of tyrosinase from *Aspergillus oryzae*. Agric. Biol. Chem. 53(2): 557-558.
- Waskisaka, Y., Segawa, T., Imamura, K., Sakiyama, T. and Nakanishi, K. 1998. Development of a cylindrical apparatus for membrane-surface liquid culture and production of kojic acid using *Aspergillus oryzae* NRRL 484. J. Ferment. Bioeng. 85(5): 488-494.



- Wei, C. I. , Huang, 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. Protect. 54: 546-548.
- Wiley, W., Tyson, G. N. and Steller, J. S. 1942. The configuration of complex kojates formed  
with some transition elements as determined by magnetic susceptibility  
measurements. Chem. Rev. 64: 963-964.
- Woodhead, S. and Walker, J.R.L. 1975. The effects of aeration on glucose catabolism in  
*Penicillium expansum* . J. Gen. Microbiol. 89: 327-336.
- Yabuta, T. 1913. Kojic acid, a new organic acid formed by *Aspergillus oryzae*. Imp. Univ.  
Tokyo. Orig. Com. Intern. Congr. Appl. Chem. (Appendix). 25(1912): 455-462.  
Chem. Abst. 7: 2191-2192.
- Yabuta, T. 1923. A new organic acid (kojic acid) formed by *Aspergillus oryzae*. J. Chem. Soc.  
Japan. 37(1916): 1185-1269. Chem. Abst. 17: 1475-1476.
- Yabuta, T. 1924. The Constitution of kojic acid, a Y-pyrone derivative formed by  
*Aspergillus oryzae* from carbohydrates. J. Chem. Soc. 125: 575-578.
- Yamamoto, S. 1991. External preparations. US Patent, 4990532.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. อาหารเลี้ยงเชื้อโพแทสเซียม โทรส เอการ์

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

ต้มมันฝรั่งนาน 10 นาที ใช้ผ้าขาวกรองเฉพาะน้ำใส่เดกซ์โทรสและวุ้นผงต้มให้ละลาย นำมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

## 2. อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1	กรัม

เติมน้ำปลอดประจุจนครบ 1 ลิตร และนำมาเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

## 3. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 (รพี โรจนอุไร, 2539)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลทรายขาว	100	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.5	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.24	กรัม

เติมน้ำปลอดประจุจนครบ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรดค่าเท่ากับ 4.5 และนำมาเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 2 (ดัดแปลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส	100	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.5	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.24	กรัม

เติมน้ำปลอดประจุจนครบ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรดค่าเท่ากับ 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 (ดัดแปลงมาจาก May และคณะ (1931) โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส	100	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรด	1.125	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
กรดฟอสฟอริก	0.054	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุจนครบ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรดค่าเท่ากับ 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 4 (ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 โดยใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลทรายขาว	100	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรด	1.125	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
กรดฟอสฟอริก	0.054	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุจนครบ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรดค่าเท่ากับ 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 (ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 โดยใช้สารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมไนเตรต เป็นแหล่ง ไนโตรเจนร่วมกัน)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส	100	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต	0.979	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
กรดฟอสฟอริก	0.054	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุจนครบ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรดค่าเท่ากับ 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 6 (ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 โดยใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลทรายขาว	100	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต	0.979	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
กรดฟอสฟอริก	0.054	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุจนครบ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรดค่าเท่ากับ 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 7 (ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส	200	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต	0.979	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
กรดฟอสฟอริก	0.054	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุจนครบ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรดค่าเท่ากับ 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 8 (ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 โดยใช้น้ำตาลทรายขาว 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลทรายขาว	200	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรต	0.979	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
กรดฟอสฟอริก	0.054	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุจนครบ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรดค่าเท่ากับ 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**11. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิก สูตรที่ 9 (ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 โดยใช้สารสกัดจากยีสต์ และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนร่วมกัน)**

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส	100	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.619	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
กรดฟอสฟอริก	0.054	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุจนครบ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรดค่าเท่ากับ 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**12. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก**

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส	100	กรัม
แอมโมเนียมไนเตรด	1.814	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
กรดฟอสฟอริก	0.054	มิลลิลิตร

เติมน้ำปลอดประจุจนครบ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรดค่าเท่ากับ 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ในอาหารสูตรนี้มีค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.75)

## ภาคผนวก ข

### วิธีเตรียมสารเคมีที่สำคัญที่ใช้ในการทดลอง

#### 1. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิก

เฟอร์ริกคลอไรด์	1	กรัม
กรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมต่างๆให้เข้ากัน และต้มจนกว่าจะละลายหมด

#### 2. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

กรดไดโนโตรซาลิไซลิก	5	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	100	มิลลิลิตร
โซเดียม-โปแตสเซียม คาร์เตต	150	กรัม

ละลายกรดไดโนโตรซาลิไซลิกในโซเดียมไฮดรอกไซด์ผสมกับ โซเดียม-โปแตสเซียม คาร์เตต ที่ละลายในน้ำปลอดประจุ 250 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุให้เป็น 500 มิลลิลิตร

#### 3. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ฟีนอล	5	กรัม
-------	---	------

เติมน้ำปลอดประจุจนครบ 100 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา

#### 4. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณอินทรีย์ในโตรเจน

##### 4.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 37 เปอร์เซ็นต์

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 370 กรัมในน้ำปลอดประจุแล้วเติมน้ำให้มีปริมาตร 1 ลิตร

##### 4.2 สารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์

ละลายกรดบอริก 40 กรัมในน้ำปลอดประจุแล้วเติมน้ำให้มีปริมาตร 1 ลิตร



#### 4.3 ตัวบ่งชี้ (indicator) ผสม

ละลายเมทริลเรค 0.1 กรัม และเมธีลินบลู 0.1 กรัม ในเอทานอลเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

### 5. สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไนเตรต

#### 5.1 สารละลายโซเดียมคลอไรด์

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 300 กรัมในน้ำปลอดประจุแล้วเติมปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

#### 5.2 สารละลายกรดซัลฟูริก

เทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 500 มิลลิลิตรลงในน้ำปลอดประจุปริมาตร 125 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชาปิดฝาให้แน่น

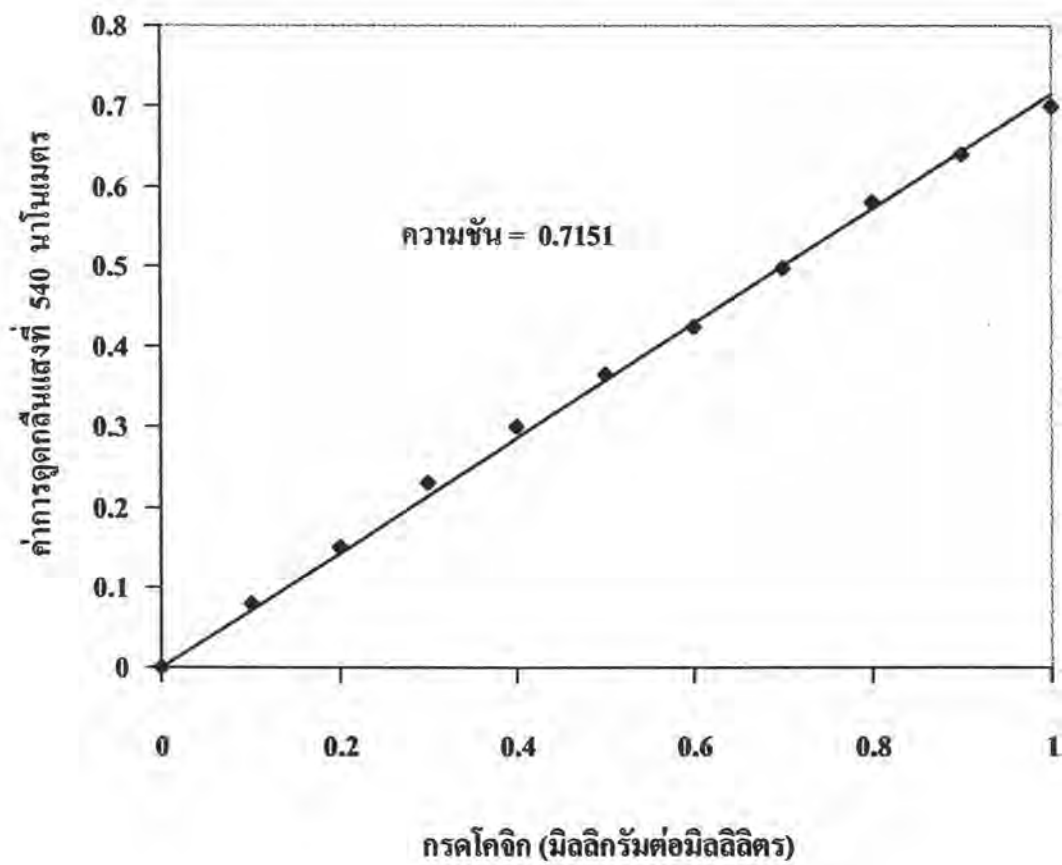
#### 5.3 สารละลายบรูซิน-กรดซัลฟานิลิก

ละลายบรูซินซัลเฟต 1 กรัม และกรดซัลฟานิลิก 0.1 กรัม ในน้ำปลอดประจุร้อน ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำปลอดประจุจนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

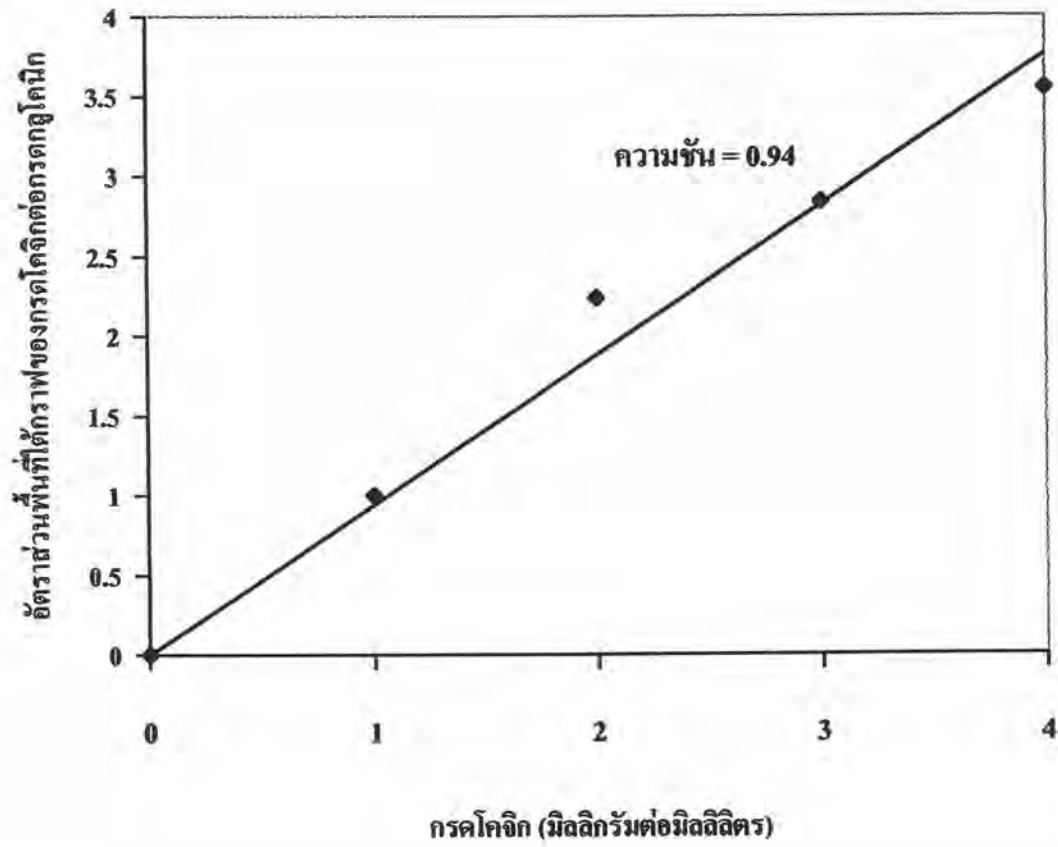
## ภาคผนวก ค

## กราฟมาตรฐาน

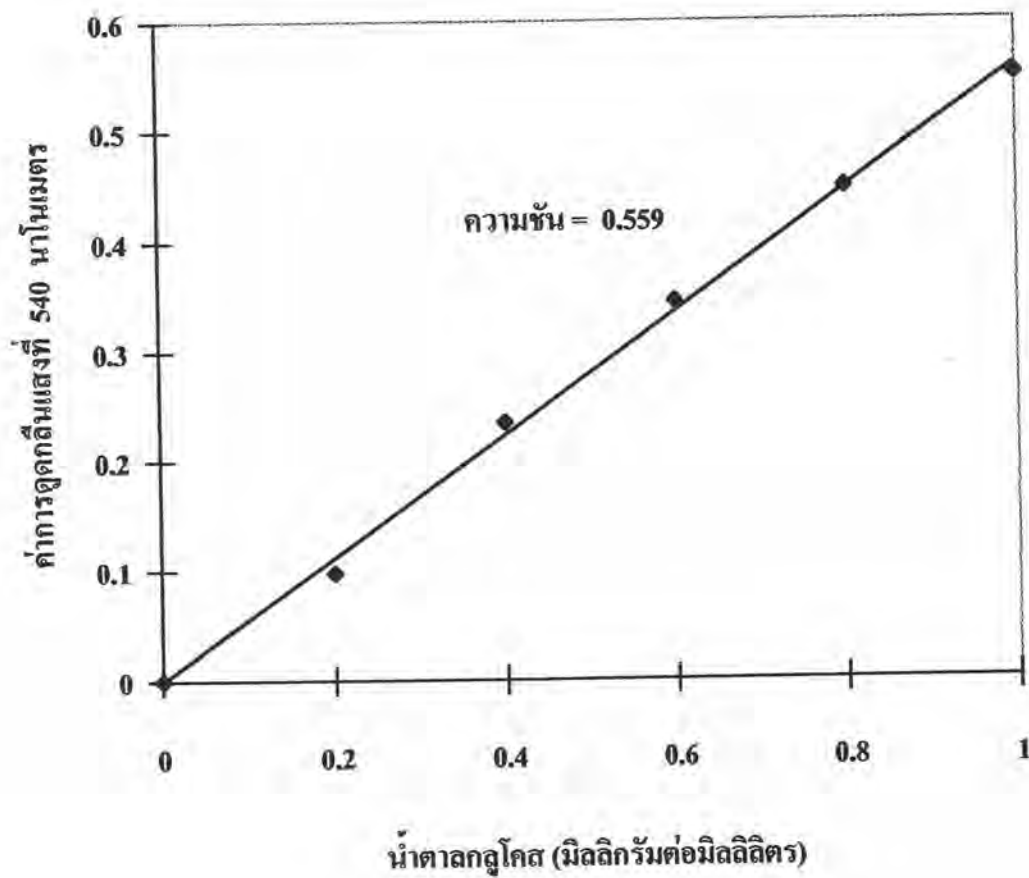
## 1. กราฟมาตรฐานของกรดโคจิก เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของกรดโคจิกโดยวิธี Bentley (1957)



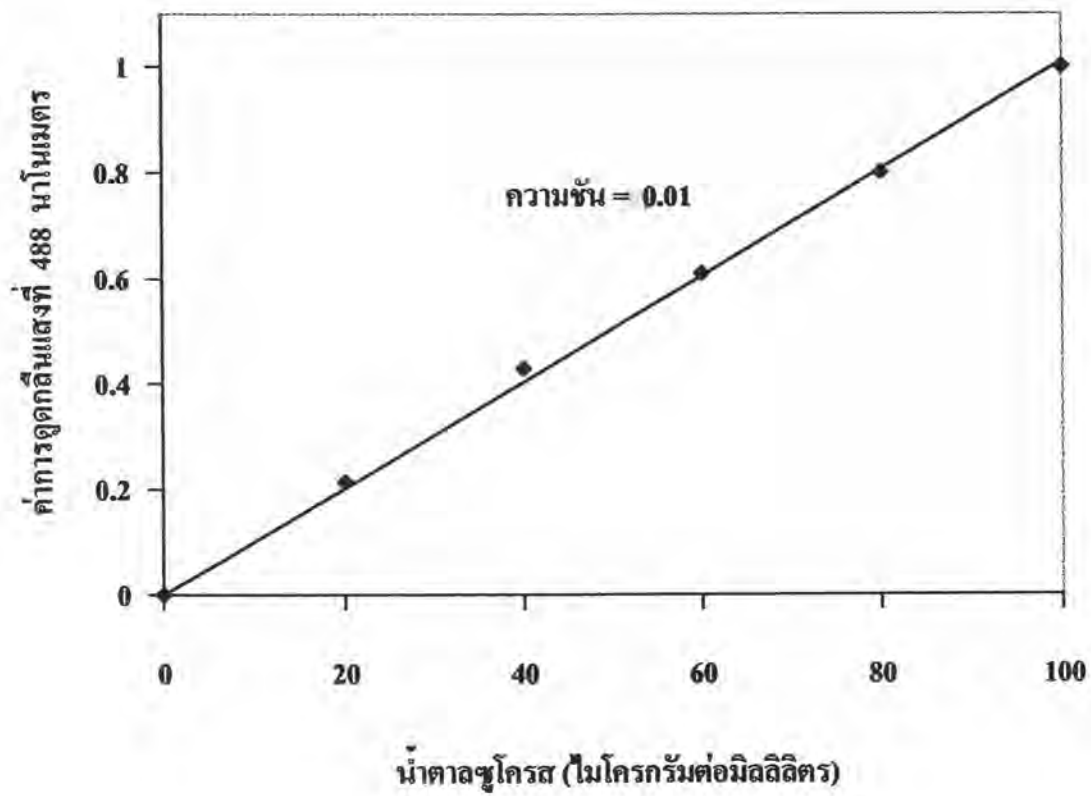
2. กราฟมาตรฐานของกรดโคจิก เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของกรดโคจิกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบ  
ของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



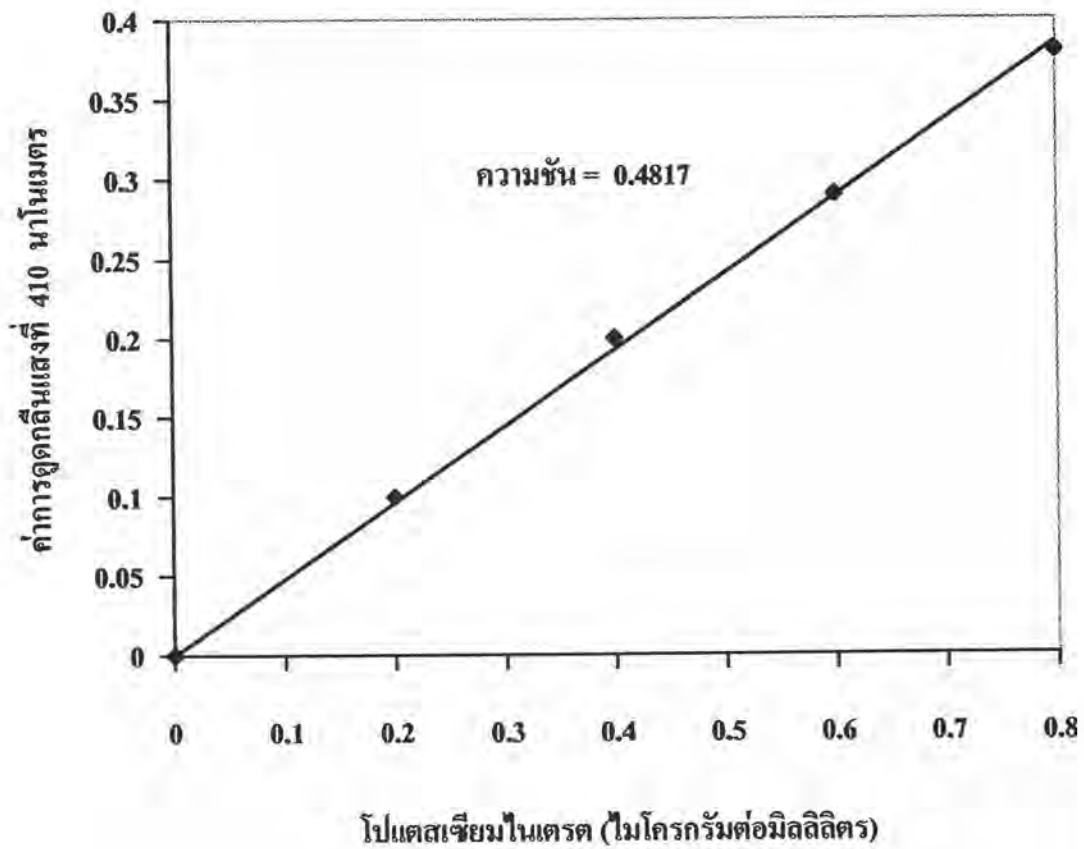
3. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีควิสต์ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีควิสต์โดยวิธีของ  
Bernfeld (1955)



4. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีของ  
Hansen และ Phillips (1981)



5. กราฟมาตรฐานของไนเตรตไนโตรเจน เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีของ Jenkins และ Medsker (1964)



## ภาคผนวก ง

### วิธีการคำนวณหาปริมาณกรดโคจิก และปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

1. การคำนวณปริมาณกรดโคจิกในตัวอย่างน้ำหมัก เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

จากกราฟมาตรฐานของกรดโคจิก เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของกรดโคจิกโดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ซึ่งมีกรดกลูโคินิกเป็นสารมาตรฐานภายใน (ภาคผนวก ค2) ให้ค่าความชันเท่ากับ 0.94 นำค่าความชันที่ได้มาคำนวณหาปริมาณกรดโคจิกของตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 จากสูตร

$$\text{ปริมาณกรดโคจิก} = \frac{\text{อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของกรดโคจิกในน้ำหมักต่อกรดกลูโคินิกมาตรฐาน} \times \text{ค่าการเจือจาง}}{\text{ค่าความชัน}}$$

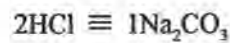
## 2. การคำนวณปริมาณของอินทรีย์ไนโตรเจน เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีของ Steyermark (1951)

เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนทั้งหมด

$$= \frac{\text{ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน } 0.05 \text{ นอร์มอล} \times \text{ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน (M)} \times 1.4}{\text{ปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}$$

วิธีการหาความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน

ซังโซเดียมไบคาร์บอเนต 0.2 กรัม ละลายในน้ำปลอดประจุ 70 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน  
 หยอดตัวบ่งชี้ซึ่งมีส่วนผสมของเมทิลเรดและเมธีลีนบลู (ภาคผนวก ข4.3) 3 หยด นำไปต้มใน  
 น้ำเดือด 3 นาที แล้วมาทำการไตเตรดขณะร้อนกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.05 นอร์มอลที่  
 เตรียมไว้จนสารละลายสีเขียวอ่อนเปลี่ยนเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรของสารละลายกรด  
 ไฮโดรคลอริกนำมาคำนวณในสมการ ดังนี้



$$\text{ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน} = \frac{1 \times \text{กรัมของโซเดียมไบคาร์บอเนต} \times 1000}{2 \times \text{มิลลิลิตรของไฮโดรคลอริก} \times 36.5}$$



### ประวัติผู้เขียน

นางสาวกนิษฐา ภูวนาถนรานูบาล เกิดวันที่ 25 เมษายน พ.ศ. 2518 สำเร็จการศึกษา  
ระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนสตรีรัตนบุรี จังหวัดนนทบุรี เมื่อปี พ.ศ. 2535 ต่อมาสำเร็จการ  
ศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยบูรพา เมื่อปีการศึกษา 2538 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.  
2539