

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความรู้เกี่ยวกับมัสตาร์ด

มัสตาร์ดเป็นพืชที่อยู่ในสกุล (genus) *Brassica* วงศ์ (family) *Cruciferae* หรือ *Brassicaceae* มัสตาร์ดแต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติและการใช้ประโยชน์ที่แตกต่างกัน เช่น *Brassica napus* (Rape), *Brassica campestris* L. var. yellow sarson (Colza or yellow sarson), *Brassica campestris* L. var. brown sarson), *Brassica campestris* L. var. toria (Toria or indian rape) และ *Brassica juncea* (Rai or Indian mustard) มีน้ำมันเป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 30-48 เปอร์เซ็นต์ ใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดน้ำมัน (Daniel and Thulasidas, 1975) ส่วน *Brassica nigra* (Black mustard) และ *Brassica hirta* (*Sinapis alba* or white mustard) ใช้เป็นเครื่องเทศที่ให้รสเผ็ด นอกจากนี้ *Brassica oleracea* L. var. Cabbage, *Brassica oleracea* L. var. Brussels Spouts, *Brassica oleracea* L. var. Cauliflower, *Brassica oleracea* L. var. Broccoli, *Brassica oleracea* L. var. Kohlrabi และ , *Brassica campestris* L. var. Turnips ใช้บริโภคใบและเมล็ด (Monreal และคณะ, 1992)

มัสตาร์ดเป็นพืชที่ปลูกโดยใช้เมล็ด เจริญเติบโตได้ดีในฤดูใบไม้ผลิ (spring) และในฤดูฝน มีความต้านทานต่อดินที่มีสภาพเป็นกรด พืชที่เหมาะสมควรต่อการเจริญอยู่ในช่วง 5.5-6.8 ตันมัสตาร์ดโดยทั่วไปมีความสูงประมาณ 2-3 ฟุต แต่ก็มีบางสายพันธุ์ เช่น *Brassica nigra* (Black mustard) สูงถึง 4 ฟุต ใบมีขนาดใหญ่ บาง สีเขียว มีทั้งแบบเรียบและขอบหยัก ดอกมีสีเหลือง กลีบดอกมี 4 กลีบ ผลมีลักษณะเรียวยาวเป็นฝัก ภายในมีเมล็ดรูปร่างกลม ขนาดเล็ก เรียงตัวเป็นแถวเดียวอยู่ภายใน สีของเมล็ดจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ โดยจะมีตั้งแต่สีน้ำตาล น้ำตาลแดงน้ำตาลเหลือง และสีเหลือง เป็นต้น (23, 28, 92) บริเวณที่ปลูกมัสตาร์ดมาก ได้แก่ สหพันธรัฐสาธารณรัฐรัสเซีย (Russia Federation) โดยในปี ค.ศ.2000 รัสเซียสามารถผลิตเมล็ดมัสตาร์ด (mustard seed) ได้ 7,000 เมตริกตัน ในขณะที่ทั่วโลกผลิตได้ 14,546 เมตริกตัน ในขณะที่เมล็ดมัสตาร์ดอีกสายพันธุ์ คือ rape seed จีนสามารถผลิตได้ 273,000 เมตริกตัน ในขณะที่ทั่วโลกผลิตได้ 475,229 เมตริกตัน (FAO, 2000) โดยแนวโน้มในการผลิต rape seed จะมากขึ้น ในขณะที่ mustard seed มีแนวโน้มที่จะผลิตน้อยลง โดยเมื่อ 10 ปีที่ผ่านมา การผลิต rape seed เพิ่มขึ้นกว่า 60,000 เมตริกตัน ในขณะที่ mustard seed ผลิตน้อยลงกว่า 1,000 เมตริกตัน

กากมัสตาร์ดหมายถึงผลิตภัณฑ์ที่เหลือจากการนำเมล็ดมัสตาร์ดไปสกัดน้ำมัน กากมัสตาร์ดที่ได้จากเมล็ดมัสตาร์ดสายพันธุ์ต่างๆจะมีชื่อเรียกต่างกัน เช่น กากมัสตาร์ดที่ได้จาก *Brassica campestris* และ *Brassica napus* จะเรียกว่า "Rape meal" หรือ "Rapeseed meal" ส่วนที่ได้จาก *Brassica juncea* จะเรียกว่า "Mustard meal" หรือ "Mustardseed meal" และที่ได้จาก *Brassica campestris* และ *Brassica napus* ที่มีการปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีปริมาณกรดไขมันที่มีชื่อว่า erucic acid และกลูโคซิโนเลท (glucosinolate) ไม่เกิน 2 เปอร์เซ็นต์ และ 30 ไมโครโมลต่อกรัม ตามลำดับ จะเรียกว่า "Canola meal" (Ebune และคณะ, 1995)

### 1.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของกากมัสตาร์ด

กากมัสตาร์ดเป็นแหล่งอาหารที่อุดมไปด้วยธาตุอาหารหลายชนิดทั้งโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และแร่ธาตุ โดยจะพบว่าปริมาณสารอาหารต่างๆของกากมัสตาร์ดจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ ฤดูกาลรวมถึงแหล่งที่ปลูกด้วย (ตาราง 1.1)

ตาราง 1.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของกากมัสตาร์ด ( 10, 11, 12, 13, 95)

องค์ประกอบทางเคมี	(% of dry matter)
ความชื้น	7.6-13.8
โปรตีน (ไนโตรเจน x 6.25)	35.9-45.5
ไขมัน (fat)	0.1-2.3
ไนโตรเจน (nitrogen free extract)	34.0-37.8
อีเทอร์ (ether extract)	2.9-4.1
เส้นใย (crude fiber)	8.9-15.4
เถ้า (ash)	7.0-11.6
แคลเซียม	0.6-0.8
ฟอสฟอรัส	1.17-1.3
พลังงานทั้งหมด (กิโลจูล/กรัม)	17.16-18.60

นอกจากนี้ในกากมัสตาร์ดยังมีสารพิษ (toxic substance) ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ได้แก่ กรดอีรูซิก (erucic acid) กลูโคซิโนเลท (glucosinolates) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสารเหล่านี้ (Yeoman and Edwards, 1994) แต่ในปัจจุบันได้มีการกำจัดและลดสารพิษเหล่านี้ โดยใช้การปรับปรุงสายพันธุ์มัสตาร์ด หรือการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดและลดสารพิษเหล่านี้ เช่น การใช้แอมโมเนียในการลดปริมาณกลูโคซิโนเลทในเมล็ดมัสตาร์ด (Bell, 1984)

#### ก. โปรตีน

จากตาราง 1.1 จะเห็นว่ากากมัสตาร์ดมีโปรตีนอยู่ถึง 35.9-45.5 เปอร์เซ็นต์ โดยประกอบไปด้วยกรดอะมิโนเกือบครบทุกชนิดในปริมาณต่างๆ ดังแสดงในตาราง 1.2 จะเห็นได้ว่า มีปริมาณกรดกลูตามิก (glutamic acid) สูงสุด ส่วนที่รองลงมาได้แก่ กรดแอสพาร์ติก (aspartic acid) ลิวซีน (leucine) ตามลำดับ

ตาราง 1.2 แสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนในกากมัสตาร์ด (11, 12, 76)

กรดอะมิโน	(กรัมต่อโปรตีน 100 กรัม)	(กรัมต่อกากมัสตาร์ด 100 กรัม)
Alanine	4.00-5.69	1.29-1.65
Arginine	5.35-7.10	2.16-2.50
Aspartic acid	4.80-7.90	2.06-2.91
Cysteine	1.33-2.40	0.50-0.99
Glutamic acid	12.03-18.0	4.99-5.88
Glycine	3.70-6.10	1.67-1.76
Histidine	1.70-2.90	0.99-1.28
Isoleucine	2.60-4.10	0.75-1.63
Leucine	5.00-7.30	2.03-2.85
Lysine	3.20-6.10	0.87-2.45
Methionine	1.78-1.90	0.60-0.94
Phenylalanine	3.10-4.56	1.11-1.64
Proline	4.90-6.70	1.66-2.31
Serine	1.40-4.82	1.60-5.11

ตาราง 1.2 (ต่อ)

กรดอะมิโน	(กรัมต่อโปรตีน 100 กรัม)	(กรัมต่อกากมัสตาร์ด 100 กรัม)
Threonine	3.10-4.60	0.44-1.84
Tryptophan	1.20-1.90	0.48-0.50
Tyrosine	1.20-3.31	0.68-1.16
Valine	3.52-5.00	1.05-2.09

ข. คาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรตในกากมัสตาร์ดมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีน สารคาร์โบไฮเดรตที่พบเป็นแบ่งปริมาณเล็กน้อย พบเส้นใย (crude fiber) 8.9-15.4 เปอร์เซ็นต์ในกากมัสตาร์ดโดยมีเซลลูโลส (cellulose) และลิกนิน (lignin) เป็นองค์ประกอบ และยังพบเพนโทแซน (pentosan) 9.9-10.0 เปอร์เซ็นต์ และแป้ง (starch) 5.8-6.4 เปอร์เซ็นต์

ค. วิตามินและแร่ธาตุ

วิตามินในกากมัสตาร์ดมีหลายชนิด ได้แก่ choline, niacin, pantothenic acid, thiamin, riboflavin, folic acid และ biotin โดยวิตามินที่พบมากคือ niacine พบมากถึง 160-168 มิลลิกรัมต่อกากมัสตาร์ด 1 กิโลกรัม ดังแสดงในตาราง 1.3

ตาราง 1.3 แสดงปริมาณวิตามินในกากมัสตาร์ด (Bell, 1984)

วิตามิน	จำนวน
Choline (mg/kg)	0.67
Niacin (mg/kg)	160-168
Pantothenic acid (mg/kg)	9.5-17.0
Thiamin (mg/kg)	5.2-9.0
Riboflavin (mg/kg)	3-3.7
Folic acid (mg/kg)	2.3
Biotin (mg/kg)	0.9

ส่วนแร่ธาตุในกากมันตาร์ดนั้น ตัวที่พบมากคือ สังกะสี แมงกานีส และโบรอนที่พบมากถึง 72, 37-80 และ 18-24 มิลลิกรัมต่อกากมันตาร์ด 1 กิโลกรัม ตามลำดับ และพบแร่ธาตุอื่นๆ อีกมากมาย ดังแสดงในตาราง 1.4

ตาราง 1.4 แสดงปริมาณแร่ธาตุในกากมันตาร์ด (10, 11)

แร่ธาตุ	จำนวน
Calcium (%)	0.68
Phosphorus (%)	1.2-2.0
Phytin-phosphorus (%)	0.8-0.9
Potassium (%)	1.3
Magnesium (%)	0.64
Sulfur (%)	0.8-1.7
Sodium (mg/kg)	6.0-7.0
Zinc (mg/kg)	72
Manganese (mg/kg)	37-80
Copper (mg/kg)	7-10
Iron (mg/kg)	7-8
Nickle (mg/kg)	1.5-4.3
Selenium (mg/kg)	1.0
Cadmium (mg/kg)	0.02-0.13
Boron (mg/kg)	18-24

## 1.2 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้อาหารจากกากมันสตาร์ด

กากมันสตาร์ดเป็นผลพลอยได้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจมากที่สุดตัวหนึ่ง และในการนำกากมันสตาร์ดมาใช้ประโยชน์นั้น พบว่ามีเพียงการนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ ในอดีตมีความพยายามที่จะนำมาใช้เพื่อเป็นอาหารของมนุษย์ด้วย แต่มีปัจจัยที่ต้องพิจารณากันมาก ได้แก่ ปริมาณโปรตีน (protein content) กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ (amino acid composition) ปริมาณเส้นใยอาหาร (crude fiber) แร่ธาตุ (minerals) วิตามิน (vitamins) และอาจจะมีสารพิษ (toxic substance) ที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ กรดอีรูซิก (erucic acid) กลูโคซิโนเลท (glucosinolates) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสารเหล่านี้ (Phillipchuk and Jackson 1979)

การใช้ประโยชน์จากกากมันสตาร์ดเริ่มขึ้นในปี 1948 โดยใช้เป็นอาหารสำหรับเบ็ดและไก่ ต่อมาจึงมีการใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ แกะ หมู เป็นต้น แต่การใช้ในช่วงต้นพบกับปัญหาเรื่องสารพิษที่เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ดังนั้นในการพัฒนาการใช้ประโยชน์จากกากมันสตาร์ดในช่วงต้นจึงควบคู่กับการกำจัดสารพิษที่เป็นองค์ประกอบ จวบจนกระทั่งปัจจุบัน การศึกษาส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นถึงการศึกษาด้านการนำไปใช้ประโยชน์และผลในการใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์เลี้ยงประเภทต่างๆ

### 1.2.1 การศึกษาการใช้กากมันสตาร์ดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

สำหรับการนำกากมันสตาร์ดมาใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นั้น ยังไม่พบว่ามีกรนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม แต่พบเพียงการศึกษาในห้องปฏิบัติการเท่านั้น เช่น

ในปี ค.ศ.1979 Phillipchuk และ Jackson ศึกษาถึงการนำเอากากมันสตาร์ดมาเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเชื้อ *Candida utilis* โดยนำกากมันสตาร์ดมาย่อยด้วยกรดและเอนไซม์โปรตีเอสที่สภาวะและชนิดต่างๆ เปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ปกติโดยทั่วไป เช่น peptone, soytone, tryptone และ neopeptone เป็นต้น พบว่า กากมันสตาร์ดที่ย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) สามารถที่จะนำมาเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญของ *Candida utilis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และผู้ศึกษายังได้ให้ความเห็นว่าน่าจะส่งเสริมและพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าได้ เพราะต้นทุนถูกกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ มาก

Gattinger, Duvnjak และ Khan ในปี ค.ศ.1990 ศึกษาถึงการนำเอากากมันสตาร์ด มาเป็นแหล่งอาหารสำหรับเชื้อ *Trichoderma reesei* ในการผลิตเอนไซม์ xylanase เปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่นๆ ได้แก่ กลูโคส, larchwood xylan และ solka-floc พบว่า การใช้กากมันสตาร์ดมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ xylanase ดีกว่าน้ำตาลกลูโคส และ larchwood xylan และมีประ

สิทธิภาพเทียบเท่ากับการใช้ solka-floc โดยสามารถผลิตเอนไซม์ xylanase ได้ 210 ยูนิต/มิลลิลิตร ในเวลาการเลี้ยง 9-12 วัน

การศึกษาถึงวิธีการนำเอากากมันฝรั่ง มาเป็นแหล่งอาหารสำหรับเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในอุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) ซึ่งศึกษาโดย Yeoman และ Edwards ในปี ค.ศ. 1992 โดยนำกากมันฝรั่งมาสกัดให้อยู่ในสภาพอาหารเหลวด้วยวิธีต่างๆ เช่น การต้มในน้ำและสกัดที่พีเอชตั้งแต่ 2-13.5 หรือการใช้ไซโตมคลอไรด์ร่วมกับไซโตมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น แล้วนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ พบว่า กากมันฝรั่งที่สกัดด้วยไซโตมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลต่อลิตร ให้อาหารที่มีปริมาณโปรตีน 78 เปอร์เซ็นต์ สามารถที่จะนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ และผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่ใช้การเตรียมอาหารแบบเดียวกัน โดยพบว่าสามารถนำไปเพาะเลี้ยงและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้โดยเชื้อหลายชนิดทั้งแบคทีเรียและฟังไจ เช่น *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Thermomonospora* spp., *Faenia rectivirgula*, *Thermoactinomyces* spp. และ *Fungus* spp. เป็นต้น โดยในบางตัวก็สามารถเจริญแต่ไม่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อบางชนิดก็ไม่สามารถเจริญในอาหารดังกล่าวได้ ได้แก่ *Thermus* spp. เป็นต้น

การศึกษาถึงการนำเอากากมันฝรั่ง มาเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *Streptomyces thermovulgaris* โดย Yeoman และ Edwards ในปี ค.ศ. 1994 โดยนำกากมันฝรั่งมาสกัดด้วยไซโตมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลต่อลิตร และนำไปเพาะเลี้ยง *Streptomyces thermovulgaris* ในถังหมัก พบว่า เชื้อสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยเฉพาะอย่างยิ่ง azocaseinase ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และพบว่าการเจริญของเชื้อจะเป็น 2 ช่วง และจะพบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในช่วงที่สอง โดยให้ข้อสันนิษฐานว่า ในช่วงแรกเชื้อจะใช้กรดอะมิโน ส่วนในช่วงที่สองจะมีการย่อยโปรตีนมาใช้

ในปี ค.ศ.1995 Ebune และคณะ ศึกษาถึงการนำเอากากมันฝรั่ง มาเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญและผลิตเอนไซม์ phytase ของเชื้อราชนิดต่างๆ ได้แก่ *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus carbonarius* และ white-rot fungus ในสภาพอาหารแข็ง โดยเฉพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร ใช้กากมันฝรั่ง 50 กรัมเป็นอาหารสำหรับเชื้อเพียงอย่างเดียวและปรับความชื้นโดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 50 มิลลิลิตร พบว่า เชื้อเหล่านี้สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ phytase ได้ดี โดยเชื้อเหล่านี้สามารถย่อย phytic acid ในกากมันฝรั่งให้หมดภายในเวลาเพียงแค่ 2 วัน และให้แอกติวิตีเอนไซม์ phytase สูงสุดภายในเวลาการเพาะเลี้ยง 2-3 วัน เท่านั้น

### 1.2.2 ความรู้เกี่ยวกับเชื้อ *Aspergillus*

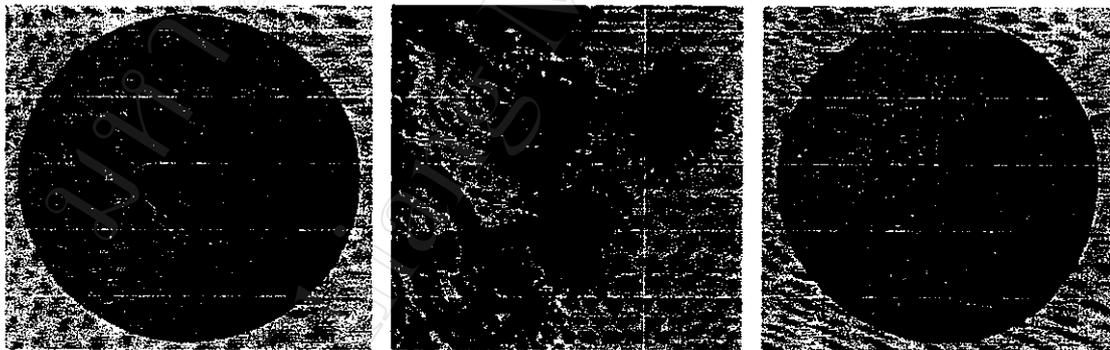
*Aspergillus* sp. เป็นเชื้อราใน Superkingdom Eukaryonta, Kingdom Myceteae, Division Amastigomycota, Subdivision Ascomycotina, Class Ascomycetes, Subclass Euascomycetidae, Order Eurotiales, Family Eurotieceae, From-genus *Aspergillus* (Ingold, 1973) เชื้อ *Aspergillus* มีมากกว่า 150 สปีชีส์ โดย 85 สปีชีส์เป็นเชื้อที่พบในประเทศอินเดีย และในปัจจุบันยังมีการค้นพบสายพันธุ์ใหม่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เชื้อ *Aspergillus* โดยทั่วไปไม่ซีดเขียมนักจะไม่ค่อยมีสี สีที่มักพบจะเป็นสีที่สว่าง (bright) และจาง (pale) โดยพบว่าสีที่พบมักจะเป็นสีดำ เขียวน้ำเงิน และสีเขียวเหลือง สามารถพบเชื้อ *Aspergillus* ได้ทั่วไปทั้งในดิน อากาศ รวมทั้งในอาหารต่างๆ เช่น ในผลไม้ ผัก แยม เนื้อสัตว์ ธัญพืช หญ้าแห้ง (dry hay) และในไม้เนื้ออ่อน (soft wood) หรือแม้แต่เสื้อผ้าที่เก็บอยู่ในที่ชื้น โดยเฉพาะประเทศในแถบเขตร้อน (tropical climate) (78, 79, 80)

เชื้อ *Aspergillus* บางสายพันธุ์เป็นสาเหตุในการก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ เช่น คอเนเดียของ *Aspergillus niger* van Tieghem ถ้าสูดเข้าไปในปริมาณมากพอจะทำให้เกิดอาการแพ้และเข้าไปติดเชื้อที่ปอด หรือ *Aspergillus fumigatus* เป็นสาเหตุในการก่อให้เกิดโรคปอดของคนและสัตว์ และ *Aspergillus nidulans* ซึ่งทำให้เกิดโรคเชื้อราที่เล็บ นอกจากนี้ในบางสายพันธุ์ ยังผลิตสารพิษในอาหาร เช่น *Aspergillus flavus* จะผลิตสารพิษ Aflatoxin B, และ Sterigmatocystin *Aspergillus parasiticus* จะผลิตสารพิษ Aflatoxin B, *Aspergillus ochraceus* จะผลิตสารพิษ Ochratoxin A *Aspergillus* เป็นต้น อย่างไรก็ตาม เชื้อ *Aspergillus* หลายสายพันธุ์ก็ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Aspergillus niger* และ *Aspergillus oryzae* โดย Raper และ Fennell ได้แบ่งเชื้อ *Aspergillus* ออกเป็น 21 กลุ่ม เพื่อให้ง่ายต่อการจำแนก

### ก. การจำแนกประเภทของ *Aspergillus* (Classification of *Aspergillus*)

#### กลุ่มที่ 1 กลุ่มของ *Aspergillus glaucus*

ลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือ คอนิเดียที่ยังอ่อนๆจะมีสีเขียวฟ้าสว่าง (bright bluish green) และจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม (dull green) จนถึงเขียวน้ำตาล (brownish green) ในบางส่วนของไมซีเลียมยังพบรังควัตถุสีแดงและน้ำตาล ไมซีเลียมมักจะมีสีแดง น้ำตาล และสีม่วง อวัยวะแต่ละส่วนมักจะมีผนังกัน ผนังจะเรียบและแบน เวสิเคิล (vesicle) มีหลายรูปแบบตั้งแต่วงกลมเล็กๆไปจนถึงขนาดใหญ่ ฟิเอลิด (phialides) จะตั้งอยู่บนเวสิเคิล เมื่อเวสิเคิลจะมีขนาดใหญ่ขึ้น จะมีการเปลี่ยนรูปร่างเป็นรูปยาวเรียว เป็น head แบบที่สอง (secondary heads) (รูป 1.1ค) คอนิเดียมักจะมีขน (spiny) แบบที่เรียบนั้นหาได้ยากมาก และมีขนาดความยาวมากกว่า 5 ไมครอน แต่มีขนาดที่ไม่แน่นอน ในบางกรณีที่อุณหภูมิต่ำพบว่ามีความยาว 15 ไปจนถึง 20 ไมครอน และมักจะมีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือลูกแพร์ (pear-shaped) และจะหลุดออกเมื่อมีอายุมากขึ้น และจะอยู่ในชั้นที่สมบูรณ์เรียกว่า "perithecia" โดยจะพบว่าจะมีสีเหลืองจนไปถึงส้ม มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 80 ไปจนถึง 250 ไมครอน ภายในบรรจุแอสโคสปอร์ (ascospores) 8 สปอร์ โดยรูปร่างของแอสโคสปอร์จะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ (รูป 1.2)



ก

ข

ค

รูป 1.1 แสดงเชื้อ *Aspergillus* กลุ่ม *Aspergillus glaucus* (Smith, 1969)

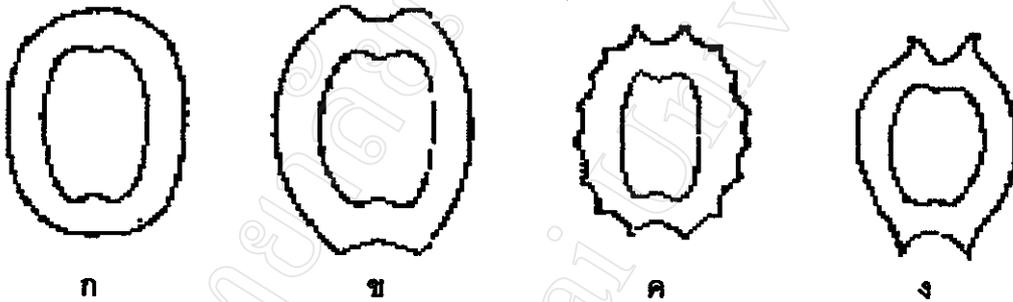
ก : head with small vesicles (x250)

ข : head with globose vesicles (x500)

ค : proliferation of phialides to form secondary heads (x250)

ความสามารถของเชื้อรากลุ่มนี้คือ ต้องการความชื้นน้อยกว่าราทุกชนิดในการเจริญของสปอร์ โดยพบว่าสามารถเจริญได้แม้กระทั่งบนเสื้อผ้าที่มีความชื้นเพียงเล็กน้อย และยังสามารถเจริญได้ในบริเวณที่มี osmotic concentration สูงๆ เชื้อ *Aspergillus* ในกลุ่มนี้ ได้แก่

*Aspergillus repens* (*Eurotium repens*) มีลักษณะพิเศษคือ บริเวณผิวชั้นนอกของโคโลนีจะมีสีผสมระหว่างสีเหลืองและสีเขียว คอนิเดียเมื่อมีขนาดใหญ่จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 5-6.5 ไมครอน perithicia มีเส้นผ่าศูนย์กลางกลางตั้งแต่ 75-100 ไมครอน แอสโคสปอร์มีขนาดตั้งแต่ 4.8-5.6 x 3.8-4.4 ไมครอน มีรูปร่างเป็นทรงไข่ ผิวเรียบ (รูป 1.2ก)



รูป 1.2 แสดงแอสโคสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus* กลุ่ม *Aspergillus glaucus* (Smith, 1969)

ก : *Aspergillus repen*

ข : *Aspergillus ruber*

ค : *Aspergillus amstelodami*

ง : *Aspergillus chevalieri*

*Aspergillus ruber* (*Eurotium rubrum*) มีลักษณะพิเศษคือ โคโลนีจะมีสีแดงสนิม (rusty red) ไปจนถึงแดงเข้ม (deep red) โดยสีที่เกิดขึ้น เกิดจากปฏิกิริยา incrustations ของรงควัตถุบริเวณโมซิลเลียม ซึ่งจะเปลี่ยนสีแดงเข้มให้เป็นสีน้ำตาลแดง คอนิเดียเป็นรูปไข่ ผิวขรุขระ สีเขียว-น้ำเงินอ่อนไปจนถึงสีน้ำตาล ขนาดความยาว 5-6.5 ไมครอน perithicia มีเส้นผ่าศูนย์กลางกลางตั้งแต่ 80-120 ไมครอน แอสโคสปอร์มีขนาดตั้งแต่ 5.2-6.0 x 4.4-4.8 ไมครอน

*Aspergillus chevalieri* (*Eurotium chevalieri*) มีลักษณะพิเศษคือ โคโลนีจะมีสีเขียว น้ำเงิน พบไฮฟาใน perithicia ซึ่งจะมีสีส้มแดง คอนิเดียมีสีส้ม มีรูปร่างเป็นทรงกลมผิวขรุขระ เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5-5.5 ไมครอน perithicia มีเส้นผ่าศูนย์กลางกลางตั้งแต่ 100-140 ไมครอน แอสโคสปอร์มีผิวเรียบ ขนาดตั้งแต่ 4.6-5.0 x 3.4-3.8 ไมครอน

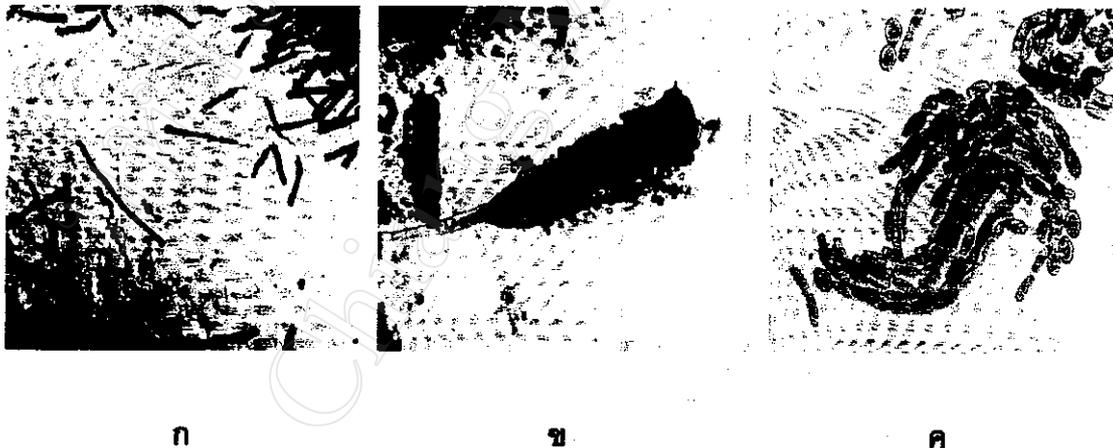
*Aspergillus amstelodami* (*Eurotium amstelodami*) มีลักษณะพิเศษคือ โคโลนีจะมีเขียว เข้มและแต้มด้วยสีเหลือง ส่วน head ของคอนิเดีย (conidial heads) มีลักษณะแผ่กระจายเป็น

รัศมีหรือเป็นรูปทรงกระบอก มีขนาดใหญ่ คอนิเดียเป็นทรงกลม ลักษณะขรุขระเล็กน้อย เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 ไมครอน perithicia มีเส้นผ่าศูนย์กลางกลางตั้งแต่ 140-160 ไมครอน

*Aspergillus echinulatus* (*Eurotium echinulatum*) มีลักษณะพิเศษคือ โคลินิจจะมีลักษณะเป็นดวงๆ และเจริญช้า มีสีเขียวน้ำเงิน ส่วนหัวของคอนิเดียและ perithicia มีสีแดงส้ม และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงเข้ม คอนิดิโอฟอร์ยาวและอาจยาวถึง 1 มิลลิเมตร คอนิเดียเป็นรูปไข่ (elliptical) รูปลูกแพร์ (pear-shaped) และคล้ายทรงกลม (sub-globose) ผิวขรุขระ ความยาวประมาณ 8-10 ไมครอน perithicia มีสีเหลืองเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 150-160 ไมครอน และจะมีไฮฟาสีแดงเจริญบนผิวของอาหาร แอสโคสปอร์มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9-10 x 6.5-7.5 ไมครอน ในบาง strains มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8-9 x 6-7 ไมครอน

#### กลุ่มที่ 2 กลุ่มของ *Aspergillus restrictus*

ลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือเป็นเชื้อที่มีอัตราการเจริญช้าแม้ว่าจะอยู่ในอาหารที่มีธาตุอาหารครบถ้วน แต่ก็พบว่าสามารถเจริญได้บนวัตถุหรือเชื้อผ้าที่มีความชื้นเพียงเล็กน้อย มีสีเขียวแก่ (dark green) หรือสีเขียวเทา (grey-green) ส่วน head มีลักษณะเรียวยาว (รูป 1.3ก-ข) โอบเวท (ovate) เป็นรูปทรงกระบอก (barrel-shape) คอนิเดียมีผิวขรุขระ



รูป 1.3 แสดงเชื้อ *Aspergillus* กลุ่ม *Aspergillus restrictus* (Smith, 1969)

ก : columnar heads (x50)

ข : typical conidiophore (x500)

ค : spores (x1000)

*Aspergillus caeiellus* มีลักษณะพิเศษคือโคโลนีจะมีสีเทาฟ้า เป็นสายพันธุ์ที่พบและแยกได้ยากมาก และเป็นสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเป็น osmophilic น้อยที่สุดในกลุ่ม

*Aspergillus conicus* เป็นเชื้อที่พบได้ในดิน มีลักษณะพิเศษคือ เริ่มต้นโคโลนีจะมีสีเขียวเทาอ่อนๆ แล้วจะเปลี่ยนรูปร่างให้ผอมลงและเปลี่ยนเป็นสีเขียวแก่ คอเนเดียมีขนาด 4.0-4.5 x 3.0-3.5 ไมครอน มีลักษณะหยาบ

*Aspergillus gracilis* เป็นเชื้อที่โคโลนีเจริญได้ช้ามากบนอาหารทุกชนิด มีลักษณะพิเศษคือโคโลนีมีสีเขียวเทาอ่อนและจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว สปอร์มีขนาดเล็ก หยาบเล็กน้อย และจะต่อกันเป็นสายและรวมกันเป็นรูปทรงกระบอกเรียวยาว

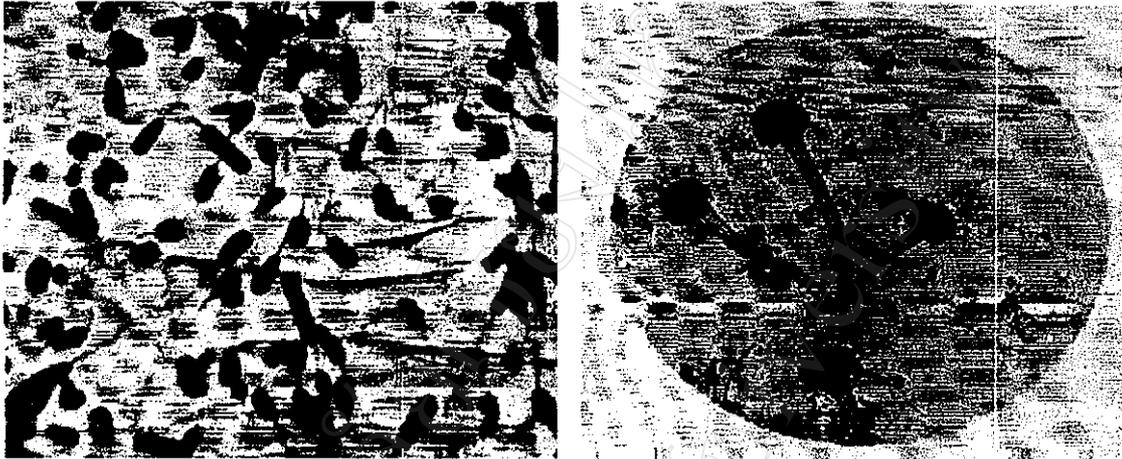
*Aspergillus penicilloides* เป็นเชื้อที่แตกต่างจากตัวอื่นๆในกลุ่มเดียวกัน เพราะหัวสปอร์ (spore heads) จะมีรูปร่างเป็นรัศมีมากกว่าที่จะเป็นรูปทรงกระบอก เจริญได้บ้างในอาหาร Czapek agar ในสภาวะการเจริญปกติต้องการความเข้มข้นของน้ำตาลสูงมากในอาหารเลี้ยงเชื้อในตอนแรกคอเนเดีย (conidia) จะเป็นรูปไข่และจะเปลี่ยนเป็นรูปถังเบียร์ (barrel-shaped) จนถึงทรงกลม (globose) มีลักษณะหยาบมาก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.0-4.0 ไมครอน หรือบางที่อาจจะพบถึง 5 ไมครอน

*Aspergillus restrictus* มีลักษณะพิเศษคือ โคโลนีจะมีสีเขียวอ่อนจนถึงเขียวน้ำตาล เวสิเคิล (vesicle) จะมี conical อยู่เล็กน้อย head จะเป็นรูปทรงกระบอกยาว คอเนเดียเมื่อยังอ่อนจะเป็นรูปทรงกระบอกและแทบจะไม่มีสี ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นรูปทรงลูกแพร์ (pear-shaped) และมีสีเขียวน้ำตาลเข้ม ขนาด 4.5-6.0 x 3-4 ไมครอน ในบางครั้งจะพบว่ามีความยาวถึง 10 ไมครอน

### กลุ่มที่ 3 กลุ่มของ *Aspergillus fumigatus*

ลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือโคโลนีมักจะเป็นสีเขียวมัวเข้ม (dark smoky green) และจะเข้มขึ้นเรื่อยๆเมื่อมีอายุมากขึ้น การสร้างสปอร์จะช้า head ที่ยังอ่อนอยู่จะมีสีเขียวฟ้า conidial heads เป็นรูปทรงกระบอก กว้างประมาณ 40 ไมครอน ส่วนความยาวนั้นค่อนข้างจะไม่แน่นอน (รูป 1.4ก) คอเนเดีย (conidia) มักจะมีสีเขียว เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-8 ไมครอน เวสิเคิล (vesicle) เป็นรูปทรงกระเปาะ (flask-shaped) และจะมี phialides เกิดขึ้นบนเวสิเคิลในลักษณะรวมตัวกันแน่น มีขนาด 6-8 x 2-3 ไมครอน คอเนเดียเป็นรูปทรงกลม ผิวขรุขระ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5-3 ไมครอน head ที่เกิดขึ้นใน lactophenol จะมีลักษณะต่างๆเกิดขึ้นมากมาย (รูป 1.4ข) เชื้อในกลุ่มนี้เมื่อเจริญถึงขั้นสูงสุดจะมีรูปร่างลักษณะของคอเนเดียที่จำเพาะที่จะสามารถแบ่งแยกได้มี 4 สปีชีส์ คือ *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus fischeri* (*sartorya fumigata*), *Aspergillus malignus* และ *Aspergillus quadricinctus* สำหรับเชื้อตัวแรก

เป็นเชื้อที่รู้จักกันดี ส่วนเชื้อตัวที่สองเป็นเชื้อที่พบเห็นได้ยาก ในขณะที่เชื้อตัวที่สามและสี่แต่ทราบเพียงว่าเป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มนี้เท่านั้น



ก

ข

รูป 1.4 แสดงเชื้อ *Aspergillus* กลุ่ม *Aspergillus fumigatus* (Smith, 1969)

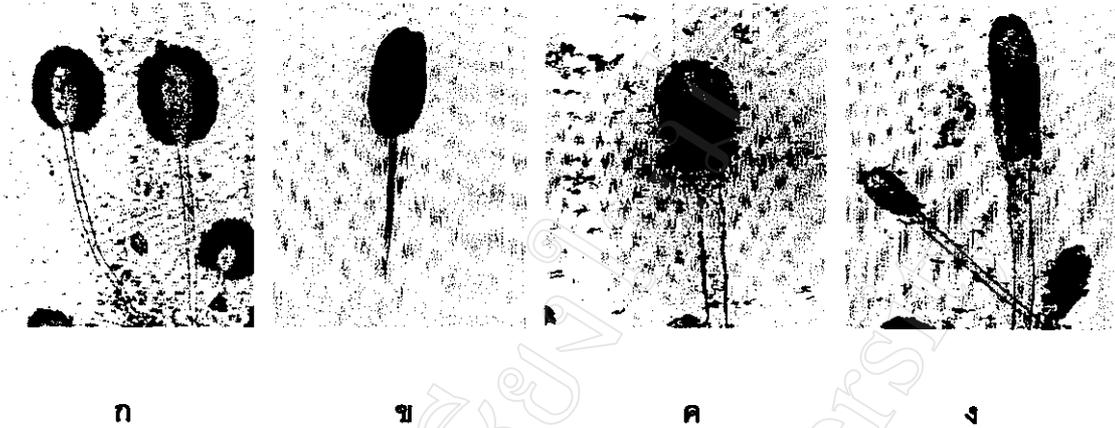
ก : columnar heads (x50)

ข : typical conidiophore (x250)

*Aspergillus fumigatus* เป็นเชื้อที่สร้างสารพิษที่ทำให้เกิดโรคในนก ที่รู้จักกันดีในชื่อของ "Aspergillosis" ส่วนมนุษย์สามารถที่จะติดโรคนี้ได้ถ้าไปสัมผัสกับเชื้อ และจะทำให้เกิดเนื้องอกในที่ต่างๆ ซึ่งไม่ได้เกิดขึ้นบ่อยนัก ลักษณะของเชื้อ *Aspergillus fumigatus* คือสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง อุณหภูมิที่เจริญได้ดีคือที่ 45 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า สามารถพบเห็นได้ในใบไม้ที่เน่าเปื่อย

กลุ่มที่ 4 กลุ่มของ *Aspergillus clavatus*

ลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือโคโลนีสามารถเจริญได้รวดเร็ว มีลักษณะอ่อนนุ่มเหมือนก้ามหอย มีสีเขียว-เทาฟ้า ลักษณะสำคัญของ *Aspergillus* กลุ่มนี้ที่ชัดที่สุดคือ มีก้านชูอับสปอร์ที่ยาว มีเวสิเคิล (vesicle) เป็นรูปกระบอง (club-shaped) และมี phialides เกิดขึ้นบนเวสิเคิลในลักษณะรวมตัวกันแน่น (รูป 1.5ก) ในบางครั้งสามารถที่จะพบบนอาหารธรรมดา (ordinary culture) head ที่แก่เต็มที่จะถูกตัดออกไป และสามารถที่จะเจริญต่อบนอาหารพิเศษ คอนิเดีย (conidia) เป็นรูปไข่มีขนาด  $3.5-4.5 \times 2.5-3$  ไมครอน



รูป 1.5 แสดงเชื้อ *Aspergillus* กลุ่ม *Aspergillus clavatus* (Smith, 1969)

ก : *A. clavus*-conidiophores (x100)

ข : *A. giganteus*-single head of characteristic shape (x25)

ค : *A. giganteus*-head with cleavate vesicle (x100)

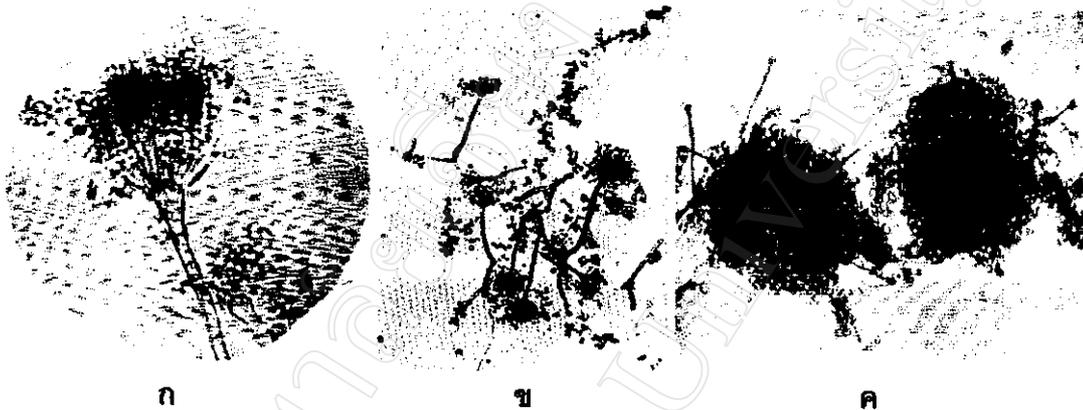
ง : *A. giganteus*-head with elongate vesicle (x100)

เชื้อในกลุ่มนี้ที่พบเห็นได้มี 2 สปีชีส์ คือ *Aspergillus clavatus* (รูป 1.5ก) และ *Aspergillus giganteus* (รูป 1.5ข-ง) พบว่ามีความแตกต่างกันเล็กน้อย คือ *Aspergillus giganteus* เมื่อเลี้ยงในอาหารธรรมดา (ordinary culture) จะผลิต head ไม่มากนัก ในขณะที่เลี้ยงบนอาหารพิเศษจะพบว่า ก้านชูอับสปอร์ก็จะยาวหลายเซนติเมตร และพบว่าเชื้อเหล่านี้ต้องการไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และในการสร้าง head ที่มีขนาดใหญ่หลายๆจะต้องมีสังกะสี (zinc) และจะต้องเลี้ยงในบริเวณที่มีแสงเพียงพอ

#### กลุ่มที่ 5 กลุ่มของ *Aspergillus nidulans*

ลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือ เมื่อเริ่มต้นโคโลนีจะมีลักษณะอ่อนนุ่มเหมือนกำมะหยี่ มีเพียงสีเขียวเท่านั้น ต่อจากนั้นจะมีจุดแต้มสีขาวจากตรงกลางกระจายออกไปรอบๆ และเมื่ออยู่ในขั้น perithecia ที่สมบูรณ์ จะเปลี่ยนไปเป็นสีแดงจนถึงม่วง ในบางครั้งพบว่าในสายพันธุ์ที่มีคอนิเดียสีม่วงจะยังคงเป็นสีม่วงอยู่แม้จะอยู่ในขั้น perithecia ที่สมบูรณ์ ก้านชูอับสปอร์จะมีลักษณะคด มีสีน้ำตาล head มีลักษณะเป็นทรงกระบอกสั้น เวลึเคิลจะมี hemipheerical ในขณะที่ phialides จะตั้งอยู่บน metulae และมีขนาด 5-6 x 2-2.5 ไมครอน คอนิเดียเป็นรูปทรงกลม ลักษณะขรุขระ มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-3.5 ไมครอน perithecia เป็นรูปทรงกลม ลักษณะขรุขระ สีแดงม่วงเข้ม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 150 ไมครอน มี asci 8

สปอร์และจะแตกออกเมื่อ perithecia แก่เต็มที่ แอสโคสปอร์ (ascospore) มีสีแดงจนถึงม่วง ขนาดประมาณ 5 x 4 ไมครอน ในบางครั้งจะพบ perithecia ถูกล้อมรอบด้วยเซลล์ที่มีผนังเซลล์ บางๆจำนวนมากที่เรียกว่า "hulle cells" (รูป 1.6ค) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 25 ไมครอน เชื้อ ในกลุ่มนี้จะมีประมาณ 18 สปีชีส์ และ 5 วาไรตี้ส์



รูป 1.6 แสดงเชื้อ *Aspergillus* กลุ่ม *Aspergillus nidulans* (Smith, 1969)

ก : head with columnar mass of spores (x250)

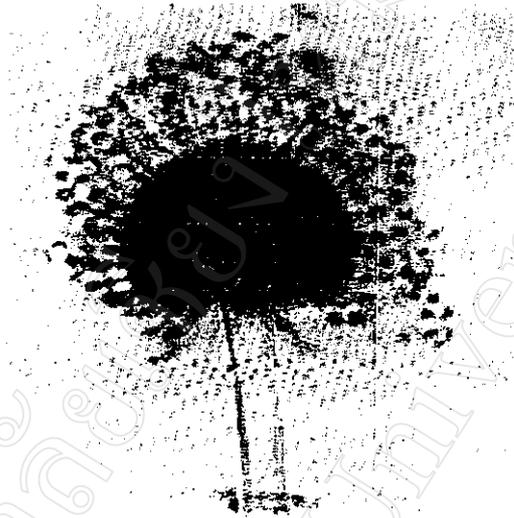
ข : a more usual type of appearance (x250)

ค : perithecia of perfect state with masses of hulle cells (x100)

#### กลุ่มที่ 6 กลุ่มของ *Aspergillus versicolor*

เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วไปในป่า และพบในแหล่งเดียวกับกลุ่มของ *Aspergillus glaucus* แต่ต้องการความชื้นในการเจริญมากกว่า ลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือการที่มีสีมากมาย ในแต่ละสายพันธุ์จะมีสีตั้งแต่เขียวอ่อน (pale green) เขียวเทา (greyish green) สีเนื้อ (buff) หรือแม้กระทั่งสีชมพู (pink) ในขณะที่เชื้อเดี่ยวๆ บางครั้งจะพบว่ามีสีเหลืองเป็นหย่อมๆ (patch of yellow) สีชมพู ขาวและเขียวบนผิวหน้าและจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้มหรือสีลูกพลัม (plum colour) ในเวลาต่อมา ส่วนลักษณะของโคโลนีอาจจะเหมือนกำมะหยี่ จับกันเป็นก้อนหรืออาจจะจับกันเป็นหย่อมๆ ก้านชูอับสปอร์จะเป็นเส้นตรง รามเรียบและไม่มีสี ส่วน head จะมีลักษณะแผ่กระจายเป็นรัศมี เวลิตีลเป็นรูปทรงกลมหรือรูปไข่ และมี phialides เกิดขึ้นบน maetulae ขนาดประมาณ 5-10 x 2-2.5 ไมครอน คอนิเดียเป็นรูปทรงกลม ขรุขระเล็กน้อย มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.5-3 ไมครอน แต่ในบางครั้งจะพบที่มีขนาดใหญ่กว่านี้ ในการเลี้ยงบน lacto-phenol

พบว่าโคโคนีและสปอร์จะมีสีเขียวอมรกตที่สวยงามมาก เชื้อในกลุ่มนี้จะมีประมาณ 17 สปีชีส์ และ 1 วาไรตี้ส์



รูป 1.7 แสดง typical head ของเชื้อ *Aspergillus versicolor* (x1000) (Smith, 1969)

#### กลุ่มที่ 7 กลุ่มของ *Aspergillus sydowii*

เป็นสปีชีส์ที่มีฐานฐานวิทยาใกล้เคียงกับกลุ่มของ *Aspergillus versicolor* แต่โคโคนีของ *Aspergillus sydowii* จะมีลักษณะเหมือนกำมะหยี่ (velvety) สีเขียวฟ้าเข้ม (deep bluish green) หรือสีน้ำเงินเขียว (greenish blue) และต่อมามากจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม (very deep red) ซึ่งทำให้เข้าใจผิดได้ง่ายว่าเป็นเชื้อ *Penicillium* ต้องทำการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถึงจะรู้ได้

#### กลุ่มที่ 8 กลุ่มของ *Aspergillus terreus*

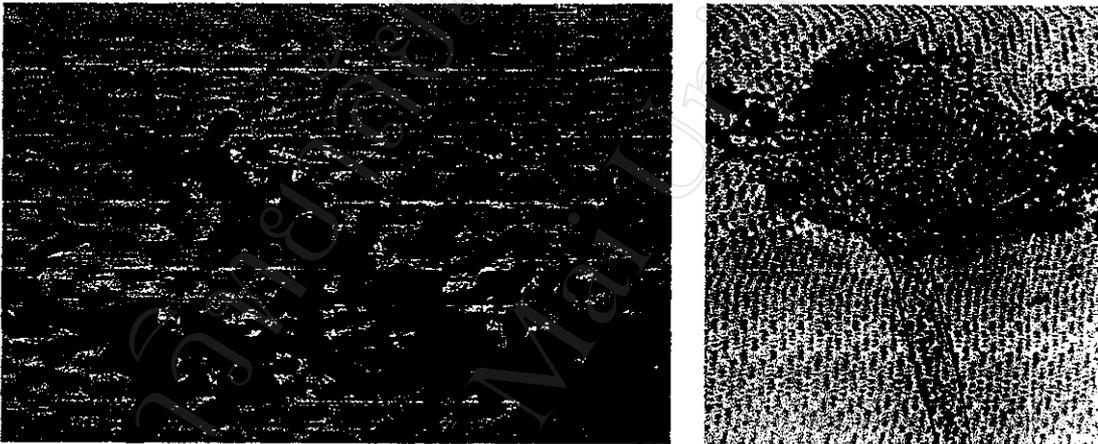
ลักษณะโดยทั่วไปของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือ head เป็นรูปทรงกระบอก ก้านชูอับสปอร์มีลักษณะเรียบ ไม่มีสี haemispherical vesicle เกิดขึ้นเหนือบริเวณครึ่งหรือสองในสามของเวสิเคิล มี phialides เกิดขึ้นบน maetulae คอนิเดียมีขนาดเล็กและมีลักษณะที่ราบเรียบ โดยปกติจะพบเชื้อกลุ่มนี้ได้ในดิน และในผักทุกชนิด และยังมีรายงานการพบเชื้อกลุ่มนี้ในลำไส้จาก อียิปต์และอเมริกา Thom และ Raper ได้แยกเชื้อกลุ่มนี้ออกเป็น 3 สปีชีส์ และ 3 วาไรตี้ส์ ในขณะที่ Raper และ Fennell ได้ลดลงเหลือ 1 สปีชีส์ และ 2 วาไรตี้ส์ คือ

*Aspergillus terreus* โคโคนีมีลักษณะเหมือนกำมะหยี่ สีอบเชย (cinnamon) จนถึงสีน้ำตาล-ทราย (sand-brown) และเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจนถึงน้ำตาลเข้ม โดยสีน้ำตาลที่เกิดขึ้นเกิดจาก

การที่มีสังกะสี (zinc) อยู่ในโครงสร้าง head เป็นรูปทรงกระบอก มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 30-50 ไมครอน และยาวถึง 500 ไมครอน เวสิเคิล (vesicle) เป็นรูปโดม (dome shaped) เกิดขึ้นใกล้ๆกับกลุ่มของ metulae ส่วน phialides มีขนาด 5.5-7.5 x 1.5-2 ไมครอน คอนิเดียมีรูปทรงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 ไมครอน

*Aspergillus terreus* var. *africanus* โคลินี้มีลักษณะเหมือนกำมะหยี่ สีอบเชย (cinnamon) จนถึงสีน้ำตาลส้ม (orange-brown) คอนิดิโอเฟอร์ (conidiophore) สั้น

*Aspergillus terreus* var. *aureus* โคลินี้รวมกันเป็นกลุ่ม มีสีเหลืองทอง head เล็ก คอนิดิโอเฟอร์ (conidiophore) ยาวถึง 500 ไมครอน หรืออาจมากกว่า



ก

ข

รูป 1.8 แสดงเชื้อ *Aspergillus* กลุ่ม *Aspergillus terreus* (Smith, 1969)

ก : columnar heads as seen in Petri dish (x50)

ข : typical head (x800)

#### กลุ่มที่ 9 กลุ่มของ *Aspergillus ustus*

ลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือ โคลินี้จะอยู่กันเป็นกลุ่ม เริ่มต้นจะมีสีเหลืองน้ำตาล (brownish yellow) และจะกลายเป็นสีน้ำตาลหรือม่วงเทาไปจนถึงสีเทา และจะกลับมาเป็นสีเหลืองและสีแดงหรือสีม่วงอ่อน ก้านชูอับสปอร์สั้น ผิวราบเรียบ สีน้ำตาลอ่อน เส้นผ่าศูนย์กลาง 5-10 ไมครอน เกิดขึ้นมาจากส่วนของ foot cell เวสิเคิลเป็นรูปทรงกลม metulae มีขนาด 5-6 ไมครอน phialides ยาว 6-9 ไมครอน คอนิเดียเป็นรูปทรงกลม ลักษณะขรุขระ เส้นผ่า

ศูนย์กลาง 3-3.5 ไมครอน ในบางครั้งพบว่ามีเส้นผ่าศูนย์กลางถึง 5 ไมครอน และในบางสายพันธุ์พบว่าการสร้าง hulle cells ที่มีรูปร่างเป็นทรงกลม ไข่ หรือได้กรอกที่มีลักษณะโค้งหรือบิดเบี้ยว (รูป 1.9) Raper และ Fennell ได้จำแนกเชื้อกลุ่มนี้ออกเป็น 5 สปีชีส์



รูป 1.9 แสดง hulle cells ของเชื้อ *Aspergillus ustus* (Smith, 1969)

#### กลุ่มที่ 10 กลุ่มของ *Aspergillus flavipes*

ลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือมีโคโคไนด์สีขาว หรือสีเงินขาว (silvery white) ในบางครั้งจะพบว่ามีสีชมพูอ่อนหรือสีม่วงสดมาแต่บนไมซีเลียม และจะพบว่าสีขาวจะยังคงอยู่และในบางครั้งจะพบว่าเป็นสีเนื้ออ่อนหรือสีเนื้อเทา (greyish buff) ในบางสายพันธุ์พบว่าการสร้างไมซีเลียที่ขัดกันเป็นปม ก้านชูอับสปอร์มีสีเหลืองหรือสีเหลืองน้ำตาล head เป็นรูปทรงกระบอก (รูป 1.10) มี phialides เกิดขึ้นบน maetulae ขนาดประมาณ 5-8 x 1.5-2 ไมครอน คอนิเดียเป็นรูปทรงกลม ผิวเรียบ มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 ไมครอน



รูป 1.10 แสดง columnar heads ของเชื้อ *Aspergillus flavipes* (Smith, 1969)

### กลุ่มที่ 11 กลุ่มของ *Aspergillus candidus*

ลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือ head จะมีลักษณะกลม สีขาวหรือสีครีมขาว เชื้อส่วนใหญ่ในกลุ่มค่อนข้างจะเจริญเติบโตซ้ำในอาหารธรรมดา (ordinary media) การเจริญจะเร็วขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น ในบางสายพันธุ์พบว่าผลิตเพียงแต่ไมซีเลียมเพียงเล็กน้อย และพบเพียงก้านชูอับสปอร์เกิดขึ้นมาจากอาหาร ผลิตภัณฑ์อื่นๆที่พบเห็นคือ พบการรวมตัวกันของโคโลนีเพียงเล็กน้อย และพบโครงสร้างของสปอร์เกิดขึ้นมาจากไมซีเลียมที่อยู่ในอากาศและในของเหลว ก้านชูอับสปอร์ (stalk) ตั้งชัน ไม่มีสีหรืออาจจะมีสีเหลืองเล็กน้อย บริเวณที่อยู่ใกล้กับเวสิเคิล มีลักษณะราบเรียบ บางสายพันธุ์ก้านชูอับสปอร์จะสั้น ในขณะที่บางสายพันธุ์ก็ยาวถึง 1 มิลลิเมตร head จะมีลักษณะกลมและบ่อยครั้งที่พบว่าจะแตกเป็นคณินเดี่ยว สายยาวเมื่อมีอายุมากขึ้น head ค่อนข้างจะมีขนาดที่ไม่แน่นอนโดยที่พบว่ามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 100-250 ไมครอน เวสิเคิลมีลักษณะกลม และมีการผลิต metulae ขึ้นมาปกคลุม ต่อจากนั้นก็มีการสร้าง head เป็นรูปทรงกระบอก metulae ที่เกิดจาก head จะมีความยาวตั้งแต่ประมาณ 5 ไมครอน จนถึง 15-20 ไมครอน และในบางครั้งพบว่ามีความยาวถึง 30 ไมครอน มีผิวที่หนา และมีรูปร่างเป็นรูปสามเหลี่ยม (wedge-shaped) ในขณะที่ phialides มีขนาด 5-8 x 2-3 ไมครอน คณินเดี่ยวมีรูปทรงกลมหรือในบางครั้งพบว่าจะเป็นรูปถังเบียร์ (barrel-shaped) ผิวราบเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5-3.5 ไมครอน ในบางสายพันธุ์พบว่าจะมีการสร้าง sclerotia สีม่วงจนถึงดำ

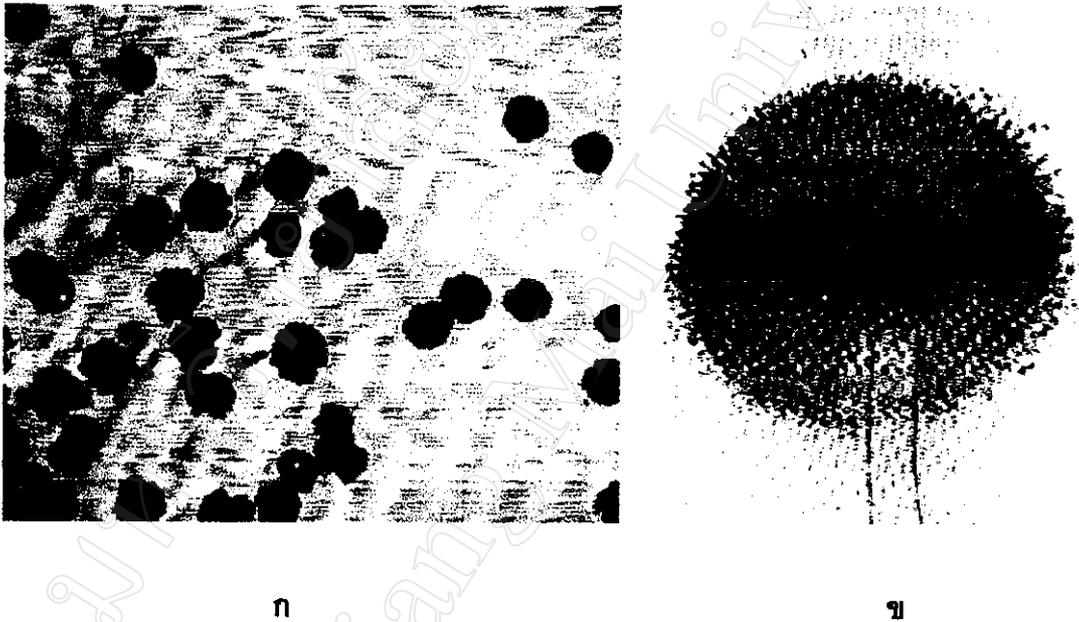
เชื้อในกลุ่มนี้จะมีลักษณะคล้ายกับเชื้อในกลุ่ม *Aspergillus glaucus* กล่าวคือสามารถเจริญได้ในอาหารหรือวัตถุที่มีความชื้นเพียงเล็กน้อย และยังสามารถที่จะเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงๆ

### กลุ่มที่ 12 กลุ่มของ *Aspergillus niger*

ลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือ มีสปอร์สีดำ จึงได้ชื่อว่าเป็น "Black Aspergilli" เป็นเชื้อที่พบได้ทั่วโลก และมีชนิดและสายพันธุ์จำนวนมาก ดังนั้นการแยกเป็นชนิดต่างให้ชัดเจนนั้นเป็นสิ่งที่ทำได้ยาก

โคโลนีของ *Aspergillus niger* สามารถที่จะกระจายได้อย่างรวดเร็ว โดยในเริ่มต้นจะมีการสร้างไมซีเลียมสีขาว และจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองสว่าง (bright yellow) มีก้านชูอับสปอร์ (stalk) จะถูกสร้างขึ้นมาจากชั้นล่าง (substratum) มีความยาวตั้งแต่ 200 ไมครอน จนถึงเป็นมิลลิเมตร โคโลนีมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10-20 ไมครอน ไม่มีสี มีลักษณะราบเรียบ และจะแยกออกเมื่อถูกกระทบ head มีลักษณะเป็นทรงกลม และจะมีการแยกที่ผิวรอบนอก (รูป 1.11ก) เวสิเคิลมีลักษณะกลม ไม่มีสีหรืออาจจะมีสีน้ำตาลเหลือง เกิดขึ้นเต็มพื้นผิว มีเส้นผ่าศูนย์กลาง

ประมาณ 50 ไมครอน phialides เกิดขึ้นจากเวสิเคิลโดยตรง ในบางสายพันธุ์พบว่า phialides มีขนาดประมาณ  $7 \times 2-3$  ไมครอน มักจะมีสีน้ำตาล และเมื่อแก่เต็มที่จะมีความยาวตั้งแต่ 10-15 ไมครอน สำหรับเชื้อ *Aspergillus niger* ส่วนเชื้อ *Aspergillus carbonarius* จะมีความยาวถึง 120 ไมครอน คอนิเดียเป็นรูปทรงกลม สีน้ำตาลจนถึงสีดำหรือน้ำตาลม่วง โดยสีจะไหลมารวมกลุ่มกัน อยู่ในชั้นของผนังเซลล์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 2.5-10 ไมครอน (รูป 1.11) ในบางครั้งจะพบ sclerotia ในสายพันธุ์ที่แยกขึ้นมาใหม่ มีลักษณะเป็นวง สีขาว เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร แต่บ่อยครั้งที่พบว่าจะกลายเป็นคอนิเดียหลังจากที่เพาะเลี้ยงขึ้นมาใหม่เพียงเล็กน้อย แต่ในบางสายพันธุ์จะพบว่าคอนิเดียที่เก็บรักษามาเป็นปีจะสร้าง sclerotia ขึ้นมาในทันที



รูป 1.11 แสดงเชื้อ *Aspergillus* กลุ่ม *Aspergillus niger* (Smith, 1969)

ก : globose heads as seen in Petri dish (x20)

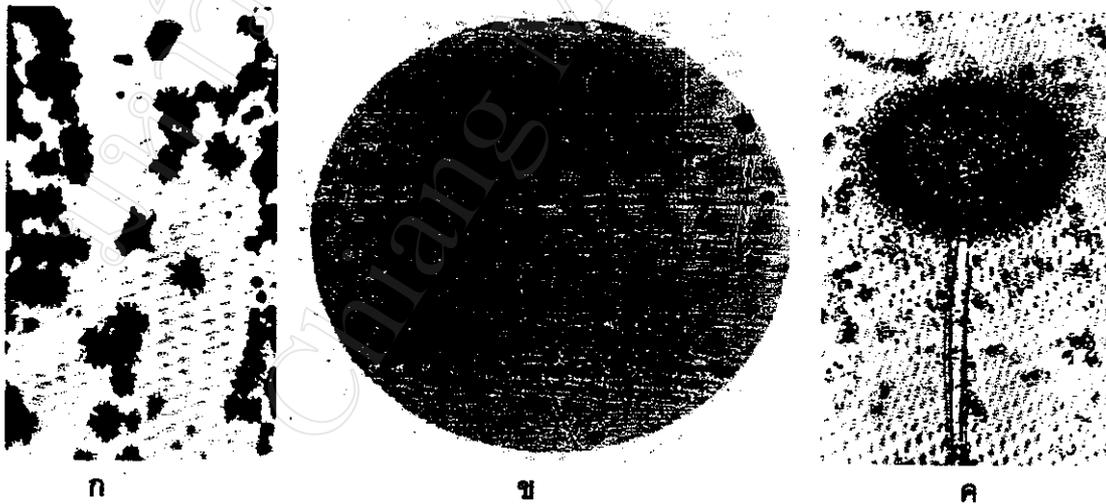
ข : young head not yet fully pigmented (x500)

ในการจำแนกเชื้อออกเป็นกลุ่มในแต่ละปีชีสนั้น มักจะใช้ข้อมูลของขนาดและรูปร่างของ maetulae และคอนิเดียเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนก โดย Thom และ Church ได้รายงานไว้ 7 สปีชีส์ ในขณะที่ Raper และ Fennell ได้รายงานไว้ 10 สปีชีส์กับ 2 วาไรตี้สำหรับพวกที่มี maetulae อยู่ที่ head และ 2 สปีชีส์สำหรับพวกที่ไม่มี maetulae

*Aspergillus niger* van Tieghem เป็นเชื้อที่มี *maetulae* สั้น คือยาวประมาณ 20-30 ไมครอน มีคอนิเดียขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5-4 ไมครอน ในบางครั้งพบถึง 5 ไมครอน head มีหลายสีซึ่งจะแตกต่างกันตาม strain โดยจะพบตั้งแต่สีน้ำตาลดำ น้ำตาลม่วง จนถึงสีดำ

กลุ่มที่ 13 กลุ่มของ *Aspergillus wentii*

เป็นกลุ่มเชื้อที่จำได้ง่าย โดยลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือจะสร้างไมซีเลียมที่รวมตัวกันอย่างหนาแน่นสูงขึ้นมาในอากาศ (aerial mycelium) มีสีขาวหรืออาจจะมีสีชมพูจนถึงสีแดงมาแต่มีอยู่ด้วยเมื่อเลี้ยงในที่ที่มีแสง สามารถพบเชื้อกลุ่มนี้ได้ในได้ดิน หัวสปอร์ (spore head) มีสีกาแฟ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 500-800 ไมครอน เมื่อแก่จะมีลักษณะที่หลุดลุ่ยไม่สม่ำเสมอโดยจะเกิดขึ้นบนก้านชูสปอร์ (stalk) ที่ยาวเรียว ลักษณะราบเรียบไม่มีสีเขียวหลายมิลลิเมตร และมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 10-25 ไมครอน เวสิเคิลเป็นรูปทรงกลม *metulae* มีความยาวที่ไม่แน่นอน แต่โดยปกติแล้วจะยาว 10-20 ไมครอน *phialides* มีขนาด 6-8 x 3 ไมครอน คอนิเดียเป็นรูปทรงกลม หรือรูปไข่เล็กน้อย มีลักษณะหยาบ แต่ในบางครั้งก็พบว่า มีลักษณะราบเรียบด้วย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 ไมครอน (รูป 1.12ก)



รูป 1.12 แสดงเชื้อ *Aspergillus* กลุ่ม *Aspergillus wentii* (Smith, 1969)

ก : mature heads as seen in Petri dish (x20)

ข : portion of young culture (x25)

ค : typical head (x250)

กลุ่มที่ 14 กลุ่มของ *Aspergillus ochraceus*

ลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือโคโลนีสีเหลืองดิน (ochre) หรือสีเนื้อ (buff) submerged mycelium จะไม่มีสี หรืออาจจะมีสีเหลืองหรือสีม่วงอ่อนๆ spore head มีขนาดใหญ่ และเห็นชัดมาก เริ่มต้นจะเป็นทรงกลม และจะแยกเป็นรูปทรงกระบอกสองหรือหลายๆ อัน ทำให้มีลักษณะ และสีเหมือนรวงข้าวโพด จึงได้ชื่อว่า "sheaves of corn" (รูป 1.13ก-ข) ก้านชูอับสปอร์ (stalk) ยาว เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 ไมครอนหรือมากกว่า มีสีเหลือง ลักษณะไม่ราบเรียบ (รูป 1.13ค) เวสิเคิล (vesicle) เป็นรูปทรงกลม metulae มีความยาวที่ไม่แน่นอน แต่ปกติจะยาว 15-30 ไมครอน phialides มีขนาด 7-10 x 1.5-2.5 ไมครอน คอนิเดีย (conidia) เป็นรูปทรงกลมหรือใกล้เคียง มีลักษณะขรุขระเล็กน้อย เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-5 ไมครอน ในบางสายพันธุ์แม้จะมี head ที่สมบูรณ์แต่ก็ไม่มีการสร้าง sclerotia ในขณะที่บางสายพันธุ์ก็มีการสร้าง sclerotia สีส้มจนถึงสีน้ำตาล แม้ว่าจะมี head เพียงเล็กน้อย



รูป 1.13 แสดงเชื้อ *Aspergillus* กลุ่ม *Aspergillus wilhelm* (Smith, 1969)

ก : heads as seen in Petri dish (x20)

ข : single large head in old culture, showing characteristic splitting (x25)

ค : typical head (x500)

กลุ่มที่ 15 กลุ่มของ *Aspergillus sulphureus*

เป็นกลุ่มที่มีขนาด รูปร่างและลักษณะคล้ายคลึงกับกลุ่มของ *Aspergillus ochraceus* แต่จะแตกต่างกันที่สีของคอนิเดีย (conidia) โดยเชื้อในกลุ่ม *Aspergillus sulphureus*

จะมีโคโคนีสีเหลืองแทนที่จะเป็นสีเนื้อเหมือนใน *Aspergillus ochraceus* และในบางสายพันธุ์พบว่ามีการผลิต sclerotia ที่สมบูรณ์จำนวนมาก

กลุ่มที่ 16 กลุ่มของ *Aspergillus ornatus*

ลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือ head จะมีขนาดใหญ่ มีลักษณะเป็นรูปรีคมีจนถึงทรงกระบอก โดยจะมีสีเขียวเข้มจนถึงน้ำตาล ในโครงสร้างที่สมบูรณ์ (perithecia) จะเป็นสีขาว จนถึงสีม่วง

กลุ่มที่ 17 กลุ่มของ *Aspergillus cervinus*

ลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือ head มีขนาดเล็ก เป็นรูปรีคมี มีสีในโทนสีเทาแกมเหลืองจนถึงชมพู ไม่มีการสร้าง perithecia

กลุ่มที่ 18 กลุ่มของ *Aspergillus cremeus*

ลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือ head จะมีสีเขียวจนถึงสีเนื้อ ในบางสายพันธุ์มีการสร้างโครงสร้างที่สมบูรณ์ (perithecia) โคนิเดียม (conidia) มีขนาดใหญ่ สีเขียวเทา (grey-green) ก้านชูอับสปอร์ (stalk) สีน้ำตาล

กลุ่มที่ 19 กลุ่มของ *Aspergillus sparsus*

เป็นกลุ่มที่มีลักษณะและรูปร่างใกล้เคียงกับกลุ่มของ *Aspergillus cremeus* กล่าวคือ head จะมีสีเขียวจนถึงสีเนื้อ ในบางสายพันธุ์มีการสร้างโครงสร้างที่สมบูรณ์ (perithecia) โคนิเดียม (conidia) มีขนาดใหญ่ แต่จะเป็นสีเนื้อ (buff) ในขณะที่ *Aspergillus cremeus* จะเป็นสีเขียวเทา ก้านชูอับสปอร์ (stalk) สีน้ำตาล

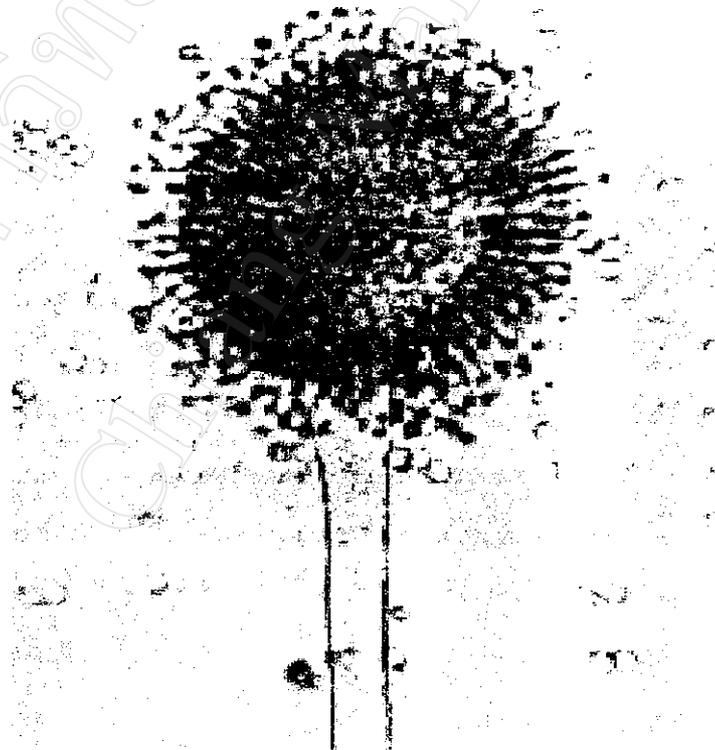
กลุ่มที่ 20 กลุ่มของ *Aspergillus nidulans*

ลักษณะพิเศษของ *Aspergillus* กลุ่มนี้คือ head เป็นรูปทรงกระบอก (columnar) ก้านชูอับสปอร์ (stalk) เป็นสีน้ำตาล โครงสร้างที่สมบูรณ์ (perithecia) และแอสโคสปอร์ (ascospores) มีสีม่วง ในบางสายพันธุ์มีการสร้าง hulle cells

กลุ่มที่ 21 กลุ่มของ *Aspergillus flavus*

Thom และ Raper ได้จำแนกเชื้อในกลุ่มนี้ออกเป็น 5 สปีชีส์ แต่ในที่นี้จะอธิบายเพียงแค่ 4 ตัวที่สำคัญ คือ *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus* และ *Aspergillus tamaris* โดยเชื้อทั้งหมดจะมีลักษณะที่เหมือนกันคือ ก้านชูอับสปอร์ จะมีลักษณะหยาบ เวสิเคิล (vesicle) มีการสร้าง metulae, phialides หรือทั้งสองอย่าง และโคนิเดียม (conidia) มีลักษณะหยาบ

*Aspergillus flavus* มีลักษณะพิเศษคือ โคลไคโนมีการเจริญและขยายออกอย่างรวดเร็ว โดยในตอนแรกจะมีสีเหลือง ต่อจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเขียว และเมื่อแก่จะมีสีเขียวน้ำตาล ก้านชูอับสปอร์ (stalk) ที่ถูกสร้างขึ้นมาจะมีความยาวถึง 1 มิลลิเมตร และมีเส้นผ่าศูนย์กลางถึง 15 ไมครอน โดยจะมีผนังที่หยาบ ส่วน head มีขนาดที่หลากหลาย อาจจะเป็นทรงกลมหรือทรงกระบอก เวสิเคิล (vesicle) เป็นรูปทรงโดม (dome-shaped) จนถึงรูปทรงกระเปาะ (flask-shaped) มีการสร้าง metulae, phialides หรือทั้งสองอย่าง phialides โดยทั่วไปมีขนาด 7-10 x 2.5-3 ไมครอน โคนิเดียม (conidia) เป็นรูปทรงกลม ในบางครั้งพบว่าเป็นรูปลูกแพร์ (pear-shaped) ลักษณะหยาบ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3.5-5 ไมครอน บางสายพันธุ์มีการสร้าง sclerotia สีน้ำตาล



รูป 1.14 แสดงส่วน head เชื้อ *Aspergillus oryzae* var. *effusus* (x500) (Smith, 1969)

*Aspergillus oryzae* มีลักษณะพิเศษคือ โคลินีที่สร้างในตอนแรกจะมีสีเหลือง และในบางครั้งก็พบสีเขียวแต่ไม่ได้พบเห็นได้ง่ายนัก ต่อจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเหลืองอ่อน ก้านชูอับสปอร์ยาวถึง 2 มิลลิเมตร ผนังเซลล์บาง มีลักษณะหยาบ คอนิเดียมีหลายขนาด โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 4 จนถึง 9-10 ไมครอน

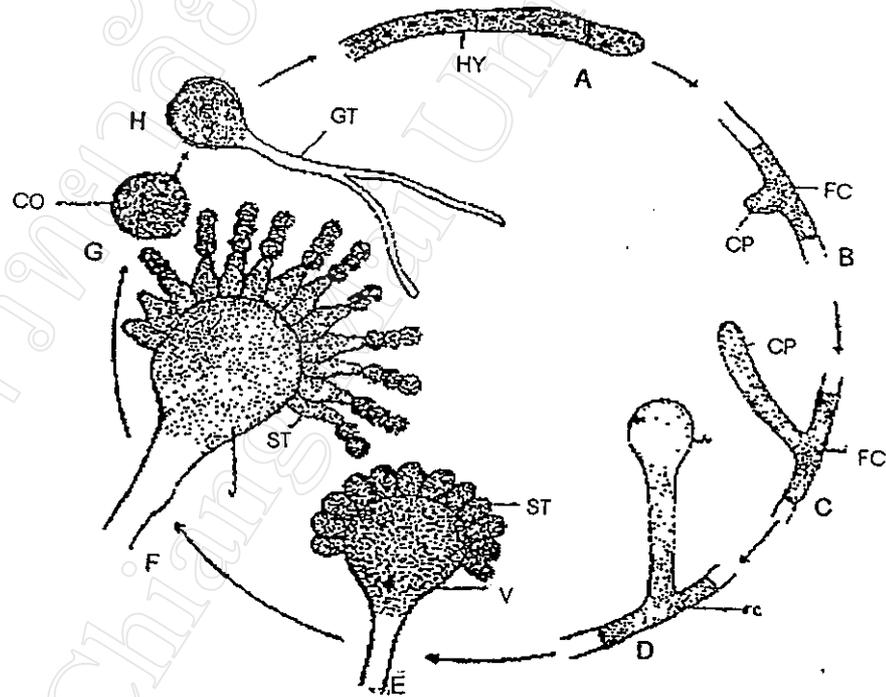
*Aspergillus oryzae* var. *effusus* เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ธรรมดาและแตกต่างจากเชื้ออื่นๆในกลุ่มนี้ โดยโคโลนีจะมีการรวมกลุ่มกัน เริ่มต้นจะมีสีขาว ต่อจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเขียว และในที่สุดจะเปลี่ยนเป็นสีแทน (tan) หรืออาจจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจนถึงสีชมพูหยาบ head จะมีลักษณะเหมือนเชื้ออื่นๆในกลุ่ม และจะพบก้านชูอับสปอร์เกิดขึ้นมาจากไมซีเลียมที่ชูขึ้นมาในอากาศ (aerial mycelium) แต่จะไม่พบในส่วนของไฮฟาหรือฟุตเซลล์

*Aspergillus parasiticus* มีลักษณะพิเศษคือ มีโคโลนีสีเขียวแก่ที่เข้มกว่าเชื้ออื่นๆในกลุ่มเดียวกัน มีก้านชูอับสปอร์ (stalk) ที่สั้น พบว่ายาวไม่เกิน 400 ไมครอน ไม่มีการสร้าง metulae โคลินีเป็นรูปทรงกลม ลักษณะหยาบ เส้นผ่าศูนย์กลาง 4-5 ไมครอน

*Aspergillus tamaris* มีลักษณะพิเศษคือ เริ่มต้นโคโลนีจะมีสีในโทนเขียว แต่โคโลนีที่แก่เต็มที่จะมีสีน้ำตาล สีน้ำตาลแก่จนถึงสีน้ำตาลแดง ในบางสายพันธุ์พบว่าจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอย่างรวดเร็วแม้จะอยู่ในช่วงเริ่มต้นของการเลี้ยง head มีขนาดใหญ่ เริ่มต้นจะเป็นทรงกลม และจะหลุดออกเป็นวงรีที่มี เวสิเคิล (vesicle) มีผนังเซลล์บาง และแตกได้ง่ายเมื่อถูกกระทบ head โดยทั่วไปจะมีการสร้าง metulae มีบางสายพันธุ์เท่านั้นที่ไม่สร้าง head ที่สร้าง metulae จะไม่สร้าง phialides โดยทั่วไป metulae จะมียาว 7-10 ไมครอน แต่ในบางสายพันธุ์ก็ยาวถึง 30 ไมครอน phialides มีขนาด 7-10 x 3 ไมครอน คอนิเดีย (conidia) เป็นทรงกลมจนถึงรูปลูกแพร์ ลักษณะหยาบเล็กน้อย เส้นผ่าศูนย์กลาง 5-7.5 ไมครอน เชื้อ *Aspergillus tamaris* จะมีคุณสมบัติที่เหมือนกับเชื้อใน *A. oryzae* และ *A. flavus* คือสามารถที่จะผลิต kojic acid

ข. วงจรชีวิตของเชื้อ *Aspergillus* (Mehrota, 1975)

เชื้อ *Aspergillus* มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาวะการเพาะเลี้ยง โดยในการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้น เชื้อ *Aspergillus* ทุกสายพันธุ์สามารถสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้ โดยจะเริ่มจากคอนิเดีย (conidia) หรือสปอร์ (spore) เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม จะมีการสร้าง germ tube (รูป 1.15H) ที่เป็นส่วนที่ทำให้เกิดไมซีเลียม และต่อมาก็มักจะมีการเปลี่ยนไมซีเลียม (mycelium) ให้ให้มีขนาดใหญ่ขึ้น และมีผนังเซลล์ที่บางลง และส่วนนี้ก็มักจะกลายเป็นฟุตเซลล์ (รูป 1.15B-D) โดยคอนิเดียแต่ละอันจะสร้างฟุตเซลล์แค่อันเดียว อาจมีลักษณะตรงหรือโค้งงอ อาจจะมีสีหรือไม่มีสี อาจจะมีผนังเซลล์ (septate) หรือไม่มีผนัง



รูป 1.15 แสดงการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อ *Aspergillus* (Mehrota, 1975)

FC : Foot cell

V : Vesicle

CO : Conidium

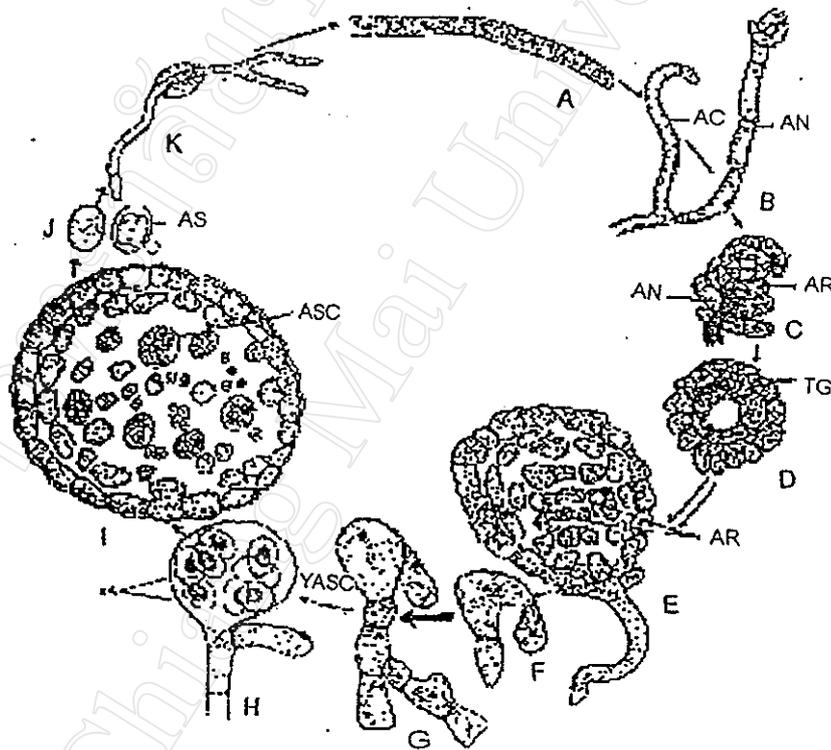
HY : Hypha

CP : Conidiophore

ST : Sterigma

GT : Germ tube

เซลล์ (non-ceptate) อาจจะมีผนังเซลล์ที่หยาบ (rough) หรือเรียบ (smooth) และก็จะกลายเป็น conidiospore (รูป 1.15B-C) ที่ต่อมากจะมีการขยายขนาดและกลายเป็นเวสิเคิล (vesicle) (รูป 1.15D-F) โดยรูปร่างของเวสิเคิลจะมีหลายแบบตั้งแต่ clavate, hemispherical, globose, elliptical ไปจนถึง spatulate โดยจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ของ *Aspergillus* ที่ส่วนปลายของเวสิเคิลจะมีการสร้างสเตอริจมา (sterigma) (รูป 1.15E,F) จำนวนมาก และที่ปลายของสเตอริจมาก็จะมีการสร้างโคนิเดียม (conidium) (รูป 1.15F) และจะมีการสร้างผนัง (septum) กันที่โคนิเดียมที่อยู่ส่วนปลาย ทำให้โคนิเดียมที่อยู่ส่วนปลายหลุดออกกลายเป็นโคนิเดียมหรือสปอร์ และเริ่มวงจรการสืบพันธุ์และเจริญเติบโตต่อไป



รูป 1.16 แสดงการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อ *Aspergillus* (Mehrota, 1975)

AR : Archicap

TG : Trichogyne

AN : Antheridium

AC : Ascogenous hyphae

YASC : Young ascus

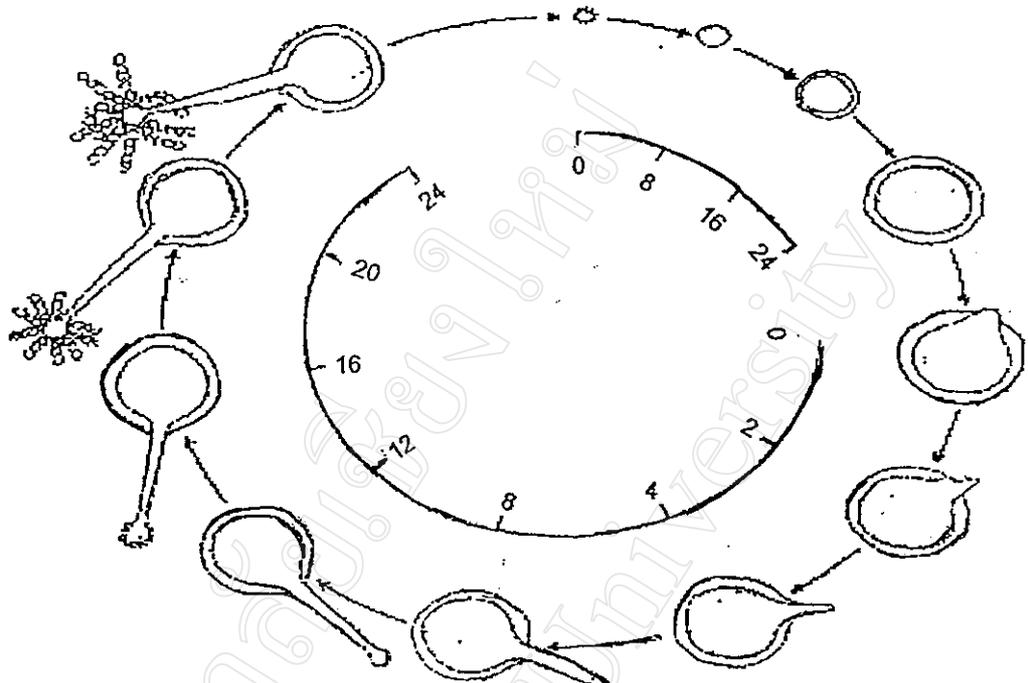
AS : Ascospore

ASC : Ascus

P : Peridium

ส่วนในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้น จะพบเพียง 25 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อ *Aspergillus* ทั้งหมดที่สามารถสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้ โดยจะเริ่มจากไมซีเลียมที่ถูกสร้างขึ้นมาจากconiเดีย จะสร้างอวัยวะเพศเมียที่เรียกว่า "archicarp" ขึ้นมาก่อน โดยในแต่ละ archicarp จะมีหลายนิวเคลียส (multinucleate) ต่อมาไฮฟาที่ยาวขึ้นจะมีการหดตัว และที่ส่วนปลายจะมีการโค้งงอเหมือนเกลียวเปิดจุกก๊อก (cork screw) ที่ในตอนแรกจะหดหลวมๆ ต่อมาก็ตึงแน่นขึ้น และจะพบว่าจะมีการสร้างผนังขึ้นมากันอวัยวะต่างๆ ทำให้เกิดเป็นโพรงที่มีอวัยวะต่างๆอยู่ภายใน และในบางครั้งจะพบการสร้าง antheridium (รูป 1.16C) ซึ่งเป็นอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ขึ้นมาสัมผัสกับ trichogyne แต่ยังไม่มีการรวมกัน (fusion) ของอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งสอง และในบางครั้งจะไม่พบการสร้าง antheridium ขึ้นมาสัมผัสกับ trichogyne แต่จะถูกสร้างขึ้นมาก่อน ในบางสายพันธุ์จะพบการรวมกันของนิวเคลียสใน ascogonium อย่างไรก็ตาม ในขั้นต้น (preliminary stage) ascogonium จะถูกพัฒนาไปมาก และจะมีการแบ่งเซลล์ของ multinucleate และจะพบการพัฒนาขึ้นมาเล็กน้อยของ ascogenous hyphae โดยในแต่ละ hyphae จะพบว่ามีสอง conjugate nuclei (รูป 1. 16D,E) ได้เป็นสี่ nuclei และจะมีอันหนึ่งสร้าง ascus (รูป 1. 16F) ดังนั้นในทุกๆ archicarp ที่เพิ่มขึ้นก็หมายถึงจำนวนของ asci ที่เพิ่มขึ้นด้วย การรวมกันของ nuclei ทั้งสองจะเกิดขึ้นในช่วงที่ ascus ยังไม่มีอายุมากนัก (รูป 1. 16G) และจะตามด้วยการแบ่งเซลล์ของสาม nuclei โดยในสองอันแรกจะแบ่งเซลล์แบบ meiosis และนิวเคลียสที่สามจะแบ่งเซลล์แบบ mitosis ได้เป็นแปด nuclei ในแต่ละแปด ของ haploid nuclei จะกลายเป็นนิวเคลียสของ ascospore ต่อไป เช่นเดียวกับฟังไจใน Ascomycetes อื่นๆ ที่จะมี cytoplasm รอบๆนิวเคลียสที่มีผนังเซลล์ และจะมีแอสโคสปอร์ 8 สปอร์ภายในแต่ละแอสคัส (ascus)

โดยช่วงเวลาในวงจรชีวิตจะแตกต่างกันตามสายพันธุ์ ธาตุอาหารที่จำเป็นของเชื้อแต่ละชนิด รวมถึงสภาวะแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ (temperature) แรงดันน้ำ (hydrostatic pressure) แสง (light) และรังสี (radiation) เช่นใน *Aspergillus niger* จะใช้เวลาในการสร้างconiเดียใหม่จากสปอร์จะใช้เวลา 2 วัน ในสภาวะที่เหมาะสม (รูป 1.17)



รูป 1.17 แสดงวงจรการสร้างคอนิเดียของ *Aspergillus niger* (Ingold, 1973)

ค. การใช้ประโยชน์ของเชื้อ *Aspergillus* ในอุตสาหกรรม (Smith และคณะ 1983)

เชื้อ *Aspergillus* นับว่ามีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น

*Aspergillus niger* ใช้ในการผลิตกรดซิตริก (citric acid) กรดกลูโคนิก (gluconic acid) กรดกาลิก (gallic acid) กรดออกซาลิก (oxalic acid) ผลิตเอนไซม์หลายชนิดที่ใช้เป็นยาช่วยย่อยอาหาร มีชื่อทางการค้าว่า Takadiastase และ Polyzime ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ( $\alpha$ -amylase) เอนไซม์เบต้า-กลูคาเนส ( $\beta$ -glucanase) เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (amylglucosidase) เอนไซม์เพคตินเนส (pectinase) เอนไซม์โปรติเอส (protease) เอนไซม์กลูโคส ออกซิเดส (glucose oxidase) เอนไซม์นารินจินเนส (naringinase) เอนไซม์แลคเตส หรือ เบต้า-กาแลคโตซิเดส (lactase or  $\beta$ -galactosidase) เอนไซม์เอกโซ-โพลีกาแลคตูโรเนส (exo-polygalacturonase) และวิตามินซี (ascorbic acid) เป็นต้น

*Aspergillus oryzae* ใช้ในการผลิต เอนไซม์เบต้า-อะไมเลส ( $\beta$ -amylase) เอนไซม์เพคตินเนส (pectinase) เอนไซม์อะมิโนเอซิลเลส (aminoacylase) เอนไซม์โปรติเอส (protease) เอนไซม์อะดีโนลิกเอซิดดีอะมิเนส (adenylic acid deaminase) เอนไซม์แลคเตส หรือ เบต้า-กาแลคโตซิเดส (lactase or  $\beta$ -galactosidase) ใช้ในการผลิตโคจิ (koji) มิโซ (miso) และโชยุ (shoyu)

*Aspergillus* spp. ใช้ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) และเอนไซม์ไลเปส (lipase)

*Aspergillus awamori* ใช้ในการผลิตเอนไซม์เพคตินเนส (pectinase) เอนไซม์แอลฟา-กาแลคโตซิเดส ( $\alpha$ -galactosidase) และเอนไซม์อินเวทาส (invertase)

*Aspergillus foetidus* ใช้ในการผลิตเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (amylglucosidase)

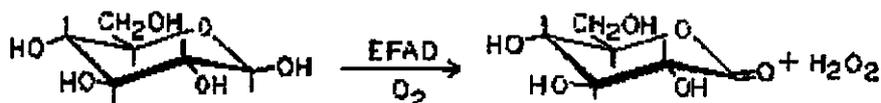
*Aspergillus itaconicus* (*Aspergillus glaucus* group) ใช้ในการผลิตกรดไอทาโคนิก (itaconic acid)

*Aspergillus terreus* ใช้ในการผลิตกรดไอทาโคนิก (itaconic acid)

สำหรับเอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Aspergillus* และมีความสำคัญในอุตสาหกรรม ได้แก่

1. เอนไซม์กลูโคส ออกซิเดส (glucose oxidase)

เอนไซม์กลูโคส ออกซิเดส (glucose oxidase) มีชื่อเรียกตามระบบว่า  $\beta$ -D-glucose : oxygen oxidoreductase, EC 1.1.3.4) ผลิตโดยเชื้อ *Aspergillus niger* เเร่งปฏิกิริยาการออกซิไดซ์กลูโคส ได้ผลิตภัณฑ์เป็น D-glucono- $\delta$ -lactone และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสในเลือด

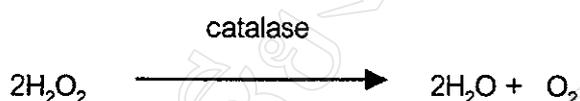


รูป 1.18 แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์กลูโคส ออกซิเดส (glucose oxidase)

(Bohinski, 1979)

## 2. เอนไซม์คะตะเลส (catalase)

เอนไซม์คะตะเลส (catalase) มีชื่อเรียกตามระบบว่า hydrogen peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.6) ผลิตโดยเชื้อ *Aspergillus niger* เร่งปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นออกซิเจน และน้ำ ใช้ในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในนมที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (milk sterilization)



## 3. เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ( $\alpha$ -amylase)

เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ( $\alpha$ -amylase) มีชื่อเรียกตามระบบว่า  $\alpha$ -1,4-Glucan 4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) ผลิตโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะไกลโคซิดของแป้งที่  $\alpha$ -1,4 ภายในสายโพลีเมอร์อย่างอิสระ ได้ผลิตภัณฑ์เป็น maltodextrins ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตมอลโตสไซรัพ (maltose syrup)

## 4. เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase)

เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) มีชื่อเรียกตามระบบว่า  $\alpha$ -1,4-Glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3) ผลิตโดยเชื้อ *Aspergillus niger* เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะไกลโคซิดของแป้งที่ปลายทีละโมเลกุล โดยสามารถย่อยได้ทั้ง  $\alpha$ -1,3,  $\alpha$ -1,4 และ  $\alpha$ -1,6 ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส และแป้งที่มีสายสั้นลง ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกลูโคสไซรัพ (glucose syrup)

## 5. เอนไซม์เบต้า-กลูคาเนส ( $\beta$ -glucanase)

เอนไซม์เบต้า-กลูคาเนส ( $\beta$ -glucanase) มีชื่อเรียกตามระบบว่า  $\beta$ -1,3 Glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.6) ผลิตโดยเชื้อ *Aspergillus niger* เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์  $\beta$ -1,3 glucan ซึ่งไม่สามารถไฮโดรไลส์ได้โดยเอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ โดยทำให้เบียร์ใส

## 6. เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase)

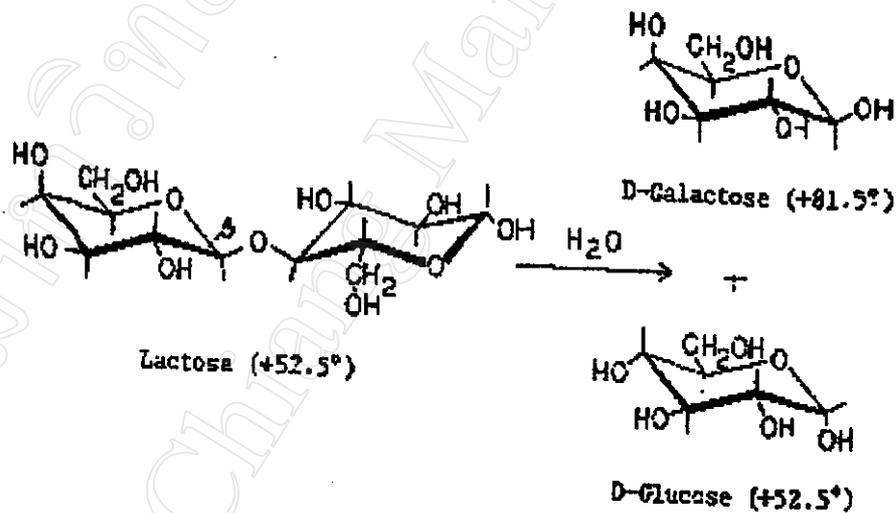
เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ผลิตโดยเชื้อ *Aspergillus* spp. และ *A. fumigatus* เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะไกลโคซิดของเซลลูโลสที่  $\beta$ -1,4 และในบางกรณีพบว่าสามารถสลายพันธะไกลโคซิดของกลูแคนที่ตำแหน่ง  $\beta$  ได้ ใช้เป็นสารช่วยย่อย (digestive aids) ในอุตสาหกรรมต่างๆ

### 7. เอนไซม์เพคตินเนส (pectinase)

เอนไซม์เพคตินเนส (pectinase) เป็นเอนไซม์เชิงซ้อนที่ประกอบด้วยเอนไซม์ย่อย 3 ชนิด คือ pectinesterase (pectin pectylhydrolase, EC 3.1.1.11) polygalacturonase (poly- $\alpha$ -1,4 galacturonide glycanohydrolase, EC 3.2.1.15) และ pectate lyases (poly- $\alpha$ -1,4 galacturonide lyase, EC 4.2.99.3) แต่ที่พบใน *Aspergillus* spp. เป็น polygalacturonase เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์พันธะ  $\alpha$ -1,4 galactosiduronic ของเพคติน ใช้ในการสกัดน้ำผลไม้ และทำให้น้ำผลไม้และไวน์ใส

### 8. เอนไซม์แลคเตส หรือ เบต้า-กาแลคโตซิเดส (lactase or $\beta$ -galactosidase)

เอนไซม์แลคเตส หรือ เบต้า-กาแลคโตซิเดส (lactase or  $\beta$ -galactosidase) มีชื่อเรียกตามระบบว่า  $\beta$ -D-Galactoside galactohydrolase, EC 3.2.1.23 เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์น้ำตาลแลคโตส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกาแลคโตสและกลูโคส ใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับหางนม (whey processing)



รูป 1.19 แสดงกลไกการทำงานของเอนไซม์แลคเตส หรือ เบต้า-กาแลคโตซิเดส (Bohinski, 1979)

## 9. เอนไซม์ไลเปส (lipase)

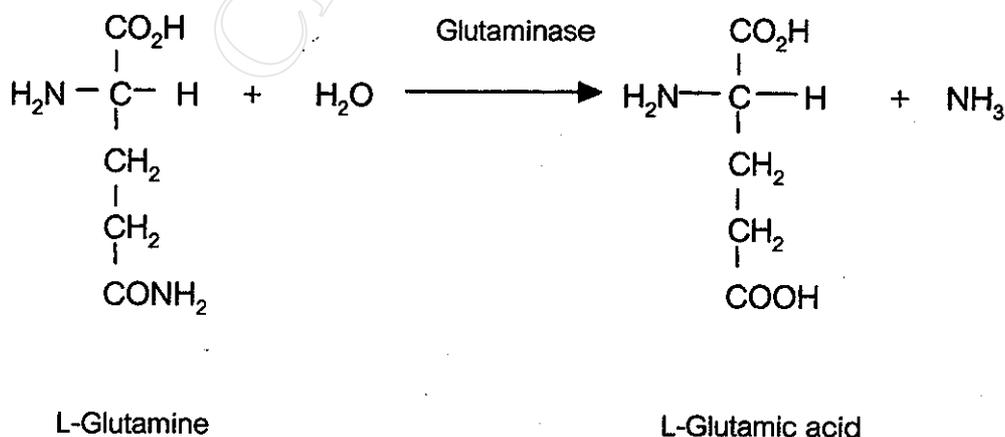
เอนไซม์ไลเปส (lipase) ที่พบใน *Aspergillus niger* คือ triacylglycerol acyl-hydrolase เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ glycerol ester เพื่อปลดปล่อยกรดไขมัน (fatty acid) ใช้ในอุตสาหกรรมเนยแข็ง เพื่อทำให้เกิดกลิ่นรสมากขึ้น

## 10. เอนไซม์โปรติเอส (protease)

เอนไซม์โปรติเอส (protease) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ด้วยน้ำ เอนไซม์โปรติเอสที่พบใน *Aspergillus* มีมากมายหลายชนิด ได้แก่  $\alpha$ -amino-acyl-peptide hydrolases (EC 3.4.1.enzyme) และ peptidyl amino-acid hydrolases (EC 3.4.2.enzyme) จะตัดพันธะเปปไทด์ที่ปลาย เพื่อแยกกรดอะมิโนที่อยู่ตรงปลาย dipeptide hydrolases (EC 3.4.3.enzyme) จะตัดกรดอะมิโนที่ปลายทีละสองตัว และ peptidyl peptide hydrolases (EC 3.4.4.enzyme) จะตัดพันธะเปปไทด์ภายในสายเปปไทด์ เช่น asperillopeptidase A (EC 3.4.4.17) จะเข้าไปตัดพันธะเปปไทด์บริเวณ carboxyl group ของ arginine หรือ leucine โดยเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตโดย *Aspergillus saitoi*, *A. niger* และ *A. oryzae* ส่วนมากจะมีคุณสมบัติเป็น acid-protease กล่าวคือ ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 2-5 ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตซอสถั่วเหลือง (soy sauce) และอุตสาหกรรมขนมปัง

## 11. เอนไซม์กลูตามิเนส (glutaminase)

เอนไซม์กลูตามิเนส (glutaminase) มีชื่อเรียกตามระบบว่า L-glutamine aminohydrolase (EC 3.5.1.2) ผลิตโดยเชื้อ *Aspergillus* spp., *A. sojae* และ *A. oryzae* เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์แอล-กลูตามิน (L-glutamine) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดกลูตามิก (glutamic acid) และแอมโมเนีย ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตซอสถั่วเหลือง



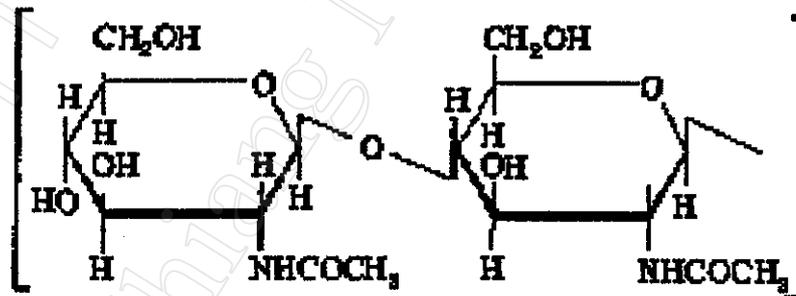
### 1.3 เทคนิคการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อราในสภาพอาหารแข็ง โดยการหาปริมาณไคติน

ปัญหาหลักอย่างหนึ่งในการศึกษากระบวนการหมักของเชื้อราในสภาพอาหารแข็งก็คือ การคำนวณหาการเจริญเติบโตของเชื้อ เพราะเราไม่สามารถแยกไมซีเลียของเชื้อราออกจากอาหารได้ ดังนั้นในการวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อราในสภาพอาหารแข็ง จึงใช้การวิเคราะห์หาสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของเชื้อราแทน โดยสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อราสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม (Ainsworth และ Sussman, 1965) คือ

กลุ่มที่ 1 สารเคมีจำพวก aminopolysaccharide

#### 1. ไคติน (chitin)

ไคติน จัดเป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่เป็นอนุพันธ์ของ 2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranan (N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine) ต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 เป็นเส้นตรง (รูป 1.20) พบได้ตามผนังเซลล์ของพืชใจ ไมซีเลียของยีสต์ สาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีน้ำตาล สาหร่ายสีแดง และในโครงร่างค้ำจุนของสัตว์ชั้นต่ำพวก arthropods ได้แก่หอย กุ้ง และปู แต่จะไม่พบตามเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์



รูป 1.20 แสดงสูตรโครงสร้างของไคติน (Ainsworth และ Sussman, 1965)

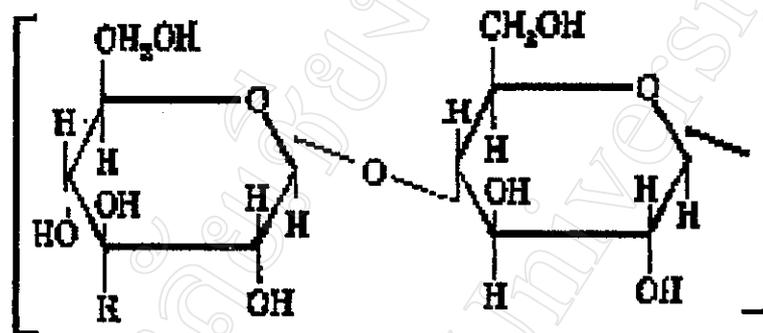
#### 2. ไคโตแซน (chitosan)

ไคโตแซน มีโครงสร้างคล้ายไคติน แต่จะต่างกันตรงที่ไคโตแซนจะไม่มีหมู่ acetyl กล่าวคือจะมีโครงสร้างเป็น 2-amido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranan ต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 เป็นเส้นตรง

## กลุ่มที่ 2 สารเคมีจำพวก Nonaminopolysaccharide

### 1. เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลส เป็นอนุพันธ์ของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 เป็นเส้นตรง (รูป 1.21) เซลลูโลสในพื้งใจอาจมีกลูโคสต่อกันถึง 4,000 หน่วย และมีน้ำหนักโมเลกุลถึง 650,000 แต่เซลลูโลสจากแหล่งอื่นอาจจะมีจำนวนกลูโคสและมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า



รูป 1.21 แสดงสูตรโครงสร้างของเซลลูโลส (Ainsworth และ Sussman, 1965)

### 2. กลูแคน (glucans)

กลูแคน เป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่เป็นอนุพันธ์ของกลูโคส กลูแคนที่พบนอกจากจะพบเดี่ยวๆแล้วยังพบในรูปของสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีน และกลูแคนที่พบมากที่สุดคือคอลลโลส (callose) เป็นอนุพันธ์ของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,3 glycosidic linkage นอกจากนี้ยังพบบายโคเดกซ์แทรน (mycodextran) ที่เป็นอนุพันธ์ของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,3 และ  $\beta$ -1,4 glycosidic linkage สลับกันไป ในโครงสร้างผนังเซลล์ของ *Aspergillus niger* ถึง 8 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เพื่อป้องกันเชื้อรา จากการถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตต่างๆไป

### 3. แมนแนน (mannans)

แมนแนน เป็นคาร์โบไฮเดรตที่เป็นอนุพันธ์ของแมนโนส (mannose) ในโครงสร้างของผนังเซลล์ของพื้งใจ สามารถพบได้ทั้งในรูปเส้นตรง (linear) และเป็นกิ่ง (branch) นอกจากนี้ยังพบในรูปของฟอสโฟแมนแนน (phosphomannan)

### 4. สาร polysaccharide อื่นๆ

สารคาร์โบไฮเดรตอื่นๆที่พบได้แก่ 6-deoxyhexose แรมโนส (rhamnose) นอกจากนี้ในการไฮโดรไลสผนังเซลล์ของพื้งใจมักจะพบ monosaccharides อื่นๆ เช่น กาแลคโตส (galactose) และไซโลส (xylose) เป็นต้น

### กลุ่มที่ 3 โปรตีน

ปริมาณของโปรตีนในผนังเซลล์ของฟังไจนั้นอาจมีน้อยมากหรือในบางสายพันธุ์อาจไม่มีเลย โดยมักจะพบในส่วนของ cytoplasm และนอกจากนี้ยังมีการพบโปรตีนในรูปสารประกอบเชิงซ้อนกับสารคาร์โบไฮเดรต

### กลุ่มที่ 4 สารประกอบอื่นๆ

นอกจากนี้ เรายังพบสารประกอบอื่น ได้แก่ ลิกนิน (lignins) ลิพิด (lipids) สารประกอบอนินทรีย์ (inorganic constituents) อนุพันธ์ของกรดนิวคลีอิก (nucleic acid derivatives) และเมลานิน (melanins)

#### 1.3.1 การไฮโดรไลซ์ไคตินให้เป็นกลูโคซามีน

การไฮโดรไลซ์ไคตินให้เป็นกลูโคซามีนเป็นการทำลายพันธะ  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glycosidic bond และย้ายหมู่ acetyl ของไคติน เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคซามีน (glucosamine) โดยมีเทคนิคและวิธีการที่แตกต่างกันออกไป ได้แก่

##### ก. วิธีของ Arima และ Uozomi (1967)

ซึ่งโคจิ (koji) 100 มิลลิกรัม และผสมกับกรดซัลฟูริก (sulphuric acid) ความเข้มข้น 72 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้โคจิละลายในกรดอย่างสมบูรณ์ แล้วเจือจางกรดให้เป็น 1 นอร์มอล โดยเติมน้ำกลั่นลงไป 55 มิลลิลิตร ทำการไฮโดรไลซ์ต่อให้สมบูรณ์โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำให้เป็นกลางโดยใช้สารละลายอิมตัวแบบเตรียม ไฮดรอกไซด์ (saturated barium hydroxide) ปรับให้มีพีเอช 6.0 ทำการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แล้วกรองเอาส่วนใสไปหาปริมาณกลูโคซามีนต่อไป

##### ข. วิธีของ Swift (1973)

ซึ่งโคจิ (koji) 100 มิลลิกรัม และผสมกับกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) ความเข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วทนไฟที่มีความจุ 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เชื่อมปิดปากหลอดแก้ว และนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที นำตะกอนที่ได้ไปล้างด้วยน้ำแล้วปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาทีอีกครั้ง ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง แล้วทำการระเหยเอาสารละลายส่วนบนออก โดยใช้การกลั่นสุญญากาศ นำตะกอนที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่นที่ทราบปริมาตรที่แน่นอนเพื่อไปวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีนต่อไป

ค. วิธีของ Tsuji และคณะ (1969)

ซังโคจิ (koji) 100 มิลลิกรัม และผสมกับกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วทนไฟที่มีความจุ 10 มิลลิลิตร เชื่อมปิดปากหลอดแก้ว และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้ขูดวัด ปริมาตรขนาด 5 มิลลิลิตร แล้วหยดสารละลาย phenolphthalin ที่มีความเข้มข้นแอลกอฮอล์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มอล จนกระทั่งได้ สีชมพู ต่อจากนั้นทำการไตเตรตกลับโดยใช้โปแตสเซียมไฮโดรเจนซัลเฟต (potassium hydrogen sulphate) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จนกระทั่งได้สารละลายใส แล้วปรับปริมาตรสารละลายที่ได้ ให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปหาปริมาณกลูโคซามินต่อไป

ง. วิธีของ Ride และ Drysdale (1972) ซึ่งดัดแปลงโดย Nandi (1978)

เป็นวิธีที่ใช้ต่างในการทำให้เกิดปฏิกิริยา depolymerization และ deacetylation ในไคติน โดยซังโคจิ (koji) 100 มิลลิกรัม ลงในหลอดเซนติฟิวซ์ที่เป็นแก้วทนความร้อน (hard glass centrifuge tube) ล้างโคจิด้วยอะซิโตน (acetone) 5 มิลลิลิตร ตามด้วยล้างด้วย น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (potassium hydroxide) ความเข้มข้น 120 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปอบที่อุณหภูมิ 130 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยมีการเขย่าเป็นครั้งคราว ทำให้เย็นแล้วเติม ice-cold 70% ethanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อตกตะกอนกลูโคซามิน ปิดฉนวนน้ำสารละลายที่ได้โดยใช้ Celite suspension ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเก็บในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที ต่อจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนครั้งแรกด้วยเอธานอล ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วย ice-cold distilled water อีก 3 รอบนำตะกอนกลูโคซามินที่ได้ไปละลายในน้ำกลั่น และนำไปหาปริมาณกลูโคซามินต่อไป

การไฮโดรไลส์ไคตินให้เป็นกลูโคซามินในแต่ละวิธีจะมีความเหมาะสมต่อฟังไจแตกต่างกันออกไป โดย Adioo และคณะ (1982) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบทั้ง 4 วิธีวิเคราะห์การเจริญเติบโตของเชื้อ *Aspergillus oryzae* พบว่า วิธีของ Ride และ Drysdale (1972) ซึ่งดัดแปลงโดย Nandi (1978) มีประสิทธิภาพสูงสุดในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามินใน *Aspergillus oryzae* โดยมีความสามารถในการ recovery สูงถึง 93.2 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตาราง 1.5 นอกจากนี้ Plassard และคณะ (1982) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบวิธีของ Swift (1973) กับ วิธีของ Ride และ Drysdale (1972) ซึ่งดัดแปลงโดย Nandi (1978) ในเชื้อ *Coriolus versicolor* พบว่า วิธี

ของ Swift (1973) มีความสามารถในการ recovery สูงถึง 93.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กับ วิธีของ Ride และ Drysdale (1972) ซึ่งดัดแปลงโดย Nandi (1978) มีเปอร์เซ็นต์ในการ recovery เพียง 50 เปอร์เซ็นต์

**ตาราง 1.5 การหาปริมาณกลูโคซามีนจาก *Aspergillus oryzae* ในโคจิโดยวิธีต่างๆ**  
(Adioo และคณะ, 1982)

ปริมาณกลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัมของโคจิ)

Time after Incubation (h)	Arima and Uazami (1967) method	Tsuji et al. (1969) method	Swift (1973) method	Ride and Drysdale (1967) method
0	2.32 (2.30)	6.01 (6.01)	7.89 (7.90)	0.07 (0.06)
18	2.34	6.01	7.89	0.08
40	2.40	6.87	7.89	1.28
52	3.01	8.57	8.97	1.82
70	3.65	8.59	10.89	2.67
Recovery (%) of glucosamine	61.0 ± 3.2	81.0 ± 2.9	68.5 ± 1.4	93.2 ± 1.9

**1.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน (glucosamine)**

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน สามารถทำได้หลายวิธีทั้งการใช้โครมาโทกราฟี (chromatographic analysis) การวิเคราะห์สี (colorimetric methods) และวิธีอื่นๆอีกมากมาย โดยมีเทคนิคและวิธีการที่แตกต่างกันออกไป ได้แก่

1. การวิเคราะห์ด้วย Ehrlich's reagent (Arima และ Uozumi, 1967)

นำสารละลายกลูโคซามีนปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย acetylacetone reagent ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใน ampoule ทำการปิด ampoule แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้ว เปิด ampoule แล้วเติมเอธานอลในปริมาตร 6.0 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลาย Ehrlich's reagent ในปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์ด้วย 3-methyl-2-benzothiazole hydrazone (Adioo และคณะ, 1982)

นำสารละลายกลูโคซามีนปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมไนเตรต (sodium nitrate) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และสารละลายไฮโดรเจนซัลเฟต (hydrogen sulphate) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อย่างละ 1.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยา deamination เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ กำจัดกรดไนตริก (nitrous acid) ที่เกิดขึ้นออก โดยการเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate) ความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที เติมสารละลาย 3-methyl-2-benzothiazole hydrazone (MBTH) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (ferric chloride) ความเข้มข้น 0.83 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร ทันที

3. การวิเคราะห์โดยการใช่ chromatography (Cousin, 1995)

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนโดยการใช่ chromatography พบว่ามีการใช้ทั้ง ion-exchange chromatography, gas chromatography และ high performance liquid chromatography โดย ion-exchange chromatography มักจะใช้ร่วมกับเครื่องมืออื่น เช่น การใช้ amino acid analyzer ร่วมกับ an ion-exchange column ที่ภายในบรรจุ sulfonate polystyrene resin พบว่า สามารถแยกกลูโคซามีนได้อย่างสมบูรณ์ และใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 2.5 ชั่วโมง และยังพบว่ามีการใช้ amino acid analyzer ร่วมกับ ion-exchange column ที่ภายในบรรจุ sulfonate styrene copolymer พบว่าใช้เวลาในการวิเคราะห์เพียง 30 นาที โดยนับว่าเร็วกว่าการวิเคราะห์สี (colorimetric assay) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้ cat ion-exchange column ที่ภายในบรรจุ copper-loaded resin ซึ่งจะดูดซับ amino sugar พบว่า สามารถแยกกลูโคซามีนได้อย่างสมบูรณ์ และพบว่าเราสามารถวิเคราะห์กลูโคซามีนในปริมาณน้อยได้ถึง 1 ไมโครกรัม โดยการใช่ liquid chromatography system ร่วมกับการวิเคราะห์ด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต (ultraviolet light) ที่ 254 และ 280 นาโนเมตร และยังพบการใช้ gas chromatography (GC) ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนที่มีจำนวนน้อยถึง 5 นาโนกรัม โดยการใช่ O-methylhydroxamine HCl ทำ

ปฏิกิริยากับกลูโคซามีน ได้ผลิตภัณฑ์เป็น O-methyloxime acetates และใช้ gas chromatography วิเคราะห์ปริมาณ O-methyloxime acetates ที่เกิดขึ้น และในการใช้ high-performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าเครื่อง HPLC นี้สามารถวิเคราะห์และแยก amino sugar แต่ละชนิดได้ โดยในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน หลังจากที่ทำกรไฮโดรไลซ์ ไคตินให้เป็นกลูโคซามีนอย่างสมบูรณ์และแยกกลูโคซามีนที่ได้โดยการใช้ ion-exchange column แล้ว นำไปทำปฏิกิริยากับ O-phthaaaldehyde และแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้โดย HPLC วิเคราะห์โดยใช้ spectrofluorometer

#### 1.4 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เนื่องจากกากมัสตาร์ดเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูก และการใช้ประโยชน์ยังไม่กว้างขวางนัก ดังนั้น เพื่อเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจ และให้เกิดประโยชน์มากขึ้น จึงควรมีการศึกษานำกากมัสตาร์ด มาใช้ในด้านอื่น ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้นำกากมัสตาร์ดมาใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus* สายพันธุ์ต่างๆ (*Aspergillus* spp.1, *Aspergillus* spp.2, *Aspergillus* spp.3 และ *Aspergillus* spp.4) เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส เซลลูเลส และกลูตามิเนส และคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมมาหาสภาวะที่เชื้อ *Aspergillus* สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุด โดยแปรผัน ปริมาณเชื้อตั้งต้น ความชื้นเริ่มต้น และอุณหภูมิ หลังจากนั้นจึงใช้สภาวะที่ดีที่สุดในการผลิต เอนไซม์ เพื่อสามารถนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ต่อไป