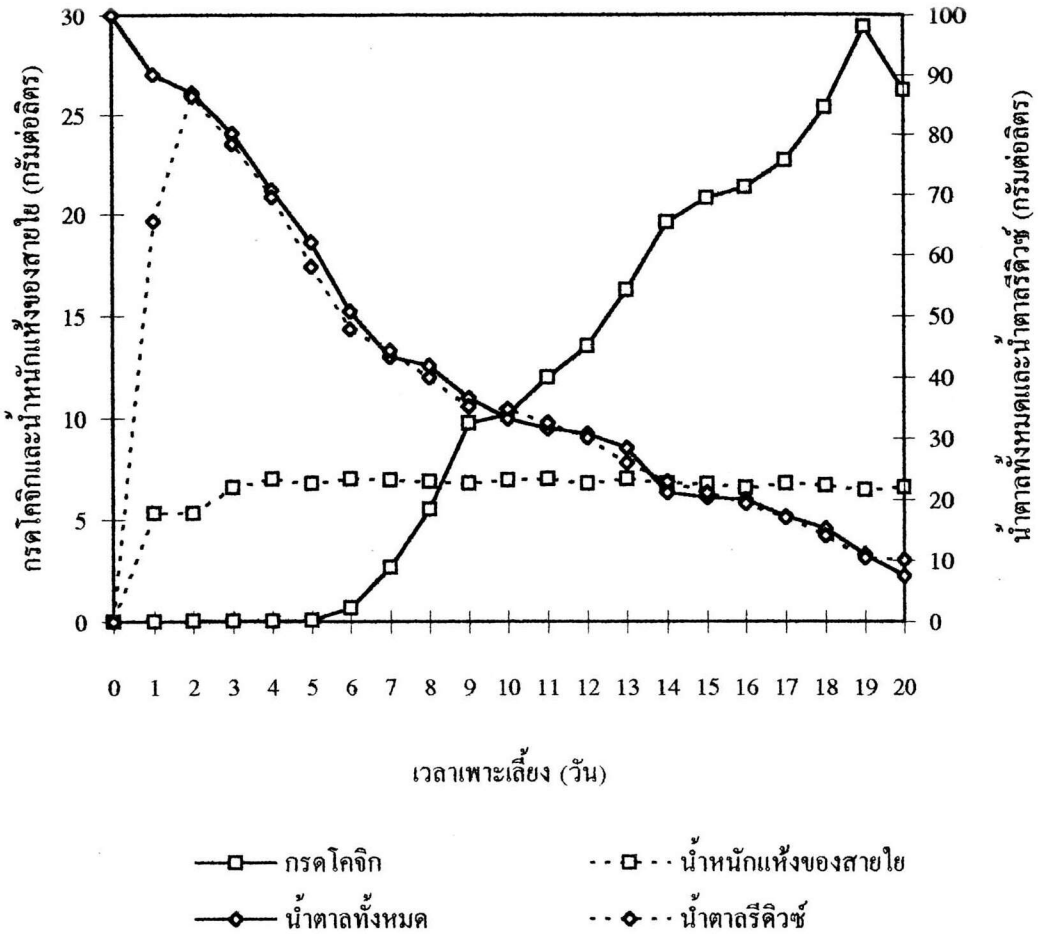
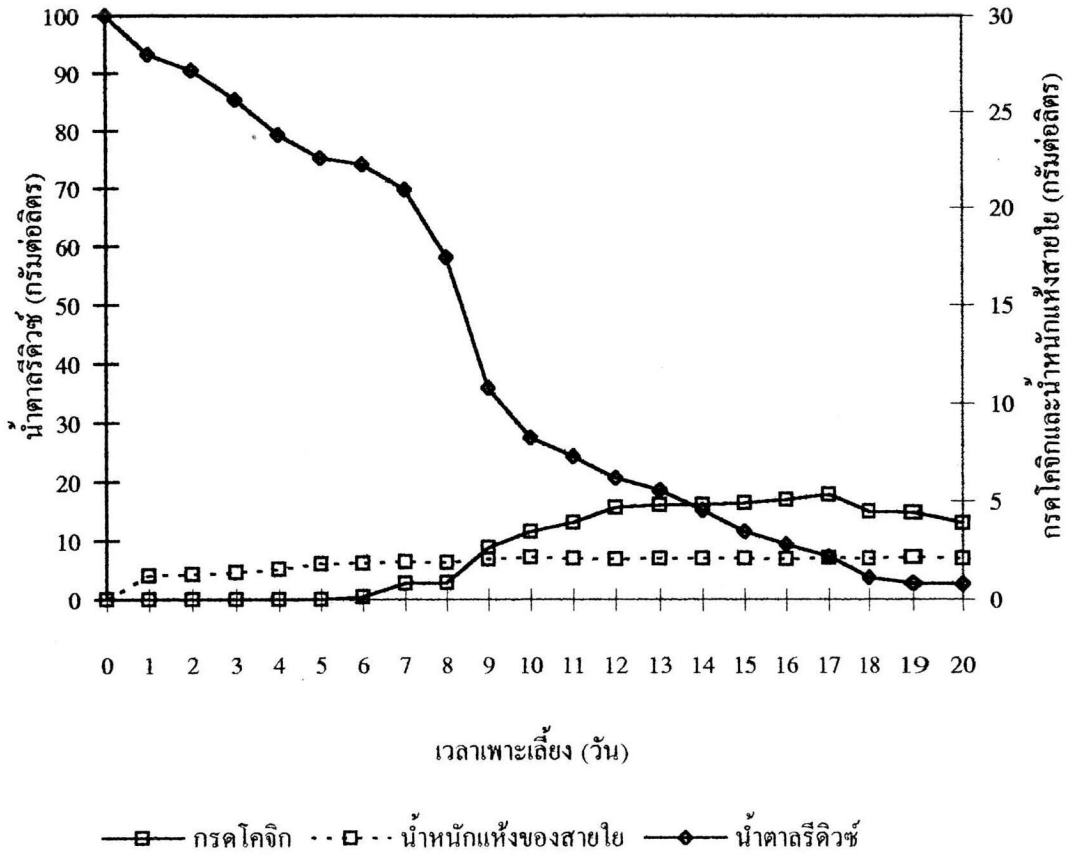
บทที่ 3
ผลการวิจัย

1.ผลการหาสูตรอาหารเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13

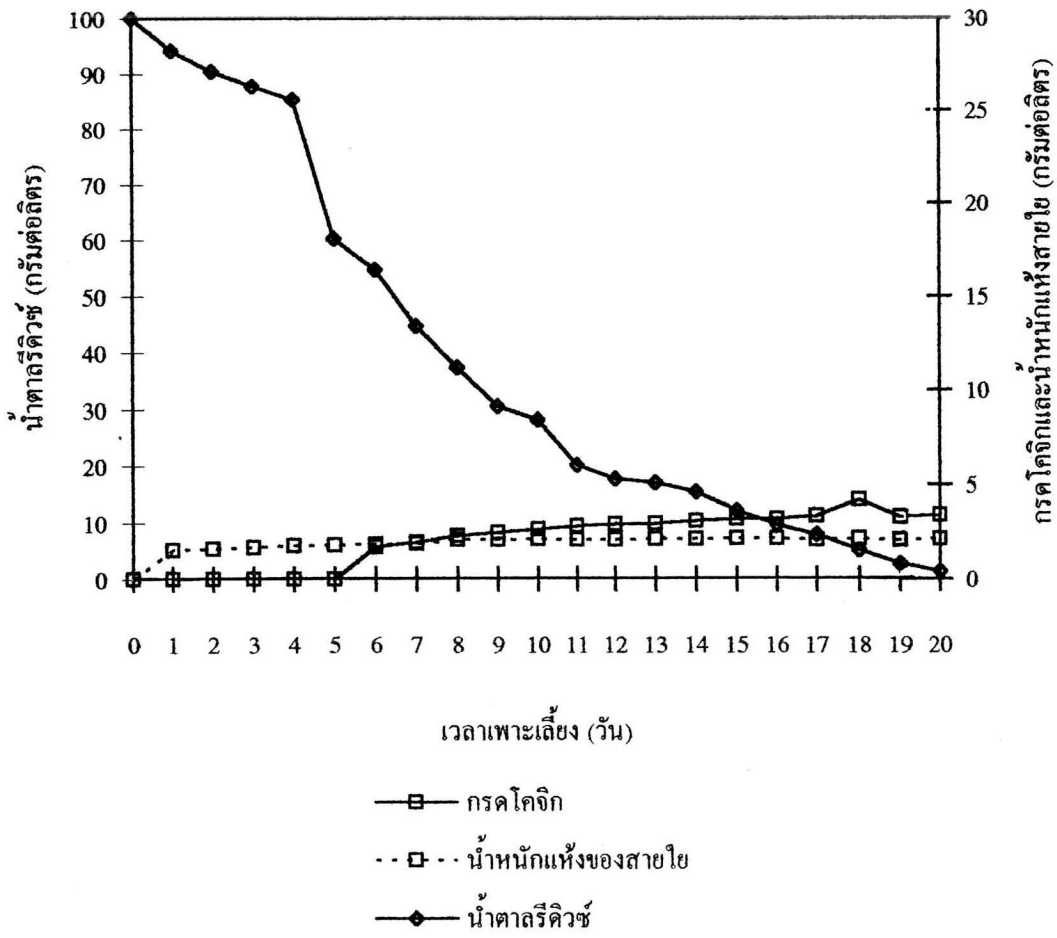
เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 เพื่อผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก 5 สูตร ได้แก่ โมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่หนึ่ง (Modified Czapex-dox I) โมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่สอง (Modified Czapex-dox II) ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครส (YES) โมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่หนึ่ง (Modified-YES I) และโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สอง (Modified YES II) (ภาคผนวก ก3-ก7) โดยใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 120 มิลลิลิตร และใช้อัตราส่วนของหัวเชื้อสปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1 : 50 (ปริมาตรต่อปริมาตร) บนเครื่องเขย่าโรตารี่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน พบว่าโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สอง (Modified YES II) ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 29.39 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง และให้การเติบโตของสายใยเท่ากับ 6.47 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 9 และ 14 รองลงมาคือโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่หนึ่ง (Modified Czapex-dox I) และโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่สอง (Modified Czapex-dox II) ซึ่งให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 17.81 และ 14.03 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง และให้การเติบโตของสายใยเท่ากับ 7.02 และ 7.18 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 10 และ 11 และ 14 ส่วนยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครส (YES) และโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่หนึ่ง (Modified YES I) ให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำมากคือให้ปริมาณกรดสูงสุดเท่ากับ 0.198 และ 0.163 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง และให้การเติบโตของสายใยเท่ากับ 11.67 และ 13.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 12 และ 13 และ 14 ส่วนการใช้น้ำตาลพบว่าในวันสิ้นสุดการทดลองจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



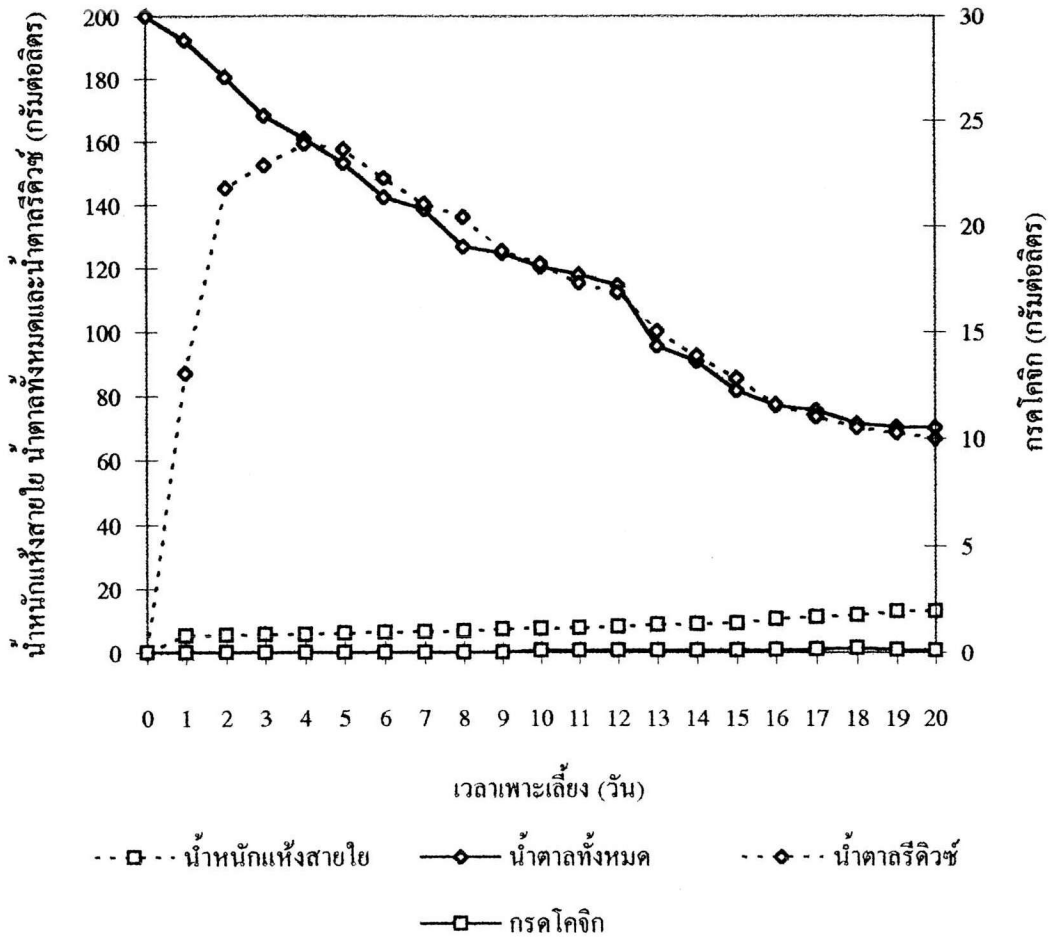
รูปที่ 9 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งของสายใย และการใช้น้ำตาลของรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟาย ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สอง (Modified YES II) เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



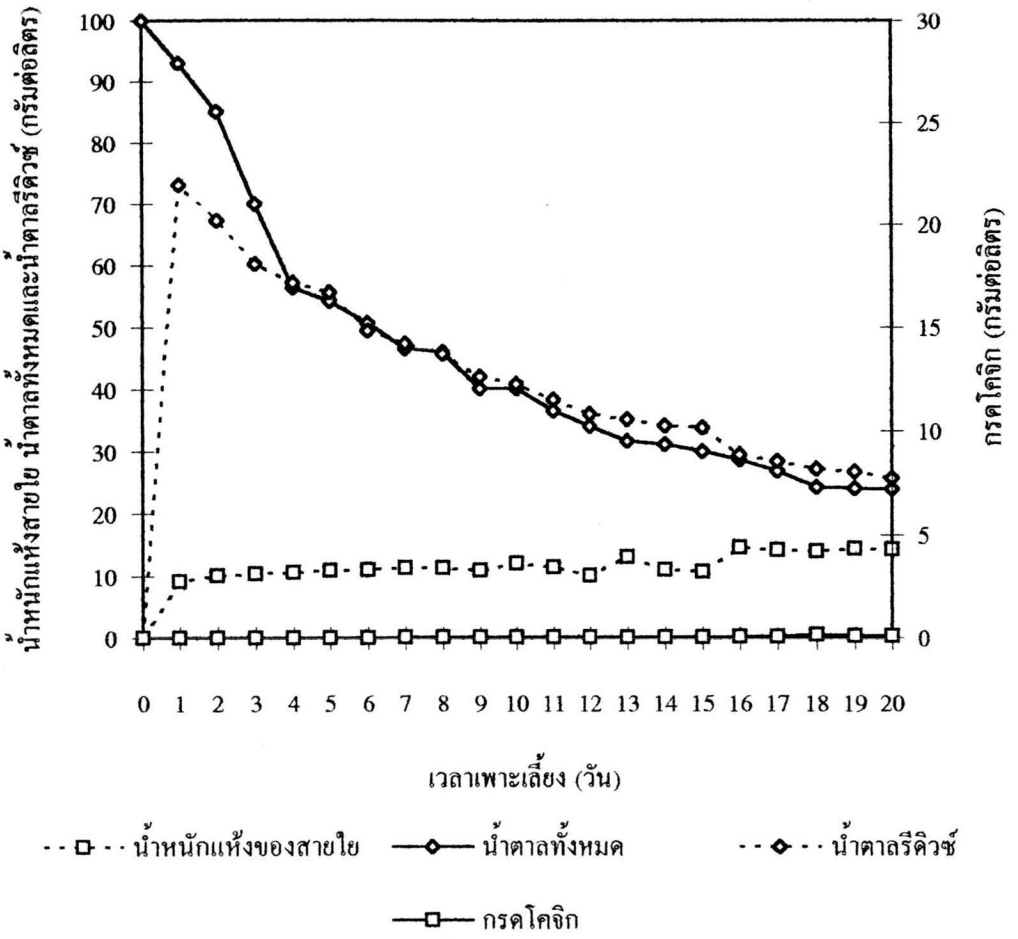
รูปที่ 10 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งของสายใย และการใช้น้ำตาลของรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟาย ซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่หนึ่ง (Modified Czapex-dox I) เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



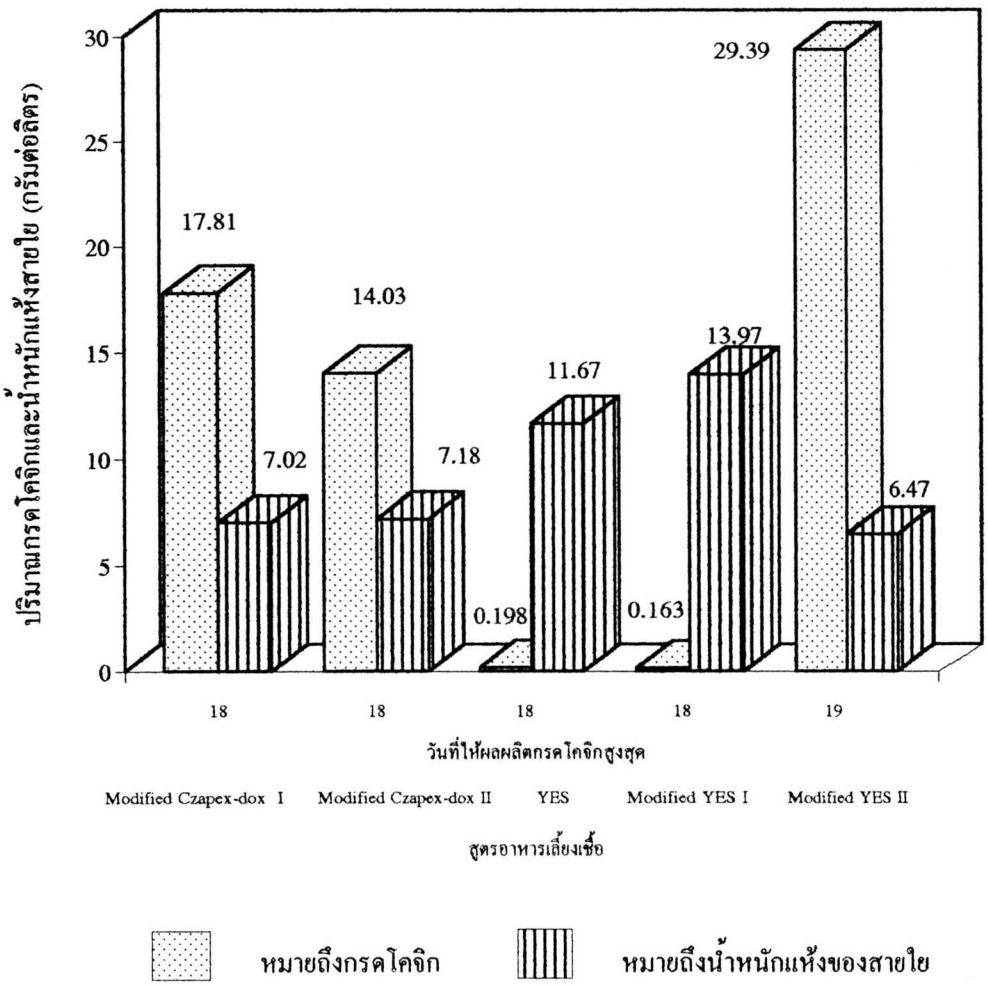
รูปที่ 11 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย และการใช้น้ำตาลของรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่สอง (Modified Czapex-dox II) เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 12 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย และการใช้น้ำตาลของรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครส (YES) เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 13 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักแห้งสายใย และการใช้น้ำตาลของรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟาย ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่หนึ่ง (Modified YES I) เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 14 ปริมาณกรดโคจิกและน้ำหนักแห้งของสายใยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกสูตรต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สอง (Modified YES II) โมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่ 1 (Modified Czapex-dox I) โมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่สอง (Modified Czapex-dox II) ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครส (YES) และ โมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่หนึ่ง (Modified YES I) เท่ากับ 10.10 กรัม (จากปริมาณน้ำตาลซูโครสตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร) และ 2.64 กรัม (จากปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร และ 1.32 กรัม (จากปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร) 76.68 กรัม (จากน้ำตาลซูโครสตั้งต้น 200 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) และ 25.74 กรัม (จากปริมาณน้ำตาลซูโครสตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ดังแสดงในรูปที่ 9 - 13 ตามลำดับ

สำหรับอัตราเฉลี่ยของการผลิตกรดโคจิก การใช้น้ำตาล และเปอร์เซ็นต์ของการผลิตกรดคิดจากปริมาณแหล่งคาร์บอน จะพบว่าโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สอง (Modified YES II) ให้อัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ยสูงสุดคือ 2.26 กรัมต่อลิตรต่อวัน รองลงมาคือโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่หนึ่ง (Modified Czapex-dox I) และโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่สอง (Modified Czapex-dox II) โดยให้อัตราการผลิตกรดเฉลี่ยเป็น 1.62 และ 1.17 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สอง (Modified YES II) ให้ร้อยละของการเกิดผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด (คิดจากปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้ไป) คือให้ผลผลิตกรดโคจิกคิดเป็นร้อยละ 32.69 ของปริมาณคาร์บอนที่ใช้ รองลงมาคือโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่หนึ่ง (Modified Czapex-dox I) และโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่สอง (Modified-Czapex-dox II) ซึ่งให้ผลผลิตกรดโคจิกคิดเป็นร้อยละ 18.29 และ 14.22 ตามลำดับส่วนยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครส (YES) และโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่หนึ่ง (Modified YES I) ให้อัตราการผลิตกรดเฉลี่ยและร้อยละของการเกิดผลผลิตกรดโคจิกจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ต่ำมาก ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 อัตราของการใช้น้ำตาล การผลิตกรดโคจิก เปอร์เซ็นต์การใช้น้ำตาลและเปอร์เซ็นต์ของการเกิดผลิตผลกรดโคจิกจากปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้

สูตรอาหาร	เปอร์เซ็นต์แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ	วันที่เริ่มผลิตกรดโคจิก (วันที่)	วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด (วันที่)	อัตราการผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตรต่อวัน) *	เปอร์เซ็นต์การใช้น้ำตาล	ผลผลิตกรดโคจิกจากคาร์บอนที่ใช้ ** (%)
Modified Czapex-dox I	กลูโคส 10 %	6	17	1.62	97.36	18.29
Modified Czapex-dox II	กลูโคส 10 %	6	18	1.17	98.68	14.22
YES	ซูโครส 20 %	5	18	0.015	76.68	0.26
Modified YES I	ซูโครส 10 %	6	18	0.013	74.26	0.22
Modified YES II	ซูโครส 10 %	6	19	2.26	89.9	32.69

* คิดจากวันที่เริ่มผลิตกรดโคจิกจนสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 20)

** คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

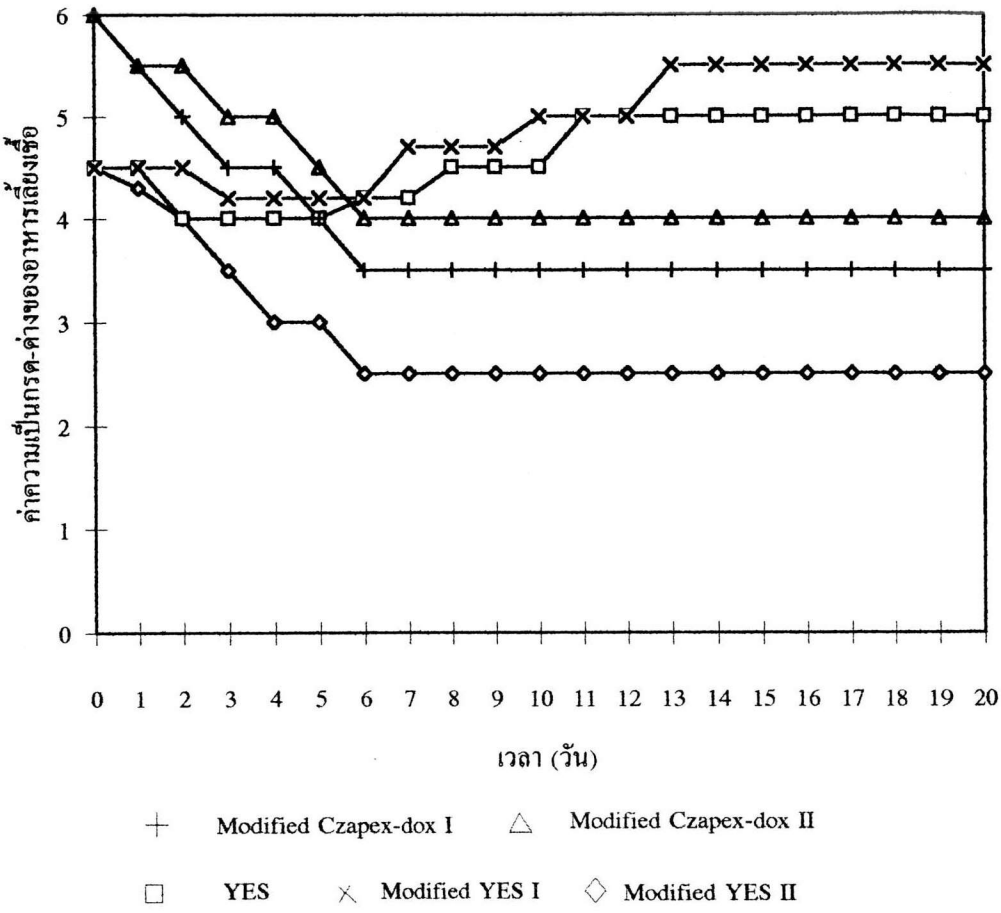
นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิก พบว่าโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สอง (Modified-YES II) จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำที่สุดคือ มีค่าเท่ากับ 2.5 ส่วนโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่หนึ่ง (Modified Czapex-dox I) และโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่สอง (Modified Czapex-dox II) จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดเท่ากับ 3.5 และ 4.0 ตามลำดับส่วนยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครส (YES) และโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สอง (Modified YES II)จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างคงที่อยู่ระหว่าง 5 - 5.5 ดังแสดงในรูปที่ 15

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้การเติบโตของสายใยสูงจะให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำ คืออาหารยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครส (YES) และ โมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์สูตรที่หนึ่ง (Modified YES I) ในขณะที่โมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกส์ซูโครสสูตรที่สอง (Modified YES II) ให้การเติบโตของสายใยน้อยกว่าแต่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูง นอกจากนี้ยังเป็นสูตรอาหารที่ง่ายในการเตรียม จึงเป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก โดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ดังนั้นจึงเลือกใช้โมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สอง (Modified YES II) เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.ผลการหาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก

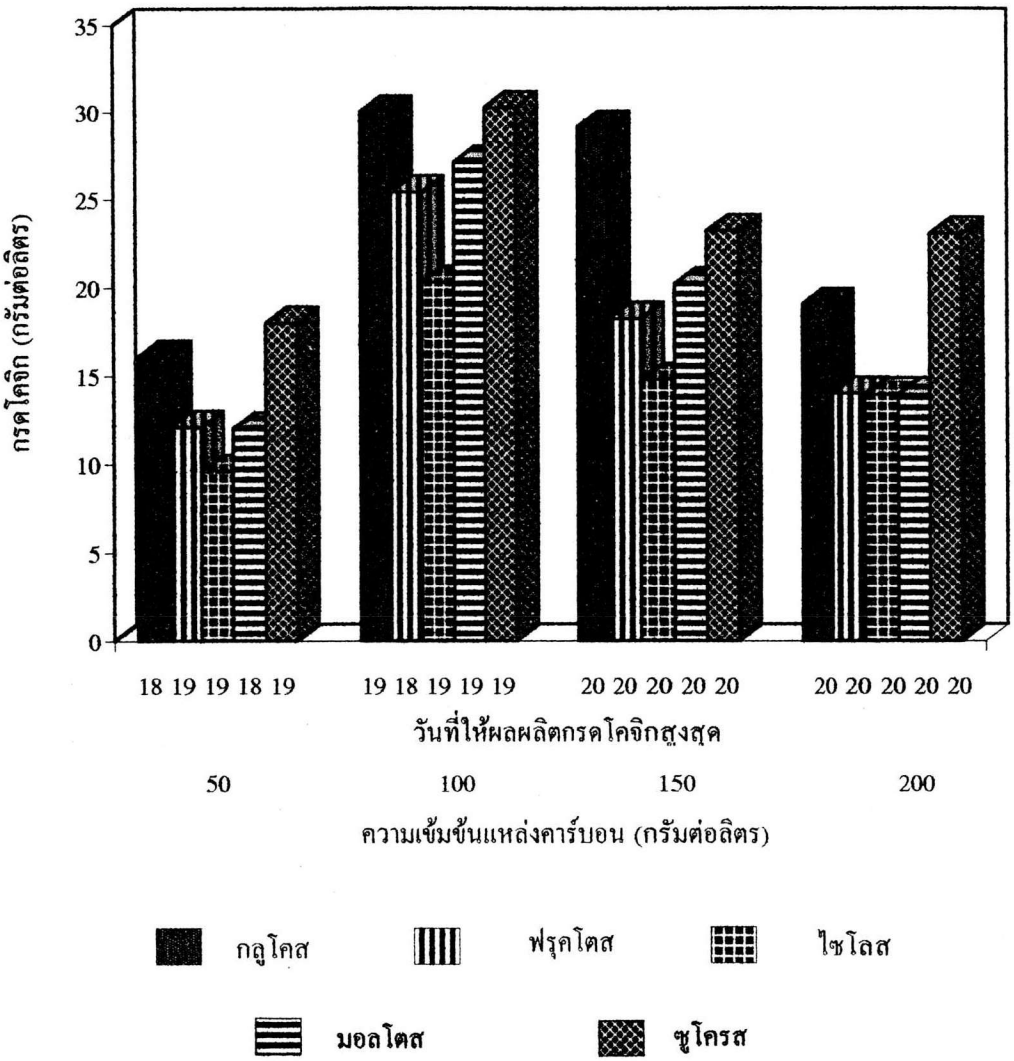
2.1ผลการหาชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงสปอร์งอกของ *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์สูตรที่สอง (ภาคผนวก ก7) เพื่อการผลิตกรดโคจิกโดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน 5 ชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลซูโครส พร้อมทั้งแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็น 4 ค่าได้แก่ 50 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

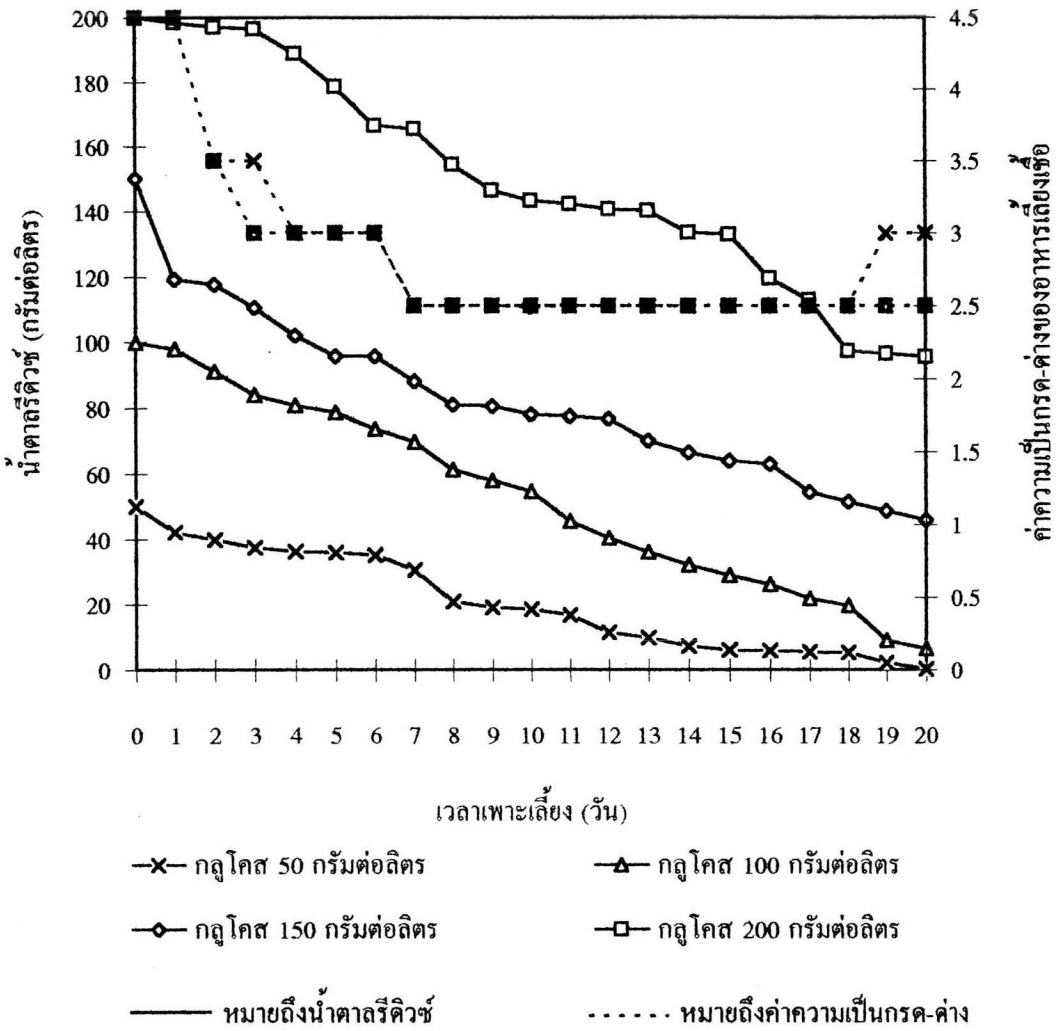


รูปที่ 15 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ ในระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

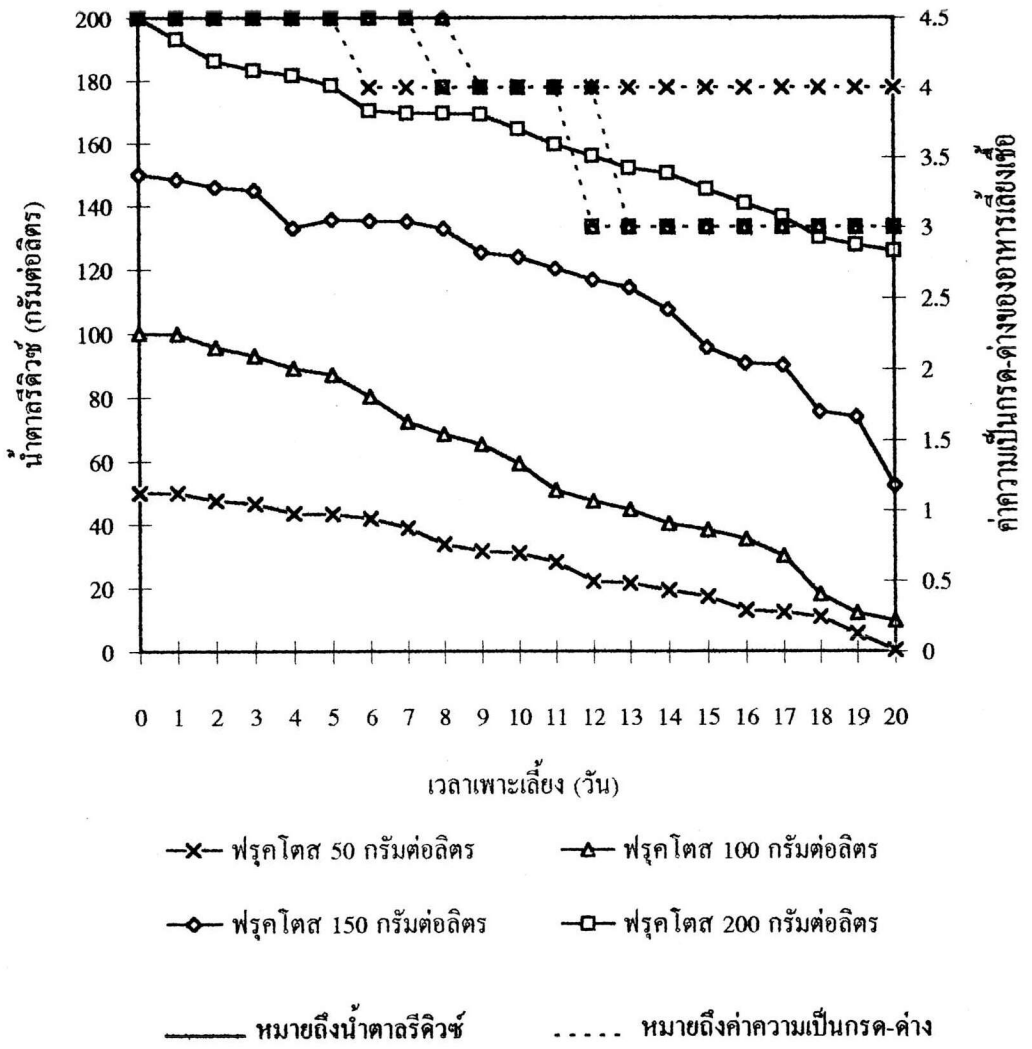
ซึ่งผลการทดลองพบว่าน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 50 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 16.08 29.98 29.11 และ 19.05 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 19 20 และ 20 ตามลำดับและมีค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำสุดเท่ากับ 2.5 2.5 2.5 และ 2.5 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 16 และ 17 ส่วนน้ำตาลฟรุคโตสความเข้มข้น 50 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 12.1 25.41 18.23 และ 14.02 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 18 20 และ 20 ตามลำดับและมีค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำสุดเท่ากับ 4 3 3 และ 3 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 16 และ 18 ส่วนน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 50 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 9.59 20.28 14.78 และ 13.97 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 19 20 และ 20 ตามลำดับและมีค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำสุดเท่ากับ 4 3 3 และ 3 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 16 และ 19 ส่วนน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 50 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตรให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 12.02 27.08 20.81 และ 13.96 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 19 20 และ 20 ตามลำดับและมีค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำสุดเท่ากับ 2.5 2.5 2.5 และ 2.5 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 16 และ 21 ส่วนน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 50 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตรให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 17.97 31.22 23.21 และ 23.08 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 19 20 และ 20 ตามลำดับและมีค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำสุดเท่ากับ 2.5 2.5 2.5 และ 2.5 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 16 และ 23 สำหรับการใช้น้ำตาลจะเห็นได้ว่ารา *Aspergillus oryzae* K-13 ใช้น้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลไดแซคคาไรด์โดยเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมดภายในวันที่ 2-4 ของการเพาะเลี้ยงดังแสดงในรูปที่ 20 และ 22 ตามลำดับ แล้วน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วในช่วงที่มีการผลิตกรดโคจิกสูง ซึ่งเป็นแบบแผนเดียวกับการใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตสและน้ำตาลไซโลส ซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ดังแสดงในรูปที่ 17 และ 18 และ 19 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกจาก



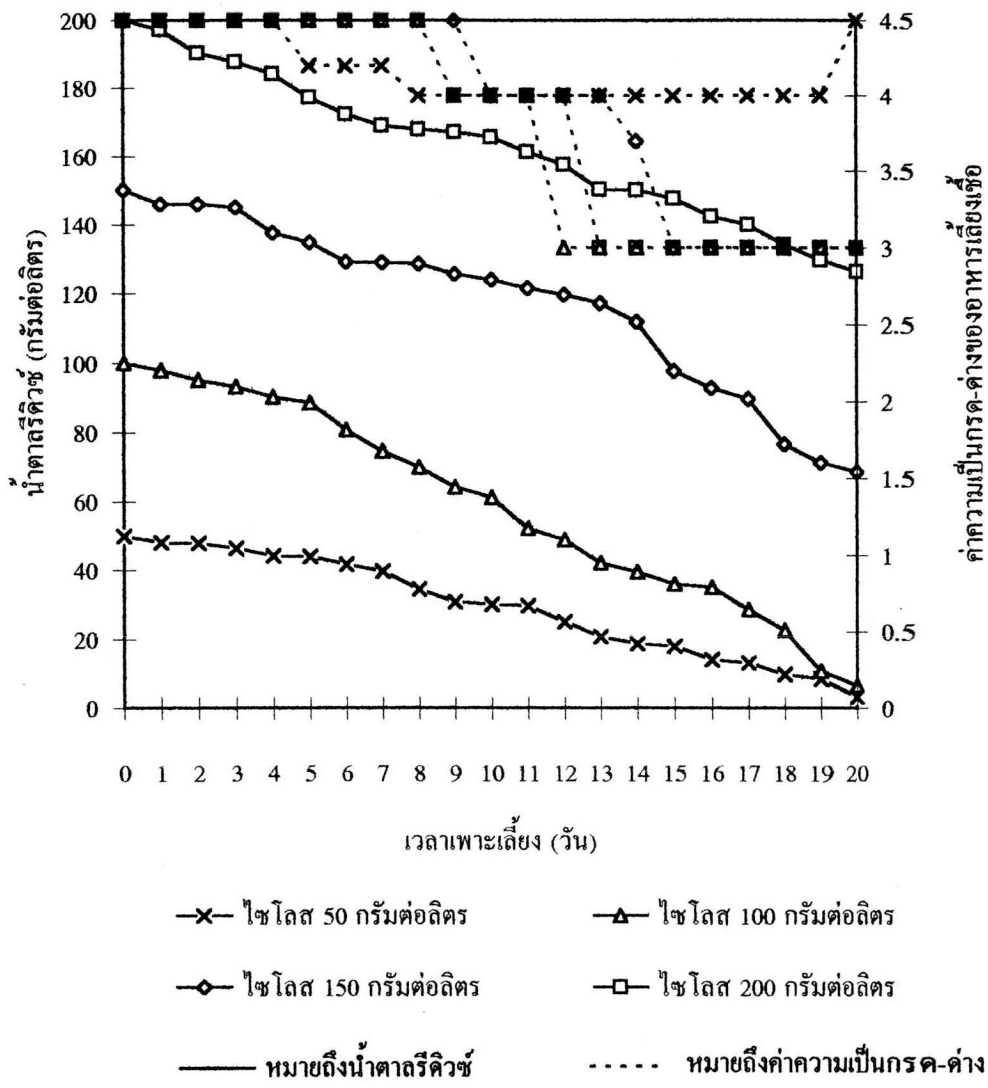
รูปที่ 16 ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



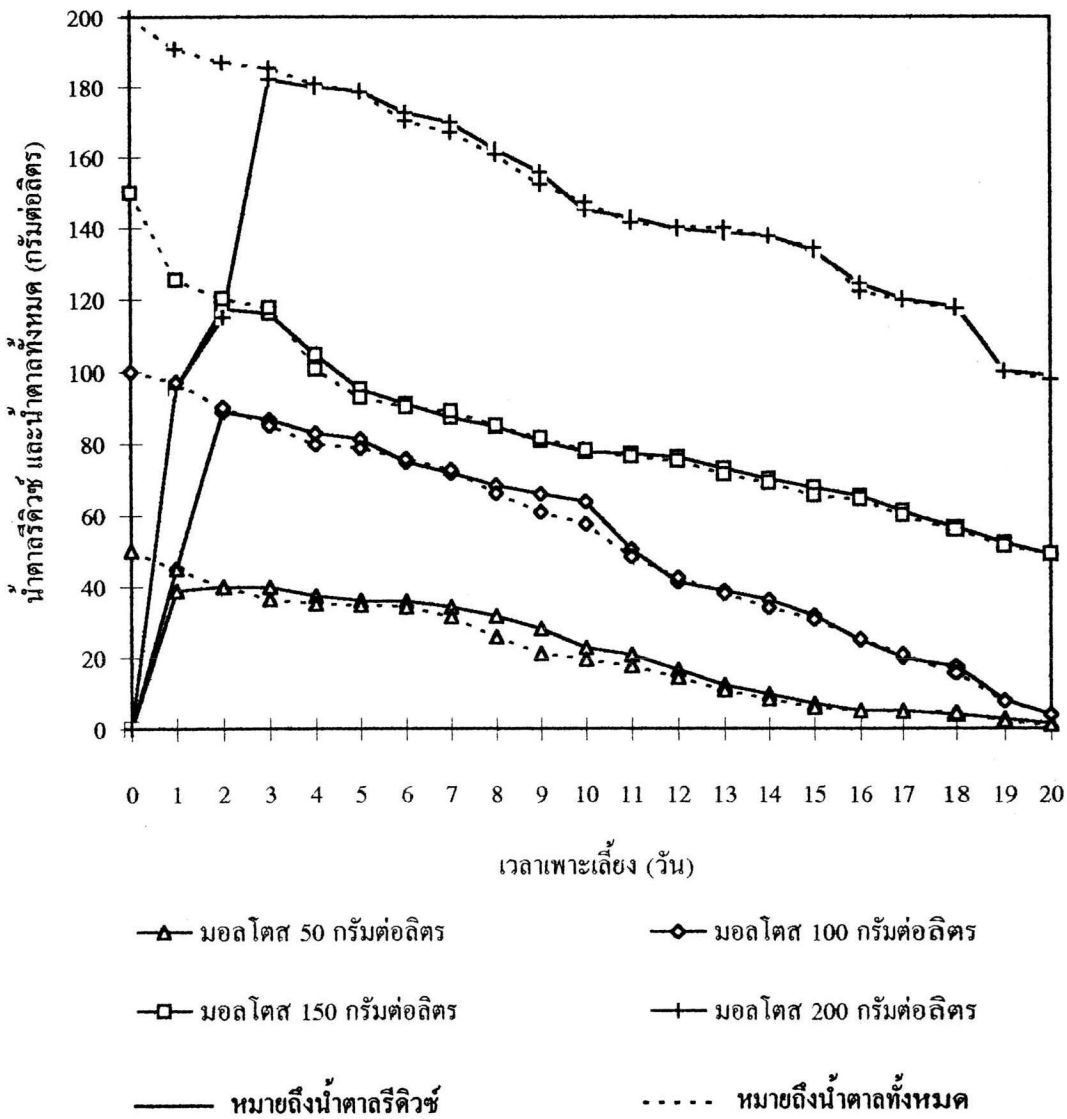
รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



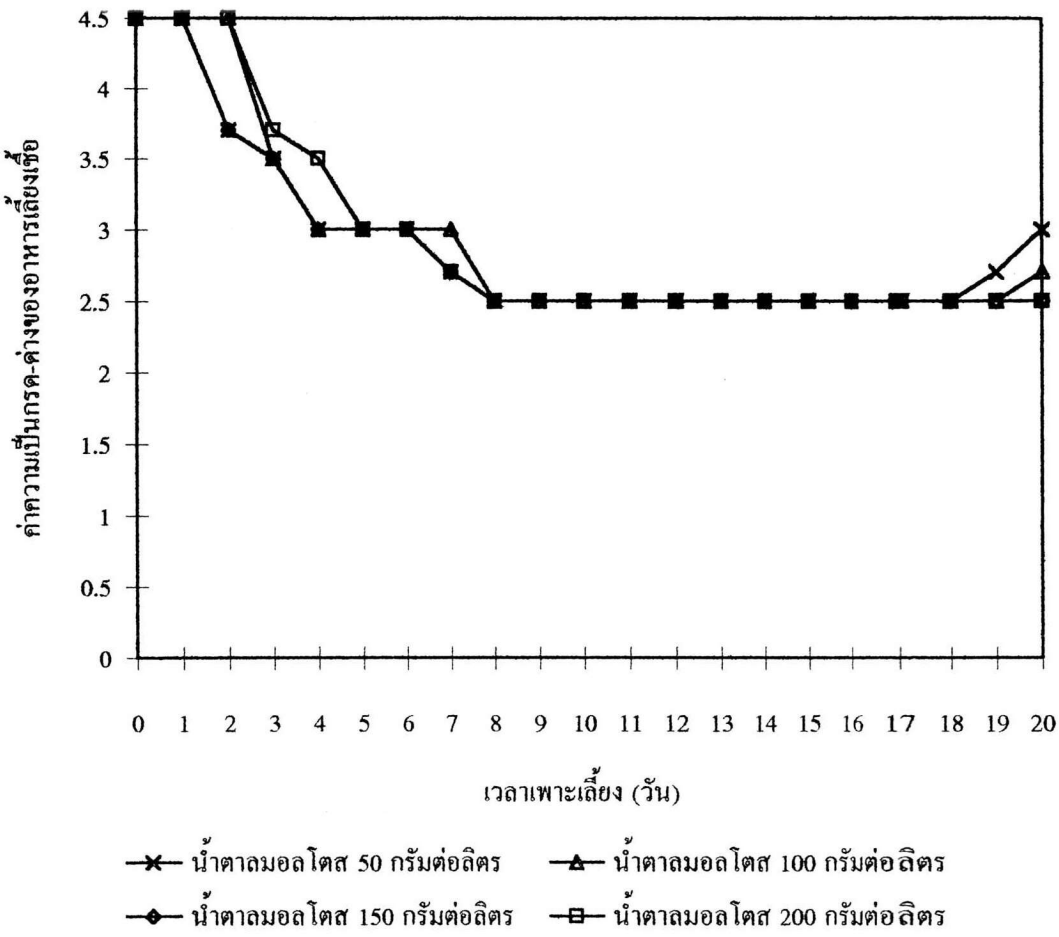
รูปที่ 18 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลฟรุคโตสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



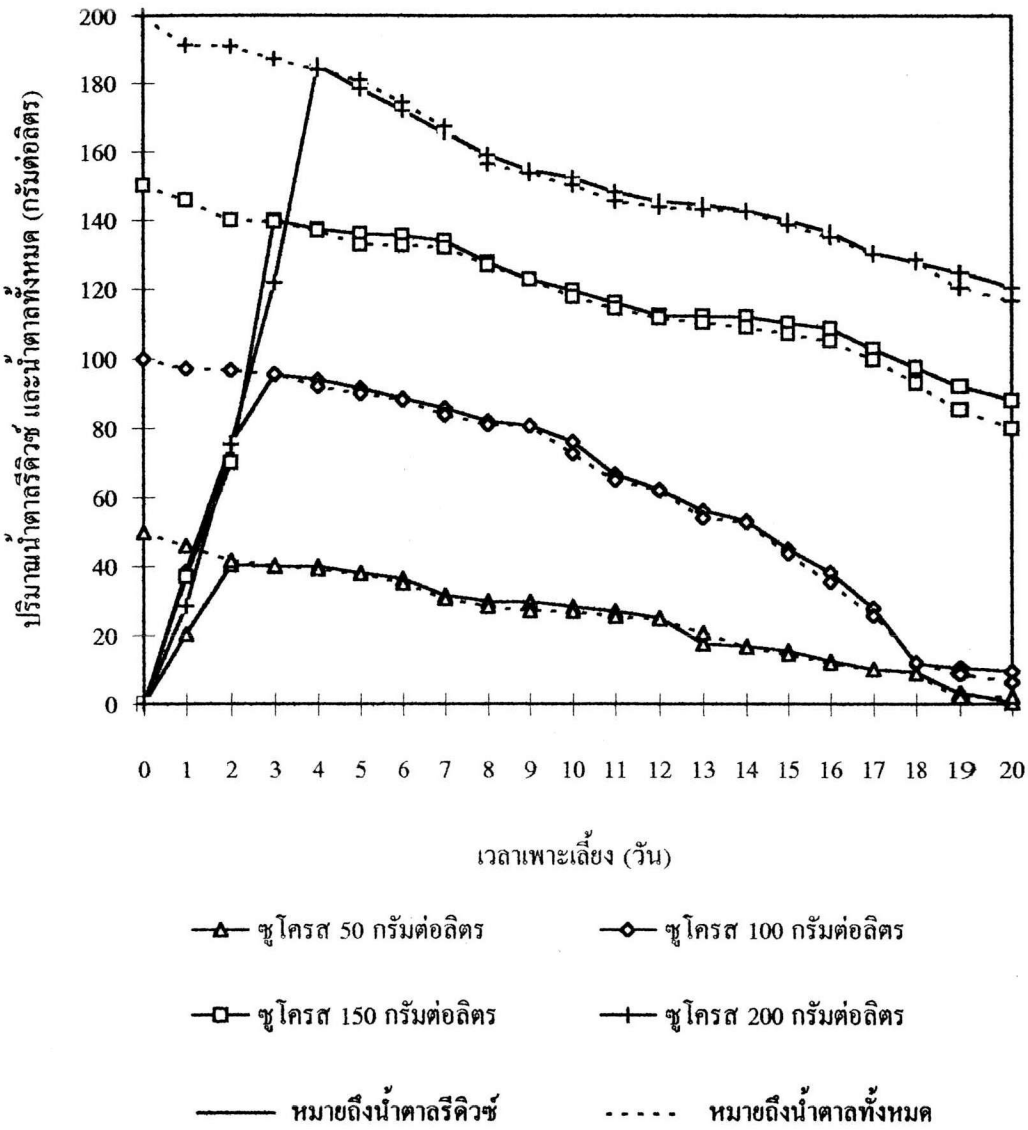
รูปที่ 19 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



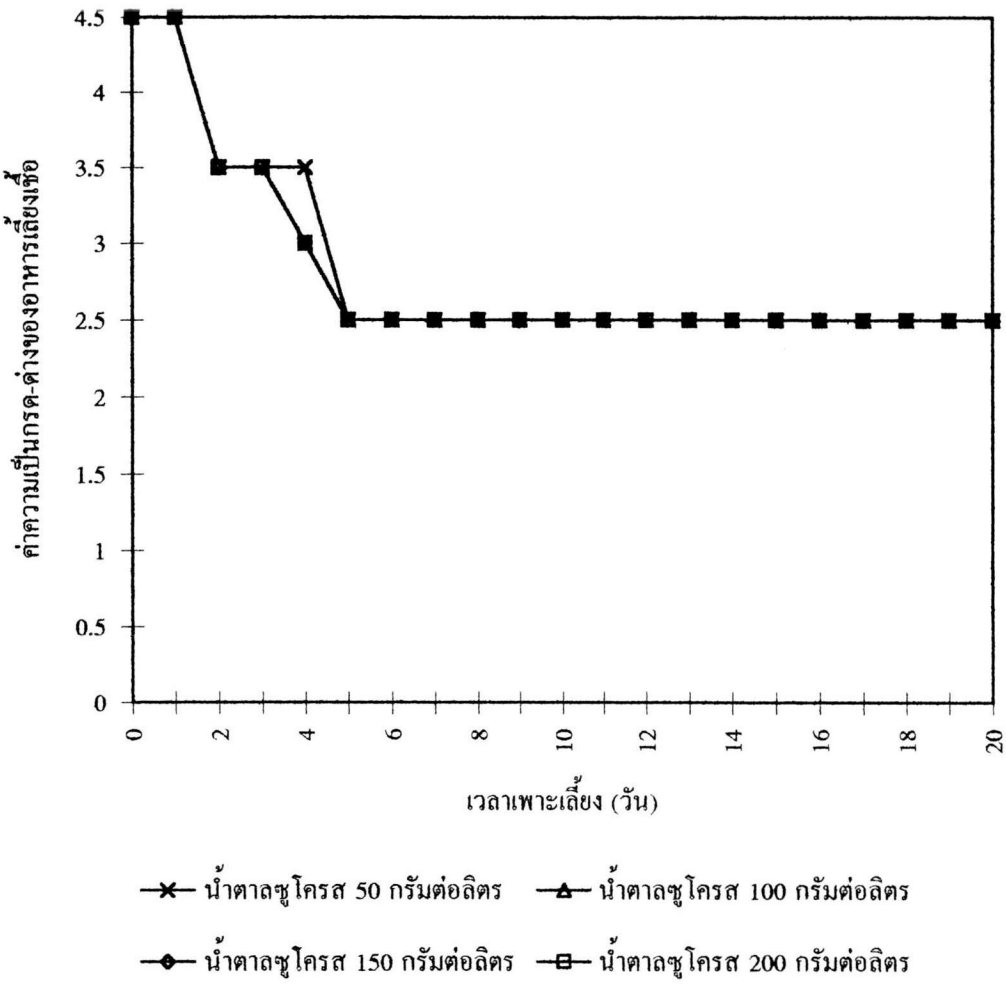
รูปที่ 20 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 21 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน โดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ ห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 22 การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 23 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดโคจิก ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอนโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

แหล่งคาร์บอนทุกชนิดทุกความเข้มข้นพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนทุกชนิดที่ทำการทดลองผลิตกรดโคจิกมีค่าเท่ากัน คือเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อและพบว่าน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 รองลงมาคือน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลฟรุคโตส และน้ำตาลไซโลส ตามลำดับ ดังแสดงใน รูปที่ 16 เมื่อเปรียบเทียบการเติบโตพบว่าการเติบโตจากแหล่งคาร์บอนชนิดเดียวกันแต่ต่างปริมาณมีความแตกต่างกันไม่มากนัก โดยที่เมื่อแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นจะมีการเติบโตเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยสำหรับแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันในปริมาณที่เท่าๆกัน จะให้การเติบโตที่แตกต่างกัน คือ น้ำตาลใดให้การเติบโตดี จะให้เปอร์เซ็นต์ของการผลิตกรดโคจิกและอัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ยลดลง ดังแสดงในตารางที่ 8

จากผลการทดลองข้อ 1 และ 2.1 แสดงให้ทราบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สอง (Modified YES II) ที่มีน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ดังนั้นจึงเลือกใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิกในการทดลองขั้นต่อไป

2.2ผลการใช้น้ำตาลทรายขาวแทนน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก

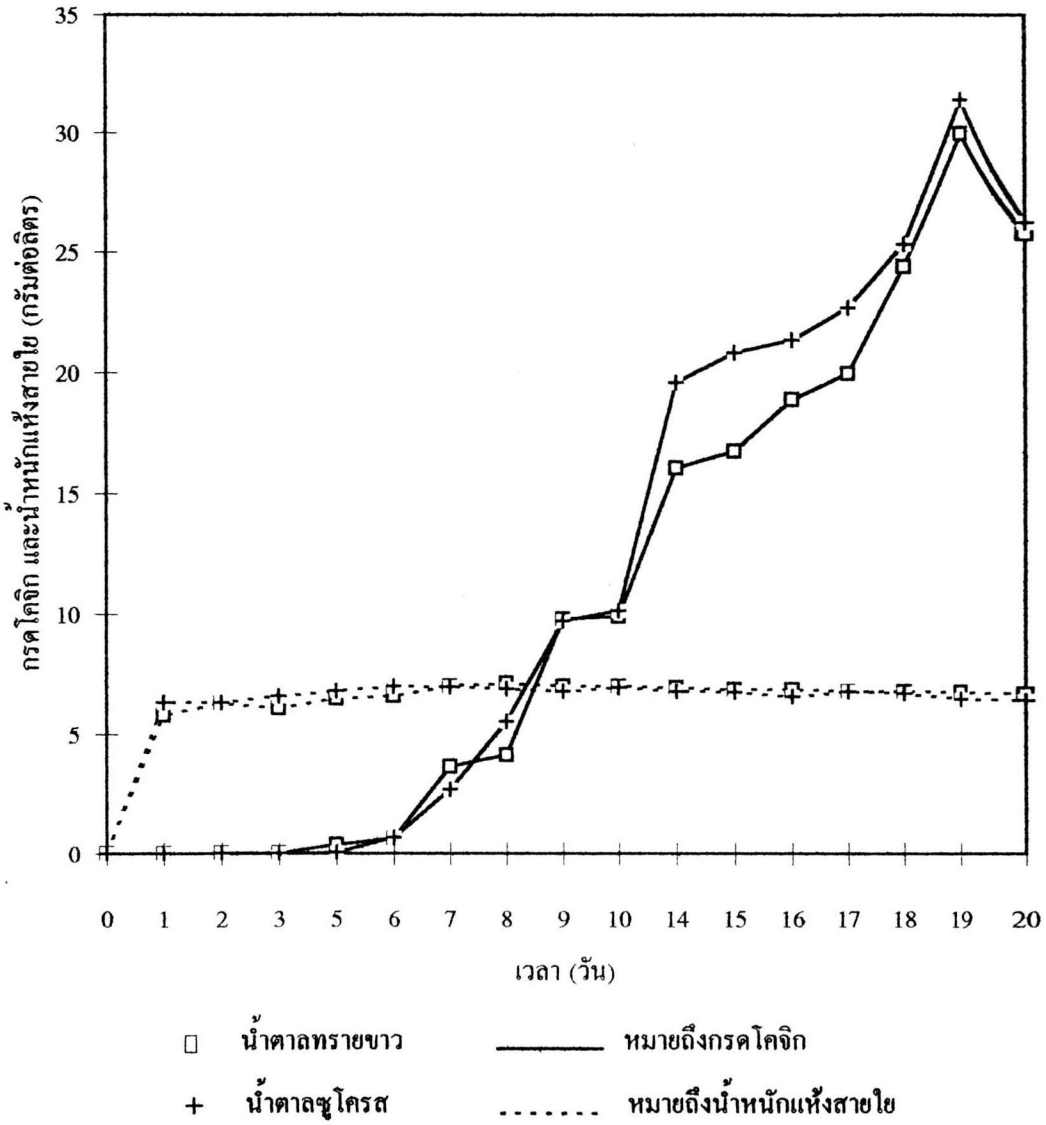
เมื่อผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สอง (ภาคผนวก ก7) ที่ได้จากการทดลองข้อ 2.1 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน 2 ชนิดคือ น้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลซูโครส ปริมาณ 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองพบว่าน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายขาวให้ผลผลิตกรดโคจิกใกล้เคียงกันคือ 31.39 และ 29.95 กรัมต่อลิตร และให้การเติบโตของสายใยเป็น 7 และ 7.14 กรัมต่อลิตรตามลำดับซึ่งใกล้เคียงกันมาก ดังแสดงในรูปที่ 24 เมื่อพิจารณาถึงการใช้น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดระหว่างการเพาะเลี้ยงพบว่าเป็นแบบแผนเดียวกันคือน้ำตาลไดแซคคาไรด์จะถูกสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมด

ตารางที่ 8 แสดงการเติบโตของสายใยรา *Aspergillus oryzae* K-13 อัตราการผลิตกรดโคจิก และร้อยละของการผลิตกรดโคจิกจากแหล่งคาร์บอนต่างๆกัน

แหล่งคาร์บอน (กรัมต่อลิตร)	เปอร์เซ็นต์การใช้น้ำตาลคิดจากคาร์บอนตั้งต้น ***	น้ำหนักแห้งของสายใยรา *Aspergillus oryzae* K-13 (กรัมต่อลิตร) ***	อัตราการผลิตกรดโคจิกเฉลี่ย (กรัมต่อลิตรต่อวัน)**	ร้อยละของการผลิตกรดโคจิกจากแหล่งคาร์บอน *
ซูโครส				
50	93.60	6.87	1.12	38.39
100	77.29	7.02	2.08	40.39
150	41.33	7.33	1.55	37.43
200	39.82	7.71	1.54	28.92
กลูโคส				
50	93.52	6.88	1.07	34.38
100	88.95	7.20	2.05	34.50
150	69.50	7.65	1.94	27.92
200	52.25	7.87	1.27	18.22
มอลโตส				
50	92.22	7.02	0.75	26.60
100	91.99	7.36	1.80	31.89
150	67.35	7.67	1.39	20.59
200	50.61	8.02	0.93	13.79
ฟรุคโตส				
50	88.48	7.14	0.81	27.35
100	81.92	7.63	1.70	31.01
150	65.00	8.10	1.22	18.69
200	37.39	8.57	0.93	18.89
ไซโลส				
50	85.10	7.13	0.64	22.58
100	89.34	7.65	1.35	22.69
150	54.30	7.98	0.99	18.14
200	36.81	8.60	0.93	18.97

* คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด ** คิดจากวันที่เริ่มผลิตกรดโคจิกจนสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 20)

*** คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด



รูปที่ 24 กรดโคจิกและน้ำหนักแห้งของสายใยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลซูโครส เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

ประมาณวันที่ 2-3 ของการเพาะเลี้ยง และน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจะถูกใช้อย่างรวดเร็วเพื่อการผลิตกรดโคจิก นอกจากนี้การใช้น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดในแต่ละวันของการเพาะเลี้ยงนั้นไล่เลี่ยกัน (รูปที่ 25)

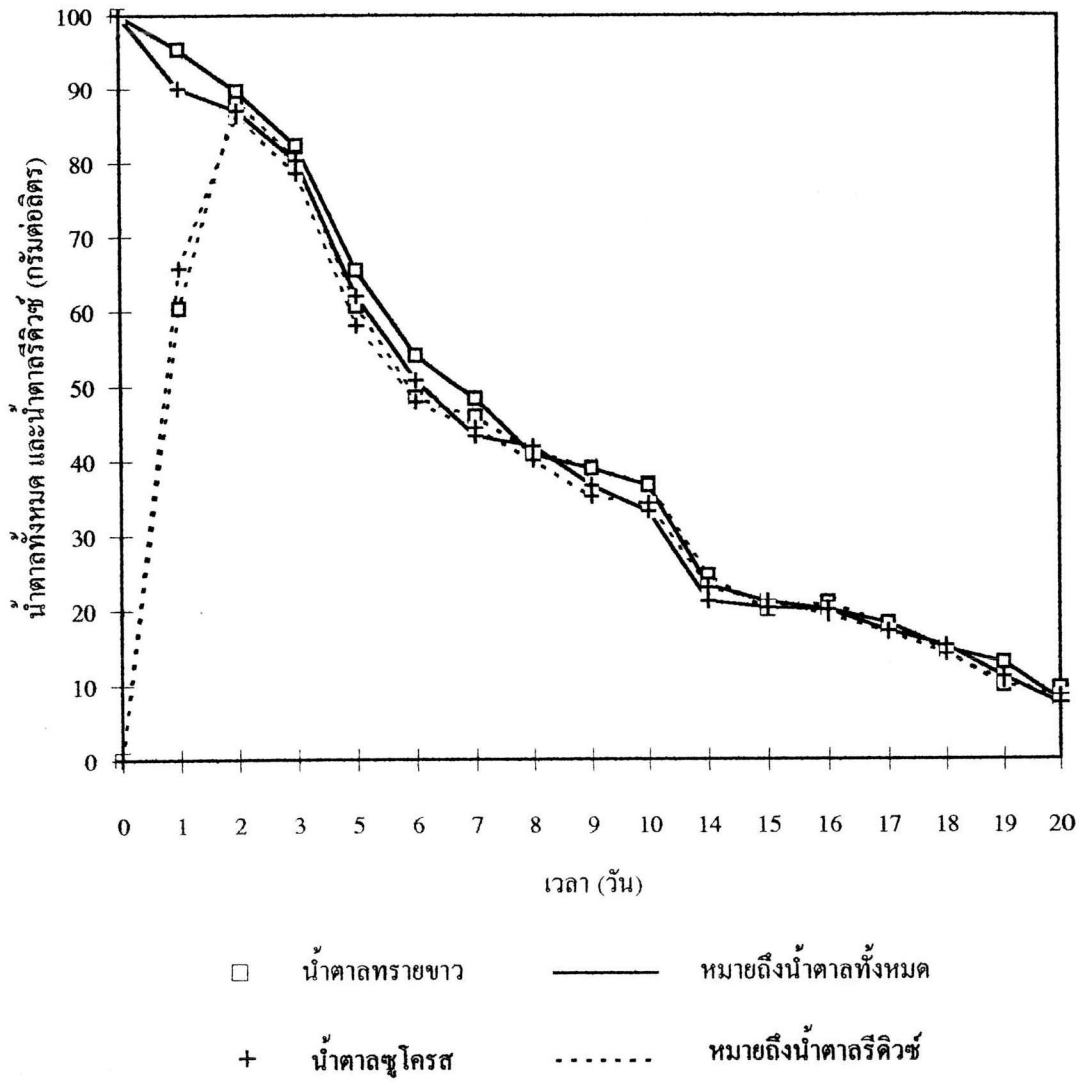
สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครส และน้ำตาลทรายปริมาณ 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนจะลดลงรวดเร็วกว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนเล็กน้อย โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนจะลดลงจนมีค่าเป็น 2.5 ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนจะลดลงจนมีค่าเป็น 2.5 ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงหลังจากนั้นก็คงที่เท่ากับ 2.5 ไปจนตลอดการทดลองเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 26

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลทรายขาวให้ผลผลิตใกล้เคียงกันมากแต่น้ำตาลทรายขาวถูกกว่าน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์มาก ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำตาลทรายขาวปริมาณ 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

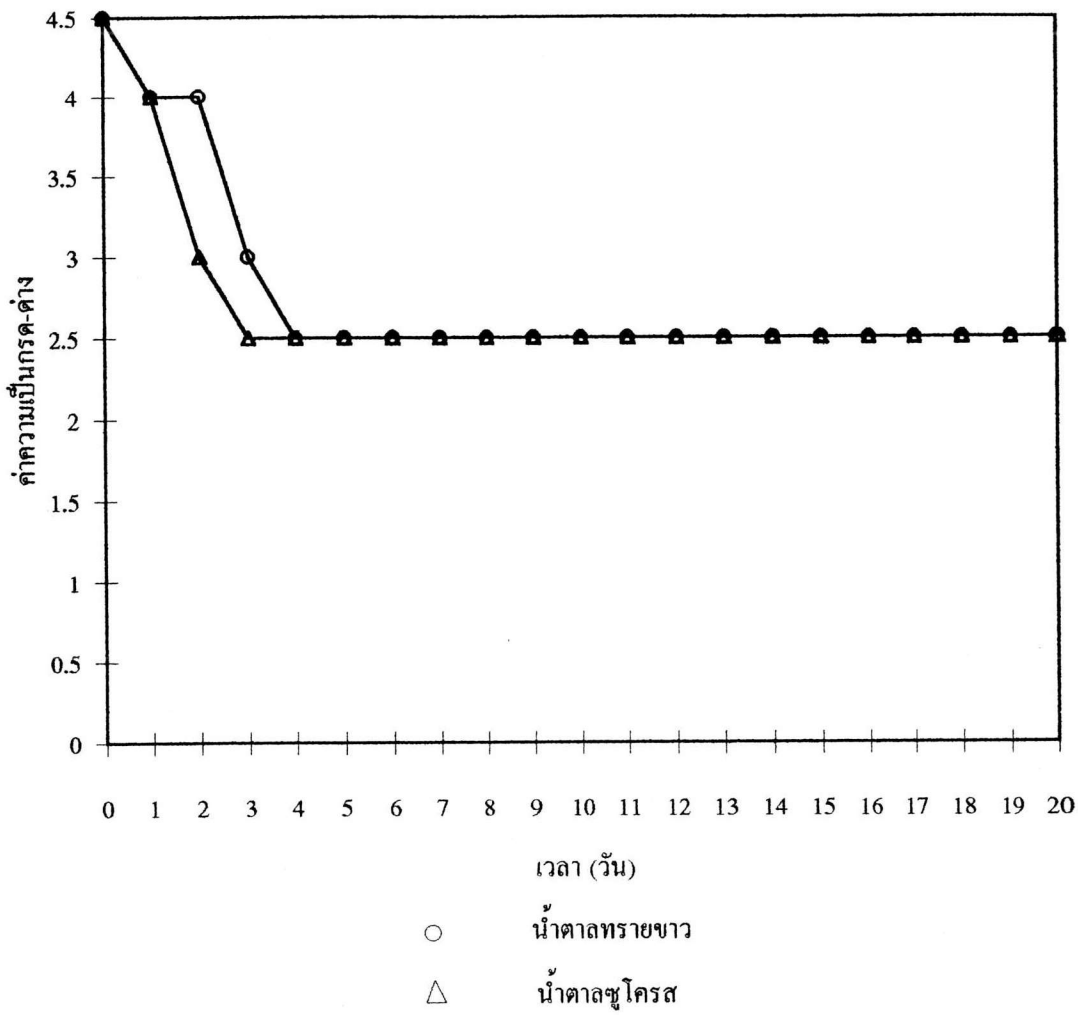
2.3ผลการหาชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก

2.3.1ผลการหาปริมาณที่เหมาะสมของสารสกัดยีสต์ต่อการผลิตกรดโคจิก

เมื่อทำการผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าโดยสปอร์งอกของรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกที่มีน้ำตาลทรายขาวปริมาณ 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอน และแปรผันปริมาณสารสกัดยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0.5 1 1.5 2 2.5 5 และ 10 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 25 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 โดยทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว และน้ำตาลซูโครส เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

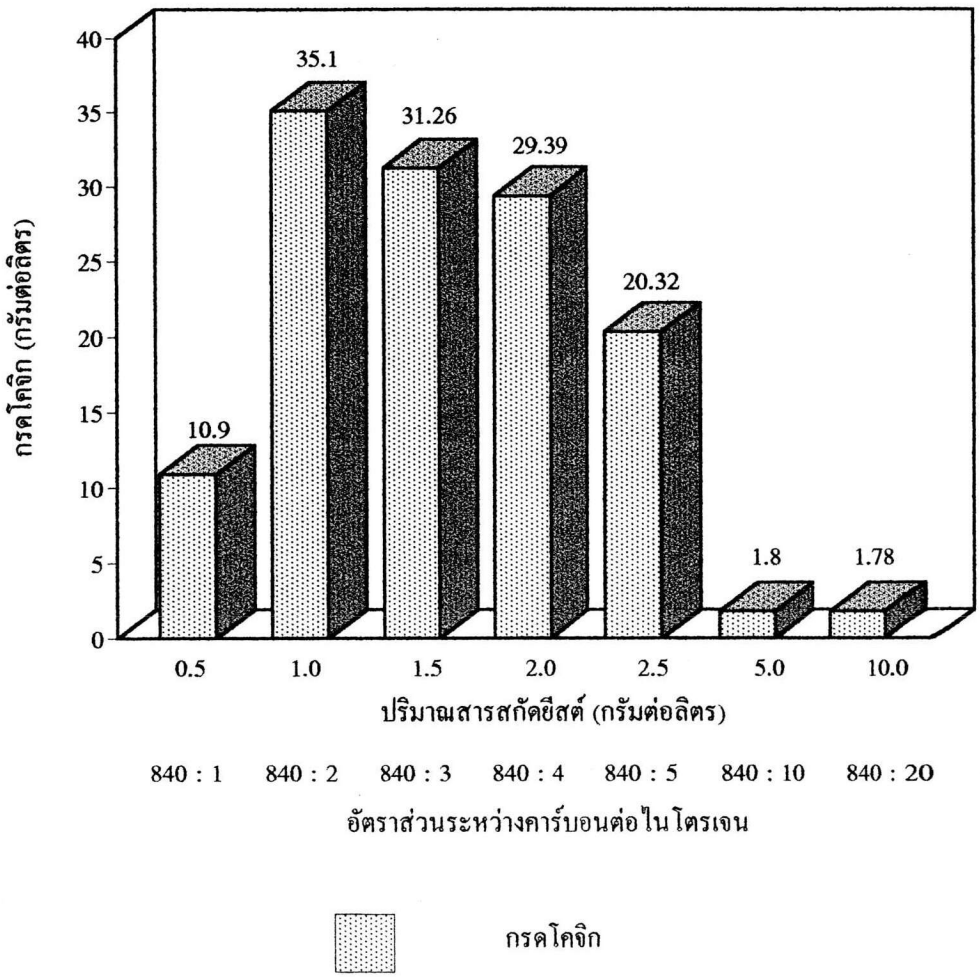


รูปที่ 26 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก โดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ทำการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นน้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลซูโครส เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

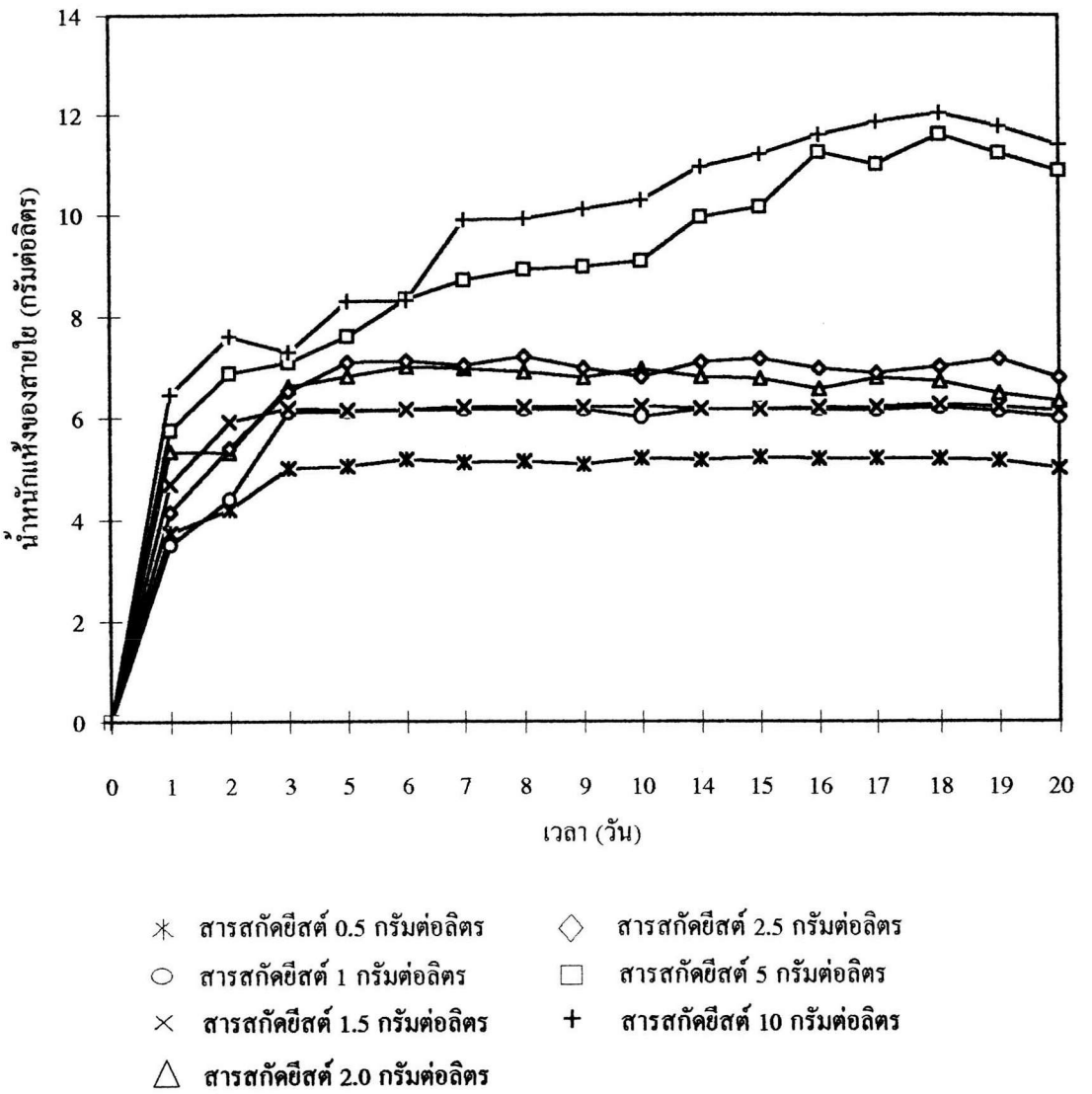
ซึ่งคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนได้เท่ากับ 0.05 0.1 0.15 0.2 0.25 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 1 840 : 2 840 : 3 840 : 4 840 : 5 840 : 10 และ 840 : 20 ตามลำดับ พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดยีสต์ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด คือให้ปริมาณเท่ากับ 35.1 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณสารสกัดยีสต์เท่ากับ 1.5 2 2.5 0.5 5 และ 10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยให้ปริมาณกรดโคจิกเท่ากับ 31.26 29.39 20.32 10.9 1.8 และ 1.78 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 27

สำหรับการเติบโตของสายใยรา จะพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกที่มีปริมาณสารสกัดยีสต์สูง จะให้การเติบโตของสายใยรามาก แต่จะให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำ โดยผลการทดลองพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณสารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตรจะให้การเติบโตมากที่สุดคือ 12.01 กรัมต่อลิตร รองลงมาได้แก่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณสารสกัดยีสต์เป็น 5.0 2.5 2.0 1.5 1.0 และ 0.5 กรัมต่อลิตร โดยให้การเติบโตเป็น 11.94 7.19 7.0 6.28 6.19 และ 5.21 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 28

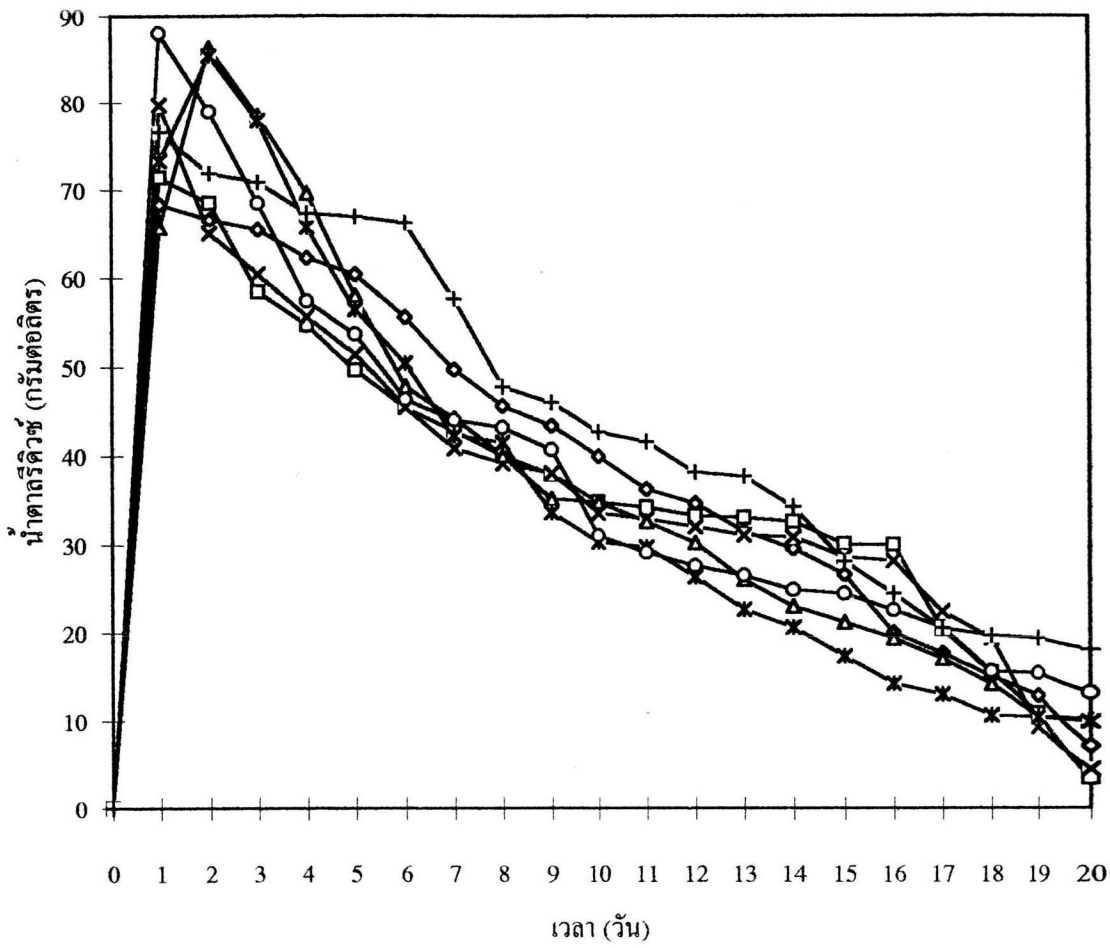
เมื่อพิจารณาถึงการใช้น้ำตาลของราในอาหารที่มีปริมาณสารสกัดยีสต์ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าราจะสลายน้ำตาลทรายขาวกลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมดประมาณวันที่ 2 - 3 ของการเพาะเลี้ยง และพบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์เท่ากับ 1 และ 1.5 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงเป็นอันดับ 1 และ 2 ราจะมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เร็ว และเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์น้อยที่สุดในวันสิ้นสุดการทดลอง โดยเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 3.45 และ 4.43 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณสารสกัดยีสต์เป็น 0.5 2.0 2.5 5.0 และ 10 กรัม ต่อลิตร จะเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันสิ้นสุดการทดลองเป็น 7.08 10.10 9.80 13.0 และ 18.01 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (รูปที่ 29)



รูปที่ 27 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทรายขาว 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และแปรผันปริมาณสารสกัดยีสต์เป็น 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 5.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 28 น้ำหนักแห้งของสายใยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกที่มีปริมาณสารสกัดยีสต์เป็น 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 5.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตรเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 29 การใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารที่มีปริมาณสารสกัดยีสต์เท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 5.0 และ 10 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

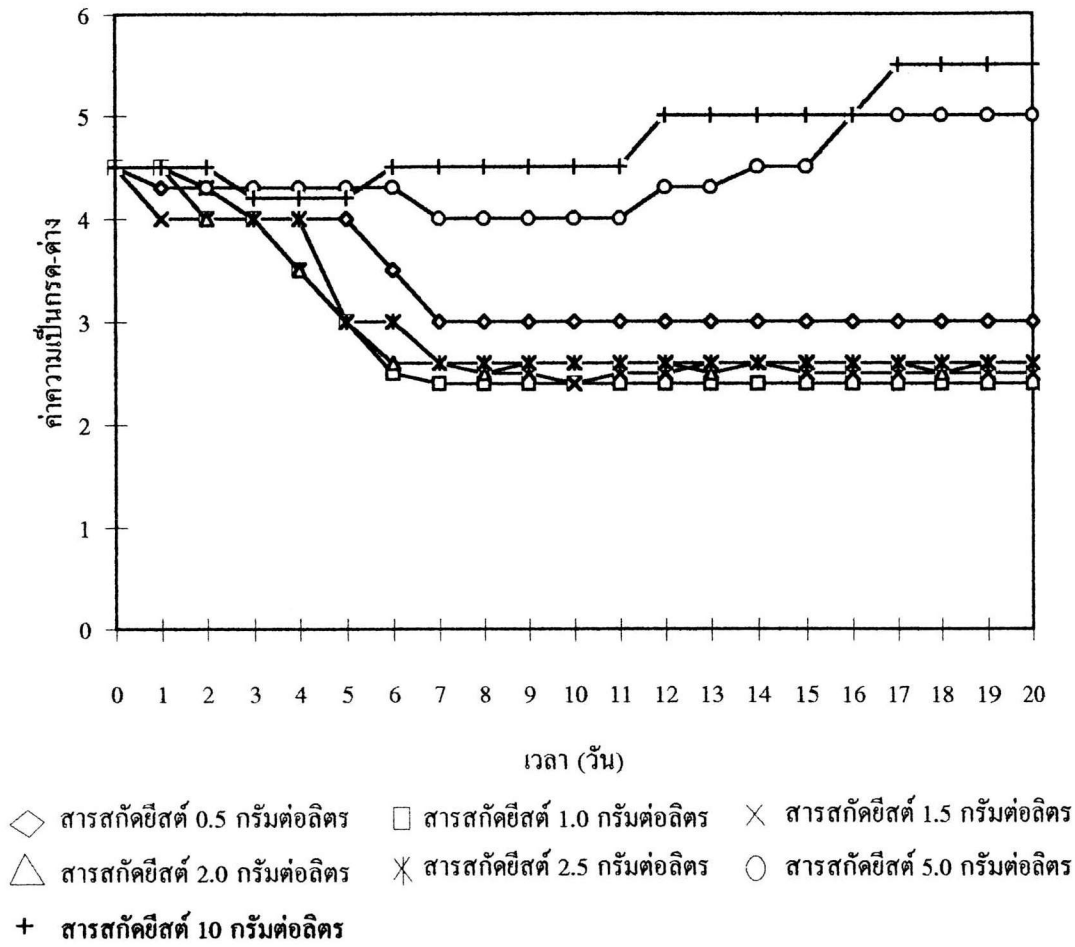
นอกจากนี้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดยีสต์เท่ากับ 10 และ 5 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จะไม่ลดลงต่ำกว่า 4.0 และเมื่อมีการเติบโตของสายใยรามากขึ้นก็จะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นด้วย ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดยีสต์ปริมาณ 0.5 1.0 1.5 2 และ 2.5 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจาก 4.5 เรื่อยๆจนมีค่าคงที่ประมาณวันที่ 5 - 6 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีค่าเป็น 3 2.4 2.5 2.6 และ 2.6 ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 30

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก ที่มีปริมาณสารสกัดยีสต์เป็น 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 5.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 1 840 : 2 840 : 3 840 : 4 840 : 5 840 : 10 และ 840 : 20 ตามลำดับ พบว่าปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณสารสกัดยีสต์เป็น 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อจะหมดเร็วเป็นลำดับที่ 1 2 3 4 และ 5 ตามลำดับ โดยจะลดลงเรื่อยๆและหมดในวันที่ 5 7 7 9 และ 9 ตามลำดับ ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณสารสกัดยีสต์เป็น 5 และ 10 กรัมต่อลิตรปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกใช้ไม่หมด โดยจะเหลือปริมาณ 0.06 และ 0.144 กรัมต่อลิตรตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 31

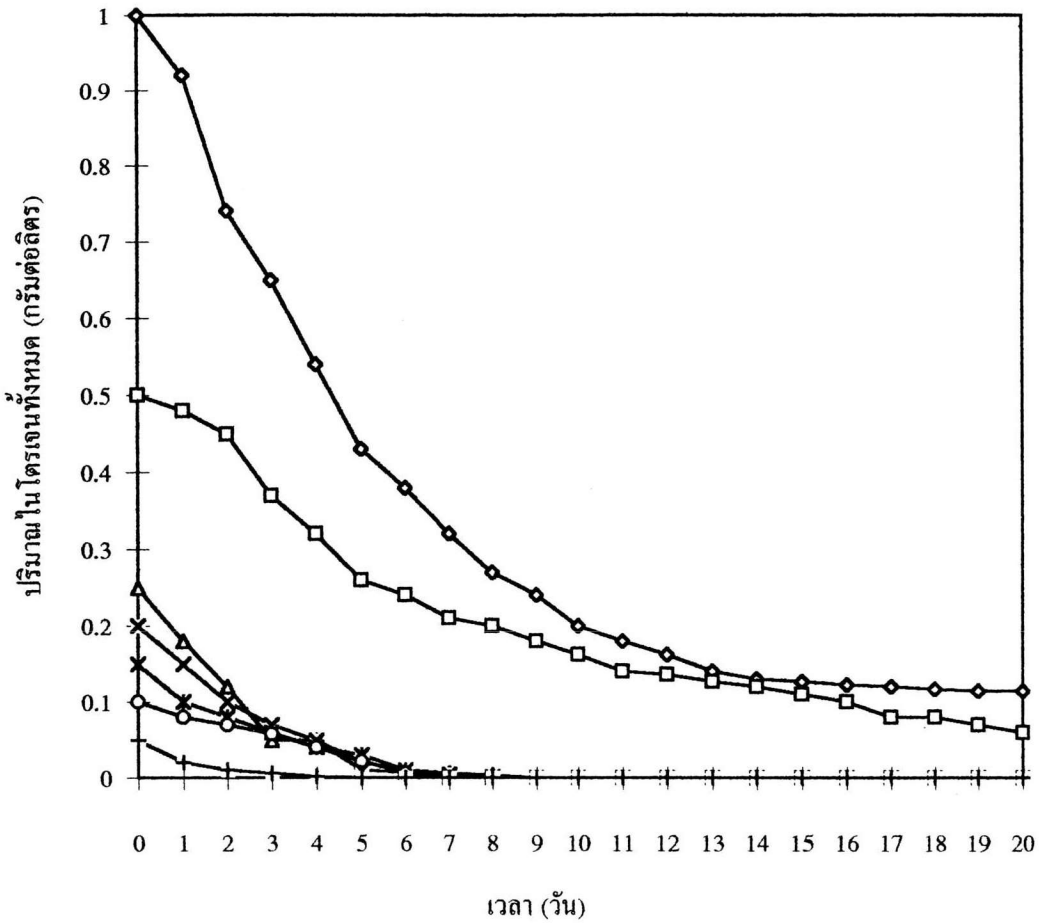
จากผลการทดลองพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกที่มีสารสกัดยีสต์ปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนจะมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13

2.3.2ผลการหาชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เสริมต่อการผลิตกรดโคจิก

เมื่อเพาะเลี้ยงรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดยีสต์ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร แล้วแปรผันปริมาณไนโตรเจนบริสุทธิ์ 2 ชนิด ได้แก่แอมโมเนียมซัลเฟต และ แอมโมเนียมไนเตรต โดยแปรผันให้มีปริมาณไนโตรเจน

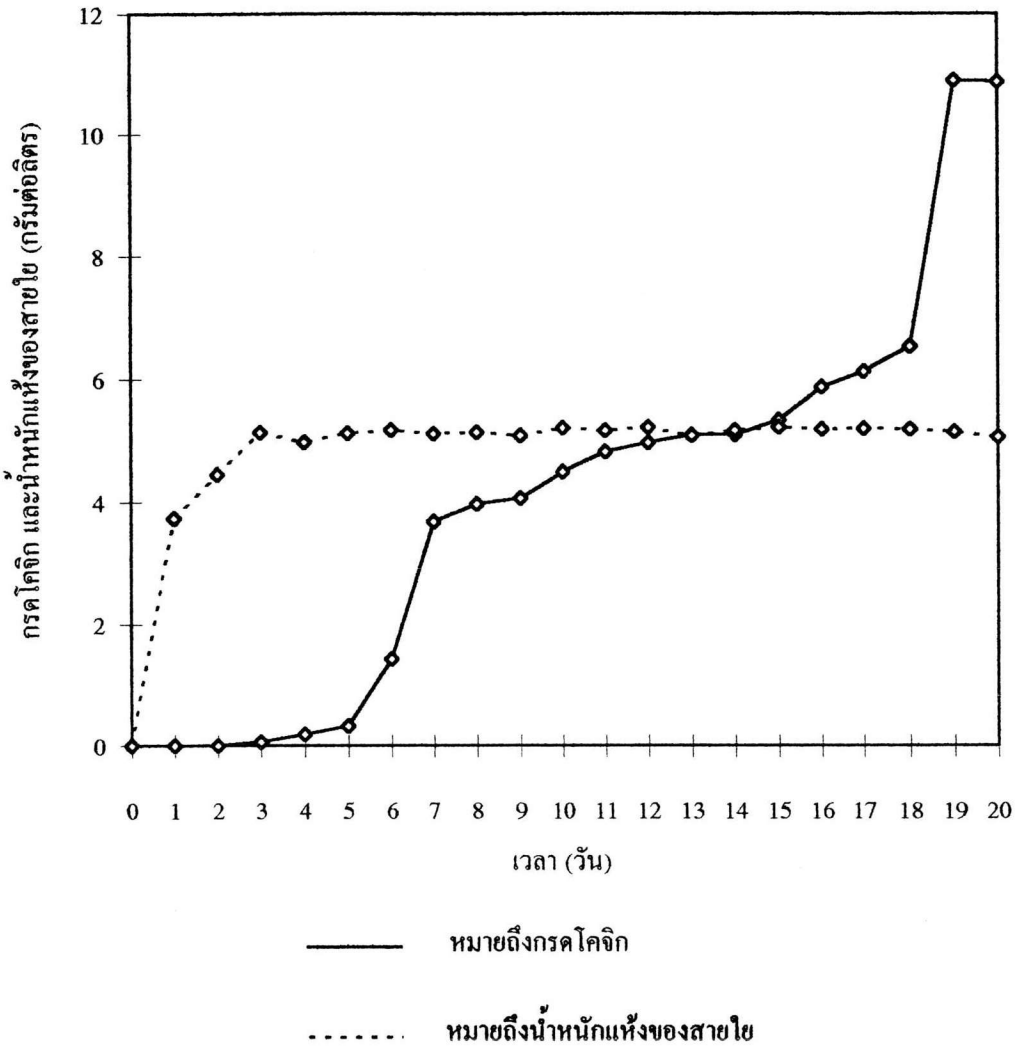


รูปที่ 30 ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณสารสกัดยีสต์เท่ากับ 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 5.0 และ 10 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

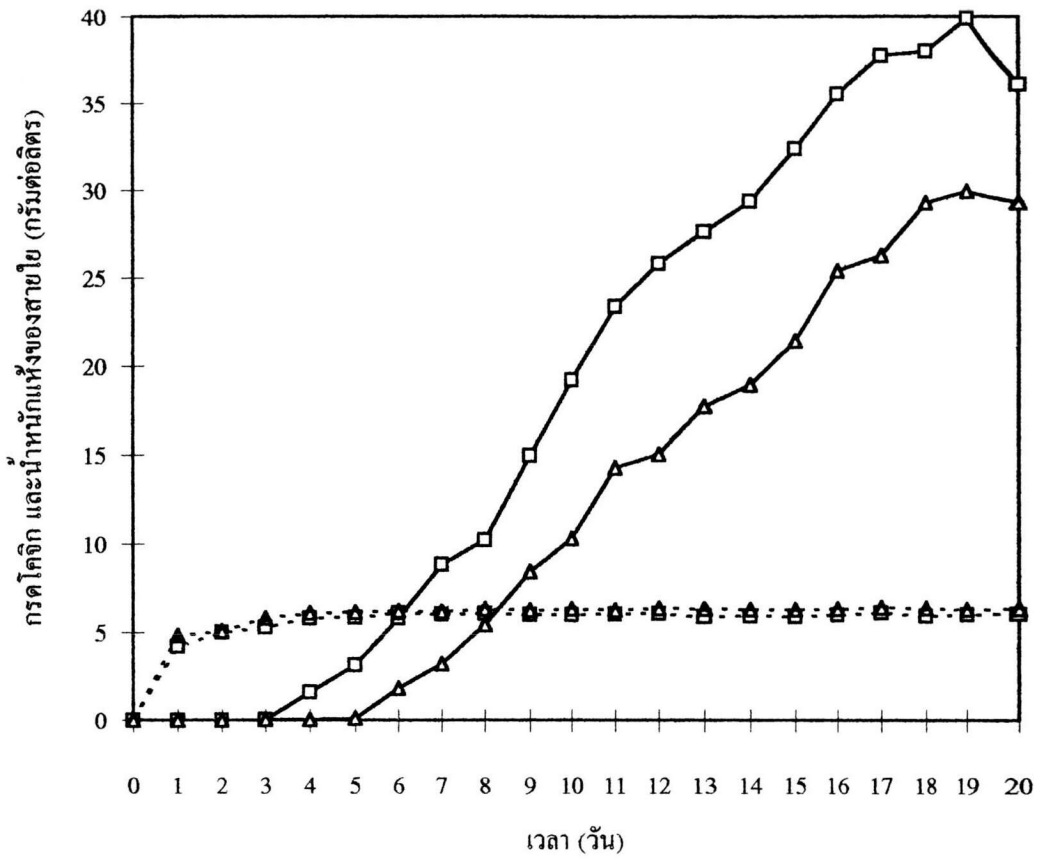


รูปที่ 31 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ซึ่งมีปริมาณสารสกัดยีสต์ตั้งต้นเป็น 0.5 1 1.5 2 2.5 5 และ 10 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0.05 0.10 0.15 และ 0.20 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เป็นอัตราส่วน 840 : 1 840 : 2 840 : 3 และ 840 : 4 ดังแสดงในตารางที่ 5 แล้วทำการตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำตาลทั้งหมด น้ำหนักแห้งของสายใย และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกวันระหว่างการผลิตจากการทดลอง พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเสริมแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน (ชุดควบคุม) คือมีสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียว ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 1 จะให้ปริมาณกรดโคจิกเท่ากับ 10.9 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยงดังแสดงในรูปที่ 32 และตารางที่ 9 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.24 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมไนเตรตปริมาณ 0.14 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งคิดเป็นปริมาณอนินทรีย์ไนโตรเจนเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (รวมกับปริมาณไนโตรเจนในสารสกัดยีสต์) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตรหรือคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 2 จะให้ปริมาณกรดโคจิกเท่ากับ 39.89 และ 29.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 33 และตารางที่ 9 เมื่อใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 0.47 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมไนเตรต 0.28 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณ ไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 3 จะให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง โดยให้ปริมาณกรดโคจิกเท่ากับ 31.93 และ 21.56 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 34 และตารางที่ 9 เมื่อใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.71 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรตเท่ากับ 0.43 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.20 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 4 จะให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง



รูปที่ 32 กรดโคจิกและน้ำหนักแห้งของสายใยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ มีปริมาณไนโตรเจนในสารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร (C:N = 840:1) เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

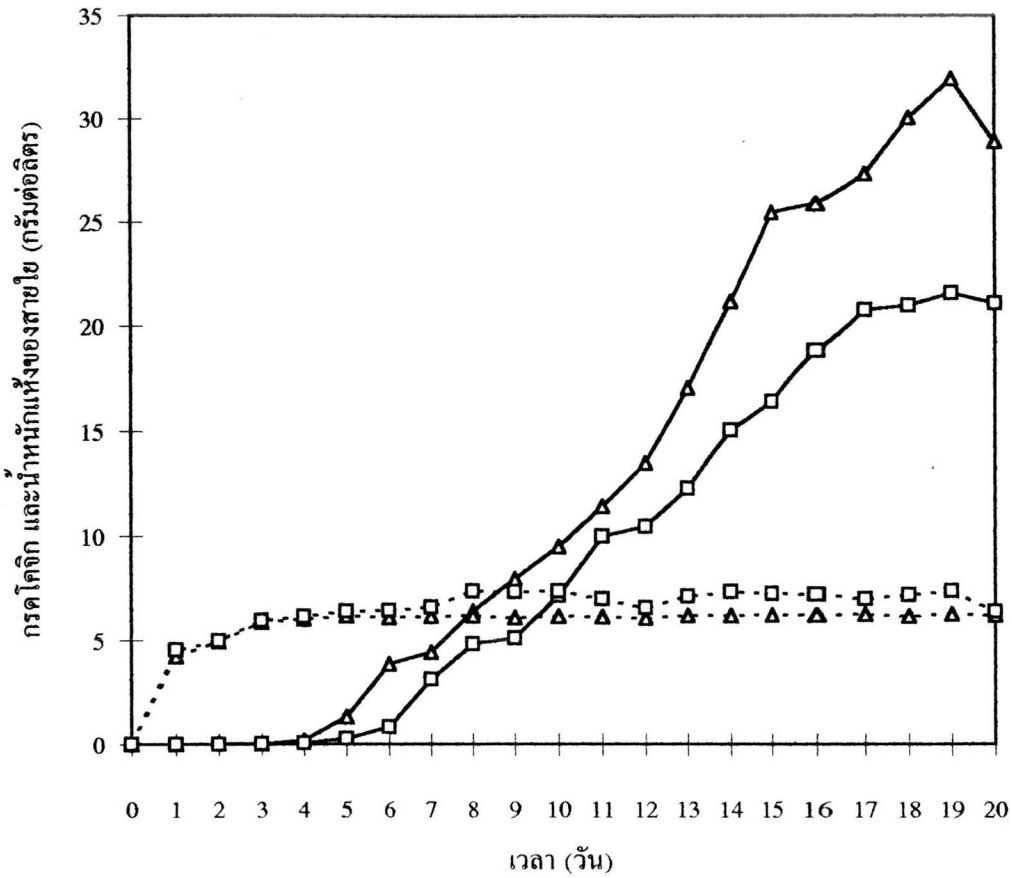


△ แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.24 กรัมต่อลิตร + สารสกัดยีสต์ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร (C:N = 840:2)

□ แอมโมเนียมไนเตรตปริมาณ 0.14 กรัมต่อลิตร + สารสกัดยีสต์ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร (C:N = 840:2)

——— หมายถึงกรดโคจิก ..... หมายถึงน้ำหนักแห้งของสายใย

รูปที่ 33 กรดโคจิกและน้ำหนักแห้งของสายใยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เสริมต่างกัน โดยจัดให้มีปริมาณไนโตรเจนรวมเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



△ แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.47 กรัมต่อลิตร + สารสกัดยีสต์ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร (C:N = 840:3)

□ แอมโมเนียมไนเตรตปริมาณ 0.28 กรัมต่อลิตร + สารสกัดยีสต์ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร (C:N = 840:3)

——— กรดโคจิก ..... น้ำหนักแห้งของสายใย

รูปที่ 34 กรดโคจิกและน้ำหนักแห้งสายใยของรา *Aspergillus oryzae* K-13 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนเสริมต่างกัน โดยจัดให้มีปริมาณไนโตรเจนรวมเท่ากับ 0.15 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

ตารางที่ 9 ผลผลิตกรดโคจิก และวันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดเมื่อแปรผันปริมาณไนโตรเจนอนินทรีย์เสริมและอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกต่างๆกัน

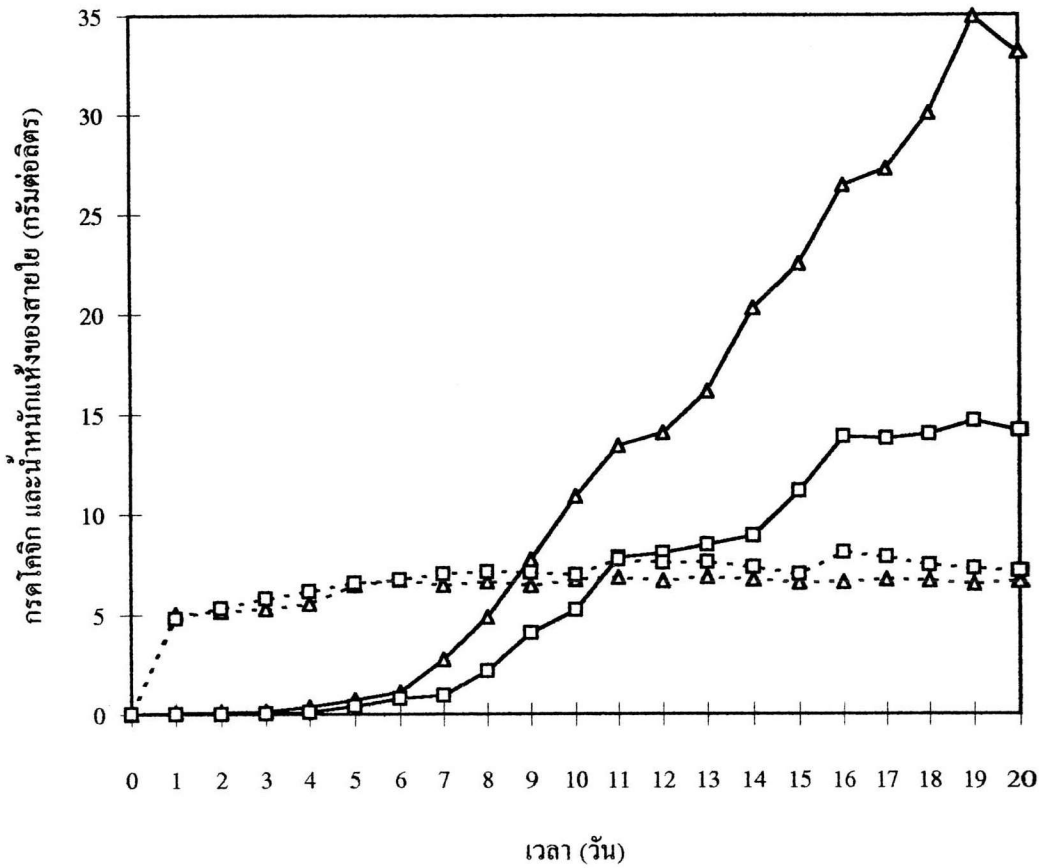
แหล่งไนโตรเจน		ปริมาณ (กรัม)	ปริมาณไนโตรเจนในแหล่งไนโตรเจนบริสุทธิ์	ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร) และอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน	ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด
อินทรีย์	อนินทรีย์					
สารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร	แอมโมเนียมซัลเฟต	0	0	0.05 (840 : 1)	10.9	19
		0.24	0.05	0.10 (840 : 2)	39.89	19
		0.47	0.10	0.15 (840 : 3)	31.93	19
		0.71	0.15	0.20 (840 : 4)	34.95	19
	แอมโมเนียมไนเตรต	0	0	0.05 (840 : 1)	10.9	19
		0.14	0.05	0.10 (840 : 2)	29.97	19
		0.28	0.10	0.15 (840 : 3)	21.56	19
		0.43	0.15	0.20 (840 : 4)	14.64	19

โดยให้ปริมาณกรดโคจิกเป็น 34.95 และ 14.64 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 35 และตารางที่ 9

สำหรับการเติบโตของสายใยเมื่อใช้ชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจนต่างกัน โดยชุดควบคุมซึ่งมีสารสกัดยีสต์ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 1 จะให้น้ำหนักแห้งของสายใยสูงสุดเท่ากับ 5.22 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 32 และเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เสริมเป็นแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.24 0.47 และ 0.71 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 2 840 : 3 และ 840 : 4 ตามลำดับจะให้น้ำหนักแห้งของสายใยสูงสุดเท่ากับ 6.09 6.24 และ 6.85 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 28 และ 29 และ 30 และเมื่อใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมไนเตรตปริมาณ 0.14 0.28 และ 0.43 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 1 840 : 2 และ 840 : 3 ตามลำดับจะให้น้ำหนักแห้งของ สายใยสูงสุดเท่ากับ 6.37 7.35 และ 8.05 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 33 และ 34 และ 35 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกที่ได้จากแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิด โดยพิจารณาในรูปของอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 840 : 1 840 : 2 840 : 3 และ 840 : 4 ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 36 จะเห็นได้ว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 0.24 กรัมต่อลิตร (ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตร) หรือคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตรและคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 2 ส่วนแอมโมเนียมไนเตรตทุกความเข้มข้นพบว่าให้ปริมาณกรดโคจิกต่ำกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน

เมื่อพิจารณาถึงอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าอัตราส่วน 840 : 2 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสม

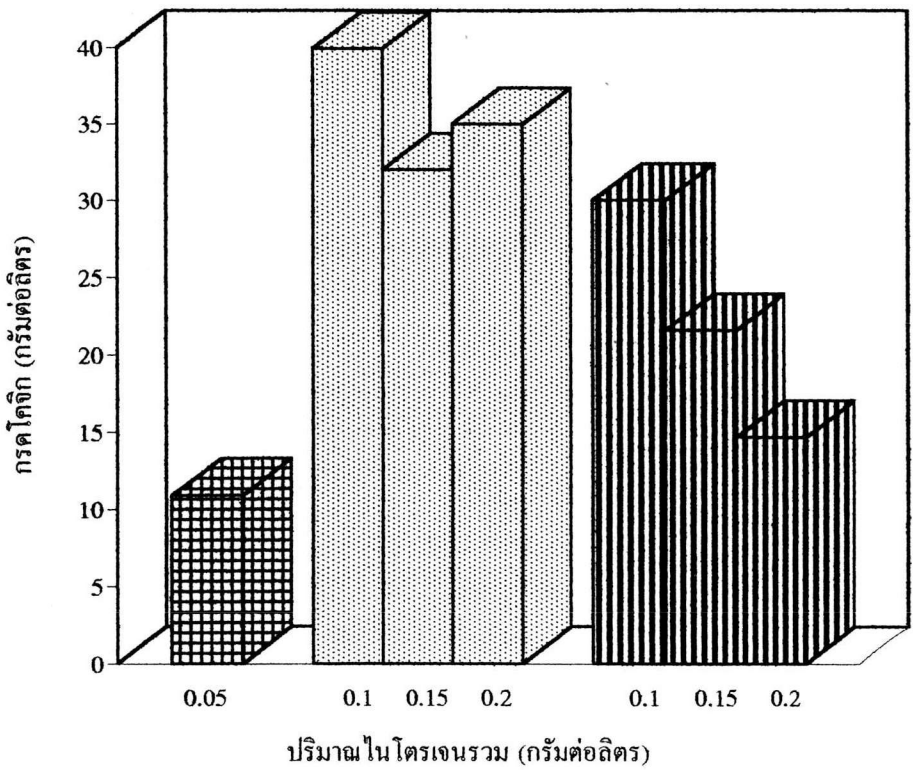


△ แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.71 กรัมต่อลิตร + สารสกัดยีสต์ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร (C:N = 840:4)

□ แอมโมเนียมไนเตรตปริมาณ 0.43 กรัมต่อลิตร + สารสกัดยีสต์ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร (C:N = 840:4)

——— หมายถึงกรดโคจิก ------- หมายถึงน้ำหนักแห้งของสายใย

รูปที่ 35 กรดโคจิกและน้ำหนักแห้งสายใยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนเสริมต่างกัน โดยจัดให้มีปริมาณไนโตรเจนรวมเท่ากับ 0.20 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



แหล่งไนโตรเจนรวมปริมาณ 0.05 กรัมต่อลิตรจากสารสกัดยีสต์ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร

แหล่งไนโตรเจนรวมปริมาณ 0.1 0.15 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้จากสารสกัดยีสต์ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตรรวมกับแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.24 0.47 และ 0.71 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

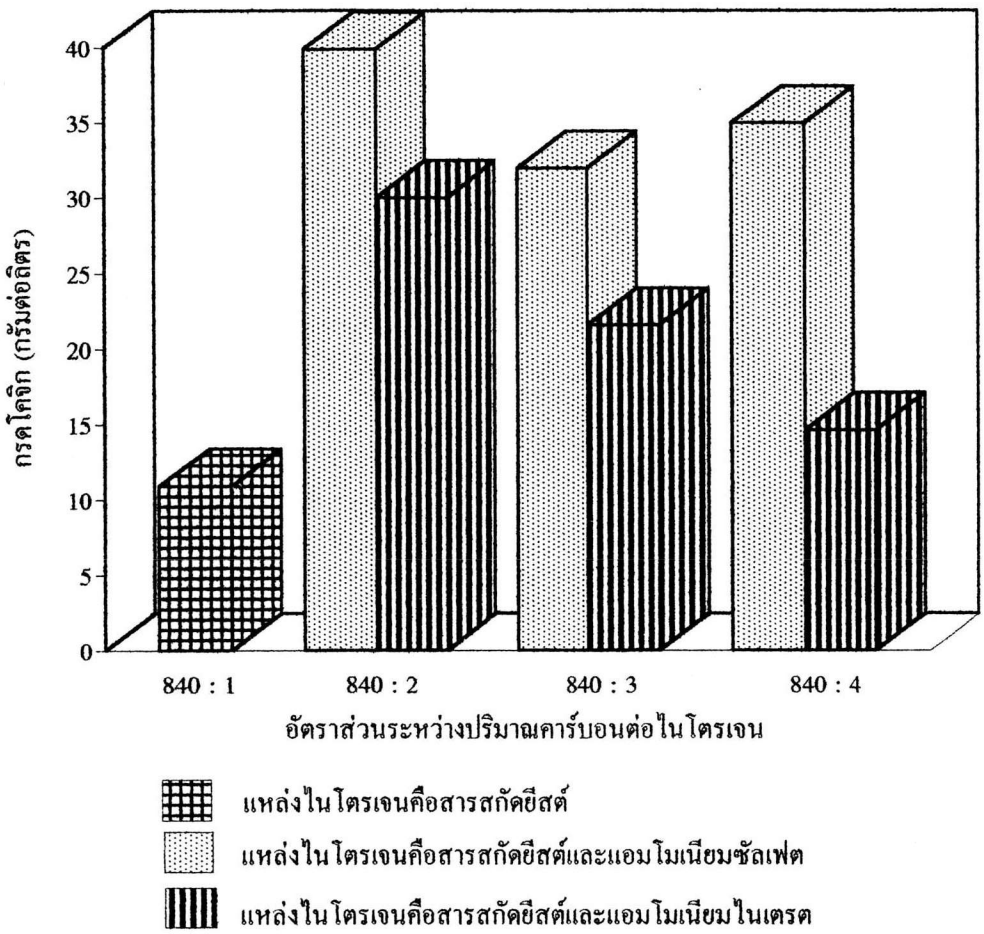
แหล่งไนโตรเจนรวมปริมาณ 0.1 0.15 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้จากสารสกัดยีสต์ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตรรวมกับแอมโมเนียมไนเตรตปริมาณ 0.14 0.28 และ 0.43 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

รูปที่ 36 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันปริมาณ และชนิดของแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด ได้แก่แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรต โดยจัดให้มีปริมาณไนโตรเจนรวมต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

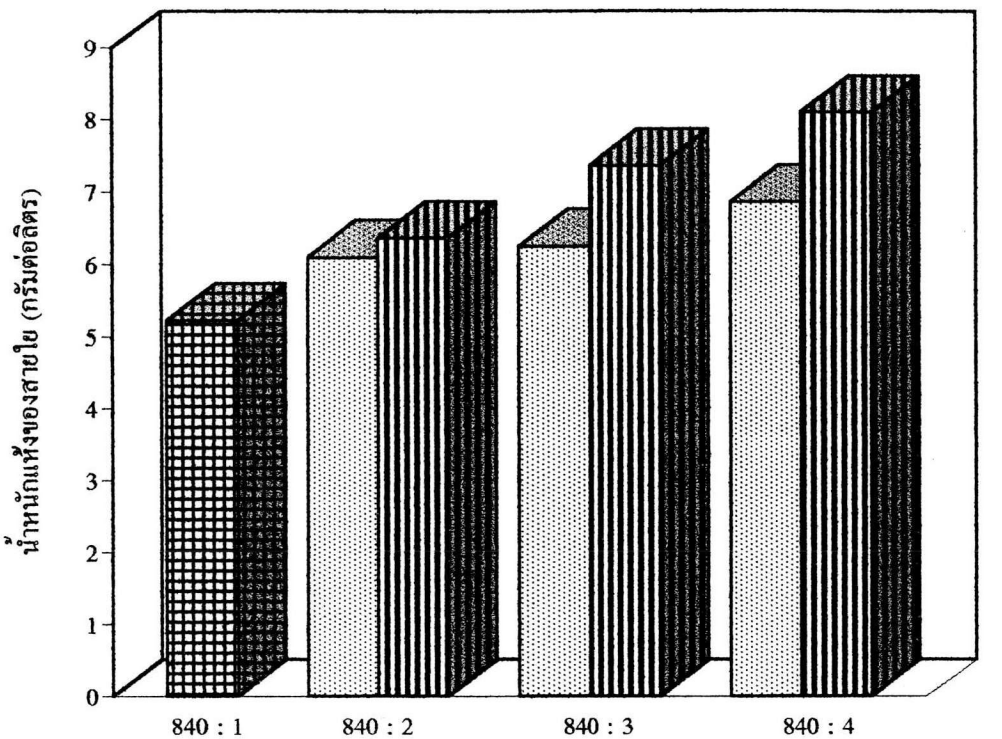
ที่สุดระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนสำหรับผลิตกรดโคจิก โดยพบว่าที่อัตราส่วน 840 : 2 เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน แม้ว่าจะให้ผลผลิตต่ำกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน แต่ก็ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าอื่นที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนเหมือนกัน ดังแสดงในรูปที่ 37

เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งของสายใยของแต่ละอัตราส่วน พบว่าอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนเสริมปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากสารสกัดยีสต์ที่อัตราส่วน 840 : 2 840 : 3 และ 840 : 4 จะให้น้ำหนักแห้งของสายใย เท่ากับ 6.09 6.24 และ 6.85 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และที่อัตราส่วน 840 : 2 840 : 3 และ 840 : 4 โดยใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนเสริม จะให้น้ำหนักแห้งของสายใย เท่ากับ 6.35 7.35 และ 7.85 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ในขณะที่อัตราส่วน 840 : 1 ซึ่งมีสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวโดยไม่มีการเสริมแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน จะให้การเติบโตของสายใยสูงสุดเท่ากับ 5.22 กรัมต่อลิตรดังแสดงในรูปที่ 38 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแอมโมเนียมไนเตรตให้การเติบโตได้ดีกว่าแต่ให้ปริมาณกรดโคจิกต่ำกว่า

เมื่อพิจารณาถึงค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการเพาะเลี้ยง พบว่าที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 840 : 2 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างรวดเร็ว และคงที่อยู่ที่ค่า 2.2 ตั้งแต่วันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่อัตราส่วน 840 : 3 และ 840 : 4 จะคงที่ที่ค่า 2.5 ในวันที่ 8 และ 6 ของการผลิตตามลำดับ ส่วนที่อัตราส่วน 840 : 2 840 : 3 และ 840 : 4 เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน จะคงที่ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.5 2.6 และ 3 ในวันที่ 9 8 และ 8 ของการผลิต ส่วนชุดควบคุม (ไม่มีการเสริมแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 1 จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างคงที่เท่ากับ 3 ในวันที่ 7 ของการผลิต



รูปที่ 37 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



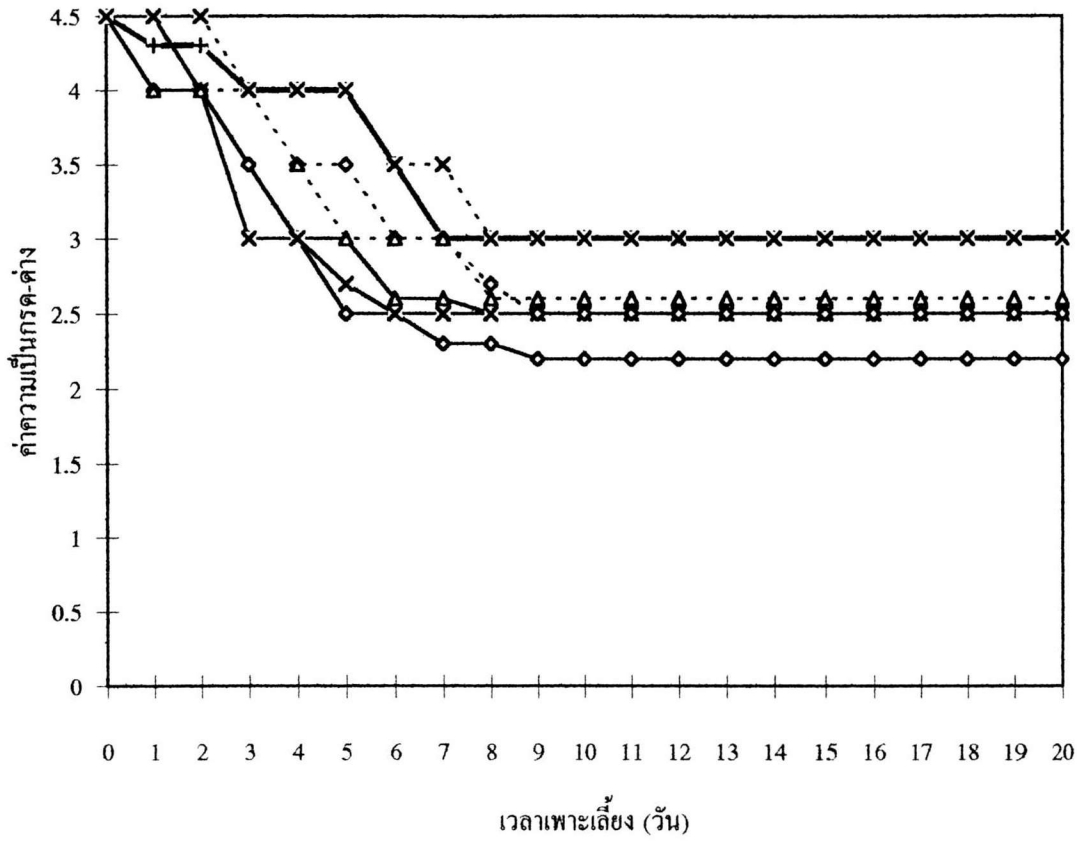
รูปที่ 38 น้ำหนักแห้งของสายใยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆกันเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

ดังแสดงในรูปที่ 39 จะเห็นได้ว่าอัตราส่วน 840 : 2 ซึ่งให้ผลผลิตสูงสุดจะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุดด้วย เมื่อตรวจสอบการใช้ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจากการทดลองใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ 2 แหล่งคือ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆกัน พบว่ามีการใช้ไนโตรเจนในรูปแบบเดียวกัน คือกรณีที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เสริมซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 1 จะใช้ไนโตรเจนหมดภายในวันที่ 5 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เสริมมีค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 2 และ 840 : 3 และ 840 : 4 จะใช้ไนโตรเจนหมดภายในวันที่ 7 และ 10 และ 11 ตามลำดับ เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนเสริมมีค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 2 840 : 3 และ 840 : 4 จะใช้ไนโตรเจนหมดในวันที่ 6 8 และ 10 ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 40

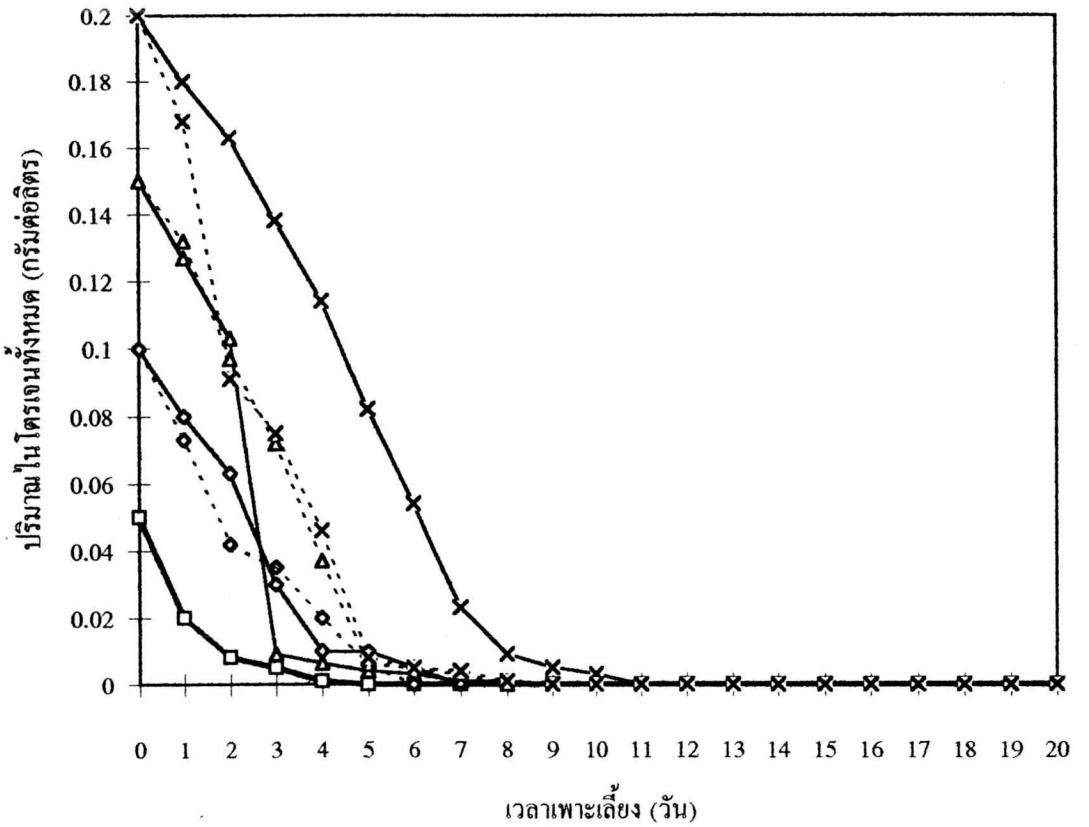
จากผลการทดลองพบว่าที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 840 : 2 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด (รูปที่ 37) ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 840 : 2 โดยมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนเสริมสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2.3.3การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารสกัดยีสต์ต่อแหล่งไนโตรเจนบริสุทธิ์สำหรับการผลิตกรดโคจิก

เมื่อทดลองผลิตกรดโคจิกในขวดเขย่าโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 840 : 2 ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดโคจิก (จากข้อ 2.3.2) โดยอัตราส่วนนี้จะมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นจะแปรอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักสารสกัดยีสต์ต่อน้ำหนักแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.25 : 0.36 0.5 : 0.24 0.75 : 0.12 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ซึ่งคิดเป็นปริมาณไนโตรเจนในสารสกัดยีสต์ต่อปริมาณ



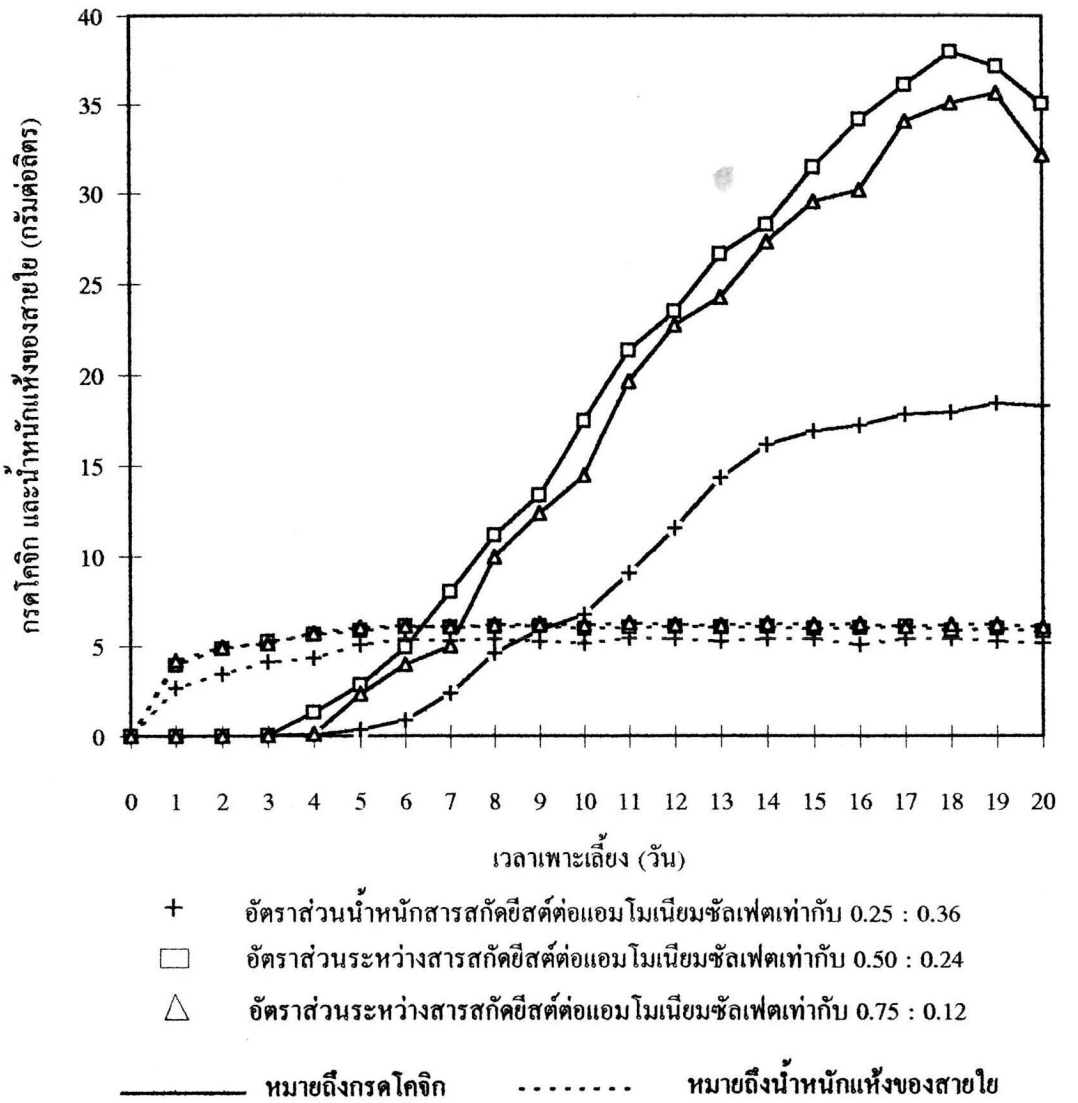
รูปที่ 39 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิก โดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างๆกันเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 40 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่างกัน และแปรผันอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

ไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.025 : 0.075 0.05 : 0.05 และ 0.075 : 0.025 โดยทั้ง 3 อัตราส่วนนี้จะมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากันคือมีปริมาณเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 6 แล้วทำการตรวจวัดปริมาณกรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักแห้ง และค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณไนโตรเจนทุกวันตลอดการผลิต จากการทดลองพบว่าแม้จะกำหนดให้ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากันคือเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร แต่ถ้าอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักสารสกัดยีสต์ต่อน้ำหนักแอมโมเนียมซัลเฟตแปรผันเป็นค่าต่างๆกัน ผลผลิตกรดโคจิกจะแตกต่างกันโดยพบว่าที่อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักสารสกัดยีสต์ต่อน้ำหนักแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.5 : 0.24 และ 0.75 : 0.12 กรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณกรดโคจิกใกล้เคียงกัน คือเท่ากับ 37.95 และ 35.64 กรัมต่อลิตร ให้การเติบโตของสายใยเท่ากับ 6.10 และ 6.28 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 41 และตารางที่ 10 และให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำสุดเท่ากันคือเท่ากับ 2.5 ตั้งแต่วันที่ 4 และ 5 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 11 ในขณะที่อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักสารสกัดยีสต์ต่อน้ำหนักแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.25 : 0.36 จะให้ปริมาณกรดโคจิกเพียง 18.42 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง ให้การเติบโตของสายใยสูงสุดเป็น 5.43 กรัมต่อลิตรดังแสดงในรูปที่ 41 และตารางที่ 10 และให้ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดเท่ากับ 4.0 ตั้งแต่วันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป ดังแสดงในตารางที่ 11

เมื่อพิจารณาการใช้ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจากการทดลองแปรผันอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักสารสกัดยีสต์ต่อน้ำหนักแอมโมเนียมซัลเฟตต่างๆกัน พบว่ามีการใช้ในรูปแบบเดียวกัน คือปริมาณไนโตรเจนจะหมดลงอย่างรวดเร็วก่อนวันที่จะมีการผลิตกรดโคจิกโดยปริมาณไนโตรเจนจะหมดในวันที่ 7 สำหรับอัตราส่วน 0.25 : 0.36 และจะหมดในวันที่ 6 สำหรับอัตราส่วน 0.5 : 0.24 และ 0.75 : 0.12 ดังแสดงในรูปที่ 42



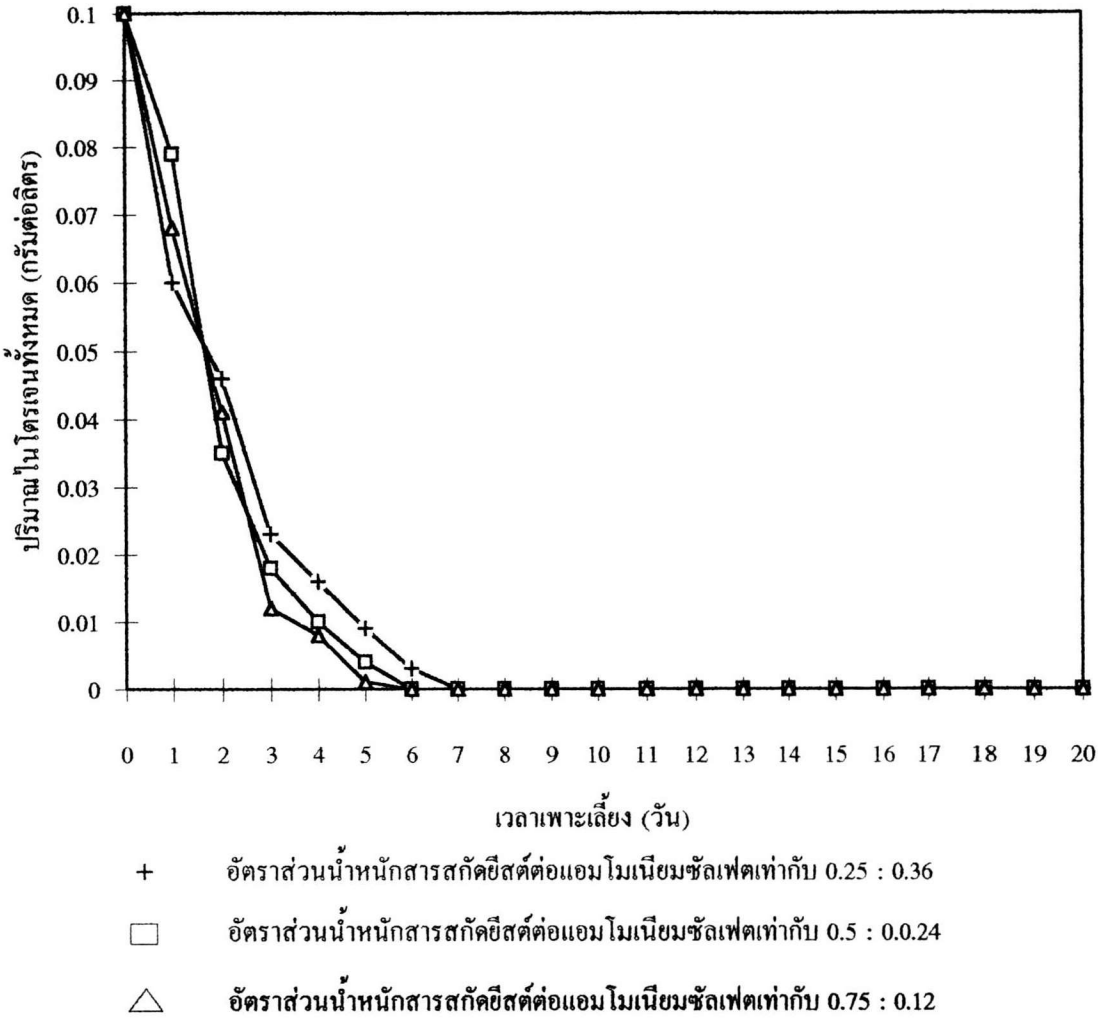
รูปที่ 41 ปริมาณกรดโคจิก และน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักสารสกัดยีสต์และน้ำหนักแอมโมเนียมซัลเฟตต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

ตารางที่ 10 ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดและน้ำหนักแห้งของสายใยเมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันอัตราส่วนระหว่างปริมาณไนโตรเจนจากสกัดจากยีสต์และปริมาณไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟต

สารสกัดยีสต์		แอมโมเนียมซัลเฟต		อัตราส่วนน้ำหนักสารสกัดยีสต์ต่อน้ำหนักแอมโมเนียมซัลเฟต	ปริมาณไนโตรเจนในสารสกัดยีสต์ต่อไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต	คิดเป็นปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด	น้ำหนักแห้งของสายใย (กรัมต่อลิตร)
ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)						
0.25	0.025	0.36	0.075	0.25:0.36	0.025:0.075	0.1	18.42	19	5.43
0.5	0.05	0.24	0.05	0.5:0.24	0.05:0.05	0.1	37.95	19	6.10
0.75	0.075	0.12	0.025	0.75:0.12	0.075:0.025	0.1	35.64	19	6.28

ตารางที่ 11 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อแปรผันอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักสารสกัดยีสต์และน้ำหนักแอมโมเนียมซัลเฟตต่างๆกัน

เวลาเพาะเลี้ยง (วันที่)	ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อแปรผันอัตราส่วนสารสกัดจากยีสต์ต่อน้ำหนักแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม : กรัม) ต่างๆกัน		
	0.25 : 0.36	0.50 : 0.24	0.75 : 0.12
0	4.5	4.5	4.5
1	4.3	4.0	4.0
2	4.0	3.2	3.5
3	4.0	2.7	3.0
4	4.0	2.5	3.0
5	4.0	2.5	2.5
6	4.0	2.5	2.5
7	4.0	2.5	2.5
8	4.0	2.5	2.5
9	4.0	2.5	2.5
10	4.0	2.5	2.5
11	4.0	2.5	2.5
12	4.0	2.5	2.5
13	4.0	2.5	2.5
14	4.0	2.5	2.5
15	4.0	2.5	2.5
16	4.0	2.5	2.5
17	4.0	2.5	2.5
18	4.0	2.5	2.5
19	4.0	2.5	2.5
20	4.0	2.5	2.5



รูปที่ 42 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารที่แปรผันอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักสารสกัดยีสต์ต่อน้ำหนักแอมโมเนียมซัลเฟตต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

3.ผลการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิก

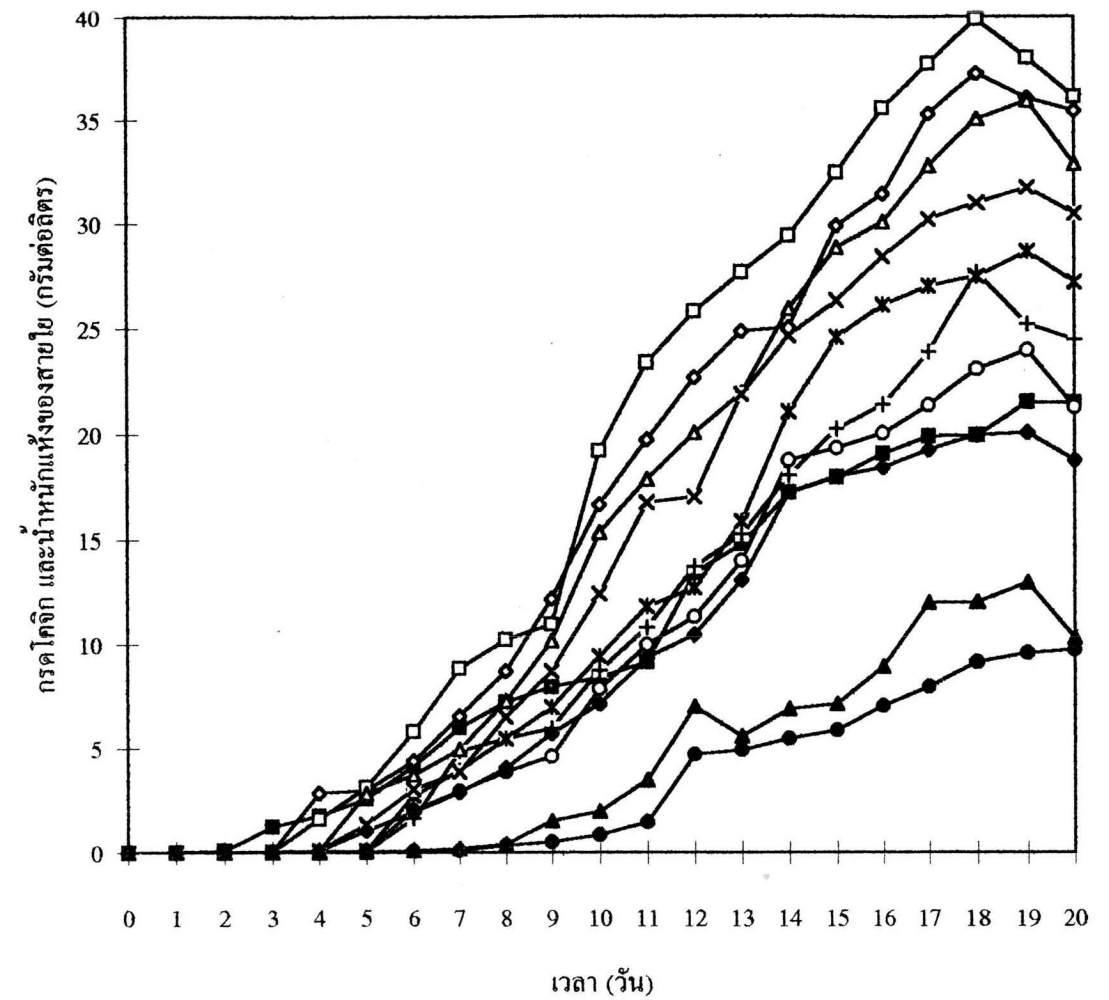
3.1การหาค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก

เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 เพื่อผลิตกรดโคจิก โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกต่างๆกัน ได้แก่ 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 และ 7.5 พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นดังกล่าวจะให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 21.51 27.64 28.64 37.25 39.89 35.91 31.71 23.95 20.07 12.95 และ 9.71 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 18 19 18 18 19 19 19 19 19 และ 20 ตามลำดับ (รูปที่ 43) ซึ่งพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 4.5 จะให้ปริมาณกรดโคจิกสูงที่สุดเมื่อเทียบกับค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นค่าอื่น

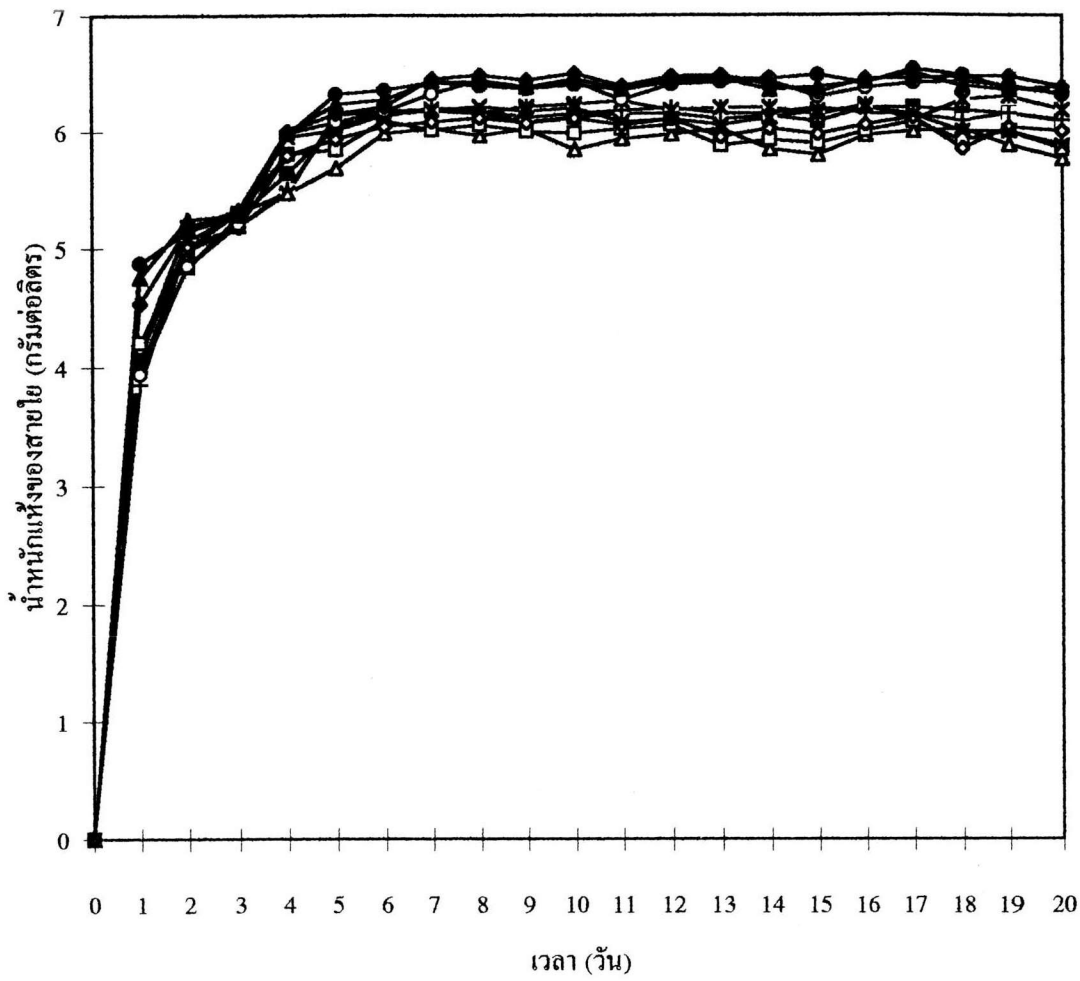
สำหรับการเติบโตของสายใยพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0 และ 7.5 จะให้การเติบโตของสายใยสูงสุดเป็น 6.17 6.20 6.27 6.02 6.09 6.12 6.21 6.44 6.47 6.50 และ 6.48 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 6.0 - 7.5 จะมีการเติบโตของสายใยสูงกว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นค่าอื่น ดังแสดงในรูปที่ 44

เมื่อพิจารณาถึงการใช้น้ำตาลพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 2.5 - 7.5 จะมีการสลายน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมดในเวลาที่แตกต่างกัน โดยน้ำตาลซูโครสจะหมดในวันที่ 3 3 3 2 2 2 3 3 4 4 และ 4 ตามลำดับ และพบว่าแบบแผนการใช้น้ำตาลจะเป็นแบบแผนเดียวกัน (รูปที่ 45 และ 46) และในวันสิ้นสุดการทดลองจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 15.72 11.05 9.05 3.07 1.03 3.98 7.32 10.01 11.81 28.64 และ 31.71 กรัมต่อลิตรตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 46

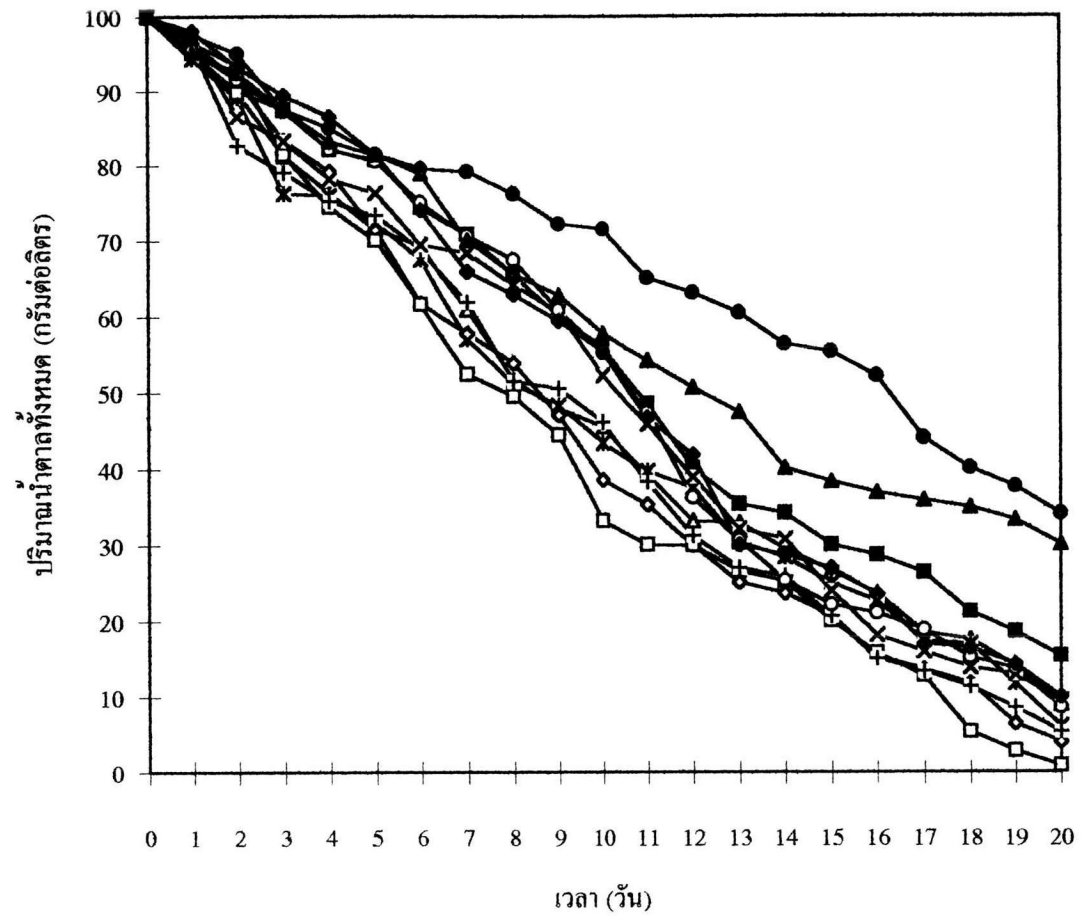
สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดโคจิกพบว่าเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 2.5 - 7.5 จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงระหว่างการ



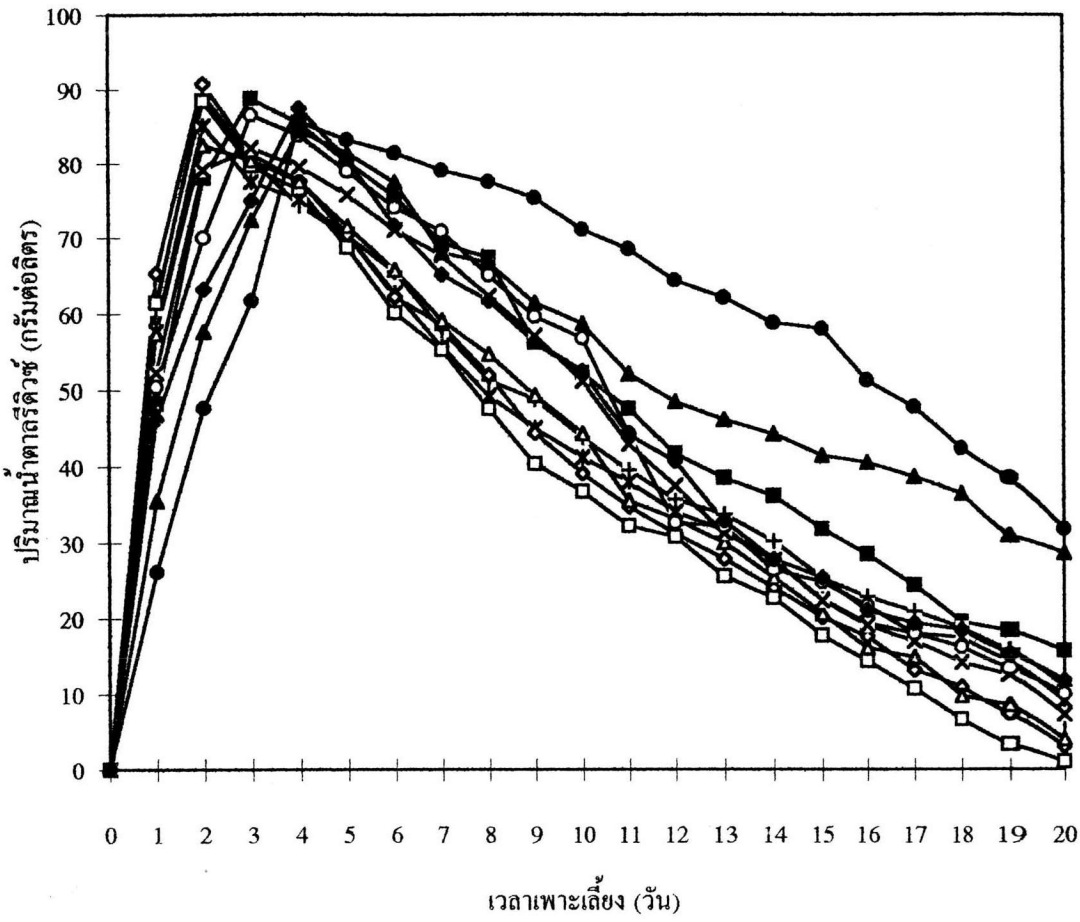
รูปที่ 43 ปริมาณกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 44 น้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 45 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อแปรค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



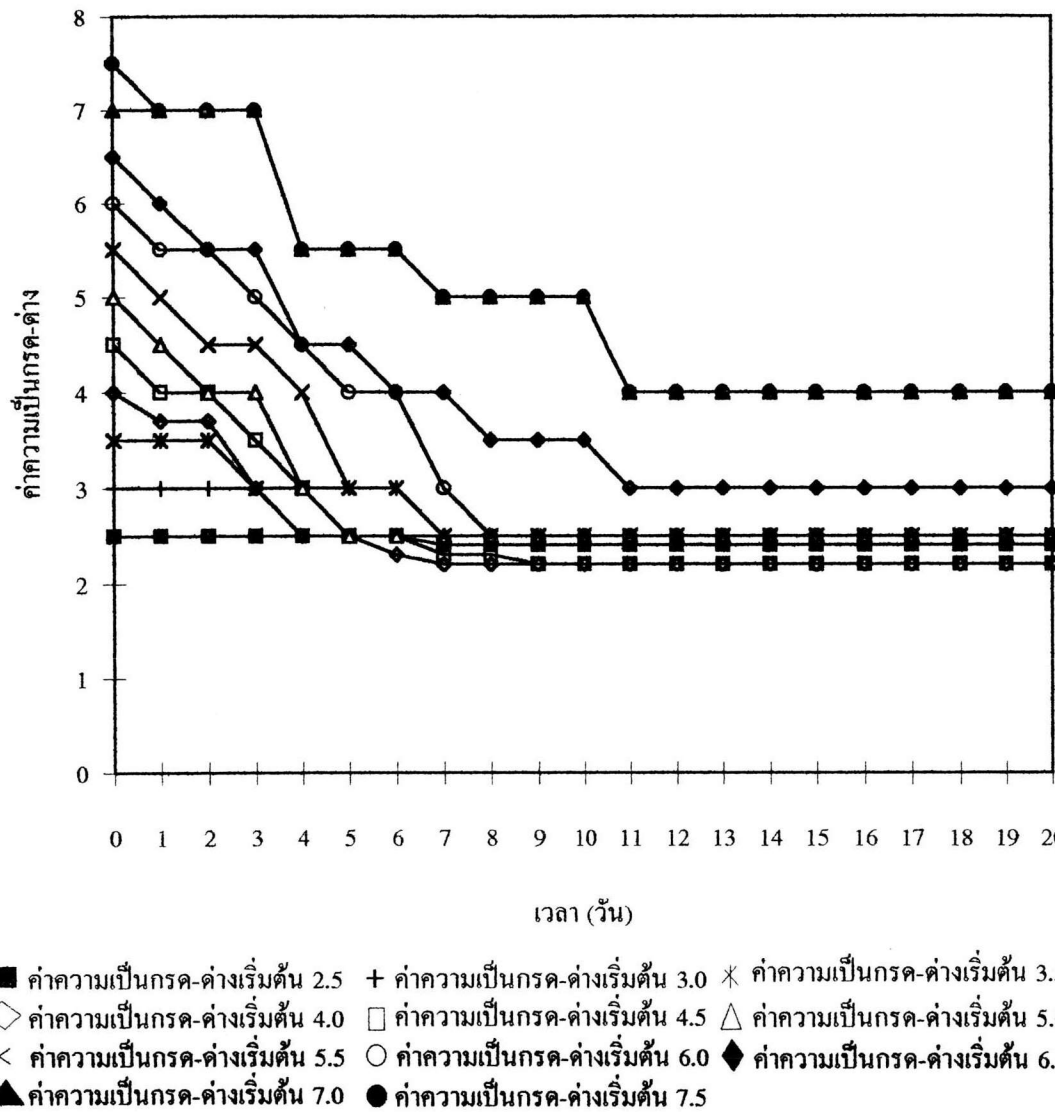
รูปที่ 46 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อแปรค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

เพาะเลี้ยงจนคงที่มีค่าเท่ากับ 2.4 2.5 2.5 2.2 2.2 2.5 2.5 2.5 3 4 และ 4 ในวันที่ 7 4 7 7 9 5 7 8 11 11 และ 11 ตามลำดับ โดยพบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 4 และ 5 จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการเพาะเลี้ยงต่ำที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 47

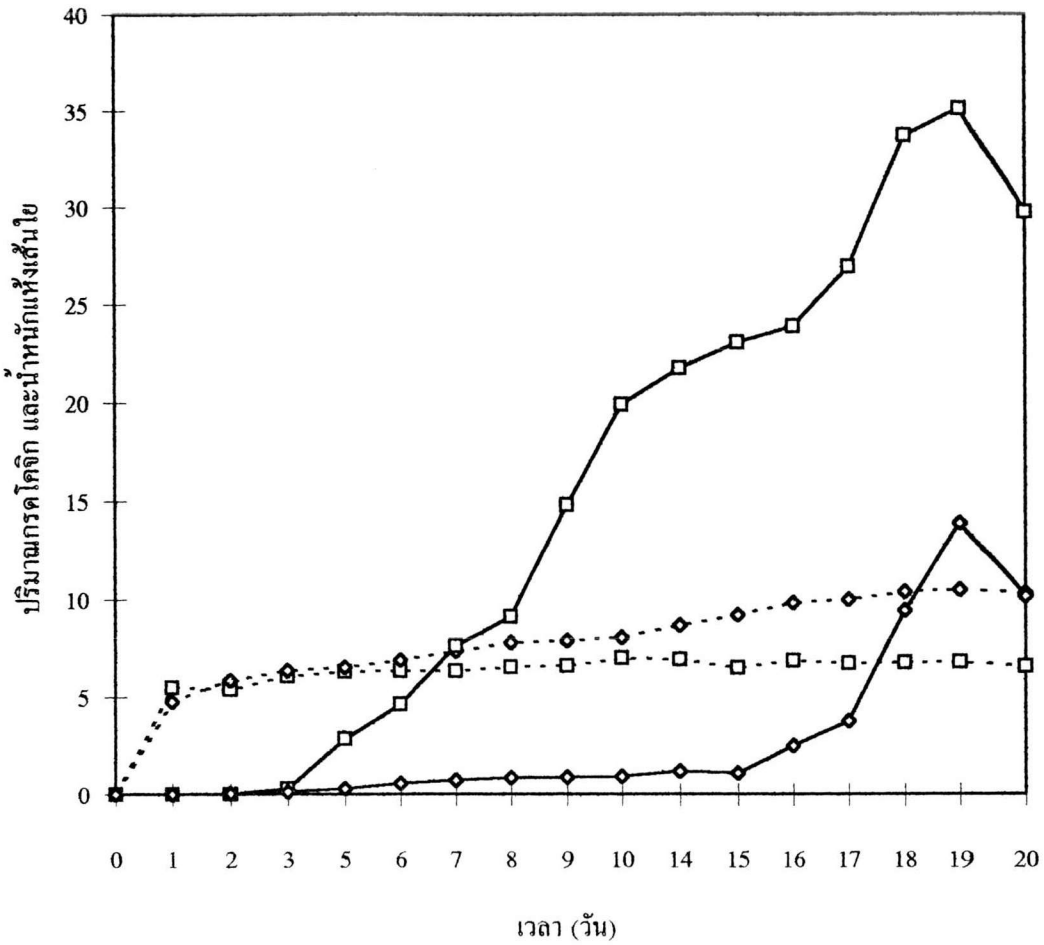
เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตกรดโคจิกเมื่อทำการแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆกัน พบว่าปริมาณกรดโคจิกที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 4.5 จะมีปริมาณสูงสุดคือเท่ากับ 39.89 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง

3.2ผลการทดลองใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก

เมื่อทำการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก8) แล้วแปรผันแหล่งน้ำที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2 ชนิดได้แก่ น้ำปลอดประจุ และน้ำประปา ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้น้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 35.1 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 48) และเมื่อใช้น้ำประปาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 13.87 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 48) โดยพบว่าน้ำประปาจะให้การเติบโตของสายใยสูงกว่าน้ำปลอดประจุ โดยให้การเติบโตสูงสุดเท่ากับ 10.48 และ 7 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 48 เมื่อพิจารณาถึงการใช้น้ำตาลระหว่างการผลิตพบว่าเป็นแบบแผนเดียวกันไม่ว่าจะใช้แหล่งน้ำใดในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ คือน้ำตาลซูโครสจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 49) และมีอัตราการใช้น้ำตาลรีดิวซ์อย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป จนวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือเท่ากับ 3.45 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหาร ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำประปาในการเตรียมอาหารจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือเท่ากับ



รูปที่ 47 ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อแปรค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 48 ปริมาณกรดโคจิกและน้ำหนักแห้งของสายใยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยแปรผันแหล่งน้ำที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2 ชนิดได้แก่น้ำปลอดประจุและน้ำประปา เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส)

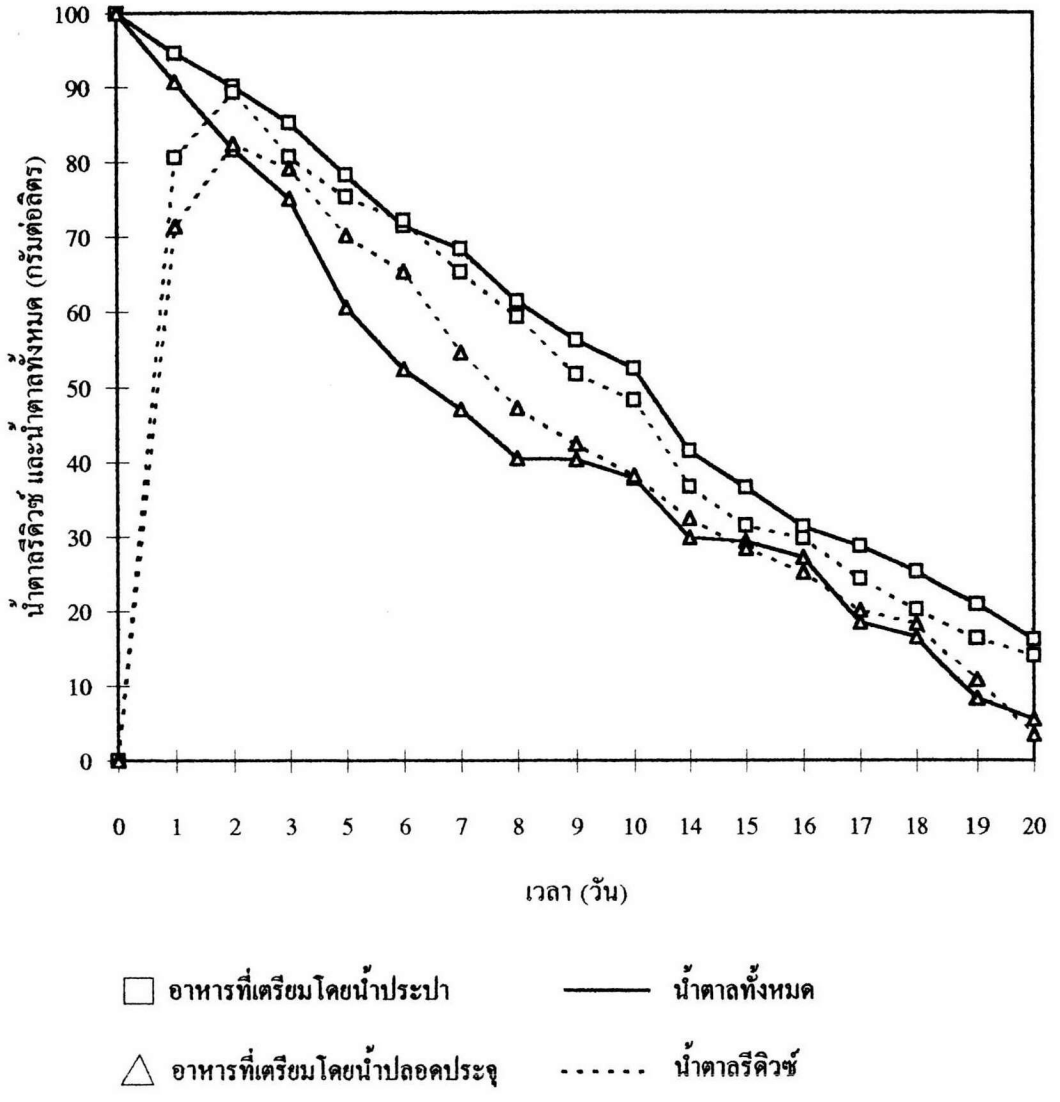
14 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 49 เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิกพบว่าหัวเชื้อที่เตรียมได้จากน้ำประปาและน้ำปลอดประจุจะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดเท่ากับ 3.5 และ 2.4 ตั้งแต่วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป ดังแสดงในตารางที่ 12 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้อาหารสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก8) การใช้น้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกจะมีความเหมาะสมกว่าการใช้น้ำประปา

3.3ผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดโคจิก

เมื่อทดลองผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก8) แล้วแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 28 30 32 34 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดคือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ปริมาณกรดโคจิกเท่ากับ 39.96 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส และ 28 องศาเซลเซียสตามลำดับ โดยให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 37.98 37.95 26.78 และ 9.06 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 19 20 และ 19 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 50

เมื่อพิจารณาการเติบโตของสายใยในวันสิ้นสุดการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยงเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส จะมีการเติบโตเท่ากับ 6.74 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยงเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส จะมีการเติบโตเท่ากับ 6.92 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยงเท่ากับ 32 องศาเซลเซียส จะมีการเติบโตเท่ากับ 6.74 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยงเท่ากับ 34 องศาเซลเซียส จะมีการเติบโตเท่ากับ 5.74 กรัมต่อลิตร และที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยงเท่ากับอุณหภูมิห้อง จะมีการเติบโตเท่ากับ 6.10 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 50

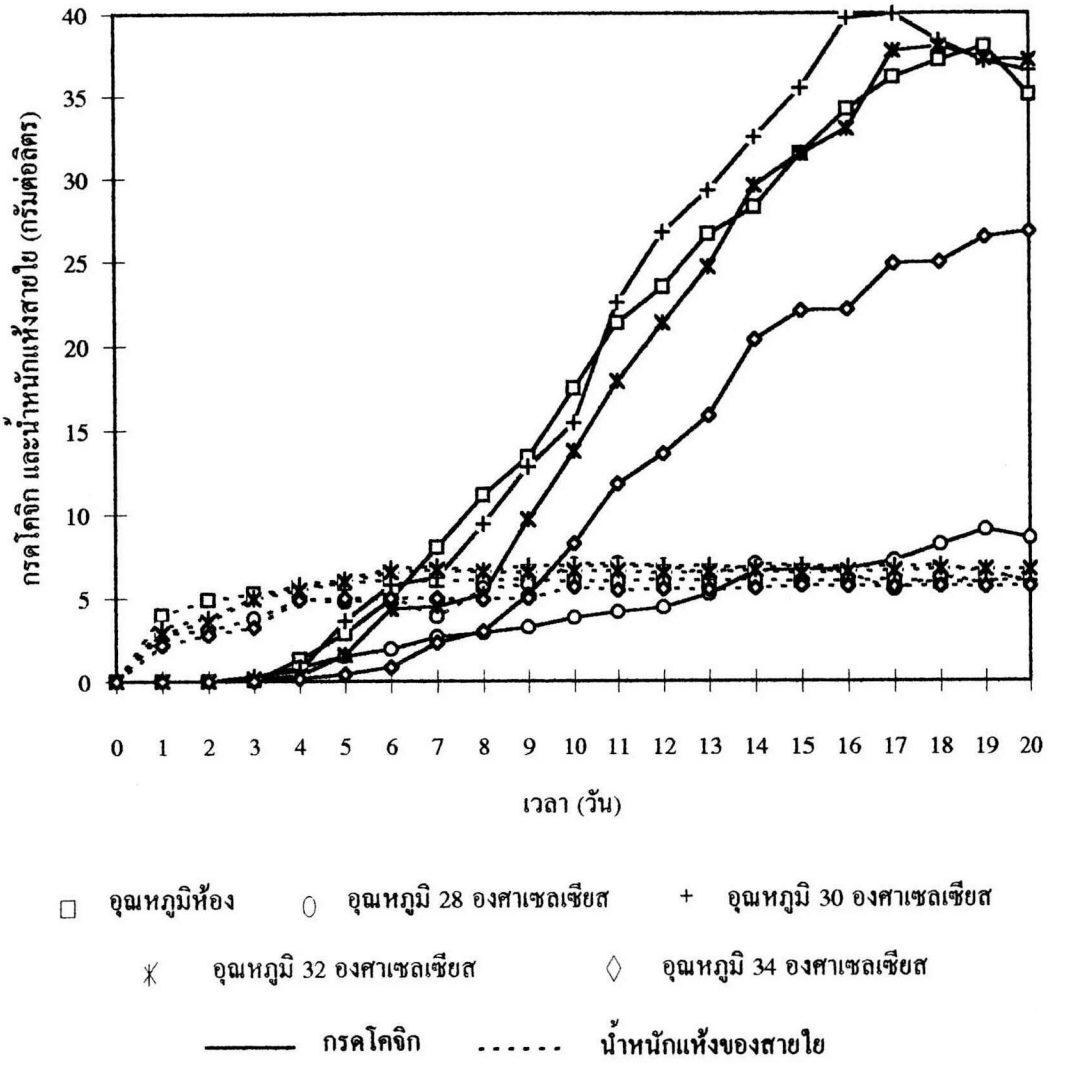
การใช้น้ำตาลของรา *Aspergillus oryzae* K-13 ที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยงต่างๆ กันมีแบบแผนคล้ายคลึงกัน คือน้ำตาลทรายขาวจะถูกสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมดภาย



รูปที่ 49 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมดระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อทำการแปรผันน้ำที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2 ชนิด ได้แก่น้ำประปาและน้ำปลอดประจุ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

ตารางที่ 12 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำประปาและน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เวลาเพาะเลี้ยง (วันที่)	ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิก	
	น้ำประปา	น้ำปลอดประจุ
0	4.5	4.5
1	4.0	4.0
2	4.0	3.5
3	4.0	3.0
4	3.8	2.7
5	3.5	2.4
6	3.5	2.4
7	3.5	2.4
8	3.5	2.4
9	3.5	2.4
10	3.5	2.4
11	3.5	2.4
12	3.5	2.4
13	3.5	2.4
14	3.5	2.4
15	3.5	2.4
16	3.5	2.4
17	3.5	2.4
18	3.5	2.4
19	3.5	2.4
20	3.5	2.4



รูปที่ 50 ปริมาณกรดโคจิกและน้ำหนักแห้งของสายใยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

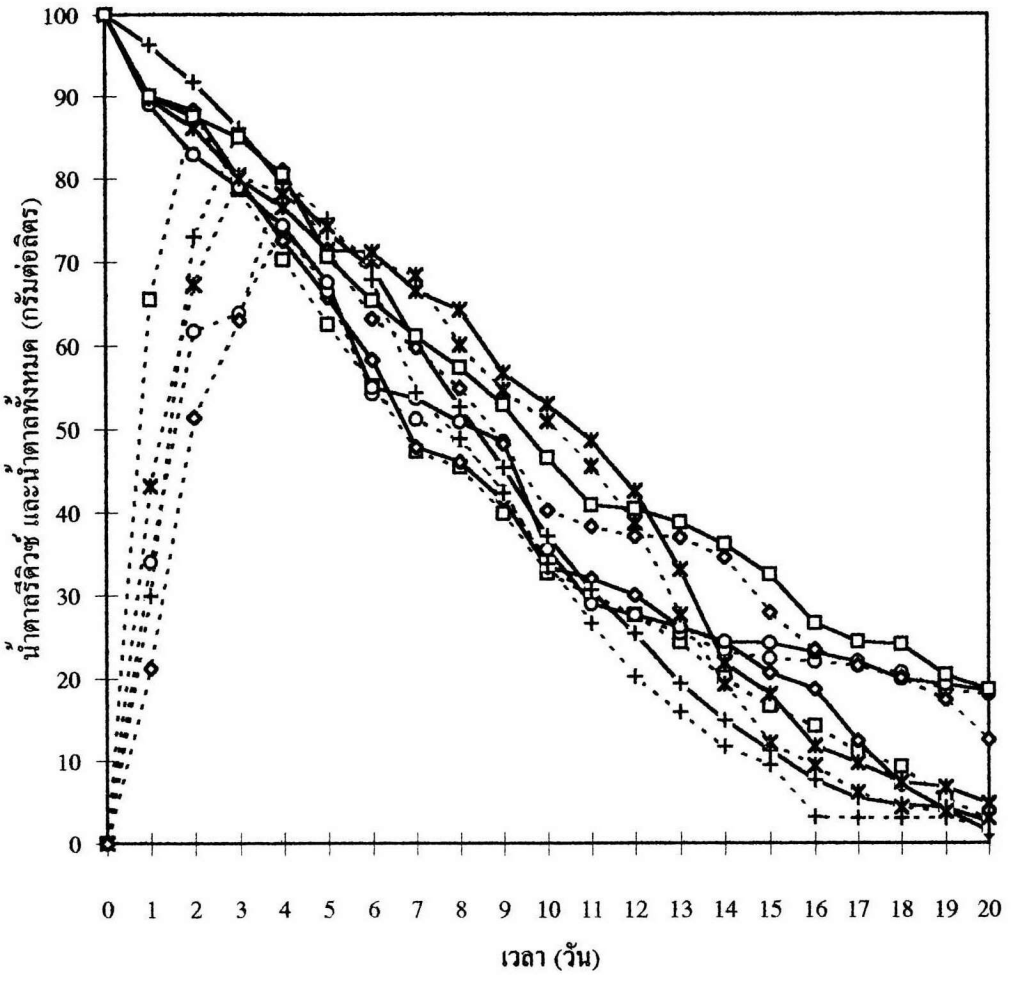
ในวันที่ 2-3 ของการเพาะเลี้ยง และจะใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วในช่วงที่มีการผลิตกรดโคจิกสูง เมื่อวันสิ้นสุดการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเหลือแตกต่างกันโดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 32 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้องจะเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักน้อยมากคือเท่ากับ 2.54 3.02 และ 2.87 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 28 และ 34 องศาเซลเซียสจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือมากกว่าคือปริมาณเท่ากับ 18.05 และ 12.55 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 51 เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยงเท่ากับ 28 องศาเซลเซียสจะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำสุดเท่ากับ 2.5 ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยงเท่ากับ 30 และ 32 องศาเซลเซียสจะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำสุดเท่ากันคือเท่ากับ 2.3 ในวันที่ 4 และ 5 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ ที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยงเท่ากับอุณหภูมิห้องจะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำสุดเท่ากับ 2.3 ในวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยงเท่ากับ 34 องศาเซลเซียสจะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำสุดเท่ากับ 3.0 ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในตารางที่ 13

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆกันดังกล่าวข้างต้น พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกจะอยู่ในช่วง 30-32 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตกรดโคจิก

4.ผลการเตรียมกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการผลิตกรดโคจิก

4.1ผลการหาการเติบโตของรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกในช่วงเวลาต่างๆกัน

เมื่อเพาะเลี้ยงสปอร์ของ *Aspergillus oryzae* K-13 ความหนาแน่น 1-2 x 10^8 สปอร์ในอาหารเลี้ยงเพื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วติดตามการเติบโตของรา *Aspergillus oryzae* K-13 ทุก 3 ชั่วโมง พบว่าสามารถแบ่งการเติบโตของ *Aspergillus oryzae* K-13 ได้เป็น 4 ระยะได้แก่ ระยะที่ไม่มีการเติบโต



รูปที่ 51 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที

ตารางที่ 13 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อแปรผันอุณหภูมิเพาะเลี้ยงต่างๆกัน

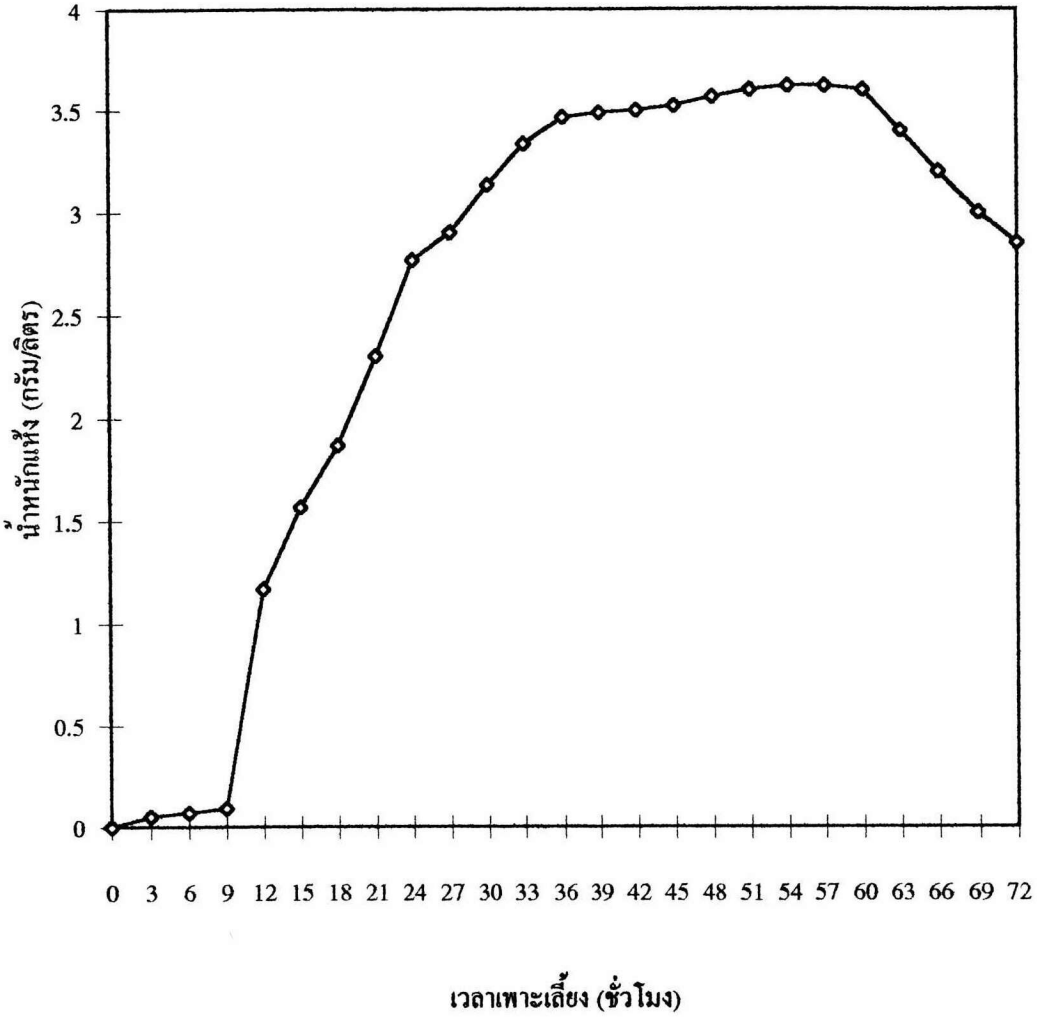
เวลาเพาะเลี้ยง (วันที่)	ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิก				
	อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส	อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส	อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส
0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
1	3.0	3.5	3.0	3.0	3.5
2	2.7	3.5	2.5	3.0	3.0
3	2.5	3.5	2.5	2.5	3.0
4	2.5	3.0	2.3	2.5	3.0
5	2.5	3.0	2.3	2.3	3.0
6	2.3	3.0	2.3	2.3	3.0
7	2.3	3.0	2.3	2.3	3.0
8	2.3	3.0	2.3	2.3	3.0
9	2.3	2.5	2.3	2.3	3.0
10	2.3	2.5	2.3	2.3	3.0
11	2.3	2.5	2.3	2.3	3.0
12	2.3	2.5	2.3	2.3	3.0
13	2.3	2.5	2.3	2.3	3.0
14	2.3	2.5	2.3	2.3	3.0
15	2.3	2.5	2.3	2.3	3.0
16	2.3	2.5	2.3	2.3	3.0
17	2.3	2.5	2.3	2.3	3.0
18	2.3	2.5	2.3	2.3	3.0
19	2.3	2.5	2.3	2.3	3.0
20	2.3	2.5	2.3	2.3	3.0

หรือมีน้อย (lag phase) คือระยะการเติบโตตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยงจนถึงชั่วโมงที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง โดยน้ำหนักแห้งเพิ่มจาก 0.01 กรัมต่อลิตรจนเท่ากับ 0.09 กรัมต่อลิตร ระยะต่อมาคือระยะที่มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว (log phase) คือระยะการเติบโตตั้งแต่หลังชั่วโมงที่ 9 จนถึงชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีการเติบโตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยน้ำหนักแห้งของสายใยราเพิ่มขึ้นจาก 0.09 กรัมต่อลิตรจนเท่ากับ 3.467 กรัมต่อลิตร ระยะที่การเติบโตคงที่ (stationary phase) คือระยะการเติบโตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 จนถึงชั่วโมงที่ 60 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งมีการเติบโตน้อยมาก โดยมีการเติบโตจาก 3.467 กรัมต่อลิตรจนเท่ากับ 3.524 กรัมต่อลิตร ระยะที่มีการสลายตัวของเซลล์ (Death phase) คือระยะการเติบโตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 60 จนสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 52

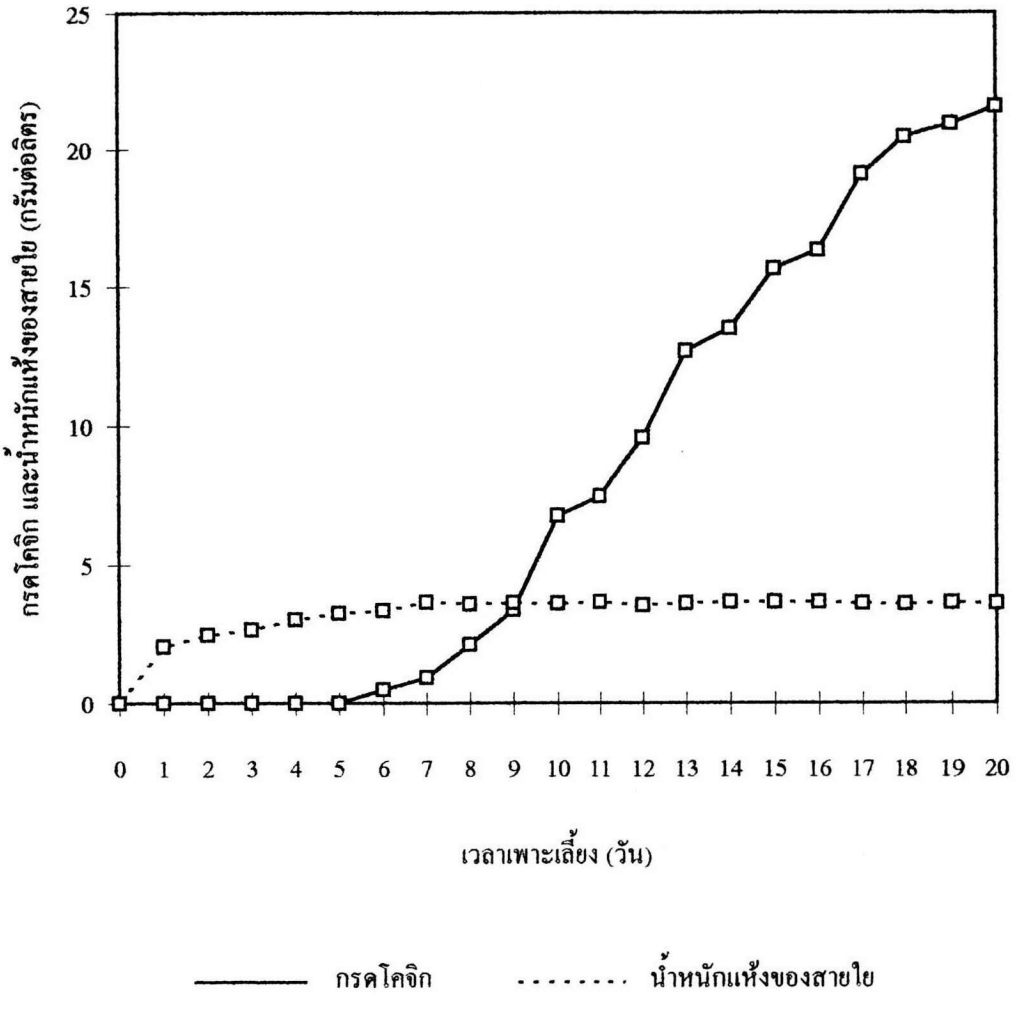
จากรูปที่ 52 จะเห็นได้ว่าหัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 12 ชั่วโมงซึ่งมีการเติบโตอยู่ในระยะต้นของระยะที่มีการเติบโตมากและรวดเร็ว หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมงซึ่งมีการเติบโตอยู่ในระยะกลางของระยะที่มีการเติบโตมากและรวดเร็ว หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 36 ชั่วโมงซึ่งมีการเติบโตอยู่ในระยะปลายของระยะที่มีการเติบโตมากและรวดเร็ว และ หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 48 ชั่วโมงซึ่งมีการเติบโตอยู่ในระยะที่มีการเติบโตคงที่ ดังนั้นจึงเลือกหัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 12 24 36 และ 48 ชั่วโมงเป็นตัวแทนของหัวเชื้อในแต่ละระยะของการเติบโตสำหรับการทดลองหาอายุที่เหมาะสมของหัวเชื้อสปอร์งอกสำหรับการผลิตกรดโคจิกต่อไป

4.2ผลการหาอายุที่เหมาะสมของหัวเชื้อ *Aspergillus oryzae* K-13 ต่อการผลิตกรดโคจิก

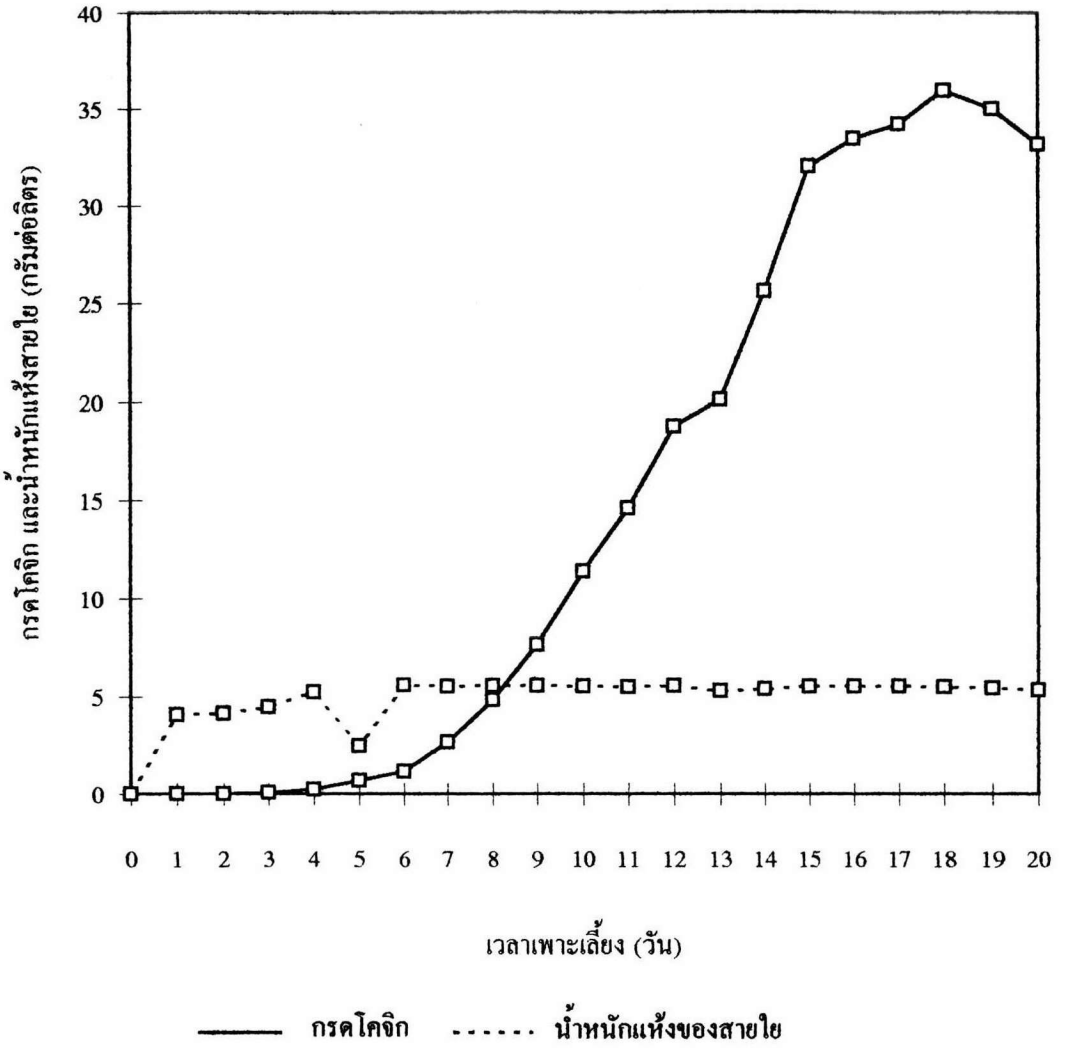
เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 โดยจัดความหนาแน่นของสปอร์หรือสปอร์งอกเท่ากับ 2-4 x 10^8 สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก8) โดยแปรผันอายุหัวเชื้อต่างกัน ได้แก่สปอร์แขวนลอย สปอร์งอกอายุ 12 24 36 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับพบว่าให้ปริมาณกรดโคจิกเท่ากับ 21.56 35.98 38.12 34.85 และ 31.92 กรัมต่อลิตรในวันที่ 20 18 18 18 และ 19 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 53 และ 54 และ 55 และ 56 และ



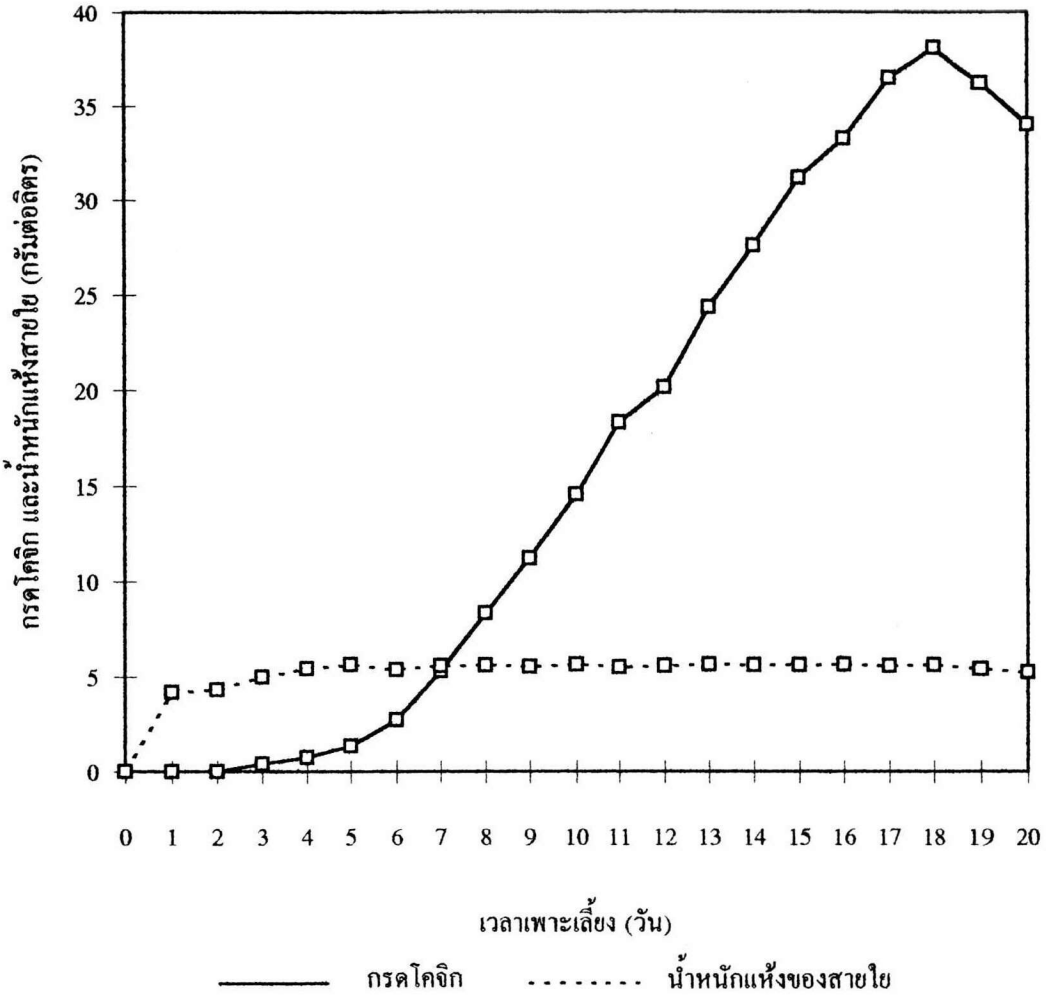
รูปที่ 52 การเติบโตของรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)



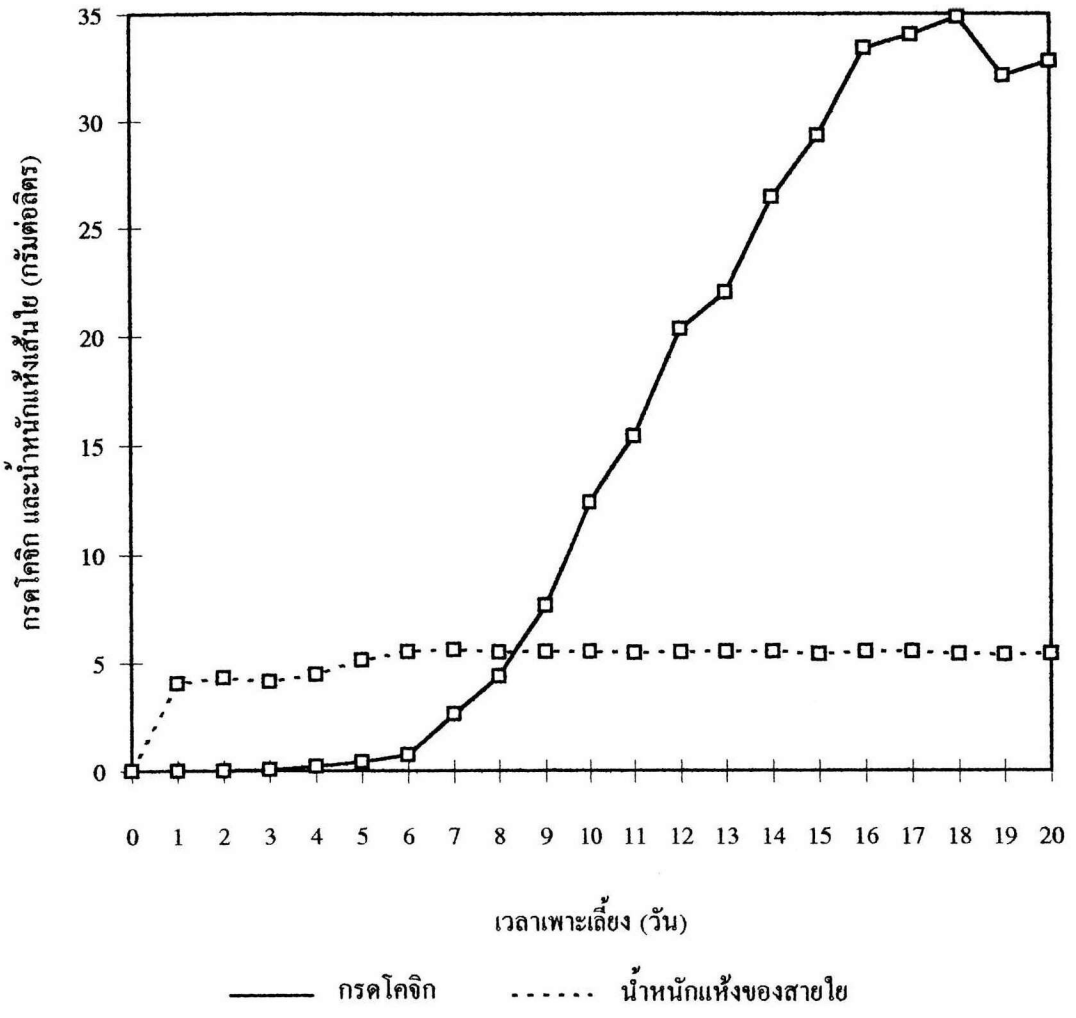
รูปที่ 53 ปริมาณกรดโคจิกและน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยใช้หัวเชื้อสปอร์แขวนลอย เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 54 ปริมาณกรดโคจิกและน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 12 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 55 ปริมาณกรดโคจิกและน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 56 ปริมาณกรดโคจิกและน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 36 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

57 ตามลำดับ เมื่อตรวจการเติบโตของสายใยพบว่าให้การเติบโตแตกต่างกัน โดยเมื่อใช้หัวเชื้อสปอร์แขวนลอยและหัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 12 24 36 และ 48 ชั่วโมงจะให้การเติบโตของสายใยสูงสุดเท่ากับ 3.65 5.58 5.64 5.61 และ 5.61 กรัมต่อลิตรตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 53 - 57 ตามลำดับ

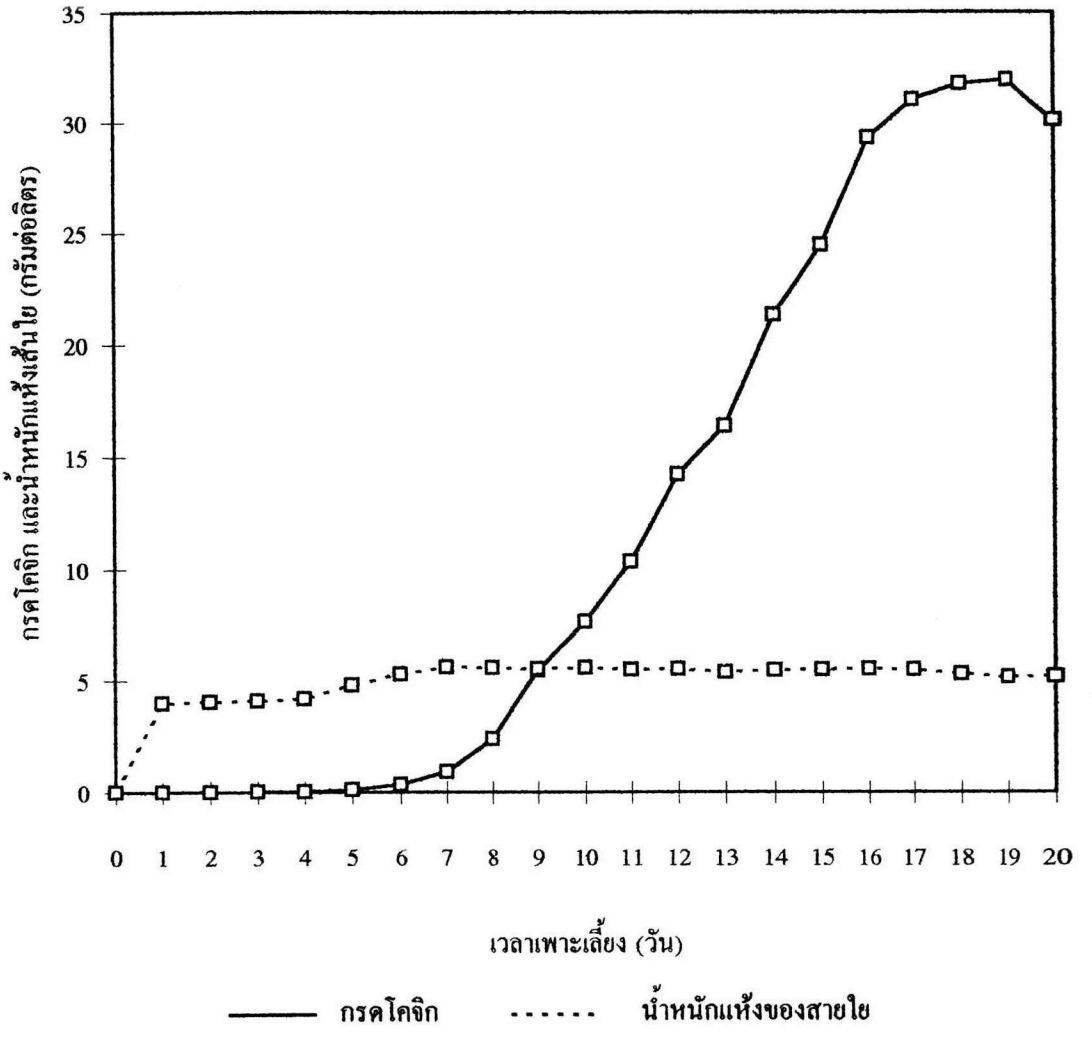
เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลพบว่าทั้งหัวเชื้อสปอร์แขวนลอยจะสลายน้ำตาลทรายขาวให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงแต่หัวเชื้อสปอร์งอกจะสลายน้ำตาลทรายขาวเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมดภายในวันที่ 2-3 ของการเพาะเลี้ยงดังแสดงในรูปที่ 58 และ 59 และหัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมงจะใช้น้ำตาลได้เร็วที่สุด โดยในวันสิ้นสุดการทดลองจะเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.20 กรัมต่อลิตรและหัวเชื้อสปอร์แขวนลอยจะใช้น้ำตาลได้ช้าที่สุดและเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดในวันสิ้นสุดการทดลองคือเหลือเท่ากับ 15.32 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 58

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิกด้วยหัวเชื้อสปอร์แขวนลอยและสปอร์งอกอายุ 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงต่ำสุดเท่ากับ 3.5 2.2 2.2 2.2 และ 2.2 ในวันที่ 7 5 5 8 และ 10 ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 14

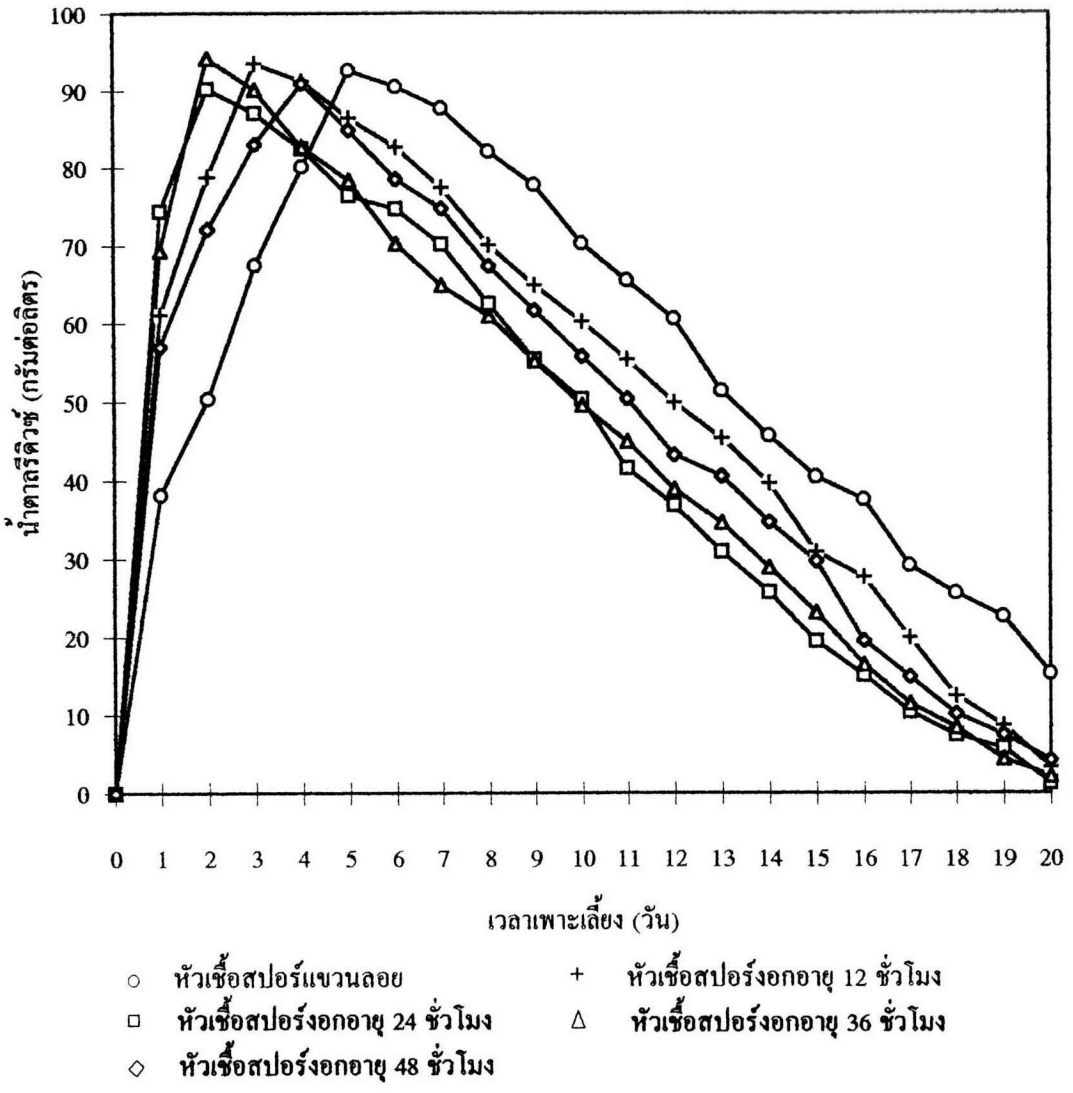
เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกจากการผลิตโดยใช้หัวเชื้อต่างๆกัน พบว่าหัวเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงเป็นหัวเชื้อที่ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด จึงเป็นอายุที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอกที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโคจิกสูง

4.3ผลการหาความหนาแน่นที่เหมาะสมของหัวเชื้อสปอร์งอก

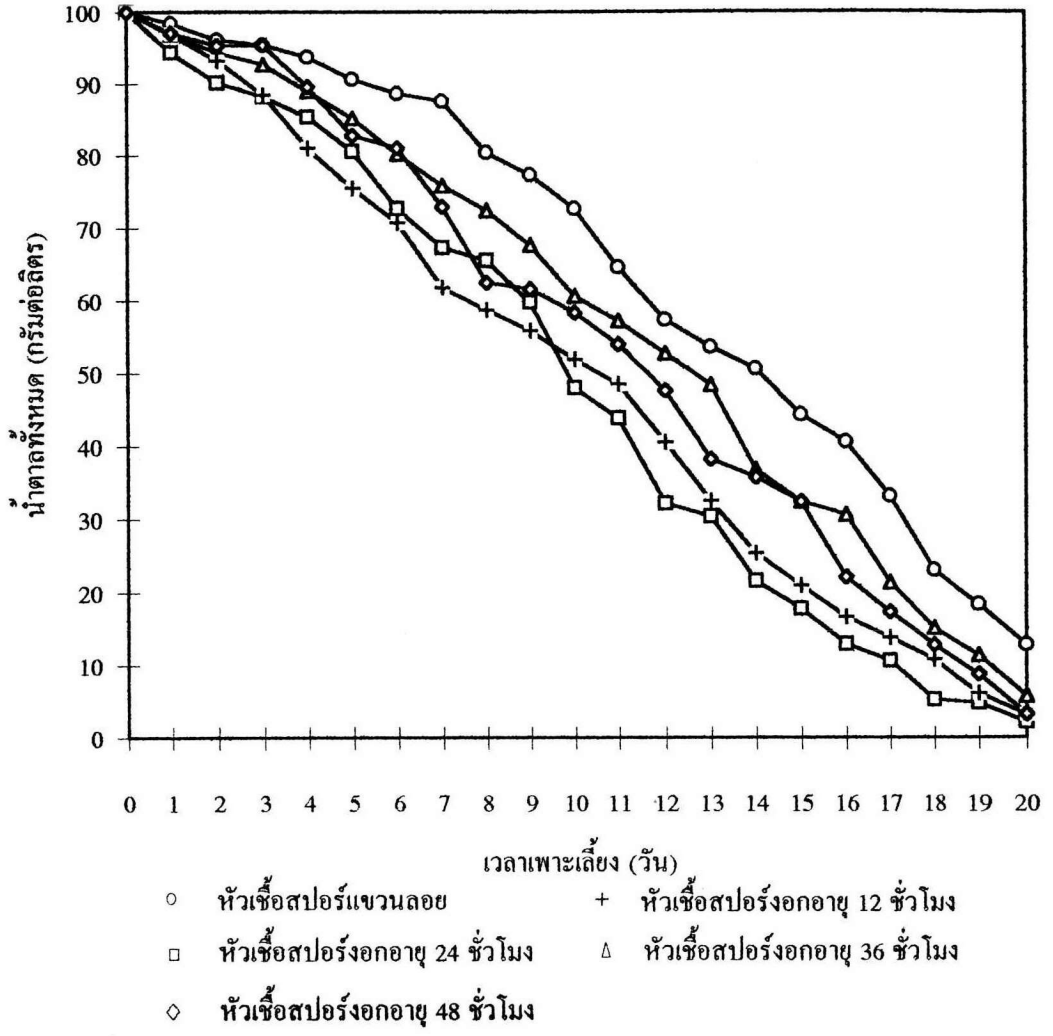
เมื่อผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก8) โดยแปรผันความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกของ *Aspergillus oryzae* K-13 ต่างๆกันเท่ากับ 4-8 x 10^5 4-8 x 10^6 4-8 x 10^7 และ 4-8 x 10^8 สปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิกปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดขนาด 500 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 120 มิลลิลิตร พบว่าที่ความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกเท่ากับ 4-8 x 10^7 สปอร์งอกจะให้ผลผลิตกรด



รูปที่ 57 ปริมาณกรดโคจิกและน้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 48 ชั่วโมง เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 58 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อแปรผันอายุหัวเชื้อต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 59 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อแปรผันอายุของหัวเชื้อต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 14 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อแปรผันอายุหัวเชื้อต่างๆกัน

เวลาเพาะเลี้ยง (วันที่)	ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดโคจิก				
	สปอร์แขวนลอย	สปอร์งอกอายุ 12 ชั่วโมง	สปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมง	สปอร์งอกอายุ 36 ชั่วโมง	สปอร์งอกอายุ 48 ชั่วโมง
0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5
1	4.5	4.0	4.0	4.0	4.5
2	4.5	4.0	3.5	4.0	4.0
3	4.0	3.5	3.0	3.5	4.0
4	4.0	2.5	2.5	3.5	3.5
5	4.0	2.2	2.2	3.0	3.0
6	4.0	2.2	2.2	2.5	3.0
7	3.5	2.2	2.2	2.5	2.5
8	3.5	2.2	2.2	2.2	2.5
9	3.5	2.2	2.2	2.2	2.5
10	3.5	2.2	2.2	2.2	2.2
11	3.5	2.2	2.2	2.2	2.2
12	3.5	2.2	2.2	2.2	2.2
13	3.5	2.2	2.2	2.2	2.2
14	3.5	2.2	2.2	2.2	2.2
15	3.5	2.2	2.2	2.2	2.2
16	3.5	2.2	2.2	2.2	2.2
17	3.5	2.2	2.2	2.2	2.2
18	3.5	2.2	2.2	2.2	2.2
19	3.5	2.2	2.2	2.2	2.2
20	3.5	2.2	2.2	2.2	2.2

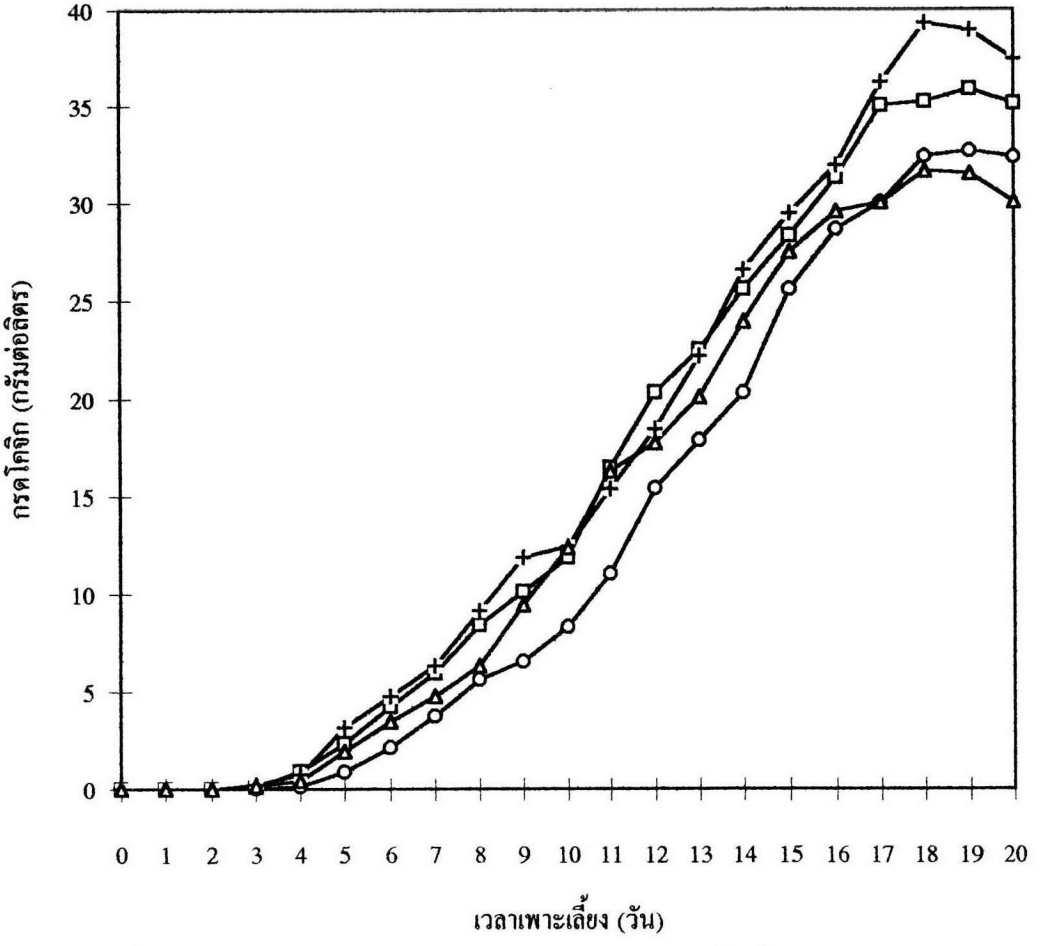
โคจิกสูงสุดเท่ากับ 39.31 กรัมต่อลิตรในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการใช้หัวเชื้อสปอร์งอกที่มีความหนาแน่นเท่ากับ 4-8 x 10^5 4-8 x 10^6 และ 4-8 x 10^8 สปอร์งอกจะให้ปริมาณกรดโคจิกเท่ากับ 32.68 35.89 และ 31.64 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 19 และ 18 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 60 เมื่อตรวจวัดการเติบโตของสายใยพบว่าการใช้หัวเชื้อที่มีความหนาแน่นเท่ากับ 4-8 x 10^5 4-8 x 10^6 4-8 x 10^7 และ 4-8 x 10^8 สปอร์งอกจะให้น้ำหนักแห้งของสายใยสูงสุดเท่ากับ 6.34 6.56 6.96 และ 7.21 กรัมต่อลิตรตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 61

สำหรับการใช้น้ำตาลในการผลิตกรดโคจิกโดยใช้หัวเชื้อความหนาแน่นต่างๆกันจะเป็นแบบแผนเดียวกัน คือน้ำตาลทรายขาวจะถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมดภายในวันที่ 2-3 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 62 และ 63 และจะมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์อย่างรวดเร็วในขณะที่มีการผลิตกรดโคจิกสูง โดยพบว่าที่ความหนาแน่นของสปอร์งอกเท่ากับ 4-8 x 10^5 4-8 x 10^6 4-8 x 10^7 และ 4-8 x 10^8 สปอร์งอก จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือเท่ากับ 3.05 1.01 0.14 และ 4.32 กรัมต่อลิตรในวันสิ้นสุดการทดลองดังแสดงในรูปที่ 62

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าที่ความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกเท่ากับ 4-8 x 10^5 4-8 x 10^6 4-8 x 10^7 และ 4-8 x 10^8 สปอร์งอก จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดเท่ากับ 2.3 2.3 2.2 และ 2.3 ตั้งแต่วันที่ 8 8 8 และ 6 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 15

4.4ผลการใช้น้ำประปาเตรียมหัวเชื้อแทนน้ำปลอดประจุ

เมื่อเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก8) โดยใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกที่แปรผันน้ำที่ใช้เตรียมเป็น 2 ชนิดได้แก่น้ำปลอดประจุและน้ำประปา พบว่าหัวเชื้อสปอร์งอกที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสปอร์งอกที่ใช้น้ำปลอดประจุและน้ำประปาในการเตรียมให้ผลผลิตกรดโคจิกใกล้เคียงกันมากโดยให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 40.03 และ



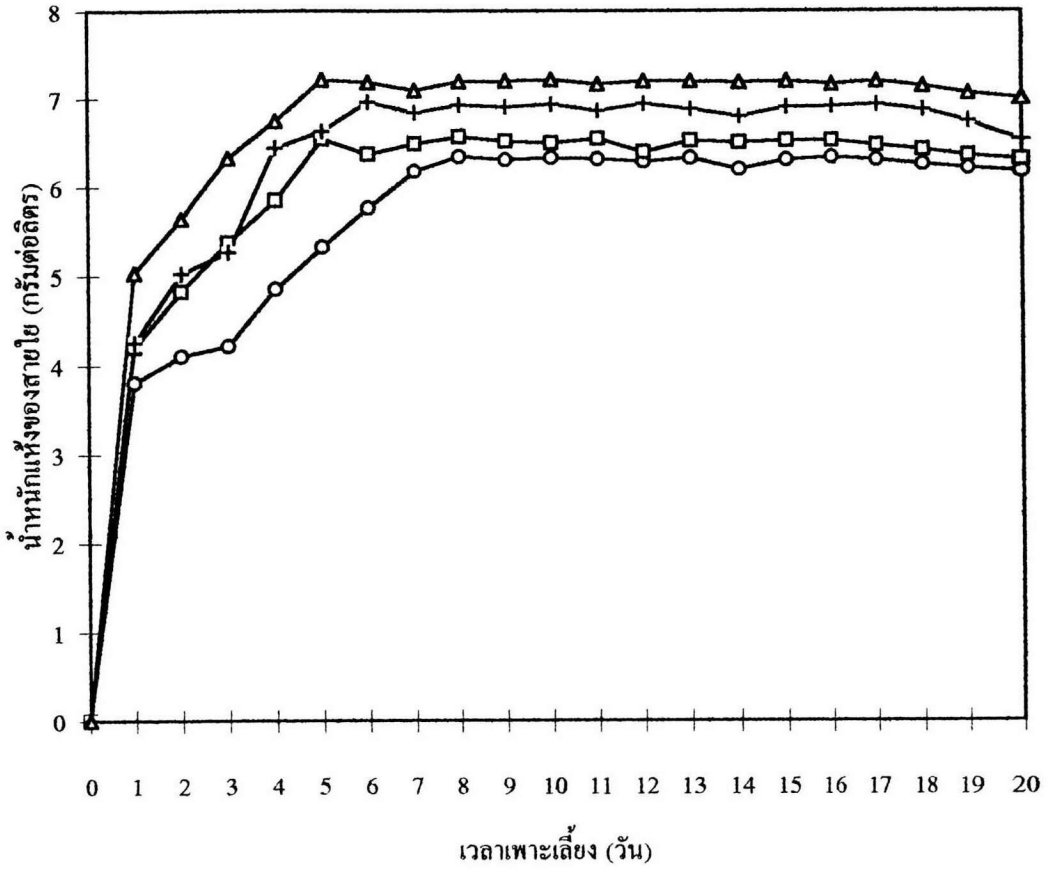
○ หัวเชื้อสปอร์งอกความหนาแน่น 4-8 x 10^5 สปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร

□ หัวเชื้อสปอร์งอกความหนาแน่น 4-8 x 10^6 สปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร

\+ หัวเชื้อสปอร์งอกความหนาแน่น 4-8 x 10^7 สปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร

△ หัวเชื้อสปอร์งอกความหนาแน่น 4-8 x 10^8 สปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมารต 100 มิลลิลิตร

รูปที่ 60 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตได้โดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยแปรผันความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



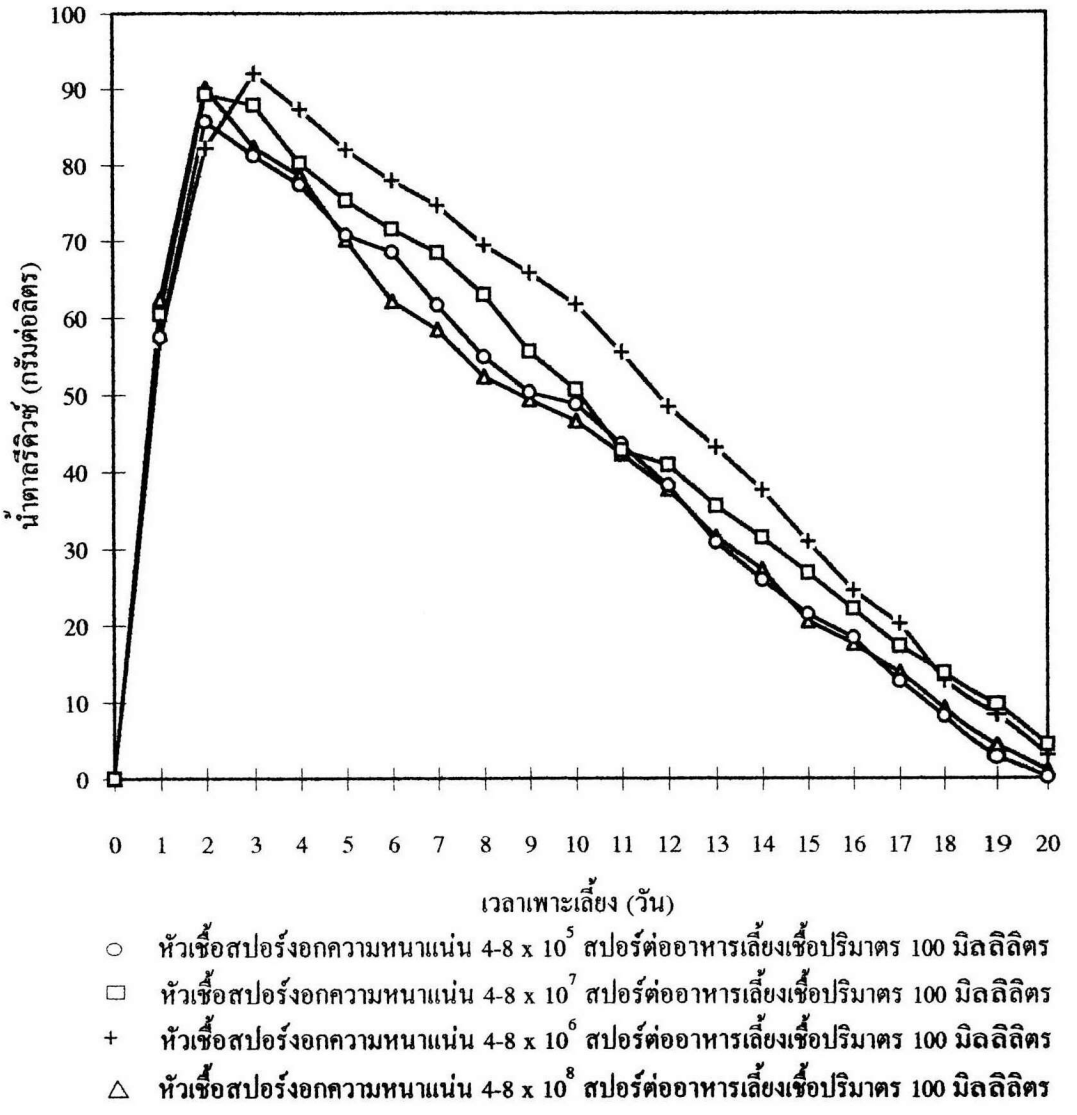
○ หัวเชื้อสปอร์งอกความหนาแน่น 4-8 x 10^5 สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร

□ หัวเชื้อสปอร์งอกความหนาแน่น 4-8 x 10^6 สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร

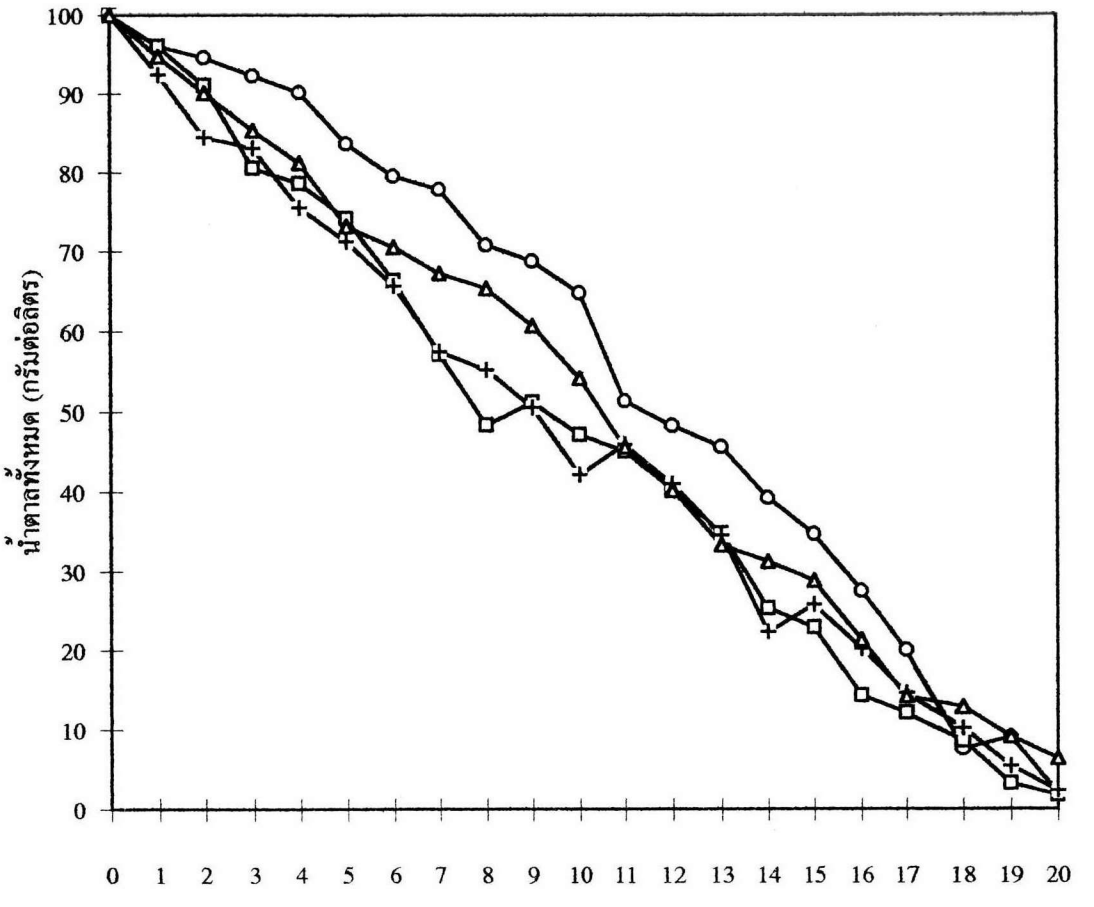
\+ หัวเชื้อสปอร์งอกความหนาแน่น 4-8 x 10^7 สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร

△ หัวเชื้อสปอร์งอกความหนาแน่น 4-8 x 10^8 สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร

รูปที่ 61 น้ำหนักแห้งของสายใย เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยแปรผันความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 62 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยแปรผันปริมาณความหนาแน่นหัวเชื้อสปอร์งอกต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 63 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยแปรผันความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกต่างๆกัน เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 15 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อแปรผันความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกต่างๆกัน

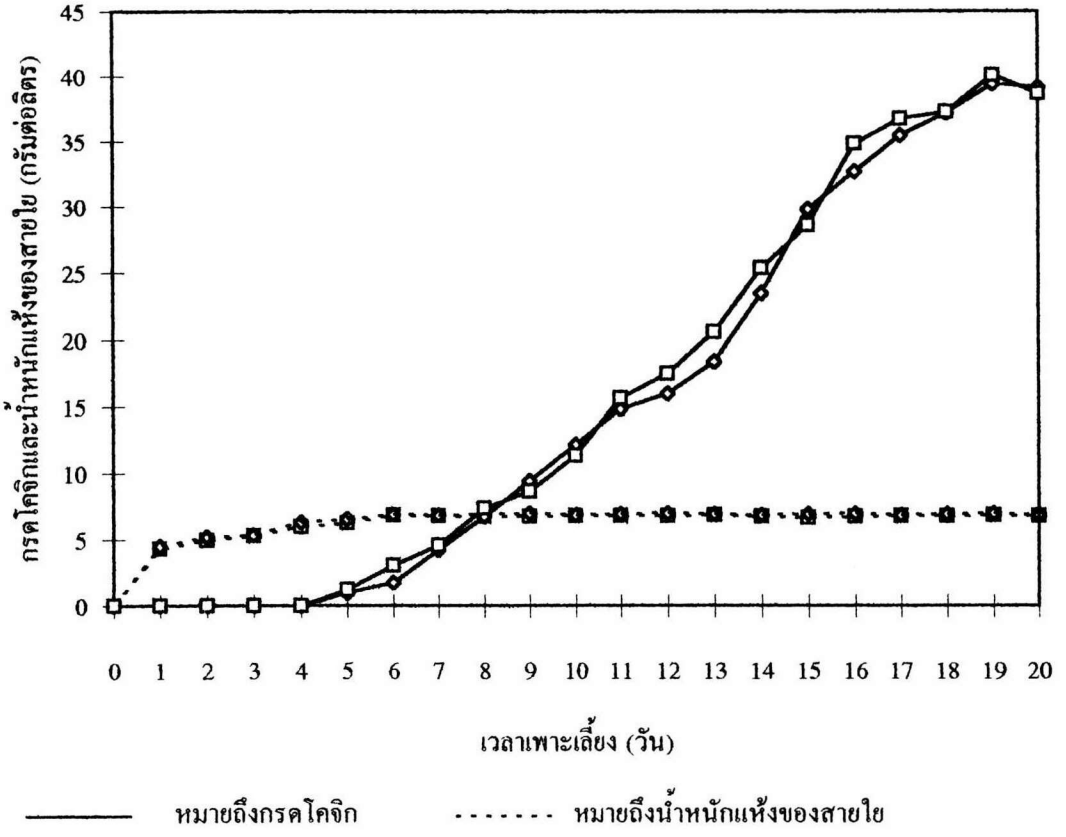
เวลาเพาะเลี้ยง (วันที่)	ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิก (สปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิกปริมาตร 100 มิลลิลิตร)			
	4-8 x 10^5	4-8 x 10^6	4-8 x 10^7	4-8 x 10^8
0	4.5	4.5	4.5	4.5
1	4.0	4.0	4.0	4.0
2	4.0	3.5	4.0	3.5
3	4.0	3.0	3.5	3.0
4	3.5	2.5	3.0	2.5
5	3.0	2.5	2.5	2.5
6	2.5	2.5	2.5	2.3
7	2.5	2.5	2.3	2.3
8	2.3	2.3	2.2	2.3
9	2.3	2.3	2.2	2.3
10	2.3	2.3	2.2	2.3
11	2.3	2.3	2.2	2.3
12	2.3	2.3	2.2	2.3
13	2.3	2.3	2.2	2.3
14	2.3	2.3	2.2	2.3
15	2.3	2.3	2.2	2.3
16	2.3	2.3	2.2	2.3
17	2.3	2.3	2.2	2.3
18	2.3	2.3	2.2	2.3
19	2.3	2.3	2.2	2.3
20	2.3	2.3	2.2	2.3

39.39 กรัมต่อลิตรตามลำดับในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง และให้น้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 6.97 และ 6.83 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 64 เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลพบว่าหัวเชื้อสปอร์งอกที่เตรียมได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกที่ใช้น้ำปลอดประจุและน้ำประปาในการเตรียมมีแบบแผนการใช้น้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกเหมือนกันคือน้ำตาลทรายขาวจะถูกสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมดภายในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง และจะเหลือน้ำตาลรีดิวซ์ในวันสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ 2.63 และ 2.03 กรัมต่อลิตรสำหรับหัวเชื้อที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกที่ใช้น้ำปลอดประจุและน้ำประปาในการเตรียมตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 69 เมื่อพิจารณาถึงค่าความเป็นกรด-ด่างพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้หัวเชื้อสปอร์งอกที่เตรียมจากน้ำประปาและน้ำปลอดประจุจะลดลงต่ำสุดเท่ากันคือเท่ากับ 2.4 ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงดังแสดงในรูปที่ 66

จากผลการทดลองแสดงให้ทราบว่าสามารถใช้น้ำประปาทดแทนน้ำปลอดประจุในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอกได้

5.ผลการผลิตกรดโคจิกภายใต้ภาวะที่เหมาะสม

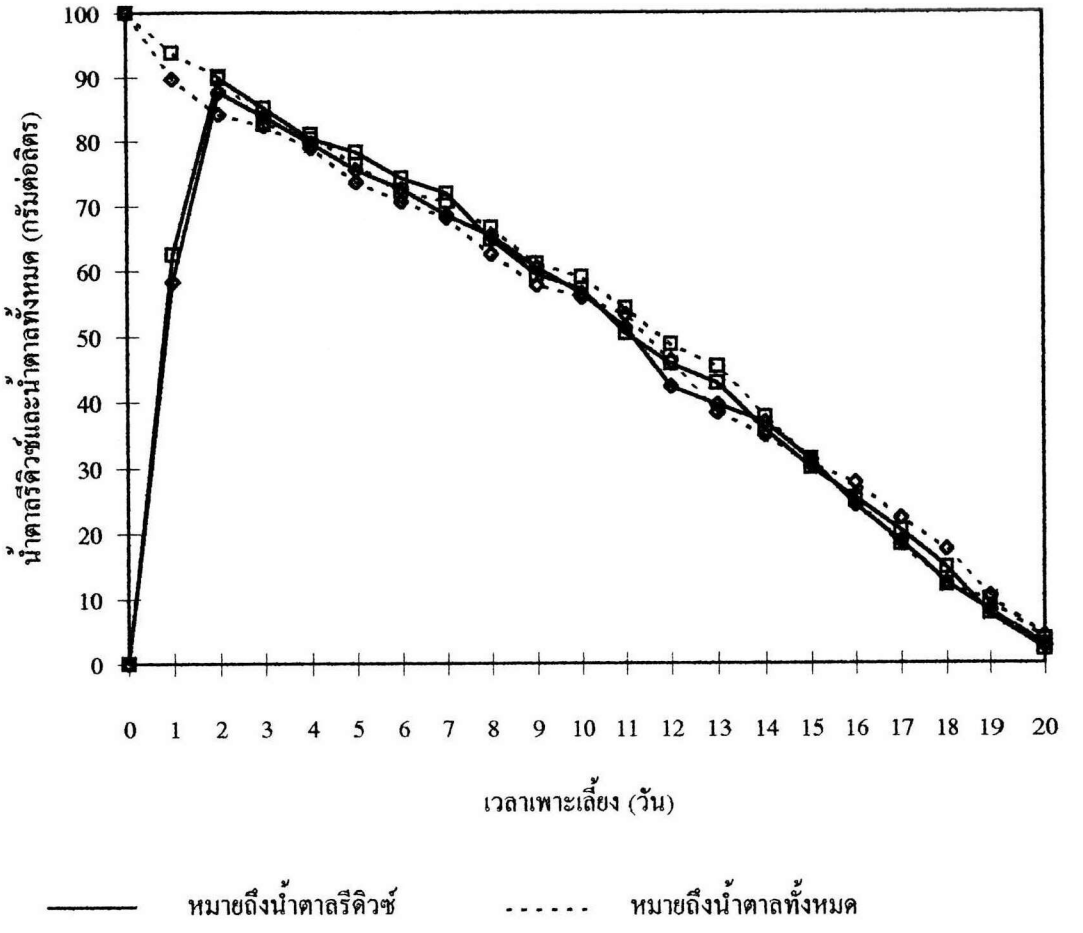
เมื่อทำการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลอง คือใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมง จัดให้มีความหนาแน่นเท่ากับ 4-8 x 10^7 สปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก8) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งได้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 4.5 โดยบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 120 มิลลิลิตรในขวดขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าจะได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 40.03 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง และให้น้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 6.83 กรัมต่อลิตร และเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในวันสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ 2.03 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำสุดเท่ากับ 2.4 ตั้งแต่วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไปจนสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 67



□ หมายถึงหัวเชื้อสปอร์งอกที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกที่เตรียมโดยน้ำปลอดประจุ

◇ หมายถึงหัวเชื้อสปอร์งอกที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกที่เตรียมโดยน้ำประปา

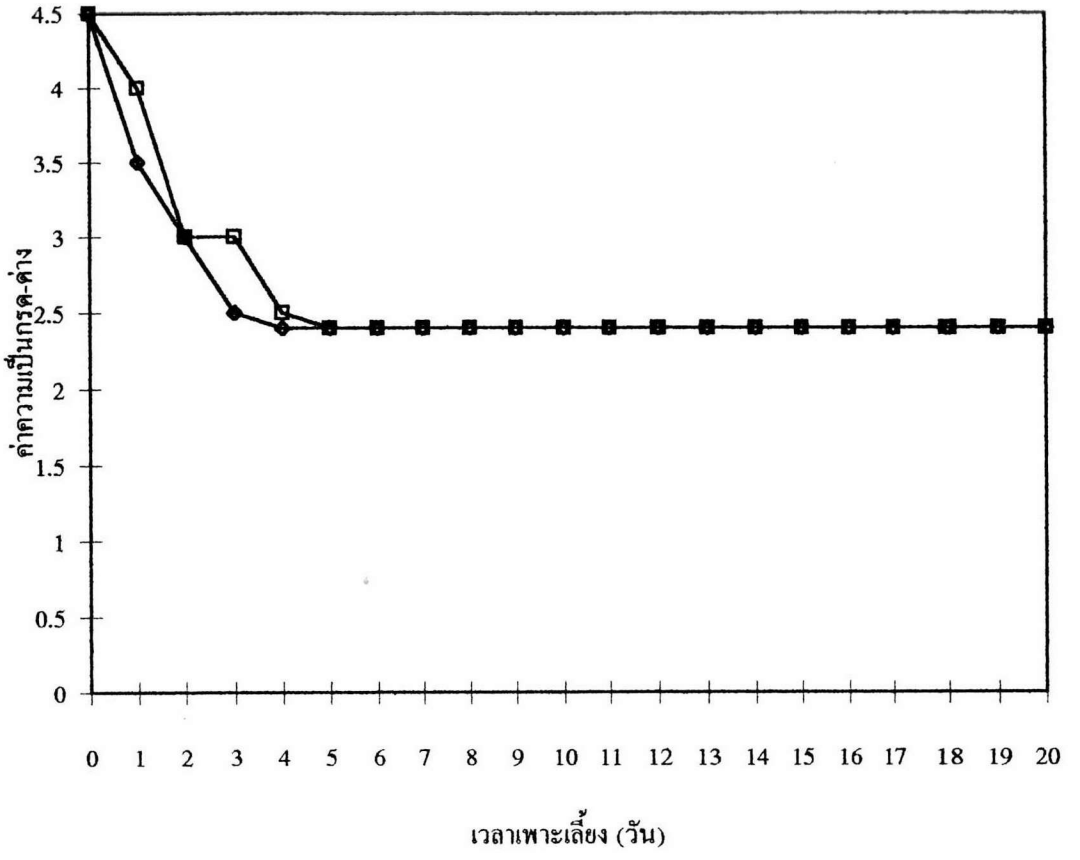
รูปที่ 64 กรดโคจิกและน้ำหนักแห้งของสายใยเมื่อเพาะหัวเชื้อสปอร์งอก *Aspergillus oryzae* K-13จากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกที่เตรียมโดยใช้น้ำปลอดประจุ และน้ำประปา เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



□ หมายถึงหัวเชื้อสปอร์งอกที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกที่เตรียมโดยน้ำปลอดประจุ

◇ หมายถึงหัวเชื้อสปอร์งอกที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกที่เตรียมโดยน้ำประปา

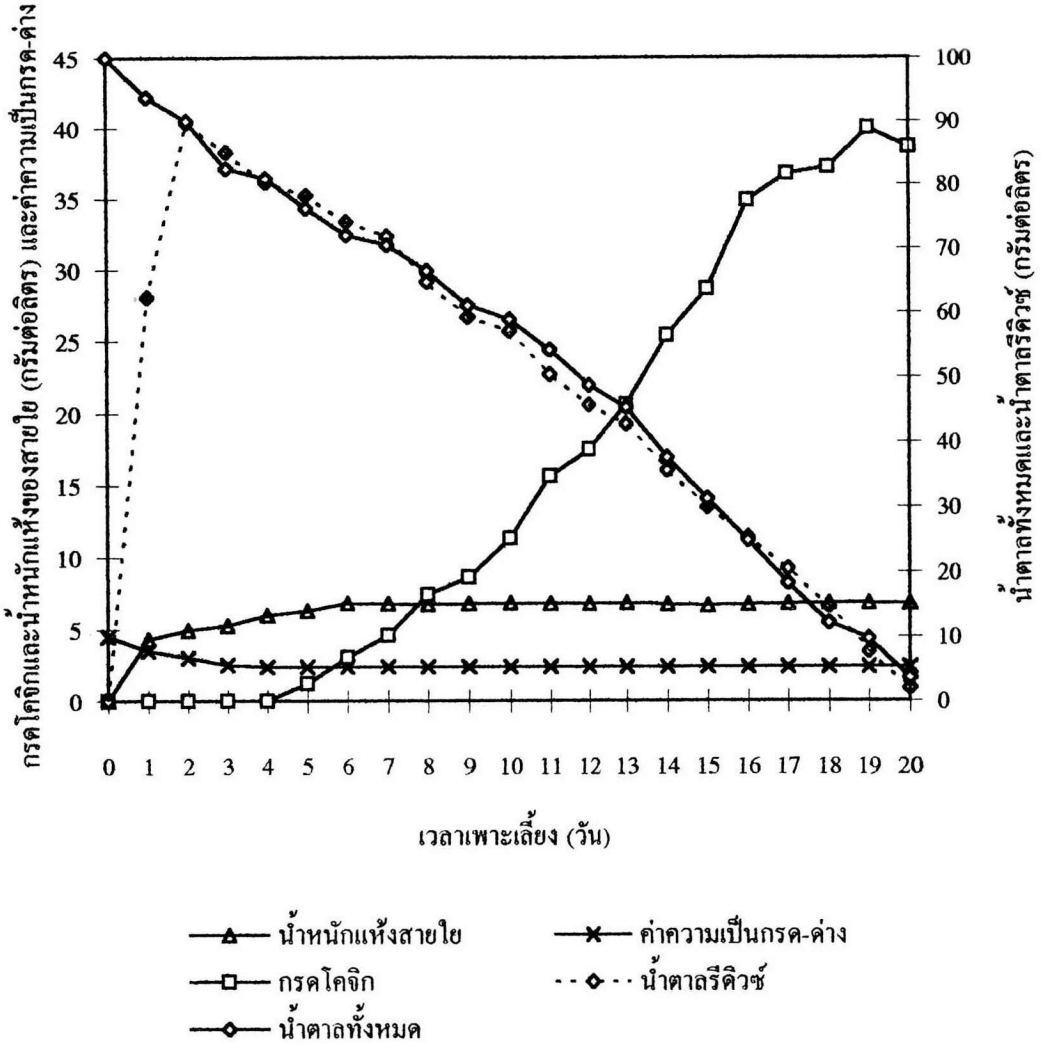
รูปที่ 65 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยใช้หัวเชื้อสปอร์งอก *Aspergillus oryzae* K-13 ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกที่เตรียมโดยน้ำปลอดประจุและน้ำประปา เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



□ หมายถึงหัวเชื้อสปอร์งอกที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกที่เตรียมโดยน้ำปลอดประจุ

◇ หมายถึงหัวเชื้อสปอร์งอกที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกที่เตรียมโดยน้ำประปา

รูปที่ 66 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิตกรดโคจิก โดยใช้หัวเชื้อสปอร์งอกของ *Aspergillus oryzae* K-13 ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกที่เตรียมโดยน้ำปลอดประจุและน้ำประปา เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 67 ปริมาณกรดโคจิก น้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักแห้งของสายใย และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม

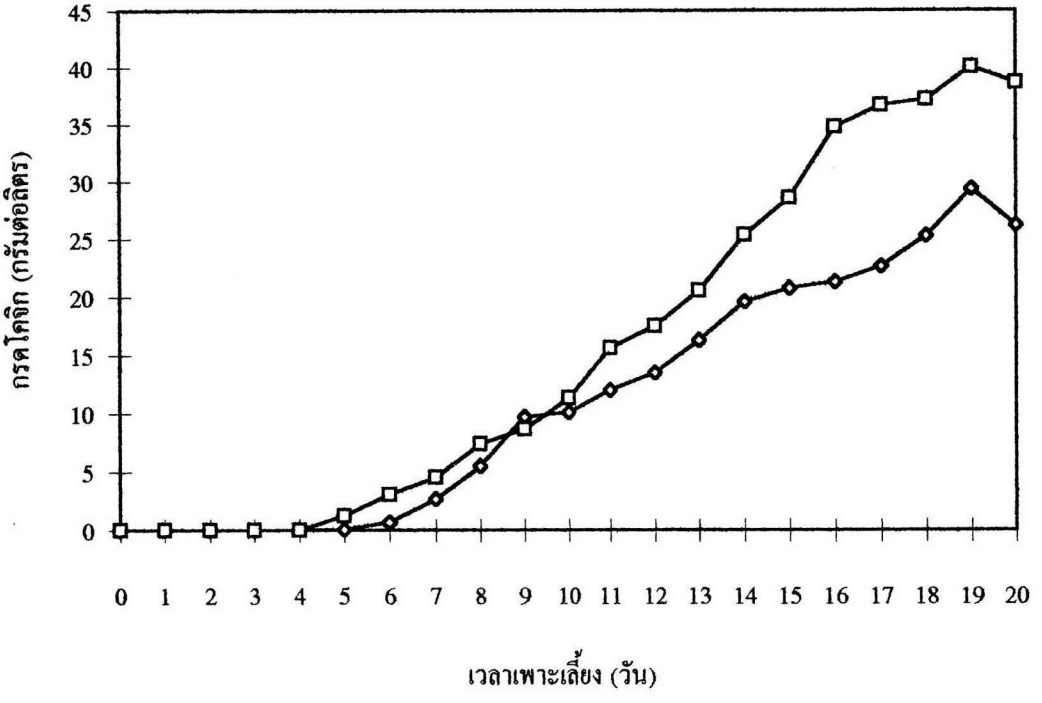
จากผลการวิจัยหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงราภายใต้ภาวะที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกได้ โดยเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตในขณะที่ยังไม่มีการปรับภาวะที่เหมาะสม คือผลผลิตกรดโคจิกที่ได้จากการเพาะเลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สองซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดในขณะนั้นเทียบกับปัจจุบันหลังทำการปรับจนได้ภาวะที่เหมาะสมแล้วคือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก8) และใช้ภาวะการเพาะเลี้ยงต่างๆตามการทดลองข้างต้นพบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกจาก 29.39 กรัมต่อลิตรเป็น 40.03 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 68

6.ผลวิเคราะห์กรดโคจิกที่สร้างขึ้นโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ด้วยวิธี HPLC

เมื่อทำการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่ผลิตในขวดเขย่าโดย *Aspergillus oryzae* K-13 เพื่อยืนยันว่าเป็นกรดโคจิก โดยใช้ตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 เป็นเวลา 20 วัน จากการทดลองในข้อ 15.3 (การทดลองผลิตกรดโคจิก โดยใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมง) ผลการทดลองดังรูปที่ 69 พบว่ากรดอินทรีย์ที่สร้างโดย *Aspergillus oryzae* K-13 มีช่วงเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ Zobox-C8 เช่น เดียวกับกรดโคจิกมาตรฐาน

7.ผลวิเคราะห์จุดหลอมเหลวกรดโคจิกที่สร้างขึ้นโดย *Aspergillus oryzae* K-13

เมื่อทำการวิเคราะห์จุดหลอมเหลวของกรดอินทรีย์ที่ผลิตในขวดเขย่าโดย *Aspergillus oryzae* K-13 เพื่อยืนยันว่าเป็นกรดโคจิก โดยใช้ตัวอย่างผลึกกรดที่ผ่านกระบวนการตกตะกอนทั้งสิ้น 13 ครั้งและผ่านกระบวนการฟอกสีด้วยผงถ่าน 3 รอบ หลังจากใช้เครื่อง Differential Scannaig Colorimetry (DSC) ทำการวิเคราะห์หาจุดหลอมเหลวของกรดโคจิกมาตรฐานและกรดอินทรีย์ที่ผลิตได้โดย *Aspergillus oryzae* K-13 พบว่าได้ค่าจุดหลอมเหลวเท่ากับ 157.1 และ 156.2 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 70



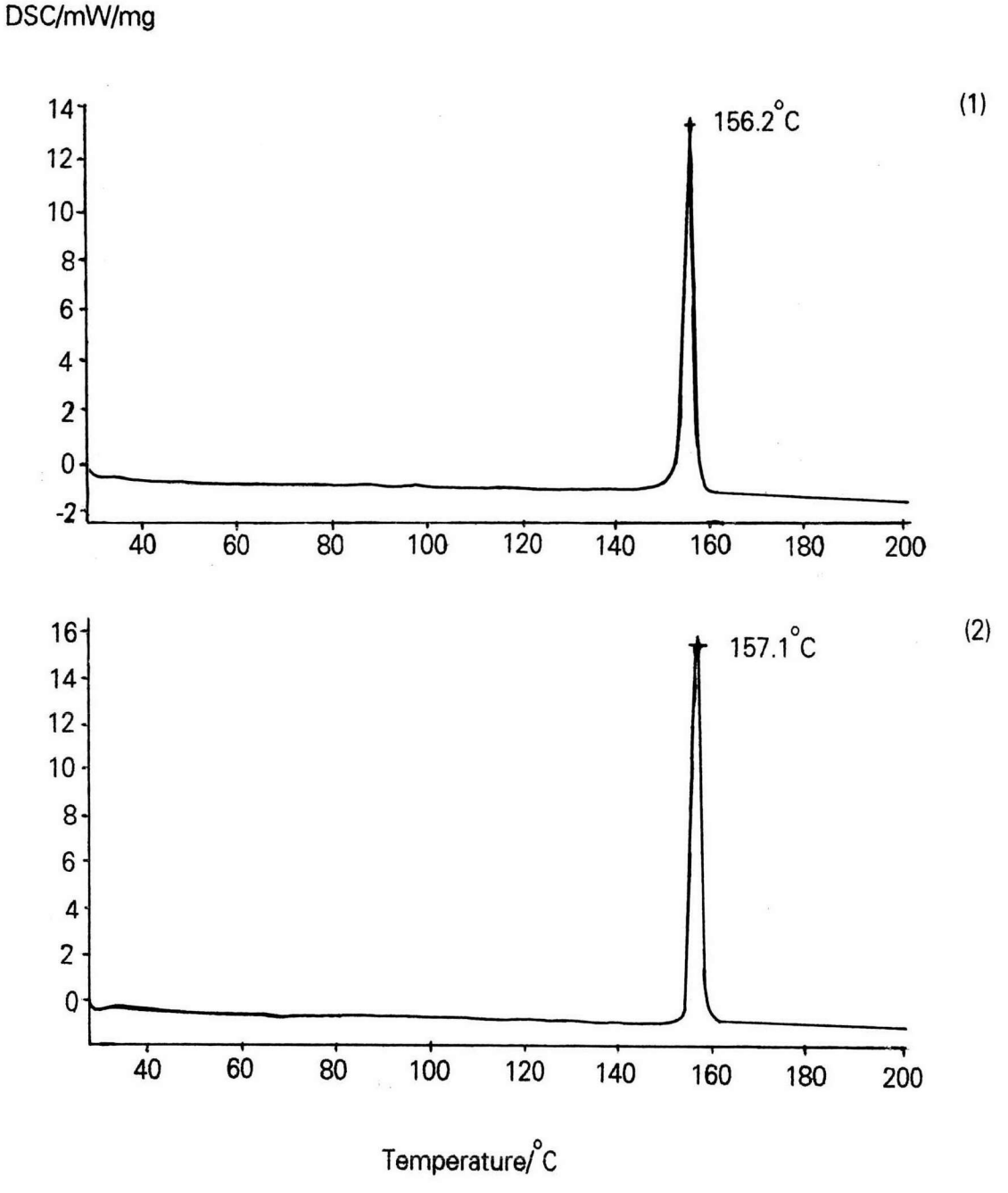
◇ ปริมาณกรดโคจิกเมื่อผลิตก่อนการปรับภาวะให้เหมาะสม *

□ ปริมาณกรดโคจิกเมื่อผลิตภายใต้ภาวะที่เหมาะสม **

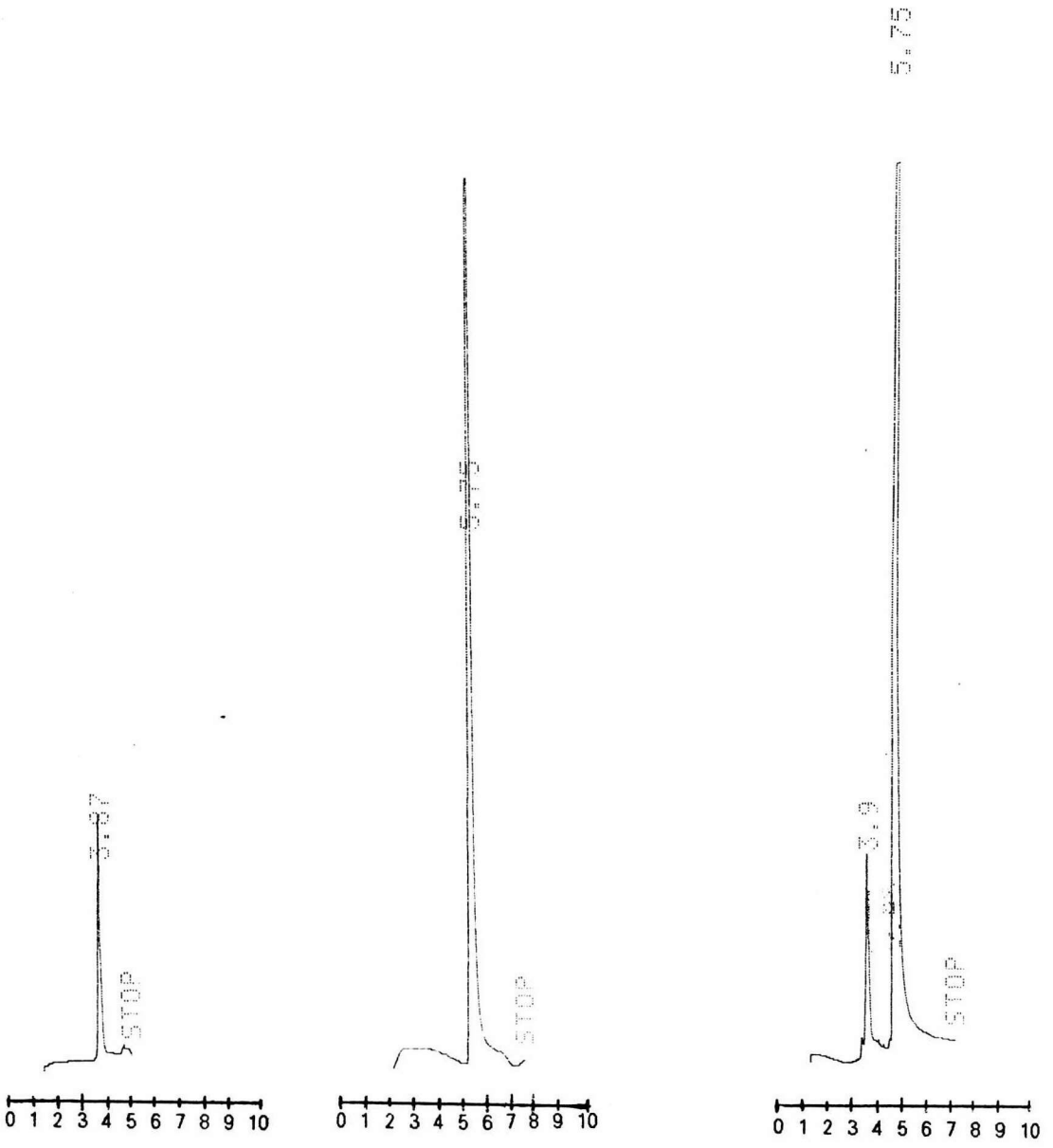
* การเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สองที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 3 องศาเซลเซียส)

** การเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก8) ภายใต้ภาวะเหมาะสมที่ได้จากการทดลอง

รูปที่ 68 ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ก่อนการปรับภาวะให้เหมาะสมและภายใต้ภาวะที่เหมาะสม



รูปที่ 70 เทอร์โมแกรมของกรดโคจิกที่สร้างโดย *Aspergillus oryzae* K-13 (1) และของกรดโคจิกมาตรฐาน (2)



รูปที่ 69 โครมาโตแกรมของกรดอินทรีย์ที่สร้างโดย *Aspergillus oryzae* K-13 เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC โดยใช้คอลัมน์ Zorbox-C8

1 กรดกลูโคนิกมาตรฐาน (ใช้เป็น internal standard)

2 กรดโคจิกมาตรฐาน

3 กรดอินทรีย์ที่สร้างโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ผสมกับกรดกลูโคนิกมาตรฐาน