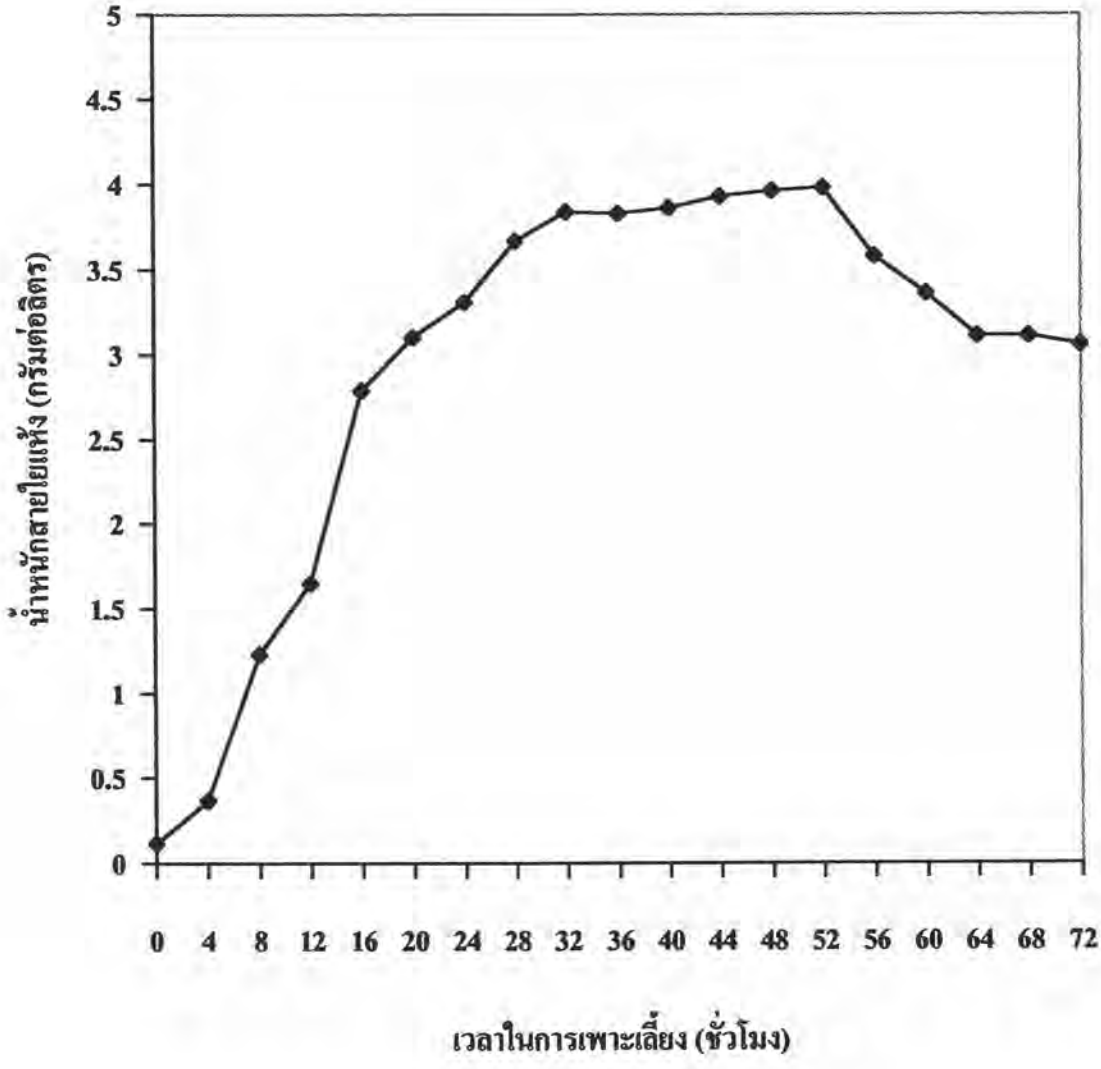
บทที่ 3

ผลการวิจัย

เมื่อเพาะเลี้ยงสปอร์แขวนลอยของ *A. oryzae* K13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อ (ภาคผนวก ก2) เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง โดยแบ่งช่วงระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง พบว่าสามารถแบ่งการเติบโตของ *A. oryzae* K13 ได้เป็น 4 ระยะ ได้แก่ ระยะที่มีการเติบโตน้อย (lag phase) ระยะที่มีอัตราการเจริญคงที่ (log phase) ระยะที่มีอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย (stationary phase) และระยะที่ไม่มีการเจริญ (death phase) (รูปที่ 12) โดยในชั่วโมงที่ 0 - 4 เป็นช่วงที่รามีการเติบโตน้อยซึ่งจะให้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 0.25 กรัมต่อลิตรของอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ จากนั้นราจะมีอัตราการเจริญคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 32 พบว่ามีน้ำหนักของสายใยแห้งเพิ่มขึ้นเป็น 3.95 กรัมต่อลิตรของอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ซึ่งหลังจากชั่วโมงที่ 32 ราเริ่มมีอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย และเข้าสู่ระยะที่ไม่มีการเจริญคือ ชั่วโมงที่ 52 จนเมื่อสิ้นสุดการทดลองคือชั่วโมงที่ 72 พบว่าจะเหลือน้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 3.32 กรัมต่อลิตรของอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ จะเห็นได้ว่าช่วงระยะที่รามีอัตราการเจริญคงที่จะมีการเติบโตอยู่ในช่วงกว้างคือ ชั่วโมงที่ 8 - 32 ซึ่งจากรายงานของ รพี โรจนอุไร (2539) ก็พบเป็นระยะเดียวกันและพบว่าอายุของหัวเชื้อ *A. oryzae* K13 ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ หัวเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ซึ่งอยู่กลางช่วงที่รามีอัตราการเจริญคงที่ (รูปที่ 12) โดยราจะมีประสิทธิภาพการผลิตกรดโคจิกสูง ดังนั้นจึงเลือกหัวเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ รพี โรจนอุไร (2539) สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป



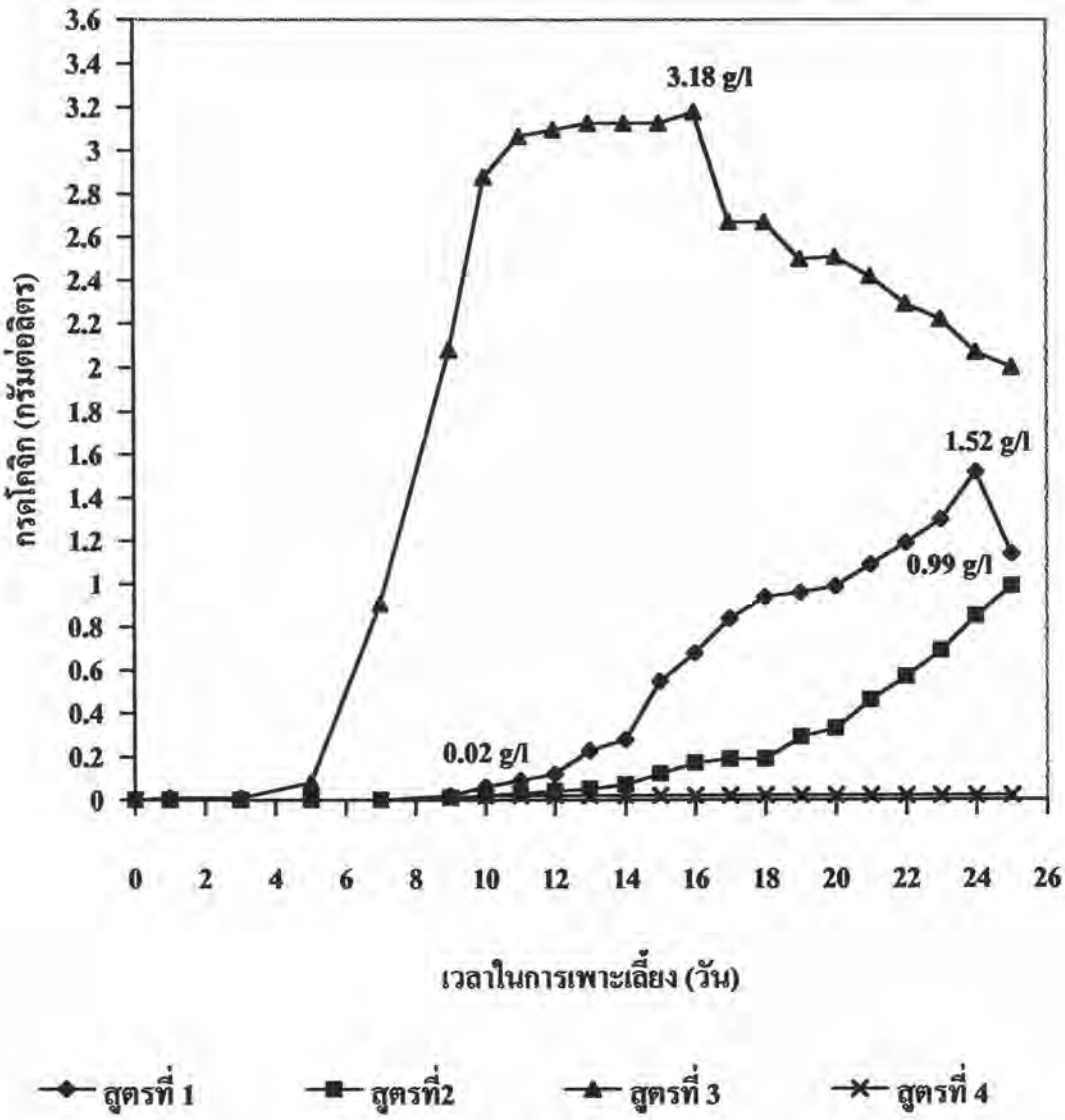
รูปที่ 12 การเติบโตของราในระหว่างการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อสปอร์แขวนลอยในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบโรตารีความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส

1. ผลการหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว

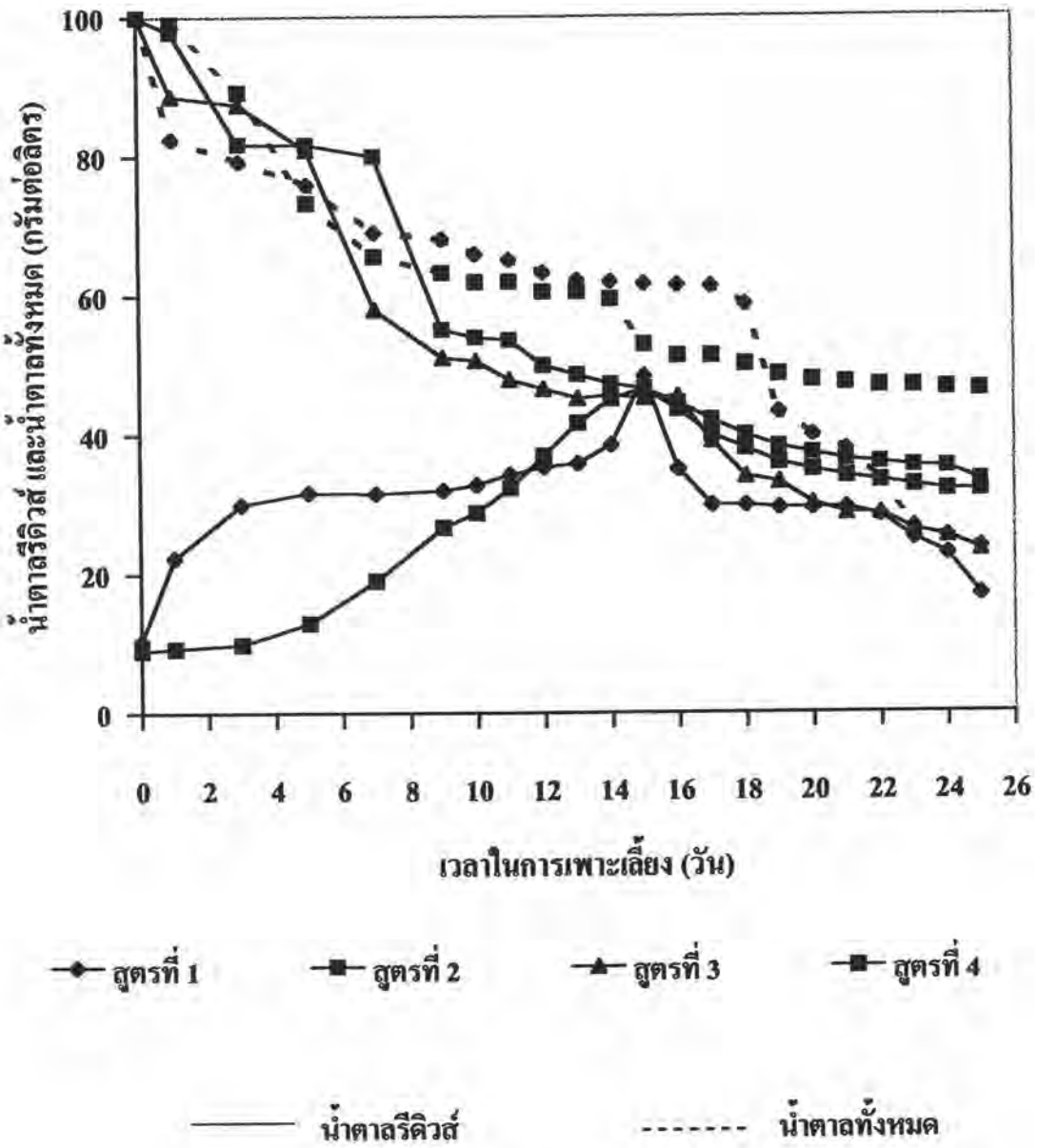
เมื่อทดลองผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรต่างๆ คือสูตรอาหารชุด ก ข และ ค (ภาคผนวก ก3 - 11) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในภาชนะแก้วรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและความสูงเท่ากับ 8.5 และ 10.0 เซนติเมตร ตามลำดับ โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองข้อ 3 และทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกตามวิธีการทดลองข้อ 4 นาน 22 - 25 วัน โดยสูตรอาหารชุด ก ประกอบด้วย 4 สูตรอาหาร (ภาคผนวก ก3 - 6) เป็นสูตรอาหารที่ได้จากการศึกษาโดย รพี โรจนอุไร (2539) และได้รายงานว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* K13 ในอาหารเหลว คือน้ำตาลทรายขาว (อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่1) และสูตรที่ดัดแปลงปริมาณคาร์บอนจากที่ศึกษาโดย May และคณะ (1931) ซึ่งได้รายงานว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยงราให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว คือน้ำตาลกลูโคส (อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3) ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อชุด ก จึงเลือกใช้สูตรอาหารทั้ง 2 สูตร โดยแปรชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้คือน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลทรายขาวในแต่ละสูตร ทำให้ได้สูตรอาหารใหม่เพิ่มขึ้นคืออาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 2 และ 4 รวมเป็น 4 สูตร ซึ่งแต่ละสูตรมีค่าความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 25 วันพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก โดยให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงกว่าสูตรอื่นคือ เท่ากับ 3.18 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 13) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตรต่อวัน ดังรูปที่ 15 รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 ให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 1.52 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 13) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.06 กรัมต่อลิตรต่อวัน ดังรูปที่ 15 ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 2 และ 4 ให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 0.99 และ 0.02 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 25 และ 10 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ (รูปที่ 13) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.04 และ 0.002 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ ดังรูปที่ 15 ส่วนการใช้น้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่1 ซึ่งมีน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในช่วงแรกลดลงอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นจะ

ลดลงอย่างช้าๆจนถึงวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นลดลงอย่างรวดเร็ว (ซึ่งเป็นช่วงที่ให้ผลผลิตกรดสูง) จนถึงวันที่ 25 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งเป็นวันสิ้นสุดการทดลองจะเหลือปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 23.70 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 14) ซึ่งสอดคล้องกับน้ำตาลรีดิวส์ที่เพิ่มขึ้นในช่วง 3 วันแรก หลังจากนั้นเพิ่มขึ้นน้อยมากและลดลงในช่วงที่มีการผลิตกรดสูง เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะเหลือน้ำตาลรีดิวส์เท่ากับ 16.96 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 4 ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาวเช่นเดียวกัน พบว่าในช่วงแรกมีการสลายของน้ำตาลทรายขาวช้ากว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 แต่เมื่อเพาะเลี้ยงจนถึงวันที่ 5 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 4 มีการใช้น้ำตาลใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่วัดได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 แต่เมื่อพิจารณาถึงปริมาณของกรดโคจิก พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 4 ให้ผลผลิตกรดต่ำกว่าคือเท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตร จึงอาจเป็นไปได้ว่าราอาจนำน้ำตาลรีดิวส์ไปใช้ในการผลิตสารอื่นซึ่งมิได้ทำการตรวจสอบ โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าจะเหลือปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวส์เท่ากับ 46.42 และ 32.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 14) ซึ่งจะเห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 และ 4 ราสลายน้ำตาลทรายขาวเป็นน้ำตาลรีดิวส์ได้ไม่หมดจึงทำให้ผลิตกรดโคจิกได้น้อย ส่วนการใช้น้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 2 และ 3 พบว่ามีการใช้น้ำตาลใกล้เคียงกันในช่วงแรก แต่เมื่อเพาะเลี้ยงจนถึงวันที่ 7 พบว่ามีการลดลงของน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 2 แต่พบว่ามีแบบแผนการใช้น้ำตาลเดียวกัน และเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 2 และ 3 จะเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เท่ากับ 33.33 และ 23.33 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 14)



รูปที่ 13 ปริมาณกรดโคจิกในระหว่างการผลิตโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกในชุด ก ซึ่งประกอบด้วย 4 สูตรอาหาร คืออาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 และ 4 ที่มีน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน และอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 2 และ 3 ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส

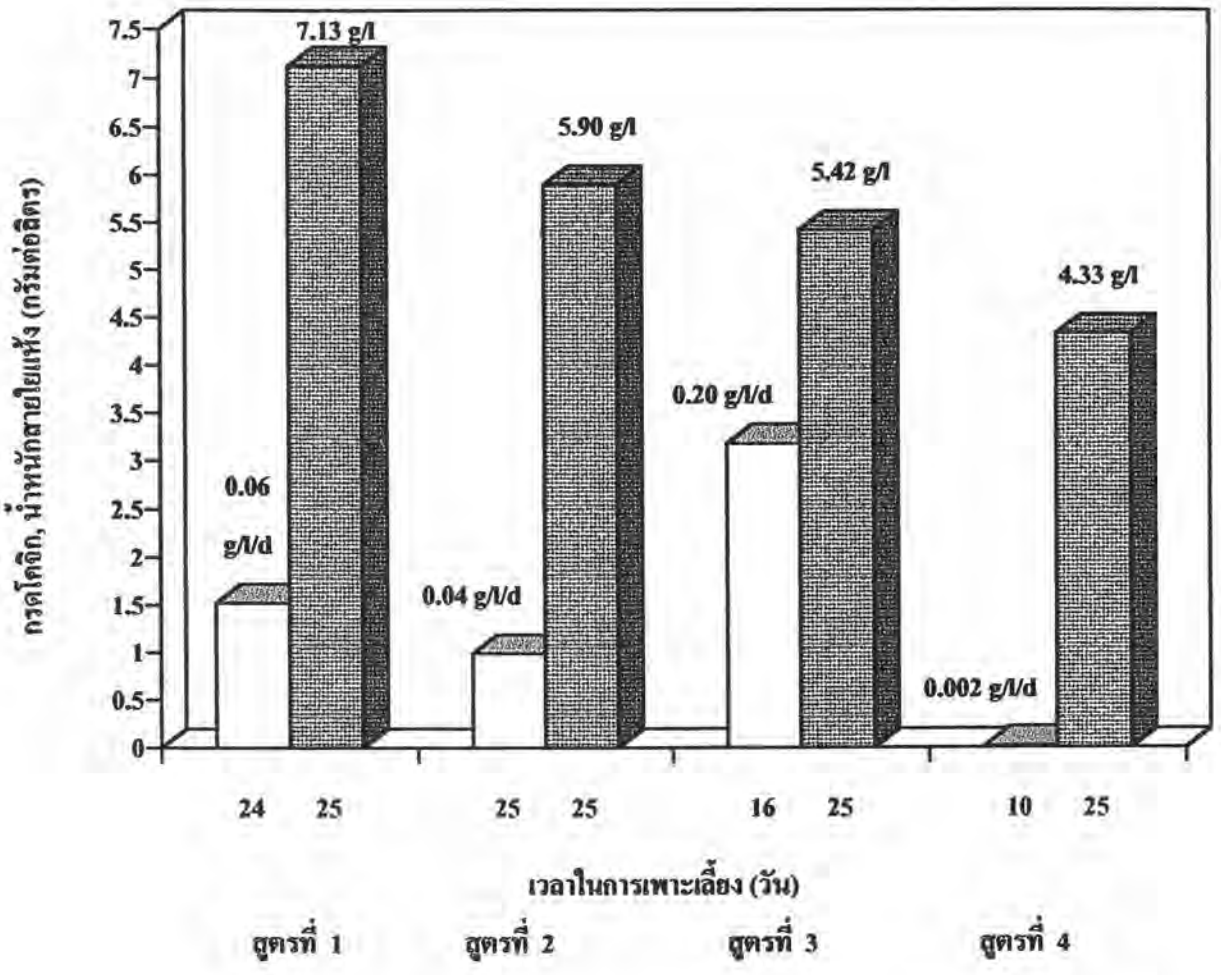


รูปที่ 14 การใช้น้ำตาลในระหว่างการผลิตโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกในชุด ก ซึ่งประกอบด้วย 4 สูตรอาหาร คืออาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 และ 4 ที่มีน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน และอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 2 และ 3 ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส

สำหรับการเติบโต พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 ให้น้ำหนักสายใยแห้งเมื่อสิ้นสุดการทดลองสูงกว่าสูตรอื่นคือ เท่ากับ 7.13 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 15 และพบว่ามีการเติบโตของสายใยเต็มผิวหน้าอาหารเหลว รวมทั้งมีการสร้างสปอร์สีเขียวอ่อนกระจายเต็มผิวหน้าอาหารเหลวอย่างสม่ำเสมอด้วย และเมื่อสังเกตจากภาพถ่ายด้านข้างพบว่ารามีการเติบโตสร้างสายใยหนากว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรอื่นในชุดเดียวกัน (รูปที่ 16) รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 2 ให้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 5.90 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 15 และพบว่ามีการเติบโตของสายใยและการสร้างสปอร์สีเขียวเต็มผิวหน้าอาหารเหลว แต่มีบางจุดที่มีการสร้างสปอร์แก่สีเขียวเข้ม และเมื่อสังเกตจากภาพถ่ายด้านข้างพบว่ามีความหนาของสายใยรองจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 (รูปที่ 17) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 และ 4 ให้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 5.42 และ 4.33 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 15 และ พบว่าการเติบโตของสายใยในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกทั้งในสูตรที่ 3 และ 4 มีน้อยมากไม่เต็มผิวหน้าอาหารเหลว ซึ่งส่วนใหญ่จะเติบโตอยู่ในอาหารเหลวด้านล่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 4 จะมีการเติบโตน้อยที่สุดเมื่อสังเกตจากภาพถ่ายด้านข้าง (รูปที่ 18 และ 19 ตามลำดับ)

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าในสูตรอาหารชุด ก นั้นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นสูตรอาหารที่น่าสนใจเนื่องจากให้ผลผลิตและอัตราการผลิตกรดโคจิกสูงกว่าสูตรอื่นๆ โดยพบว่าให้ผลผลิตกรดสูงที่สุดเท่ากับ 3.18 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นร้อยละของการผลิตกรดโคจิกคิดจากปริมาณคาร์บอนที่ใช้เท่ากับ 5.84

แต่เนื่องจากมีรายงานว่าราสายพันธุ์นี้เมื่อใช้แหล่งอนินทรีย์ในโตรเจนเพียงอย่างเดียวจะให้ผลผลิตกรดไม่สูงเท่าการเสริมด้วยสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร (รพี โรจนอุไร, 2539) ดังนั้นในสูตรอาหารชุด ข จึงทดลองเสริมสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 ซึ่งคัดเลือกมาจากสูตรอาหารชุด ก และทดลองใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิด คือน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลทรายขาว โดยแปรความเข้มข้นเป็น 100 และ 200 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้สูตรอาหารใหม่เป็น 4 สูตร ได้แก่อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 - 8 (ภาคผนวก ก7 - 10)



รูปที่ 15 เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิก ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด และน้ำหนักสายใยแห้ง ณ วันสิ้นสุดการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวชุด ก ซึ่งประกอบด้วย 4 สูตรอาหาร คือ

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 เป็นสูตรอาหารที่ศึกษาแล้วว่าเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ในอาหารเหลว (รพี โรจนอุไร, 2539) ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว 100 กรัมต่อลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 2 เป็นสูตรอาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 โดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 เป็นสูตรอาหารที่ดัดแปลงมาจากสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยงราให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว (May และคณะ, 1931) ซึ่งใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และมีส่วนประกอบอื่นๆคงเดิม

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 4 เป็นสูตรอาหารที่ดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 โดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาว

(ก)

(ข)

รูปที่ 16 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 25 วัน

(ก)

(ข)

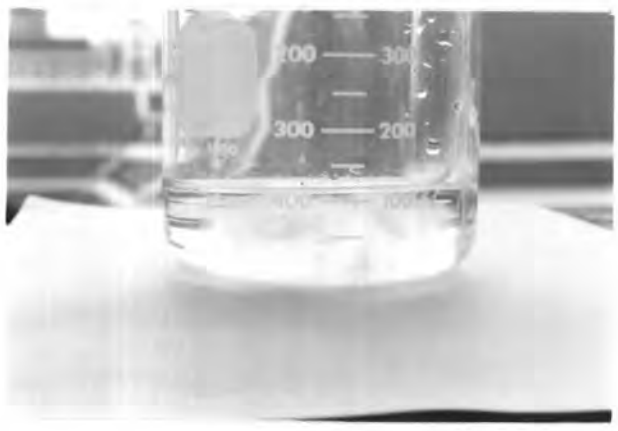
รูปที่ 17 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 2 ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 25 วัน

(ก)

(ข)

รูปที่ 18 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 25 วัน

(ก)



(ข)

รูปที่ 19 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 4 ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 25 วัน

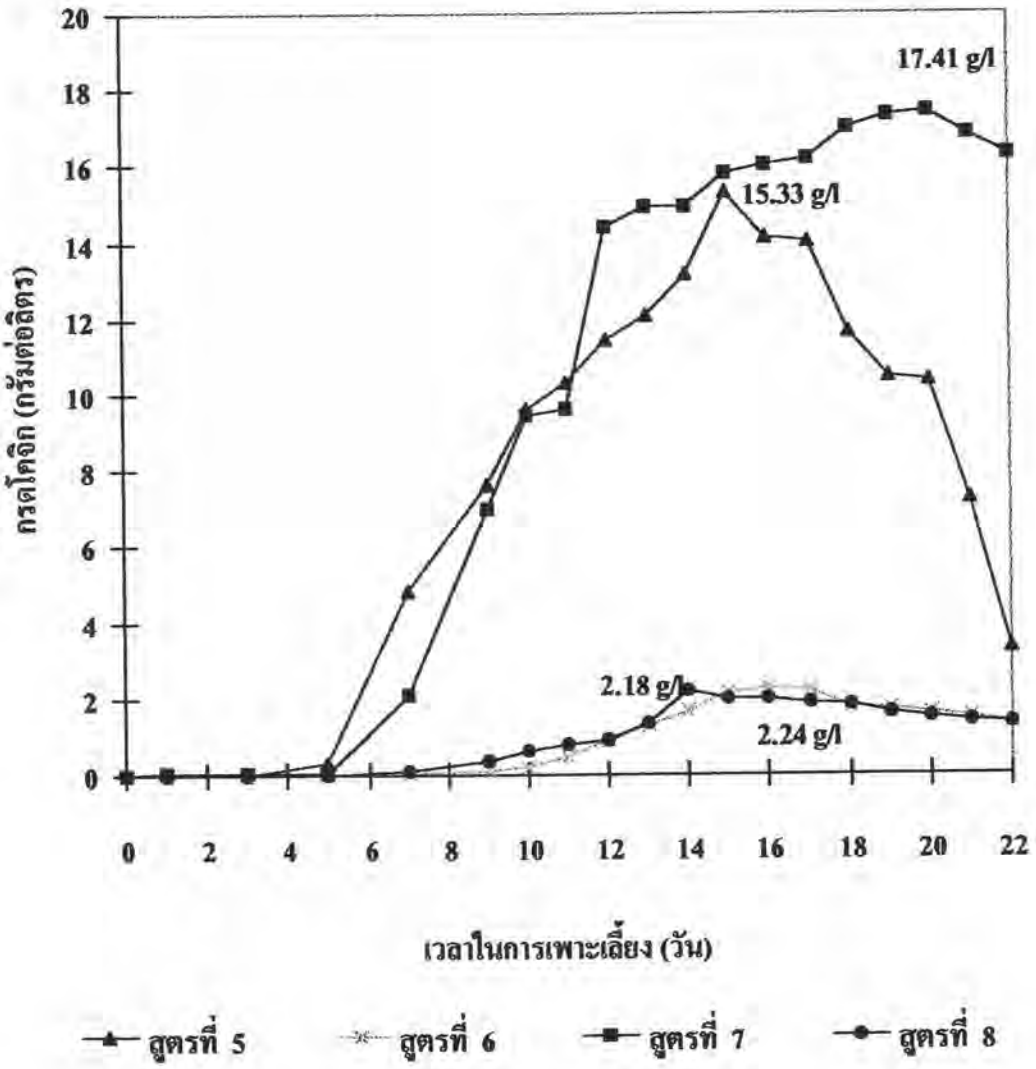
เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกในสูตรอาหารชุด ข นาน 22 วัน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 และ 7 ให้ผลผลิตกรดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 20 โดยพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 7 ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 200 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงกว่าสูตรอื่นคือเท่ากับ 17.41 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 20 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 15.33 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 6 และ 8 ซึ่งมีน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 2.24 และ 2.18 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 16 และ 14 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ ดังรูปที่ 20 สำหรับการใช้น้ำตาล พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 7 ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนมีการใช้น้ำตาลเร็วกว่าสูตรอื่น ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดโคจิกที่เพิ่มสูงขึ้นแล้วจะใช้น้ำตาลช้าลงหลังจากเพาะเลี้ยงถึงวันที่ 18 และพบว่าจะเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในวันที่ 22 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 9.66 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 21) ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงจนถึงวันที่ 5 มีการลดลงของน้ำตาลรีดิวส์อย่างรวดเร็ว และมีน้ำตาลรีดิวส์เหลือในวันที่ 22 ของการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 4.68 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 6 และ 8 ซึ่งมีน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีการสลายของน้ำตาลทรายขาวช้ามาก โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 6 สลายน้ำตาลทรายขาวเร็วขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 14 วัน ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 8 นั้นพบว่าการสลายน้ำตาลทรายขาวเป็นน้ำตาลรีดิวส์เป็นไปอย่างช้าๆจนสิ้นสุดการทดลองก็ยังเหลือน้ำตาลทรายขาวในอาหารเหลวสูงมาก โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 6 และ 8 จะเหลือปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 18.67 และ 100.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เท่ากับ 11.54 และ 47.23 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จึงทำให้การผลิตกรดโคจิกในอาหารทั้ง 2 สูตรต่ำมาก ดังรูปที่ 21

ส่วนน้ำหนักสายใยแห้ง ณ วันที่ 22 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ให้น้ำหนักของสายใยแห้งเท่ากับ 11.13

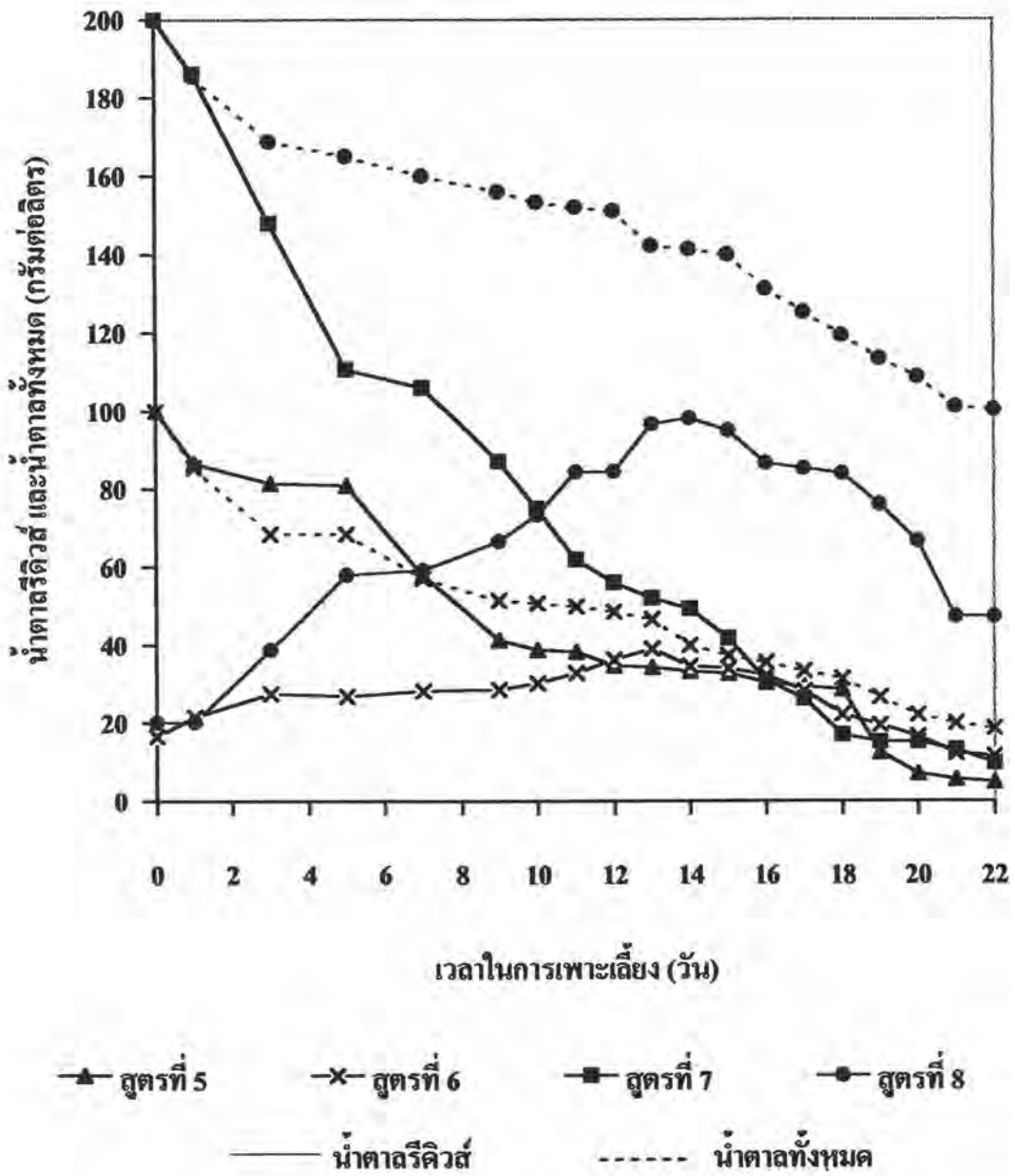
กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 22 และพบว่ามีการเติบโตของสายใยเต็มผิวหน้าอาหารเหลวมีการสร้างสปอร์สีเหลืองกระจายเต็มผิวหน้าอาหารเหลวอย่างสม่ำเสมอ และเมื่อสังเกตจากภาพถ่ายด้านข้างพบว่าให้ความหนาของเส้นใยรองจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 7 (รูปที่ 23) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 6 ให้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 9.40 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 22 และพบว่ามีการเติบโตของสายใยบางๆเต็มผิวหน้าอาหารเหลว และมีการสร้างสปอร์สีเขียวเข้มหนาเป็นบางจุด (รูปที่ 24) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 7 ให้น้ำหนักสายใยสูงที่สุดคือ เท่ากับ 17.99 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 22 และพบว่ามีการเติบโตของสายใยเต็มผิวหน้าอาหารเหลวแต่ไม่สม่ำเสมอ มีการสร้างสปอร์สีเหลืองแกมเขียว และเมื่อสังเกตจากภาพถ่ายด้านข้างพบว่ามีความหนาของสายใยมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรอื่นๆ (รูปที่ 25) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 8 ให้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 6.61 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 22 และพบว่ามีการเติบโตของสายใยใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 6 โดยมีการเติบโตของสายใยบางๆเต็มผิวหน้าอาหารเหลว และสร้างสปอร์สีเขียวเข้มเป็นบางจุด (รูปที่ 26)

เมื่อพิจารณาถึงอัตราการผลิตกรดโคจิกและร้อยละของการผลิตกรดโคจิกคิดจากปริมาณคาร์บอนที่ใช้ซึ่งแสดงผลดังรูปที่ 22 และตารางที่ 9 พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ให้อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 1.02 กรัมต่อลิตรต่อวัน รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 7 ให้อัตราการผลิตกรดเท่ากับ 0.87 กรัมต่อลิตรต่อวัน ส่วนร้อยละของการผลิตกรดโคจิกคิดจากปริมาณคาร์บอนที่ใช้ พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ให้ร้อยละของการผลิตกรดสูงที่สุดคือ เท่ากับ 22.47 รองลงมาคืออาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 7 ให้ร้อยละของการผลิตกรดโคจิกคิดจากปริมาณคาร์บอนที่ใช้มีค่าเท่ากับ 9.42 ซึ่งจะเห็นได้ว่าแม้ว่าปริมาณกรดที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 7 (17.41 กรัมต่อลิตร) จะสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 (15.33 กรัมต่อลิตร) แต่เมื่อคิดเทียบจากปริมาณคาร์บอนที่ใช้ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 กลับให้ร้อยละของการผลิตดีกว่า รวมทั้งใช้ปริมาณน้ำตาลในการผลิตน้อยกว่า ซึ่งจะเห็นได้จากร้อยละของการใช้น้ำตาลน้อยกว่าคือ เท่ากับ 68.23 ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 7 จะมีค่าเท่ากับ 92.46 ซึ่งมีค่าร้อยละของการใช้น้ำตาลมากกว่าถึง 24.23 ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 จึงเหมาะสมต่อการผลิตกรดมากกว่า ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิต

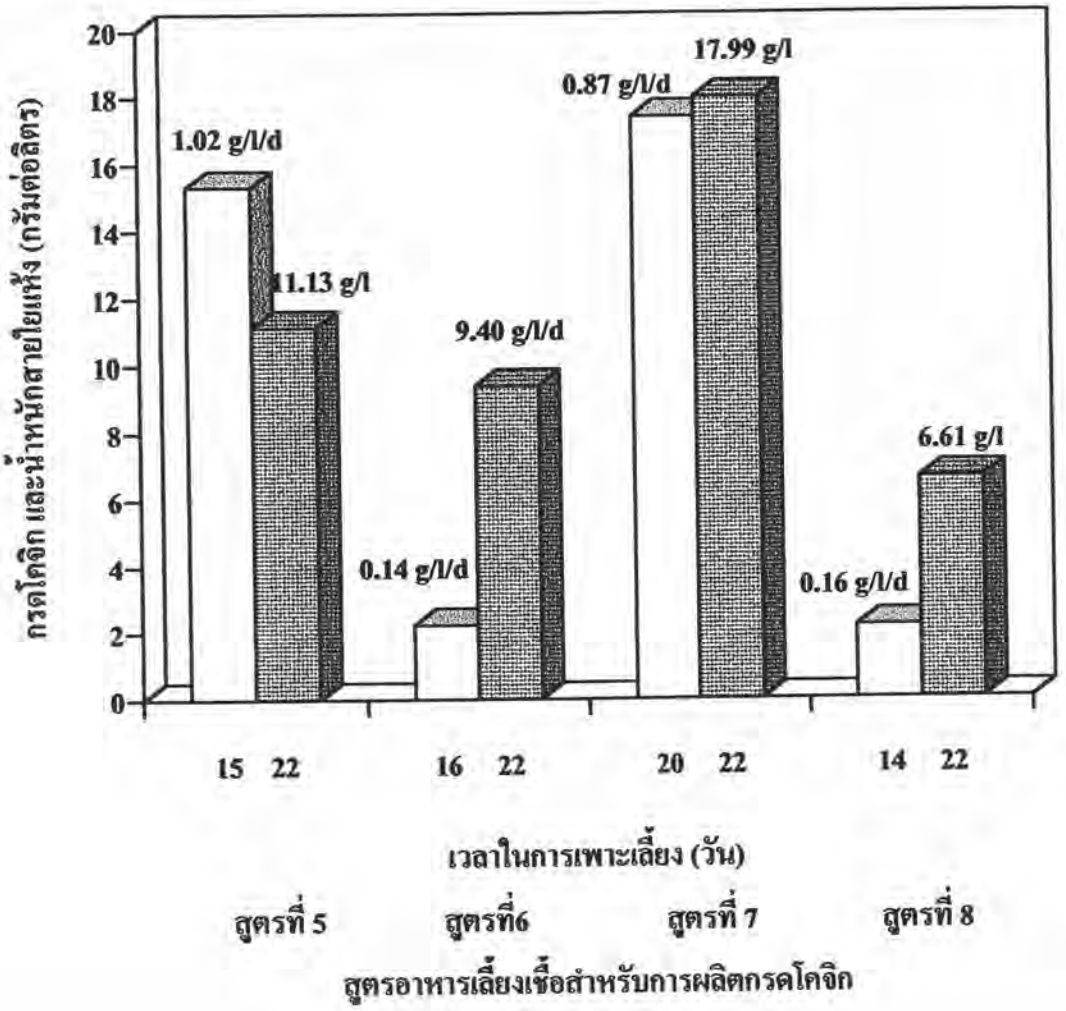
กรดโคจิกสูตรที่ 6 และ 8 ให้อัตราการผลิตกรดและร้อยละของการผลิตกรดโคจิกคิดจากปริมาณคาร์บอนที่ใช้ต่ำมากไม่น่าสนใจ (ตารางที่ 9)



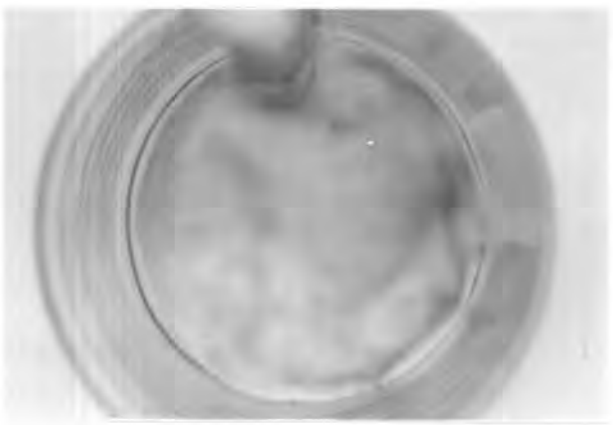
รูปที่ 20 เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิก จากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 (น้ำตาลกลูโคส 10 %) สูตรที่ 6 (น้ำตาลทรายขาว 10 %) สูตรที่ 7 (น้ำตาลกลูโคส 20 %) และสูตรที่ 8 (น้ำตาลทรายขาว 20 %) ซึ่งเป็นอาหารสูตรที่มีองค์ประกอบอื่นๆเหมือนกันแต่ต่างกันที่ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 21 เปรียบเทียบการใช้น้ำตาลจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 (น้ำตาลกลูโคส 10 %) สูตรที่ 6 (น้ำตาลทรายขาว10 %) สูตรที่ 7 (น้ำตาลกลูโคส 20 %) และสูตรที่ 8 (น้ำตาลทรายขาว 20 %) ซึ่งเป็นอาหารสูตรที่มีองค์ประกอบอื่นๆเหมือนกันแต่ต่างกันที่ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน



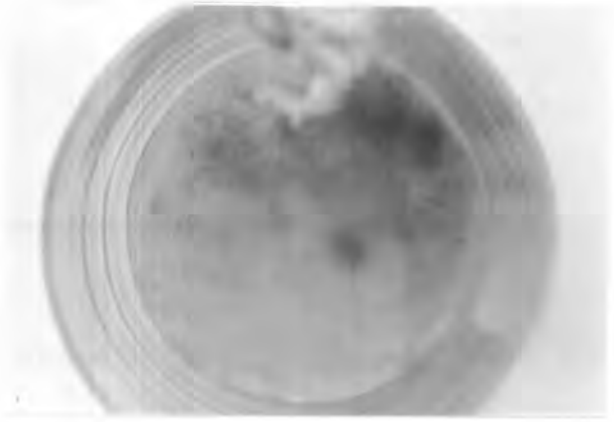
รูปที่ 22 เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิก ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด และน้ำหนักสายใยแห้ง ณ วันสิ้นสุดการทดลอง จากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 6 7 และ 8 ซึ่งมีองค์ประกอบอื่นๆเหมือนกัน แต่ต่างกันที่ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน



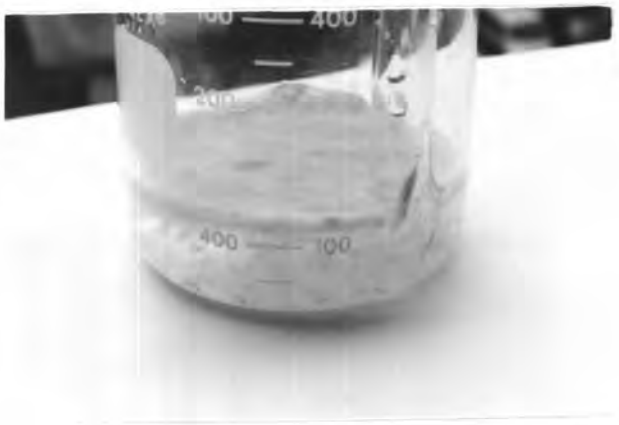
(ก)

(ข)

รูปที่ 23 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน

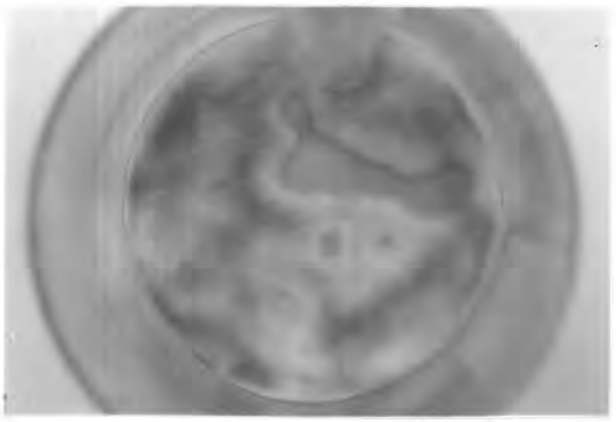


(ก)



(ข)

รูปที่ 24 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 6 ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน

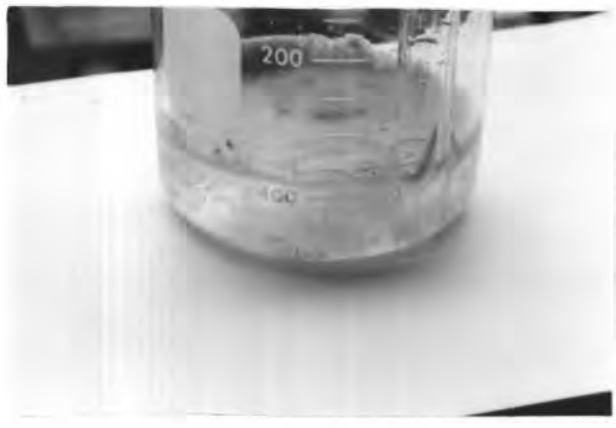


(ก)

(ข)

รูปที่ 25 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 7 ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน

(ก)



(ข)

รูปที่ 26 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 8 ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$2 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน

ตารางที่ 9 อัตราการผลิตกรดโคจิก ร้อยละของการใช้น้ำตาล และร้อยละของการผลิตกรดโคจิก คิดจากปริมาณคาร์บอนที่ใช้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 5 6 7 และ 8

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่	ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน (กรัมต่อลิตร)	ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด	อัตราการผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตรต่อวัน) *	ปริมาณคาร์บอนที่ใช้ในแต่ละสูตรอาหาร *		ผลผลิตกรดโคจิกคิดจากปริมาณคาร์บอนที่ใช้ (เปอร์เซ็นต์) *
						(กรัมต่อลิตร)	(เปอร์เซ็นต์)	
3	น้ำตาลกลูโคส 100	NH_4NO_3 1.125	3.18	16	0.20	54.44	54.44	5.84
5	น้ำตาลกลูโคส 100	Yeast extract 0.5 + NH_4NO_3 0.979	15.33	15	1.02	68.23	68.23	22.47
6	น้ำตาลทรายขาว 100	Yeast extract 0.5 + NH_4NO_3 0.979	2.24	16	0.14	67.77	67.77	3.31
7	น้ำตาลกลูโคส 200	Yeast extract 0.5 + NH_4NO_3 0.979	17.41	20	0.87	184.92	92.46	9.42
8	น้ำตาลทรายขาว 200	Yeast extract 0.5 + NH_4NO_3 0.979	2.18	14	0.16	101.80	50.90	2.14

หมายเหตุ * หมายถึง คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

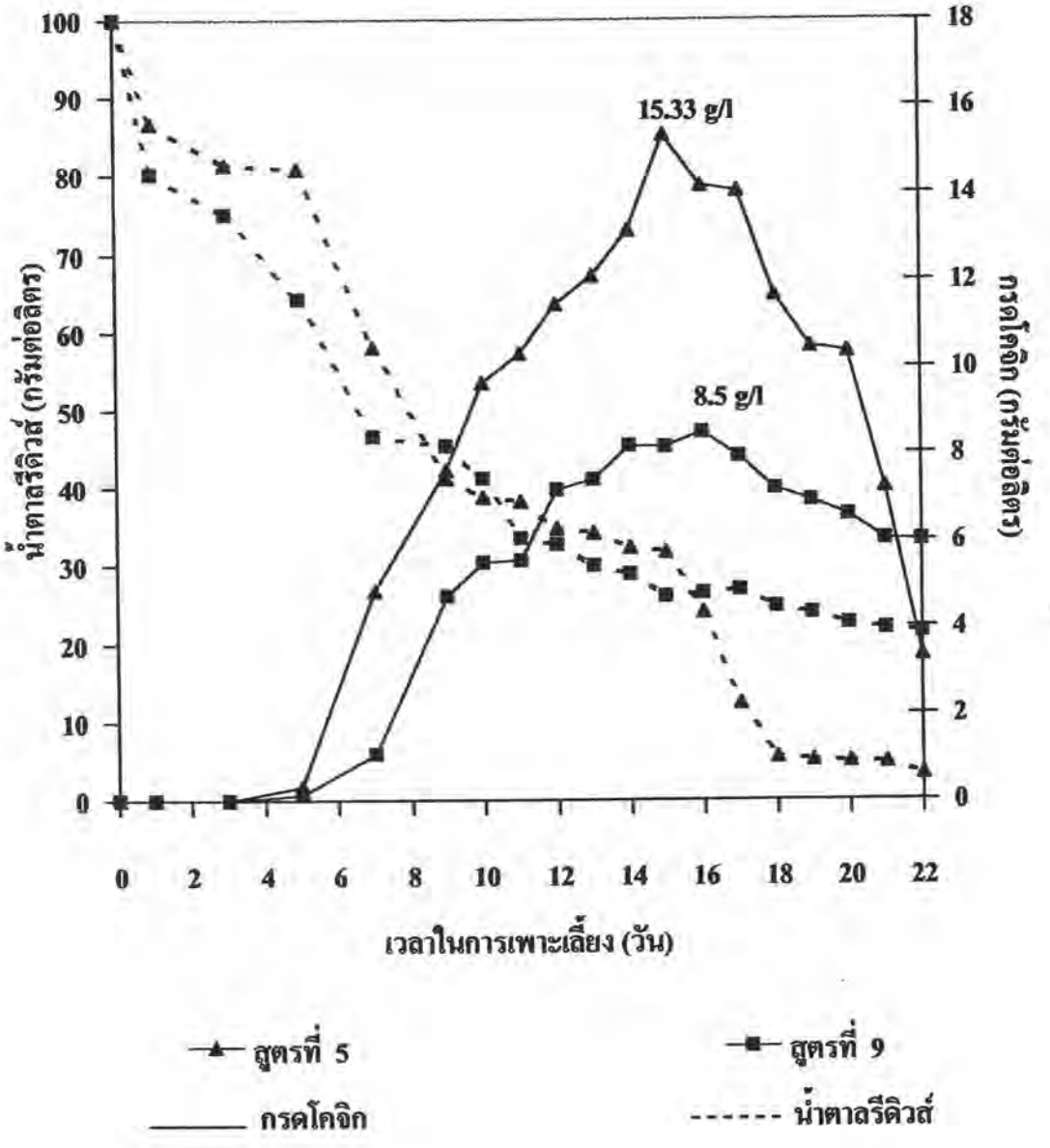
จะเห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 และ 7 ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเสริมสารสกัดจากยีสต์เพื่อใช้เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ทดแทนร่วมกับแอมโมเนียมไนเตรตซึ่งเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่มีองค์ประกอบอื่นๆ เหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 15.33 และ 17.41 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าในสูตรอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวคือ อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 ซึ่งให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 3.18 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 6 และ 8 ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบอื่นๆเหมือนกับอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 และ 7 แต่ต่างกันที่ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 6 และ 8 จะให้ผลผลิตกรดต่ำมากเท่ากับ 2.24 และ 2.18 กรัมต่อลิตร จึงแสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตโดยวิธีการเพาะเลี้ยงให้ราเจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเหมาะสมกว่าการใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือน้ำตาลกลูโคสในปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร (อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5) เพราะถึงแม้จะมีการเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสเป็น 2 เท่า (อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 7) แต่ผลผลิตกรดที่ได้ก็สูงขึ้นไม่มากนักซึ่งไม่คุ้มต่อการลงทุน ดังตารางที่ 9 ดังนั้นจึงเลือกใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ในการทดลองขั้นต่อไป

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเสริม และมีแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่จากรายงานของ รพี โรจนอุไร (2539) พบว่าแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารเหลวโดยราสายพันธุ์นี้คือแอมโมเนียมซัลเฟต ดังนั้นจึงทดลองแปรแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 จากแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต โดยคงค่าปริมาณไนโตรเจนในอาหารเหลวให้เท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 จึงได้เป็นสูตรอาหารชุด ค จำนวน 1 สูตร ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 9

จากผลการทดลองพบว่าแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตกรดโคจิกและการเติบโตของรา โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 9 ซึ่งมีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนให้ผลผลิตกรดโคจิกลดลงเกือบครึ่งหนึ่งของผลผลิตกรดที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ซึ่งมีแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนแม้มีองค์ประกอบอื่นเหมือนกัน โดยให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 8.50 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง คิดเป็นอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.53 กรัมต่อลิตรต่อวัน และเท่ากับ 15.33 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง คิดเป็นอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 1.02 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 27 และ ตารางที่ 10 สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ พบว่าในช่วง 8 วันแรกของการเพาะเลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 และ 9 มีแบบแผนการใช้น้ำตาลเดียวกัน แต่อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ใช้น้ำตาลช้ากว่าแต่กลับผลิตกรดได้เร็วและสูงกว่า แต่เมื่อเพาะเลี้ยงจนเลยวันที่ 16 ไปพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 จะใช้น้ำตาลรวดเร็วกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 9 (รูปที่ 27) ส่วน น้ำหนักสายใยแห้งของราพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ให้น้ำหนักสายใยแห้งสูงสุดเท่ากับ 11.13 กรัมต่อลิตร และในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 9 ให้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 7.82 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 22 ของการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 10) ซึ่งจะเห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 เป็นสูตรที่ให้การเติบโตที่พอเหมาะต่อการผลิตกรดโคจิกได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 9 และเมื่อพิจารณาถึงลักษณะการเติบโตพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 9 มีการเติบโตของสายใยและการสร้างสปอร์ไม่เต็มผิวหน้าอาหารเหลว และเมื่อเปรียบเทียบจากภาพถ่ายด้านข้างพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 9 (รูปที่ 28) มีความหนาของสายใยน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 (รูปที่ 23)

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณน้ำตาลที่ใช้ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 มีร้อยละของการใช้น้ำตาลไปในการผลิตกรดมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 9 คือ เท่ากับ 68.23 และ 50.90 ตามลำดับ ส่วนร้อยละของผลผลิตกรดคิดจากปริมาณคาร์บอนที่ใช้ พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 มีค่าสูงที่สุดคือ เท่ากับ 22.47 ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 9 มีค่าเท่ากับ 16.70 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเติบโต

และการผลิตกรดโคจิกมากกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต จึงให้ประสิทธิภาพในการผลิตกรดสูง (ตารางที่ 10)



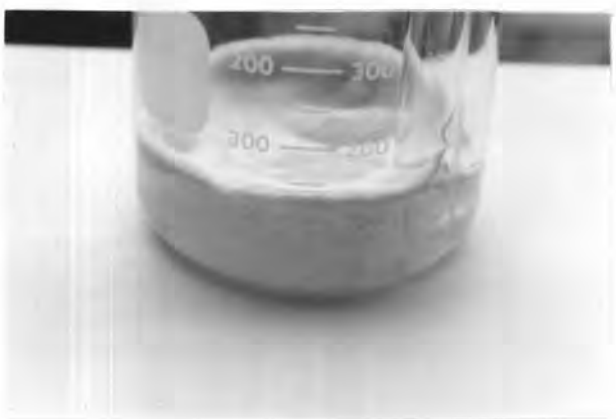
รูปที่ 27 ปริมาณกรดโคจิก และน้ำตาลรีดิวส์ระหว่างการผลิตโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 และ 9 ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 10 อัตราการผลิตกรดโคจิก ร้อยละของการใช้น้ำตาล และร้อยละของการผลิตกรดโคจิก คิดจากปริมาณคาร์บอนที่ใช้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 และ 9

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่	น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ชนิด และปริมาณของแหล่งไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด	อัตราการผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตรต่อวัน) *	น้ำหนักสายใยแห้งในวันสิ้นสุดการทดลอง (22 วัน) (กรัมต่อลิตร)	ร้อยละของปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ *	ร้อยละของการผลิตกรดโคจิกคิดจากปริมาณคาร์บอนที่ใช้ *
5	100	Yeast extract 0.5 + NH_4NO_3 0.979	15.33	15	1.02	11.13	68.23	22.47
9	100	Yeast extract 0.5 + $(NH_4)_2SO_4$ 1.619	8.50	16	0.53	7.82	50.90	16.70

หมายเหตุ * หมายถึง คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด

(ก)



(ข)

รูปที่ 28 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 9 ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 22 วัน

ดังนั้นสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวคือ อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมีสารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมไนเตรต ในปริมาณ 0.5 และ 0.979 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งจะใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5

จากผลการทดลองข้อ 1 จะเห็นได้ว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวคือ น้ำตาลกลูโคส ซึ่งต่างจากการผลิตในอาหารเหลวเนื่องจากการเพาะเลี้ยงบนผิวหน้าอาหารเหลวจุลินทรีย์เจริญเฉพาะบริเวณรอยต่อของอาหารกับอากาศเท่านั้น ดังนั้นความต้องการอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนน่าจะแตกต่างไปจากการผลิตในอาหารเหลวที่ รพี โรจนอุไร (2539) เคยศึกษามาแล้ว จึงทำการทดลองอีกครั้ง

เมื่อทำการทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ซึ่งเป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่คัดเลือกจากผลการทดลองข้อ 1 โดยคงค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไว้ รวมทั้งคงค่าของสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งใช้เป็นแหล่งวิตามิน ปัจจัยเสริมการเติบโต (growth factor) และแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน แล้วแปรปริมาณของแอมโมเนียมไนเตรตที่ใช้เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.979 1.254 1.533 1.814 และ2.093 กรัมต่อลิตร เพื่อให้ได้อัตราส่วนโดยรวมของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.0 102 : 1.25 102 : 1.5 102 : 1.75 และ 102 : 2.0 ตามลำดับ โดยทำการผลิตนาน 17 วัน จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนพอเหมาะ จะส่งเสริมการผลิตกรดโคจิก แต่ถ้าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงหรือต่ำเกินไปจะมีผลทำให้ผลิตกรดโคจิกได้น้อยลง โดยที่อัตราส่วน 102 : 1.75 ให้ผลผลิตกรดสูงกว่าอัตราส่วนอื่นคือ เท่ากับ 25.84 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 35) รองลงมาคือที่อัตราส่วน 102 : 1.5 ให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 22.47 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 33) ส่วนที่อัตราส่วนอื่นๆให้ผลผลิตกรดเรียงจากมากไปหาน้อยได้แก่ 102 : 2.0 102 : 1.25 และ 102 : 1.0

โดยให้ปริมาณกรดโคจิกเท่ากับ 21.52 18.21 และ 15.56 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 16 และ 16 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ (รูปที่ 37 31 และ 29 ตามลำดับ)

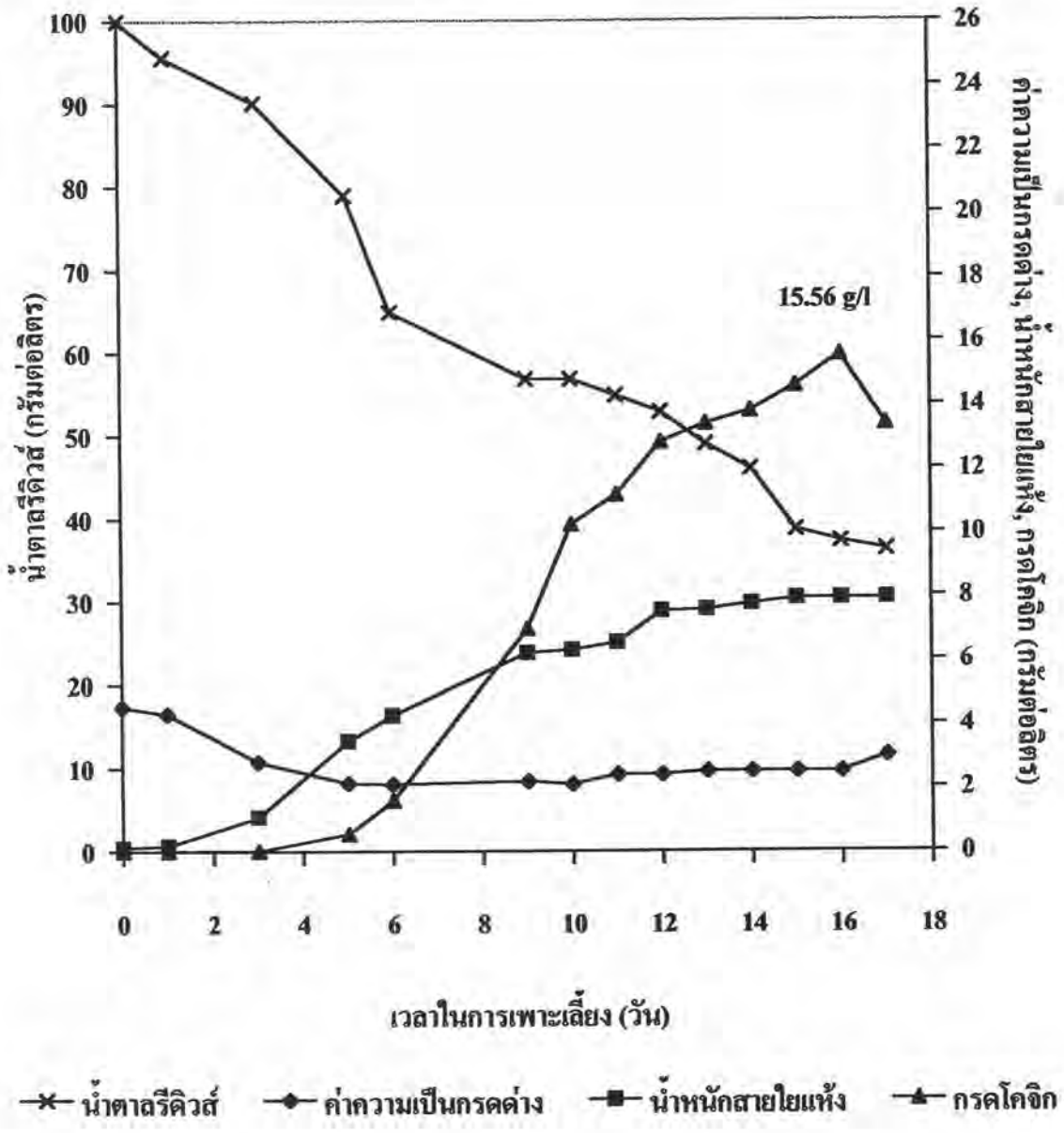
สำหรับการเติบโตของสายใยในระหว่างการผลิต พบว่าถ้าค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนสูงคือมีไนโตรเจนน้อยจะให้การเติบโตน้อยกว่าแต่ส่งเสริมการสร้างสปอร์และถ้าใช้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำเกินไป นั่นคือมีปริมาณของไนโตรเจนสูงเกินความจำเป็นจะส่งเสริมการสร้างสายใยมากกว่าการผลิตกรด โดยที่อัตราส่วน 102 : 1.0 หลังจากเพาะเลี้ยง 3 วัน ราเริ่มมีการสร้างสายใยบนผิวหน้าอาหารเหลวและที่ขอบของภาชนะแก้วที่ใช้เลี้ยงเชื้อและสร้างสปอร์สีเหลืองอ่อนเป็นบางแห่ง เมื่อเพาะเลี้ยงจนถึงช่วงวันที่ 14 – 16 พบว่ามีการสร้างสปอร์สีเหลืองแกมเขียวเจริญปิดผิวหน้าอาหารเหลว (รูปที่ 30) และให้น้ำหนักสายใยแห้งมากที่สุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่นๆ ซึ่งน้ำหนักสายใยแห้งที่เพิ่มขึ้นอาจมาจากน้ำหนักของสปอร์ก็ได้ โดยให้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 7.93 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 29) ในขณะที่อัตราส่วน 102 : 1.25 102 : 1.5 102 : 1.75 และ 102 : 2.0 เริ่มมีการสร้างสายใยเจริญที่ผิวหน้าอาหารเหลวและสร้างสปอร์สีเหลืองอ่อนตั้งแต่วันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเช่นกัน แต่จำนวนของสปอร์ที่สร้างน้อย มีการสร้างสายใยบางๆปิดผิวหน้าอาหารเหลวในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง สีของสปอร์มีสีเหลืองแกมน้ำตาลอ่อนๆ (รูปที่ 32 34 36 และ 38 ตามลำดับ) และให้น้ำหนักของสายใยสูงสุดเท่ากับ 6.65 6.47 6.09 และ 7.67 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 31 33 35 และ 37 ตามลำดับ)

สำหรับการใช้น้ำตาล พบว่ามีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วในช่วงที่รามีอัตราการเจริญคงที่แล้วจะใช้น้ำตาลน้อยลงเมื่อราเข้าสู่ระยะที่มีอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย และเมื่อถึงช่วงที่ราผลิตกรดโคจิกสูงก็จะมีการใช้น้ำตาลมากขึ้นซึ่งเป็นแบบแผนเดียวกัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 36.36 32.33 30.77 24.07 และ 27.59 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 29 31 33 35 และ 37 ตามลำดับ ส่วนค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการผลิตมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงเดียวกันคือลดลงอย่างรวดเร็วใน 3 วันแรกของการเติบโต หลังจากนั้นเมื่อมีการผลิตกรดโคจิกแล้วค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 2.0 - 2.5 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายที่มีกรดโคจิกละลายอยู่ (รูปที่ 29 31 33 35 และ 37) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกและการเติบโต ณ ค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างกัน พบว่าที่อัตราส่วน 102 : 1.75 สายใยมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดสูงสุด กล่าวคือมีการเติบโตน้อยที่สุดแต่ให้ผลผลิตกรดสูงกว่า (รูปที่ 39) นอกจากนี้ยัง

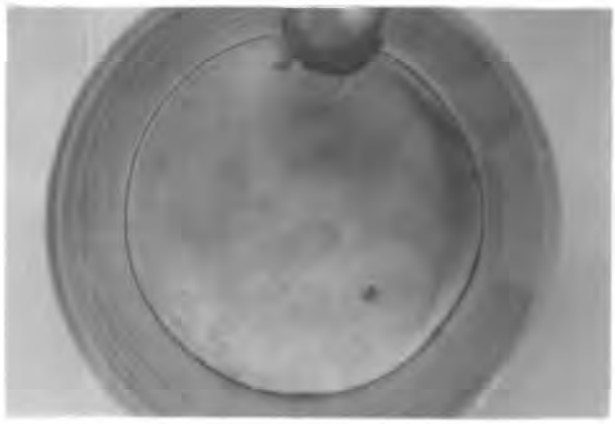
พบว่าในทุกๆอัตราส่วนราจะผลิตกรดสูงในระยะที่มีอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย (stationary phase) จึงเป็นการยืนยันได้ว่ากรดโคจิกน่าจะจัดเป็นสารทุติยภูมิ (secoundary metabolite) คือมีการสร้างกรดหลังจากการเติบโต (รูปที่ 39) เมื่อพิจารณาถึงอัตราการผลิตกรดโคจิกจากการแปรอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 102 : 1.0 102 : 1.25 102 : 1.5 102 : 1.75 และ 102 : 2.0 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 11 พบว่าในวันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดของแต่ละอัตราส่วนจะให้อัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.97 1.14 1.50 1.62 และ 1.44 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ สำหรับปริมาณผลผลิตกรดโคจิกต่อน้ำตาลกลูโคสที่นำไปใช้ ($Y_{p/s}$) ในวันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด ซึ่งจะแสดงถึงประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ พบว่าให้ผลเรียงจากมากไปหาน้อยได้แก่ 102 : 1.5 102 : 1.75 102 : 2.0 102 : 1.25 และ 102 : 1.0 โดยมีค่าเท่ากับ 0.38 0.35 0.34 0.29 และ 0.25 ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณผลผลิตกรดโคจิกต่อน้ำหนักสายใยแห้งที่สร้างขึ้นในวันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด ($Y_{p/x}$) ซึ่งจะแสดงถึงประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดโคจิก พบว่าที่อัตราส่วน 102 : 1.75 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 4.27 รองลงมาคือที่อัตราส่วน 102 : 1.5 102 : 2.0 102 : 1.25 และ 102 : 1.0 ให้ผลเท่ากับ 3.48 2.84 2.78 และ 1.97 ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

สำหรับการใช้ไนโตรเจนที่อัตราส่วน 102 : 1.0 102 :1.25 102 :1.5 และ 102:1.75 พบว่ามีแบบแผนการใช้ไนโตรเจนเดียวกัน โดยพบว่าในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง ไม่สามารถวัดปริมาณไนโตรเจนในสารสกัดจากยีสต์ได้ เหลือเพียงแต่ปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมไนเตรต จึงแสดงให้เห็นว่าในช่วง 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยงราใช้ไนโตรเจนไปในการเติบโตสูง และเริ่มลดลงอย่างช้าๆในช่วงวันที่ 3 - 12 หลังจากนั้นปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในอาหารเหลวจะคงที่ในช่วง 0.02 - 0.05 กรัมต่อลิตร จนสิ้นสุดการทดลองพบว่าที่อัตราส่วน 102 : 1.0 102 : 1.25 102 : 1.5 และ 102 : 1.75 จะเหลือไนโตรเจนเท่ากับ 0.02 0.03 0.04 และ 0.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 40) ในขณะที่อัตราส่วน 102 : 2.0 พบว่าปริมาณไนโตรเจนในสารสกัดจากยีสต์หมดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน แต่ยังสามารถวัดปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมไนเตรตได้ และพบว่ามีการใช้ไนโตรเจนช้ากว่าอัตราส่วนอื่นๆ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 14 วัน ปริมาณไนโตรเจนลดลงใกล้เคียงกับอัตราส่วนอื่นๆ เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะเหลือไนโตรเจนเท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 40) เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบ

การเติบโตของสายใยพบว่า เมื่อปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มน้อยลง (0.02 – 0.05 กรัมต่อลิตร) การเติบโตของราจะเริ่มเข้าสู่ระยะที่มีอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย



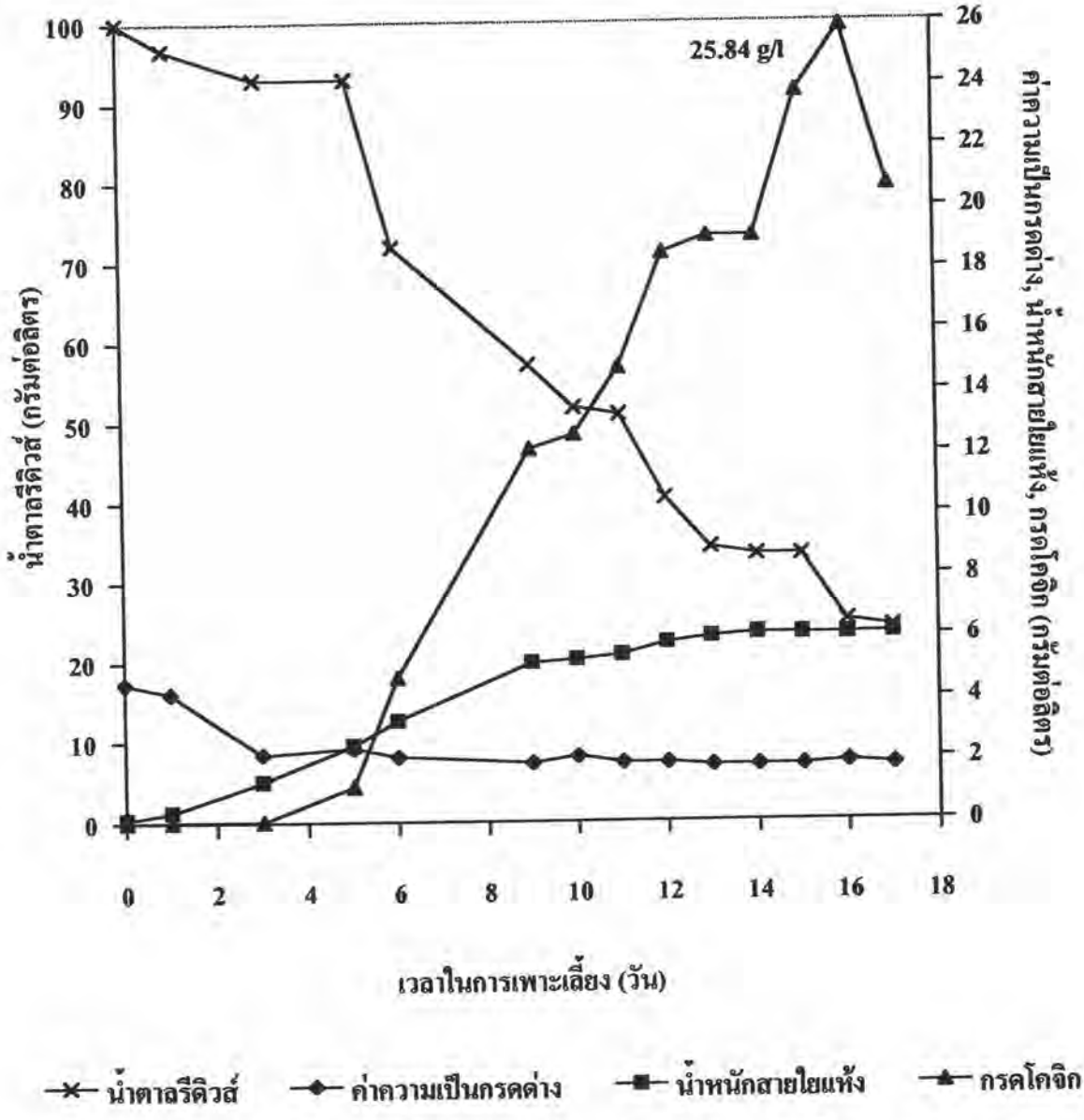
รูปที่ 29 ปริมาณกรดโคจิก การใช้น้ำตาล ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำหนักสายใยแห้งในระหว่างการผลิตโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.0 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส



(ก)

(ข)

รูปที่ 30 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.0 ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 17 วัน

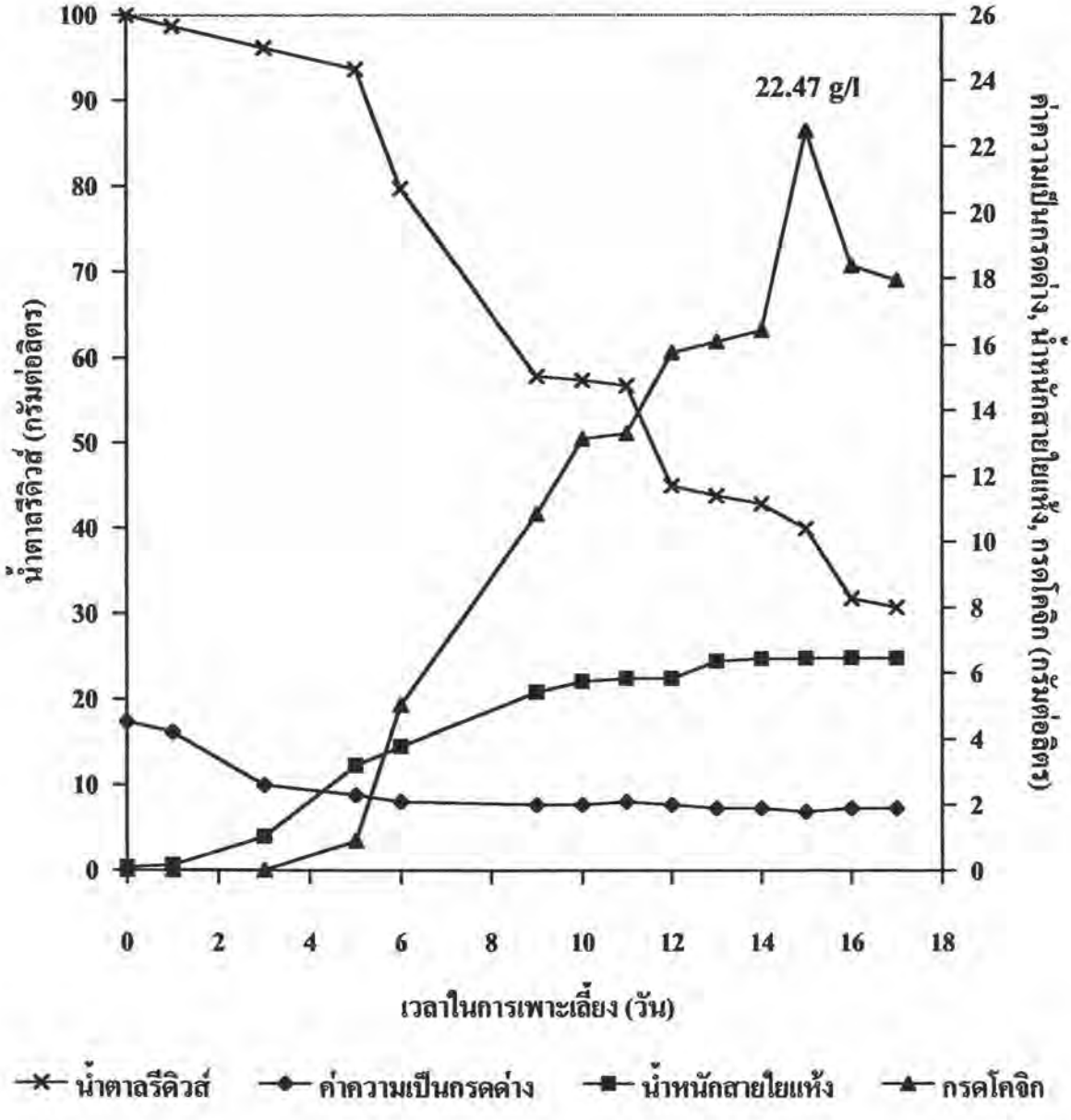


รูปที่ 31 ปริมาณกรดโคจิก การใช้น้ำตาล ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำหนักสายใยแห้งในระหว่างการผลิตโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.25 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

(ก)

(ข)

รูปที่ 32 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.25 ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาซลเซียส นาน 17 วัน

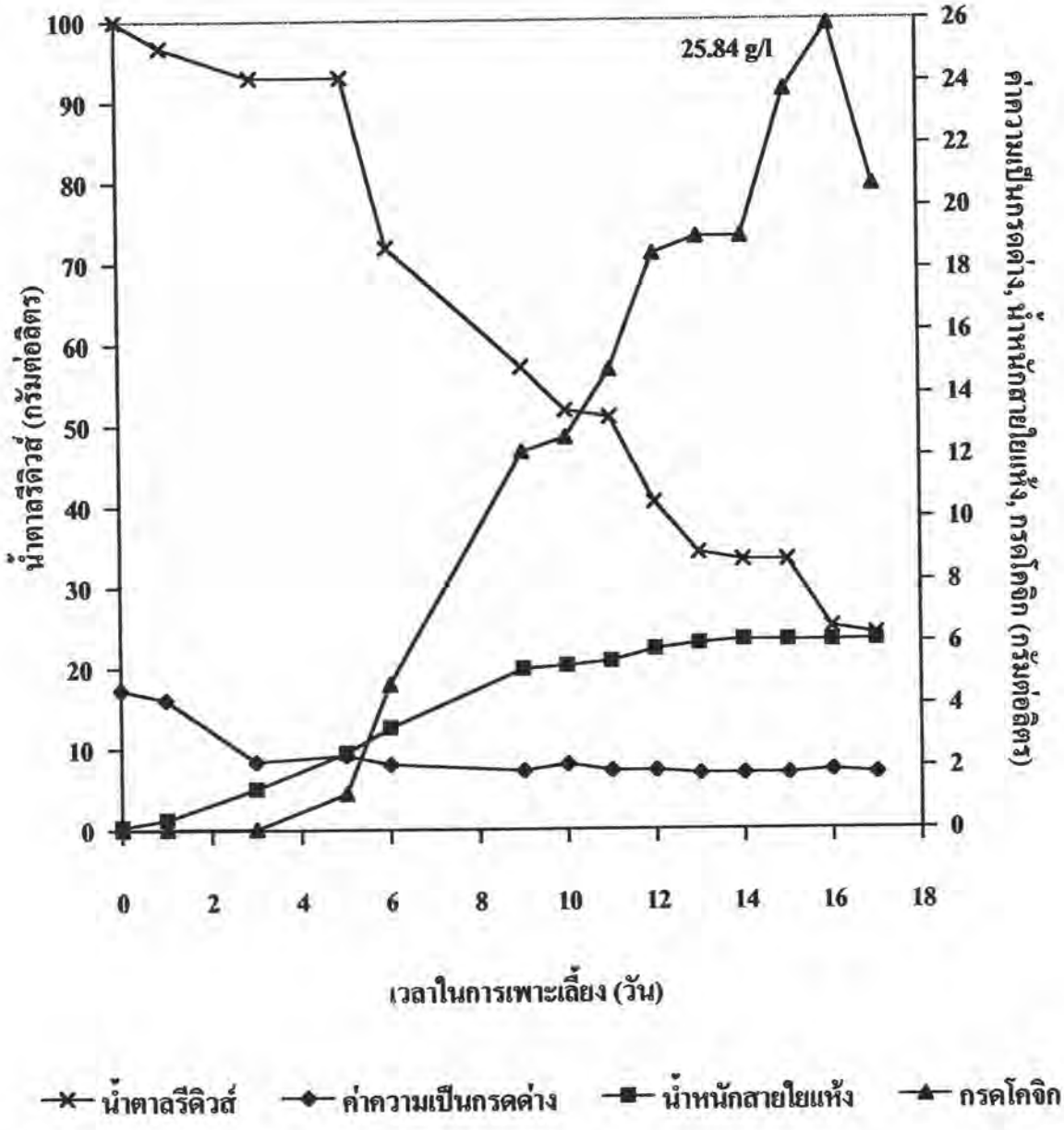


รูปที่ 33 ปริมาณกรดโคจิก การใช้น้ำตาล ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำหนักสายใยแห้ง ในระหว่างการผลิตโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส

(ก)

(ข)

รูปที่ 34 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.5 ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 17 วัน

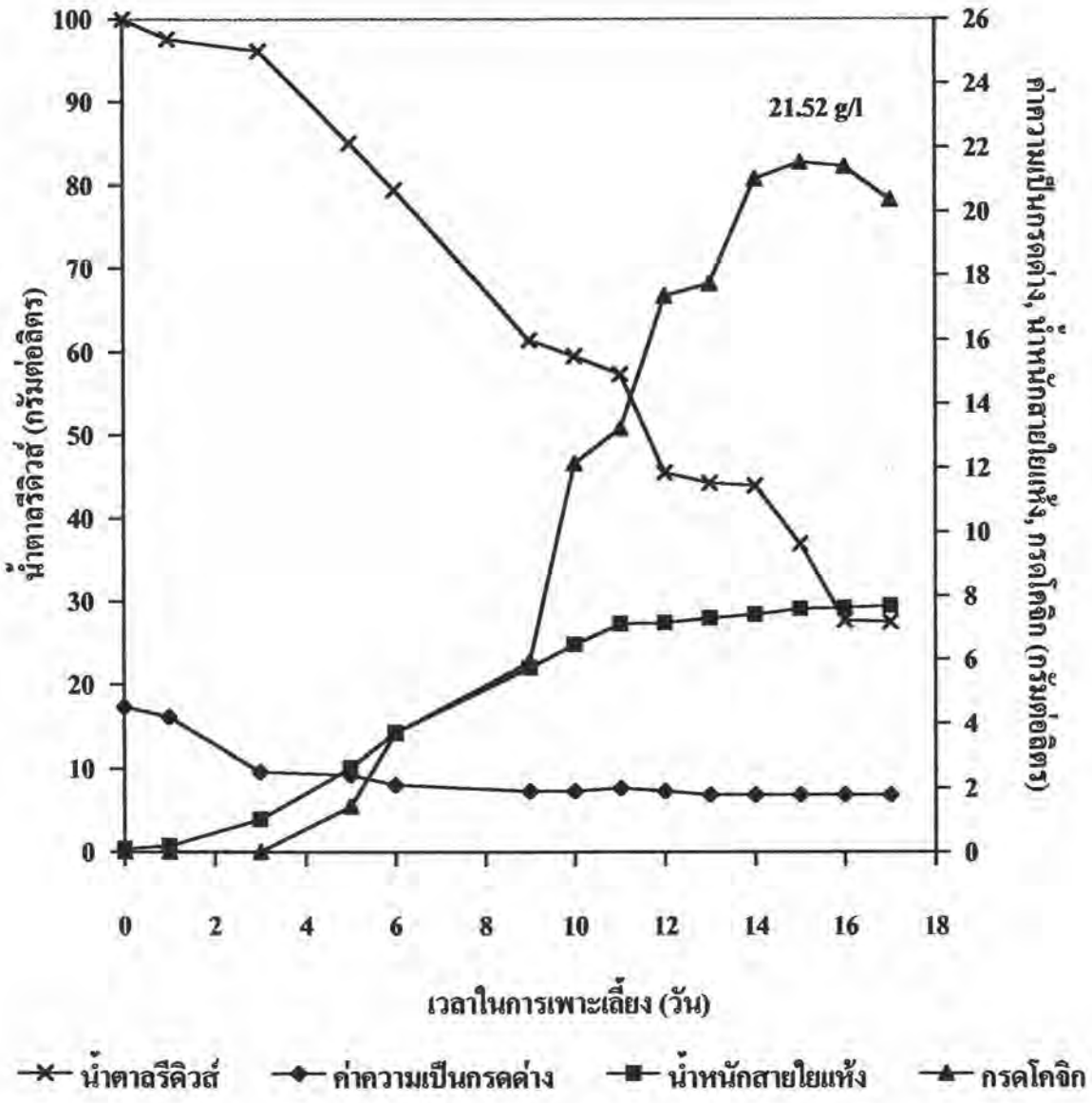


รูปที่ 35 ปริมาณกรดโคจิก การใช้น้ำตาล ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำหนักสายใยแห้งในระหว่างการผลิตโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.75 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

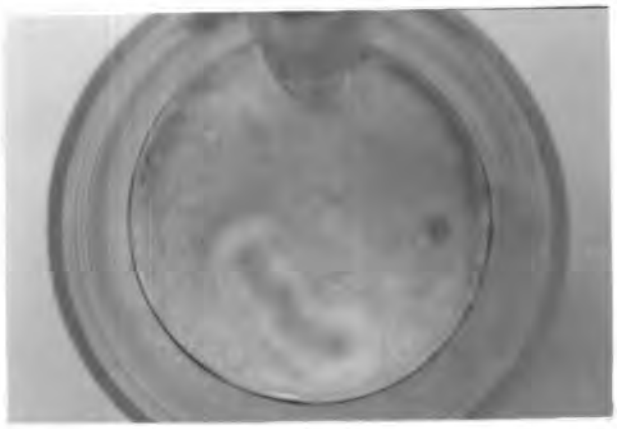
(ก)

(ข)

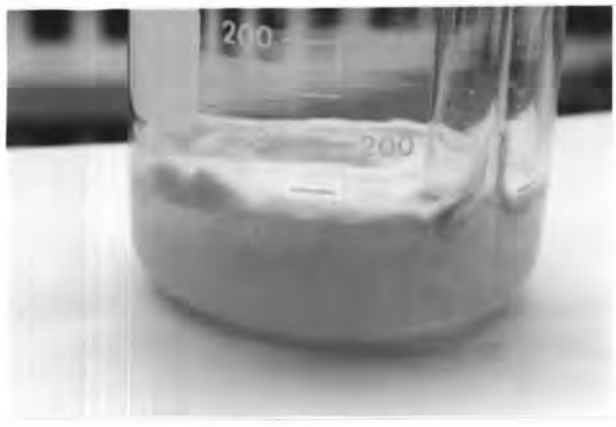
รูปที่ 36 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.75 ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 17 วัน



รูปที่ 37 ปริมาณกรดโคจิก การใช้น้ำตาล ค่าความเป็นกรดด่าง และน้ำหนักสายใยแห้งในระหว่างการผลิตโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 2.0 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส

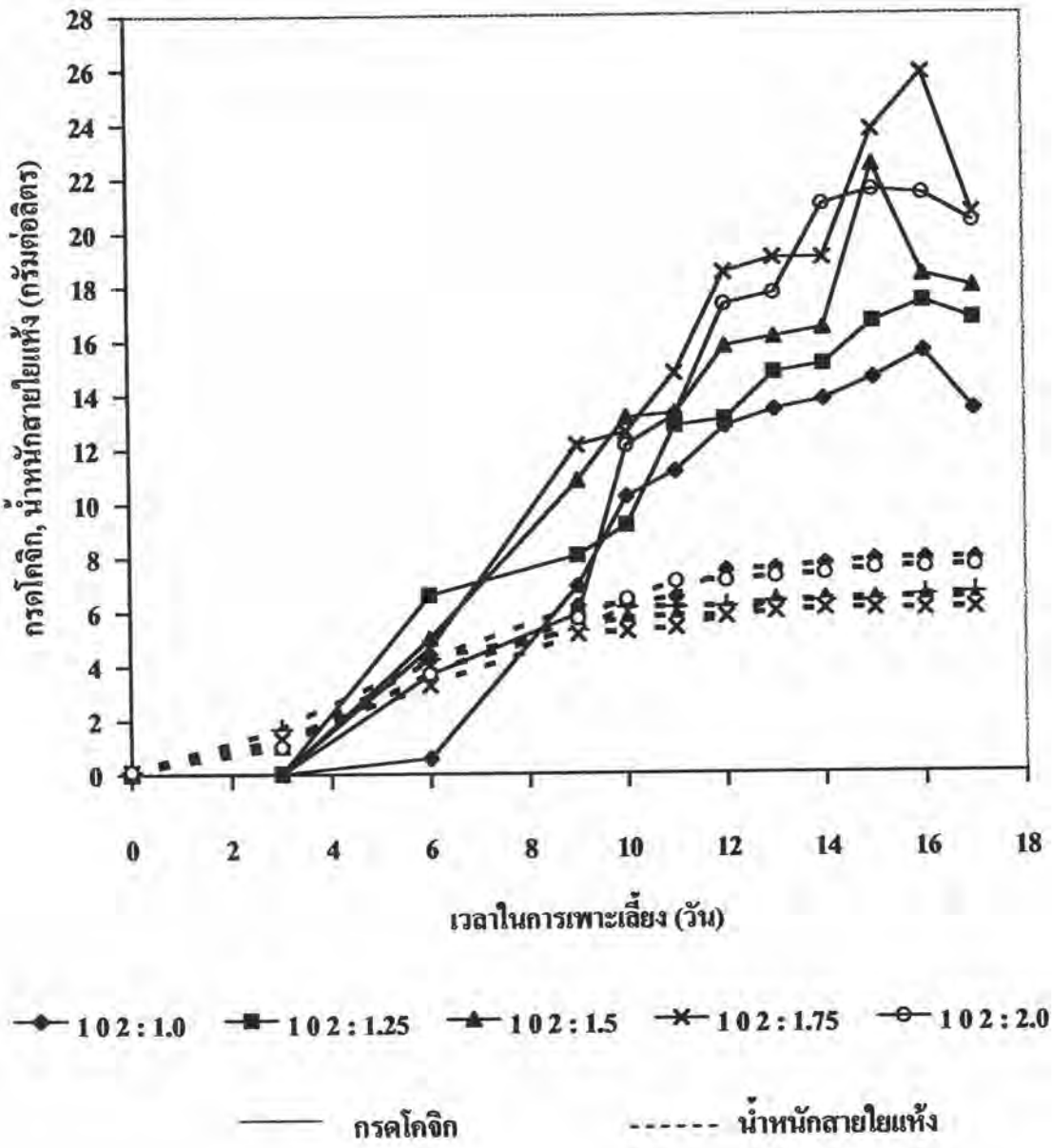


(ก)

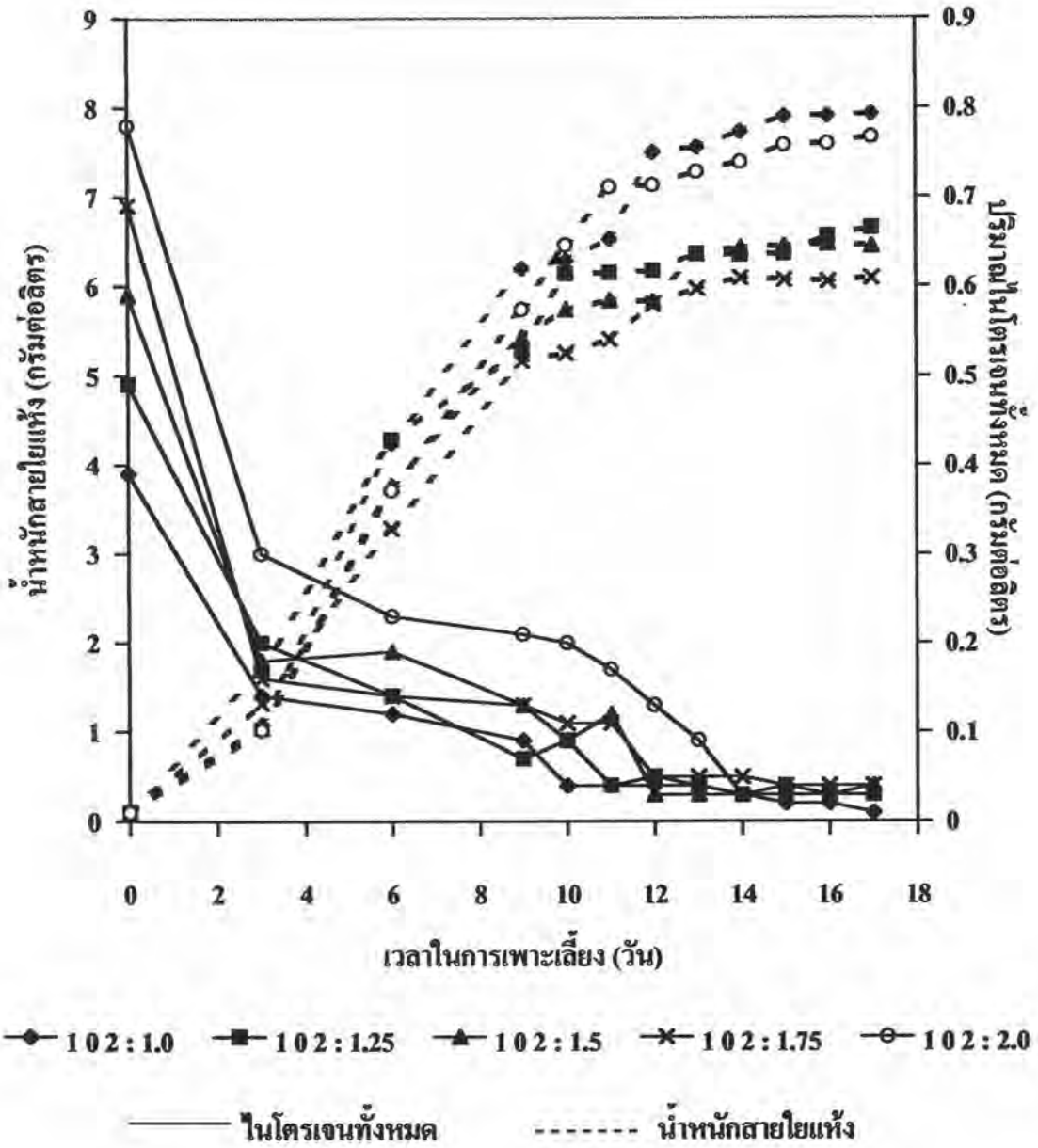


(ข)

รูปที่ 38 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 2.0 ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 17 วัน



รูปที่ 39 เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิก และน้ำหนักสายใยแห้งในระหว่างการผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่แปรอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน



รูปที่ 40 เปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และน้ำหนักสายใยแห้ง ในระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่แปรอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างกัน

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพในการผลิตกรดโคจิกจากการแปรอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่างกัน

อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน	ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ (กรัมต่อลิตร) *	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร) *	วันที่ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุด (วัน)	อัตราการผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตรต่อวัน) *	น้ำหนักสายใยแห้ง (กรัมต่อลิตร) *	$Y_{p/s}$ *	$Y_{p/x}$ *
102 : 1.0	62.70	15.56	16	0.97	7.91	0.25	1.97
102 : 1.25	63.89	18.21	16	1.14	6.56	0.29	2.78
102 : 1.5	60.00	22.47	15	1.50	6.45	0.38	3.48
102 : 1.75	75.00	25.84	16	1.62	6.05	0.35	4.27
102 : 2.0	62.98	21.52	15	1.44	7.58	0.34	2.84

หมายเหตุ * หมายถึง คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

3. ผลการหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก โดยคงค่าอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

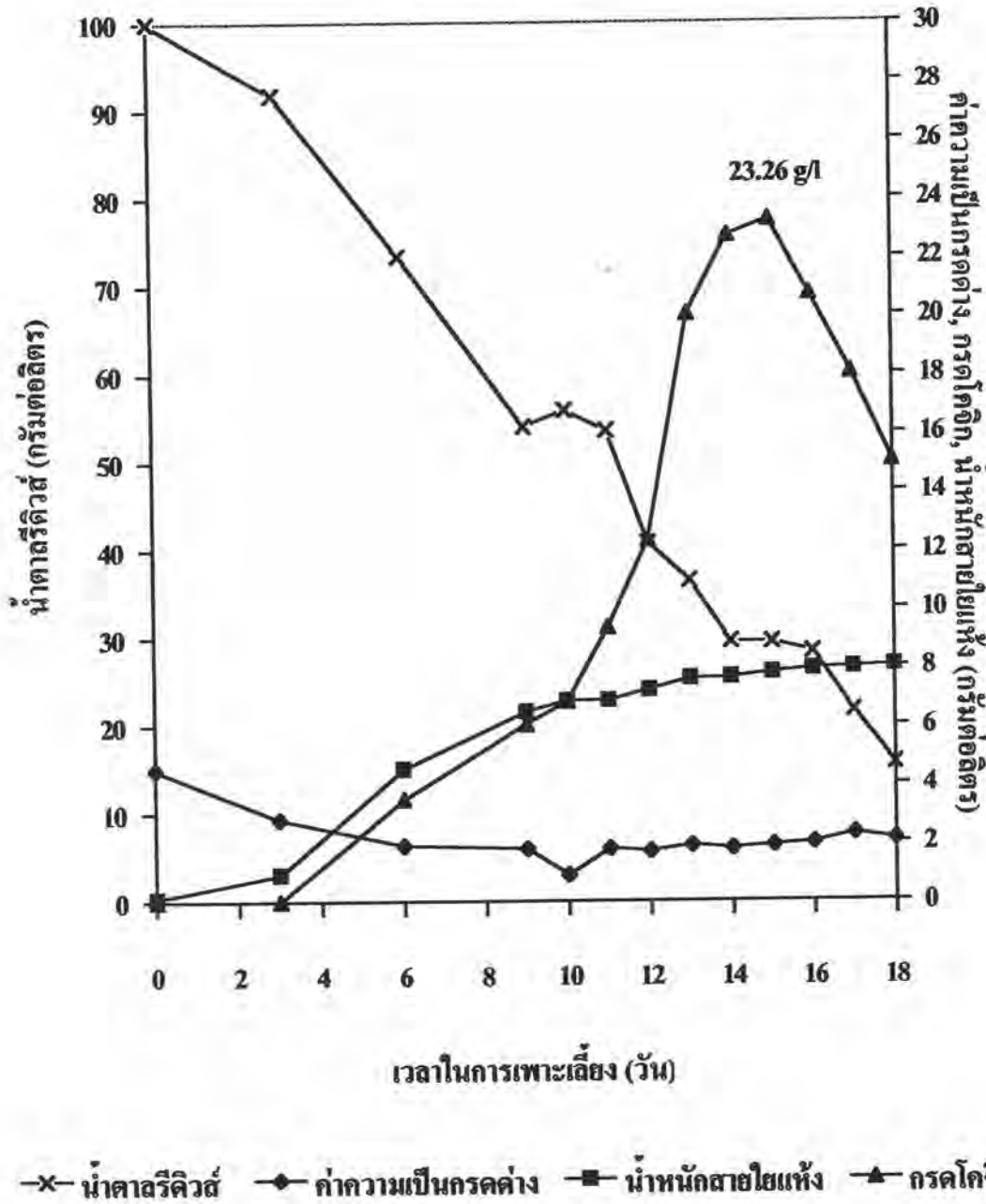
เมื่อได้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดความสมดุลย์ระหว่างการเติบโตและการผลิตกรดโคจิกซึ่งทำให้ได้ผลผลิตกรดสูงแล้ว จึงหาปริมาณของคาร์บอนสูงสุดที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการแปรปริมาณของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 75 100 125 150 175 และ 200 กรัมต่อลิตร โดยยังคงค่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนให้เหมาะสมคือ เท่ากับ 102 : 1.75 เท่ากันในแต่ละการทดลอง คือ ใช้สารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร ใช้แอมโมเนียมไนเตรตเท่ากับ 1.324 1.814 2.304 2.794 3.284 และ 3.774 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลจากการทดลองพบว่า ถ้าปริมาณน้ำตาลตั้งต้นสูงนั่นคือมีปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงจะส่งผลให้ผลิตกรดโคจิกได้สูงขึ้นด้วย แต่ถ้าปริมาณน้ำตาลตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไปคือมากกว่า 175 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกรดโคจิกที่สร้างจะลดลง โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลตั้งต้นเท่ากับ 175

กรัมต่อลิตรให้ผลผลิตกรดสูงกว่าปริมาณน้ำตาลตั้งต้นอื่นคือเท่ากับ 26.74 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยง ดังรูปที่ 45 และ 47 รองลงมาคือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลตั้งต้นเท่ากับ 125 100 และ 150 กรัมต่อลิตร โดยให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 23.73 23.26 และ 22.83 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 15 และ 16 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ (รูปที่ 43 42 44 และ 47 ตามลำดับ) ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณ น้ำตาลตั้งต้นเท่ากับ 200 และ 75 กรัมต่อลิตร ราผลิตกรดโคจิกได้น้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลตั้งต้นอื่นๆ ดังรูปที่ 46 41 และ 47 ตามลำดับ โดยพบว่าจะให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 18.57 และ 16.03 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 และ 16 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ส่วนค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลตั้งต้น 75 100 125 150 175 และ 200 กรัมต่อลิตร พบว่ามีแบบแผนการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างใกล้เคียงกัน โดยจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยง และเริ่มคงที่หลังจากวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นช่วงที่มีการสร้างกรดสูงโดยให้ค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 1.6 – 1.9 (รูปที่ 41 – 46)

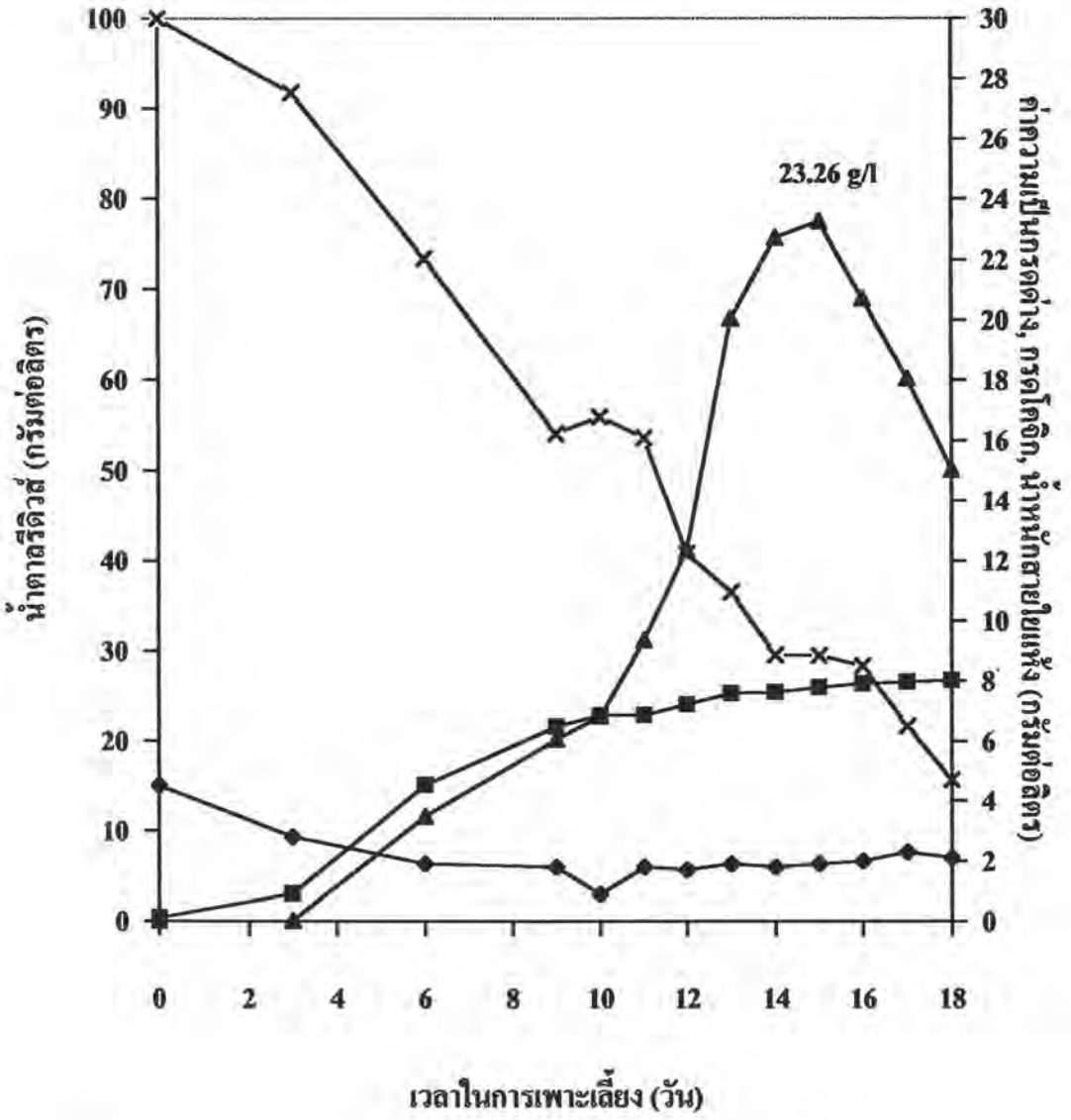
ส่วนการเติบโตของสายใยในระหว่างการผลิตกรดโคจิก พบว่าเมื่อมีปริมาณน้ำตาลตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมากจะทำให้มีการเติบโตของสายใยสูงยกเว้นในกรณีที่มีปริมาณน้ำตาลตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไปจะทำให้รามีการเติบโตช้าลง โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลตั้งต้นเท่ากับ 75 และ 100 กรัมต่อลิตร มีแบบแผนการเติบโตเดียวกัน โดยมีการเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง และเมื่อเพาะเลี้ยงจนถึงวันที่ 12 ราเริ่มเติบโตช้าลงจนเกือบจะคงที่ และพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองจะให้น้ำหนักสายใยแห้งสูงสุดไม่สูงมากนักคือ เท่ากับ 6.43 และ 8.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 41 และ 42 ตามลำดับ) ส่วนลักษณะการเติบโตของสายใยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลตั้งต้นเท่ากับ 125 150 และ 175 กรัมต่อลิตร พบว่ามีการเติบโตเพิ่มขึ้นตลอดช่วงการผลิต และให้การเติบโตสูงกว่าที่ปริมาณน้ำตาลตั้งต้น 75 และ 100 กรัมต่อลิตร มากคือเมื่อสิ้นสุดการทดลองจะให้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 13.36 12.67 และ 15.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 43 44 และ 45 ตามลำดับ) ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลตั้งต้นเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร ในช่วงแรกจะมีการเติบโตช้ากว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งต้น 125 150 และ 175 กรัมต่อลิตร แต่หลังวันที่ 12 ราเริ่มมีการเติบโตเร็วขึ้น เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะให้น้ำหนักสายใยแห้งสูงสุดเท่ากับ 14.31 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 46

สำหรับการใช้น้ำตาลพบว่ามีแบบแผนการใช้น้ำตาลเดียวกัน และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 17) พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลตั้งต้นเท่ากับ 75 100 125 150 175 และ 200 กรัมต่อลิตร จะเหลือน้ำตาลรีดิวส์เรียงจากน้อยไปหามากตามลำดับคือ เท่ากับ 8.67 15.67 19.55 42.46 64.64 และ 72.95 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 41 – 46 ตามลำดับ)

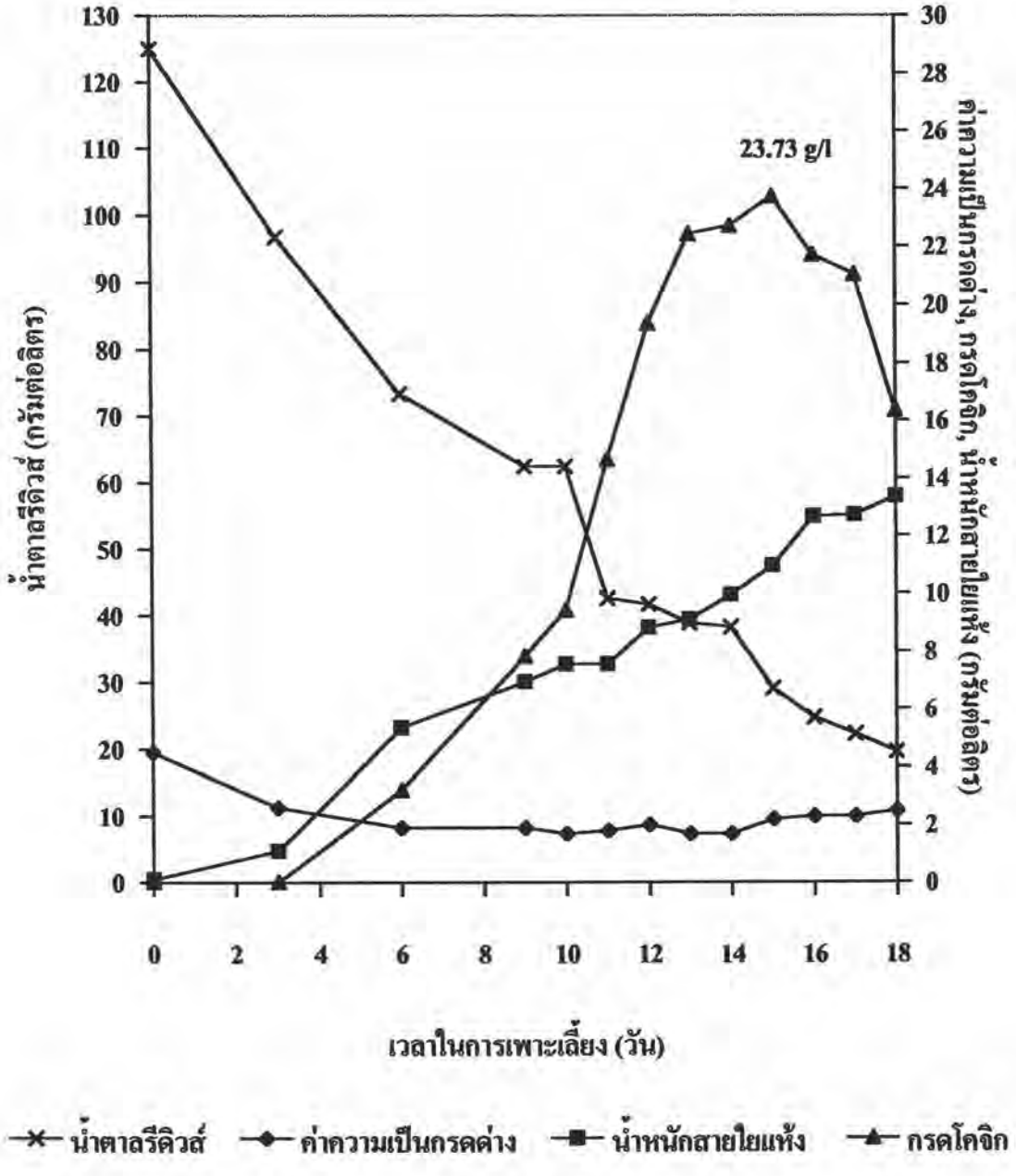
เมื่อเปรียบเทียบถึงประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดโคจิก ($Y_{p/x}$) และประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ ($Y_{p/s}$) พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร จะมีค่าสูงที่สุดคือ เท่ากับ 2.99 และ 0.33 ตามลำดับ รองลงมาคือที่ปริมาณน้ำตาลตั้งต้นน้อยกว่า 100 กรัมต่อลิตรคือ 75 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่า $Y_{p/x}$ และ $Y_{p/s}$ เท่ากับ 2.51 และ 0.25 ตามลำดับ และสำหรับที่ปริมาณน้ำตาลตั้งต้นมากกว่า 100 กรัมต่อลิตร คือ 125 150 175 และ 200 กรัมต่อลิตร จะมีค่า $Y_{p/x}$ เรียงลำดับจากมากไปหาน้อยตามลำดับคือ 2.17 2.07 1.81 และ 1.71 และมีค่า $Y_{p/s}$ เท่ากับ 0.25 0.22 0.24 และ 0.17 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อมีปริมาณน้ำตาลตั้งต้นสูง ถึงแม้จะให้การเติบโตที่มากแต่ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิกกลับต่ำกว่าที่ปริมาณน้ำตาลตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร ดังเช่นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลตั้งต้น 175 กรัมต่อลิตร จะให้ปริมาณกรดโคจิกสูงที่สุดแต่ปริมาณกรดก็ไม่สูงเท่าที่ควร ส่วนที่ปริมาณน้ำตาลตั้งต้น 75 กรัมต่อลิตร ก็พบว่าให้ประสิทธิในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิกสูงแต่เนื่องจากปริมาณน้ำตาลตั้งต้นต่ำเกินไปจึงผลิตกรดได้น้อย (ตารางที่ 12)



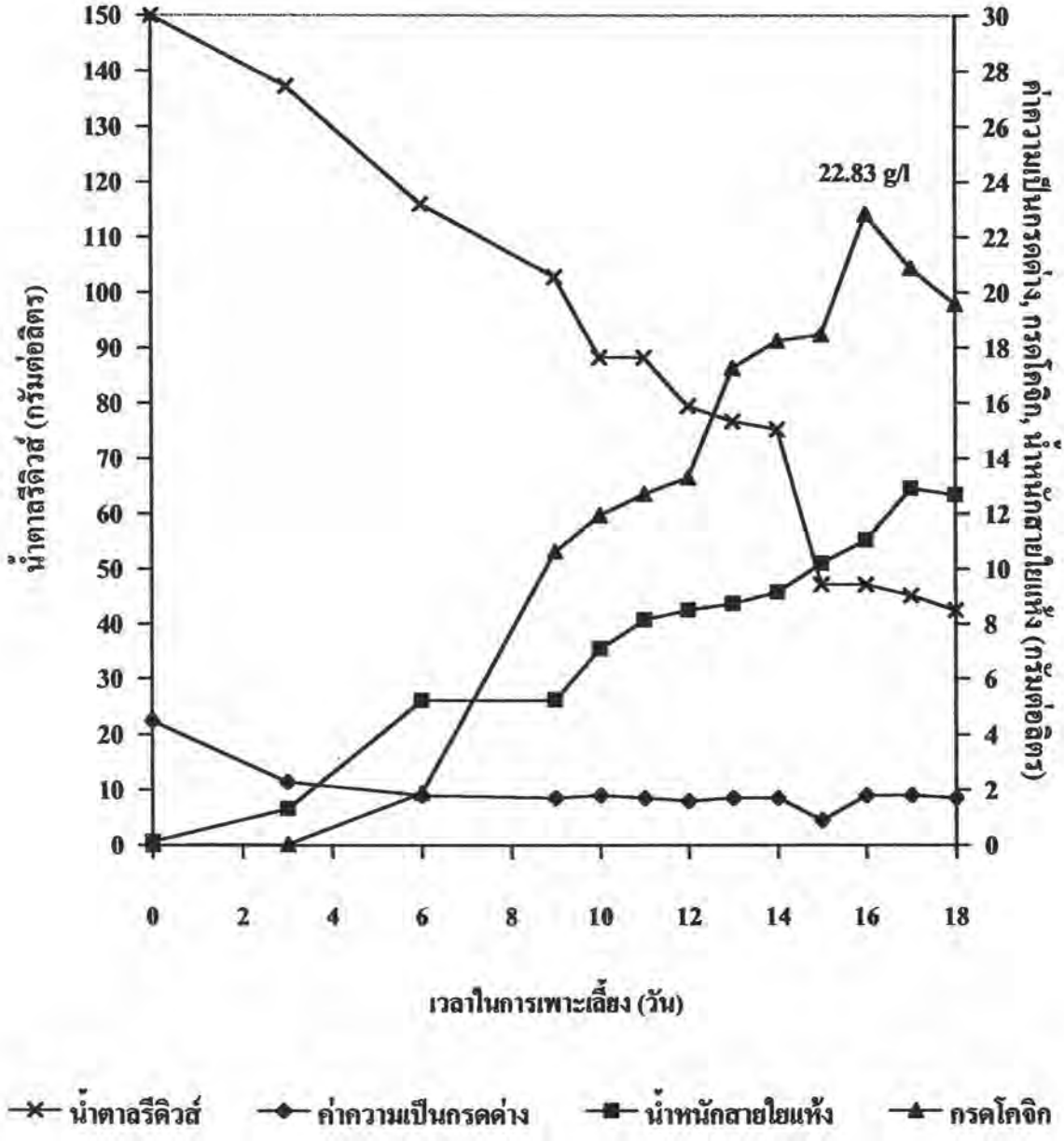
รูปที่ 41 น้ำหนักสายใยแห้ง การใช้น้ำตาล ปริมาณกรดโคจิก และค่าความเป็นกรดด่าง ในระหว่างการผลิตจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ที่มีน้ำตาลกลูโคสในปริมาณ 75 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส



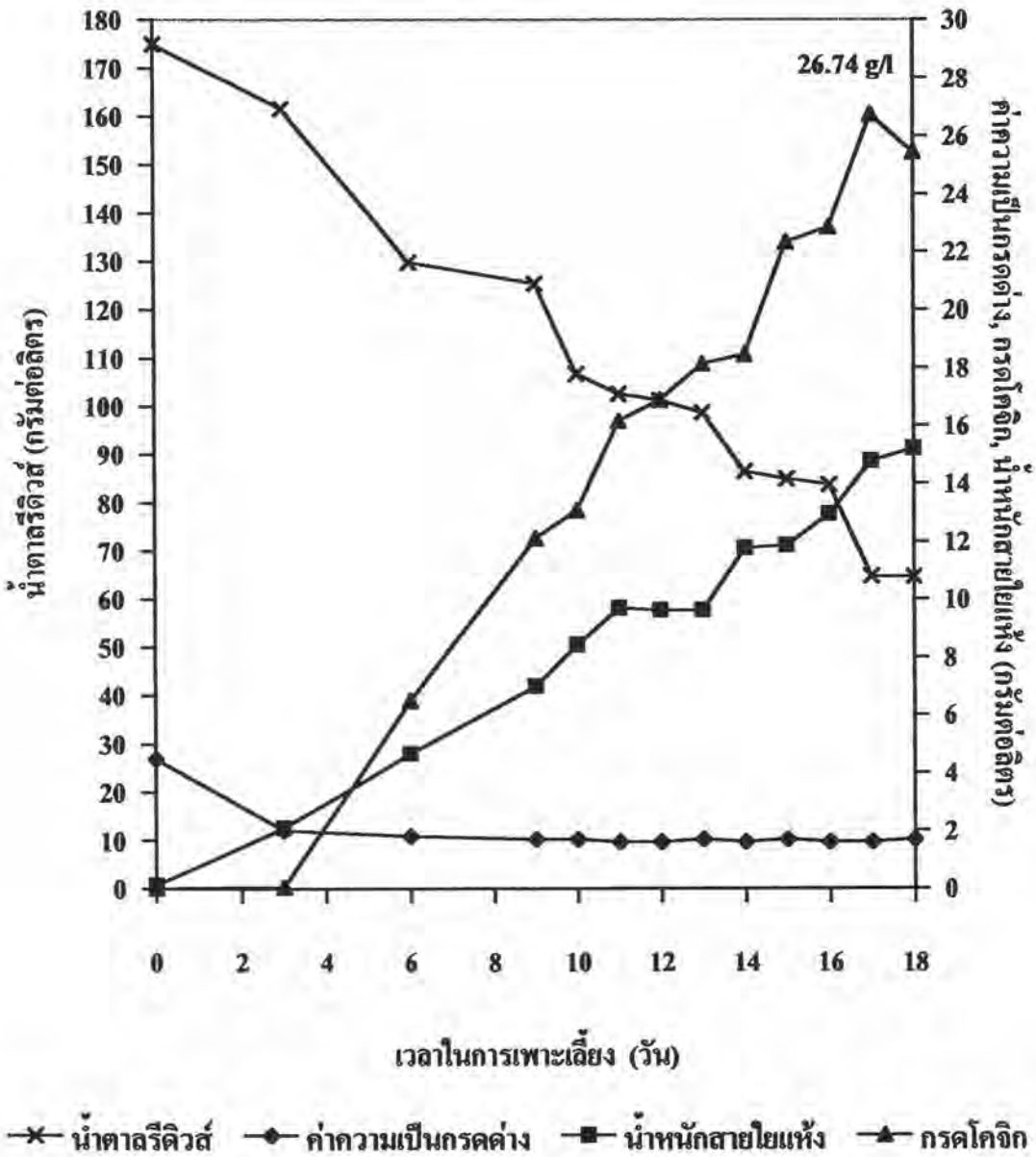
รูปที่ 42 น้ำหนักสายใยแห้ง การใช้น้ำตาล ปริมาณกรดโคจิก และค่าความเป็นกรดด่าง ในระหว่างการผลิตจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคสในปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส



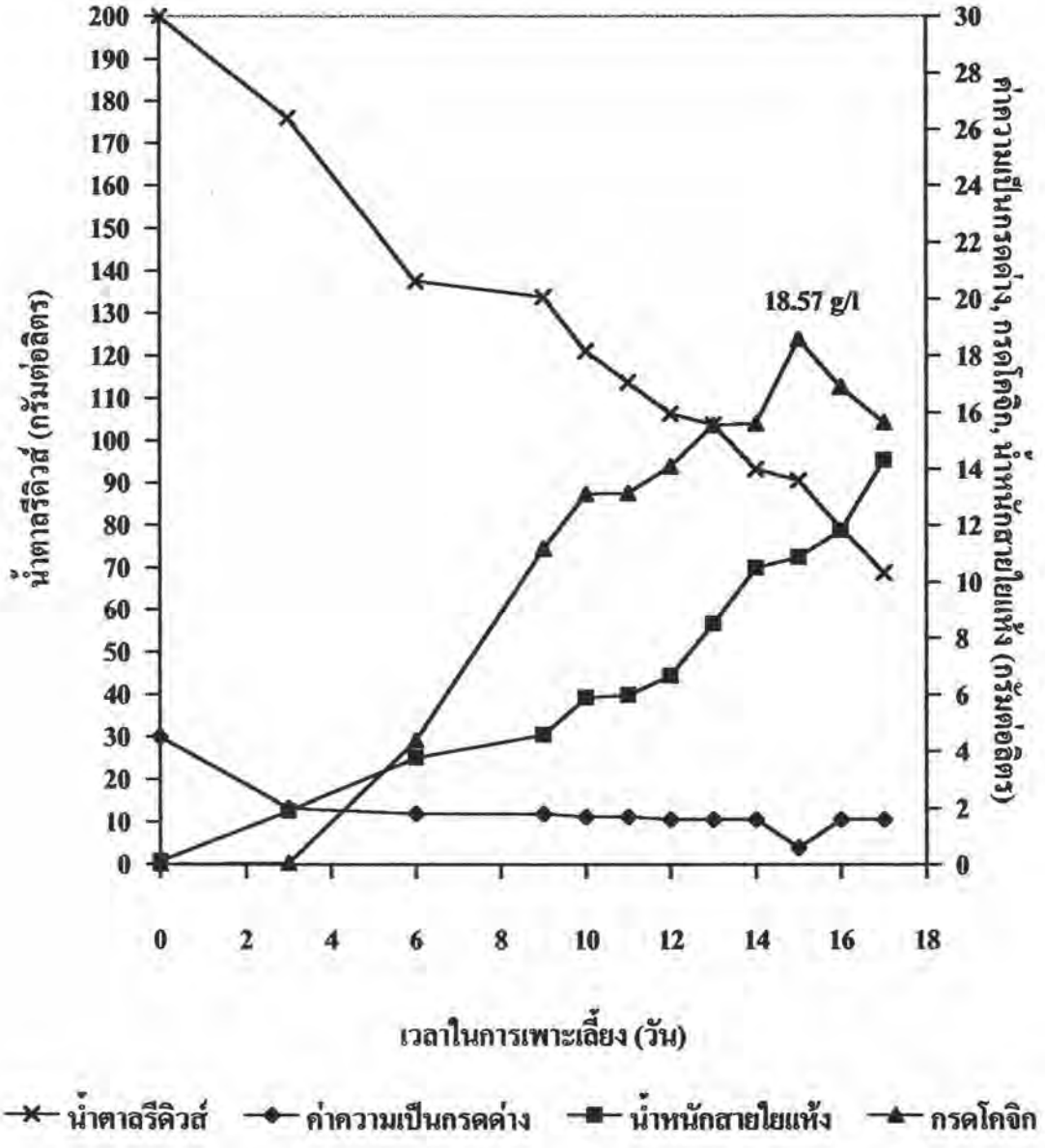
รูปที่ 43 น้ำหนักสายใยแห้ง การใช้น้ำตาล ปริมาณกรดโคจิก และค่าความเป็นกรดด่าง ในระหว่างการผลิตจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคสในปริมาณ 125 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส



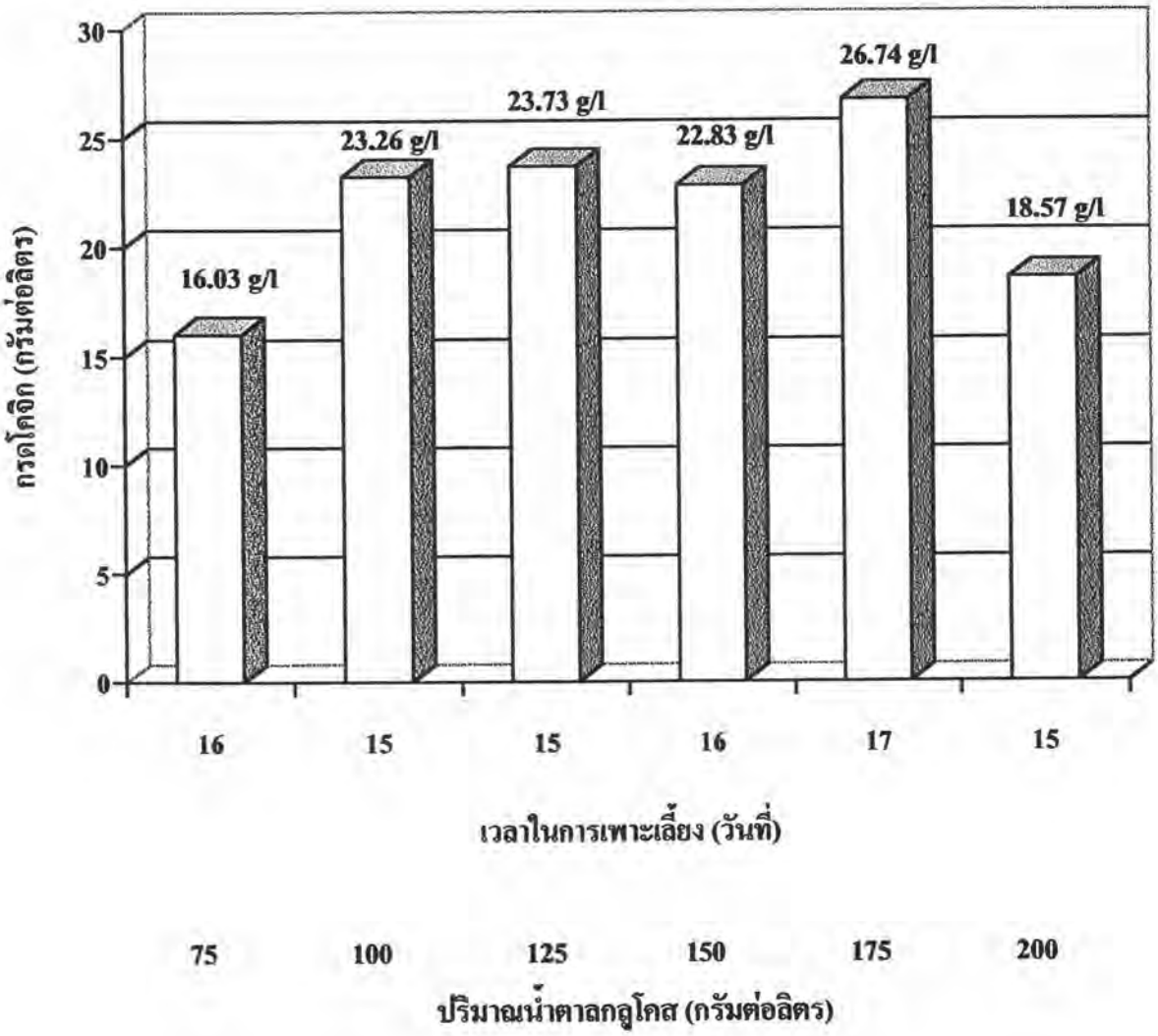
รูปที่ 44 น้ำหนักสายใยแห้ง การใช้น้ำตาล ปริมาณกรดโคจิก และค่าความเป็นกรดด่าง ในระหว่างการผลิตจากการเพาะเลี้ยง *A: oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ที่มีน้ำตาลกลูโคสในปริมาณ 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส



รูปที่ 45 น้ำหนักสายใยแห้ง การใช้น้ำตาล ปริมาณกรดโคจิก และค่าความเป็นกรดด่าง ในระหว่างการผลิตจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ที่มีน้ำตาลกลูโคสในปริมาณ 175 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส



รูปที่ 46 น้ำหนักสายใยแห้ง การใช้น้ำตาล ปริมาณกรดโคจิก และค่าความเป็นกรดด่าง ในระหว่างการผลิตจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ที่มีน้ำตาลกลูโคสในปริมาณ 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส



รูปที่ 47 เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 12 ประสิทธิภาพในการผลิตกรดโคจิก จากการแปรปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ (กรัมต่อลิตร)	วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด (วัน)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตรต่อวัน) *	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร) *	ร้อยละของปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ *	น้ำหนักสายใยแห้ง (กรัมต่อลิตร) *	$Y_{p/s}$ *	$Y_{p/x}$ *
75	16	16.03	1.00	63.33	84.44	6.39	0.25	2.51
100	15	23.26	1.55	70.5	70.50	7.79	0.33	2.99
125	15	23.73	1.58	95.9	76.72	10.96	0.25	2.17
150	16	22.83	1.43	102.92	68.61	11.04	0.22	2.07
175	17	26.74	1.57	110.25	63.00	14.78	0.24	1.81
200	15	18.57	1.24	109.39	54.70	10.86	0.17	1.71

หมายเหตุ * หมายถึง คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

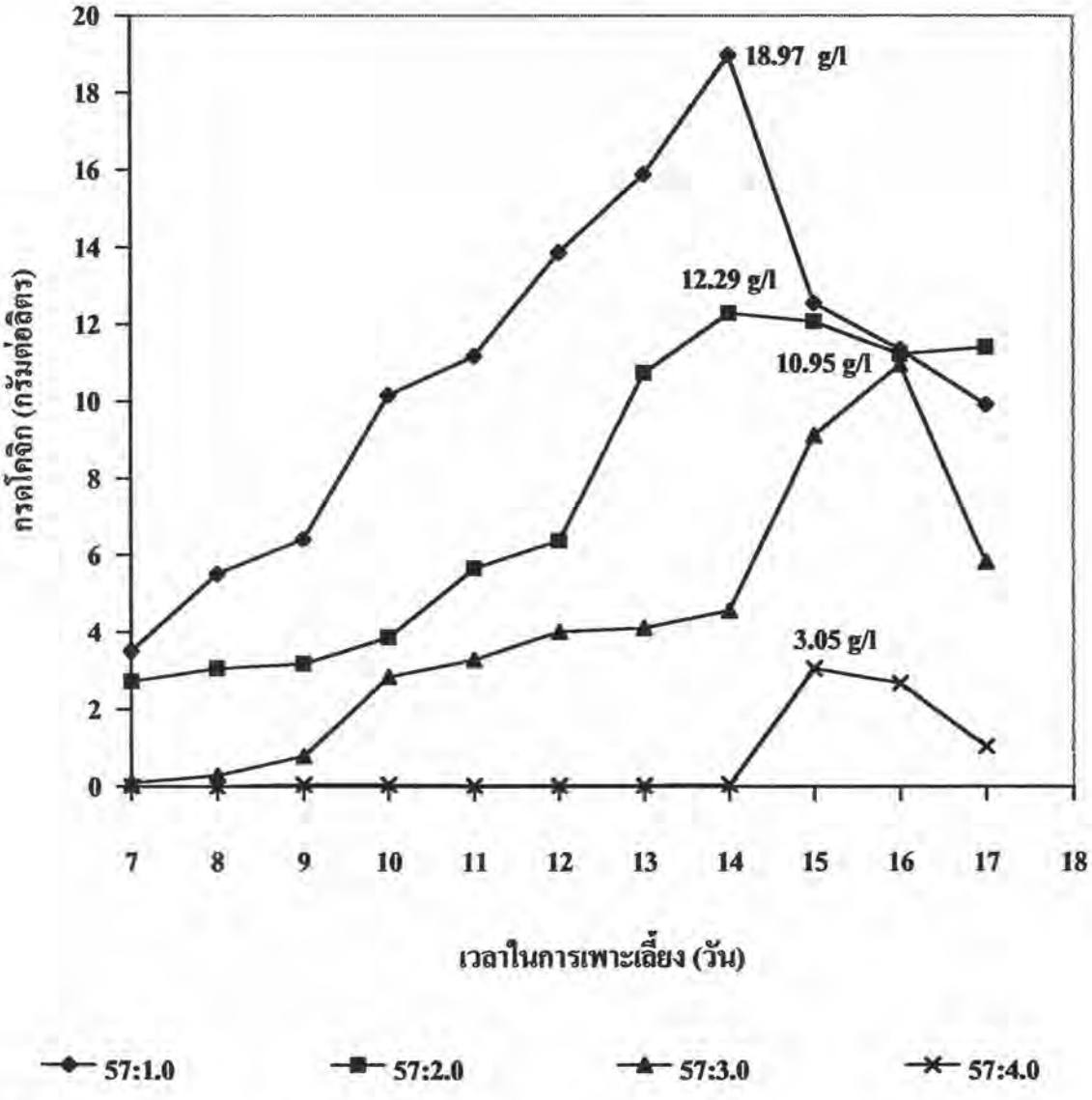
จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าที่ปริมาณน้ำตาลตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร ยังคงเป็นปริมาณน้ำตาลตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกภายใต้อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.75 ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 ที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.75 โดยมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ในการทดลองขั้นต่อไป

4. ผลการหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเพื่อการผลิตกรดโคจิก

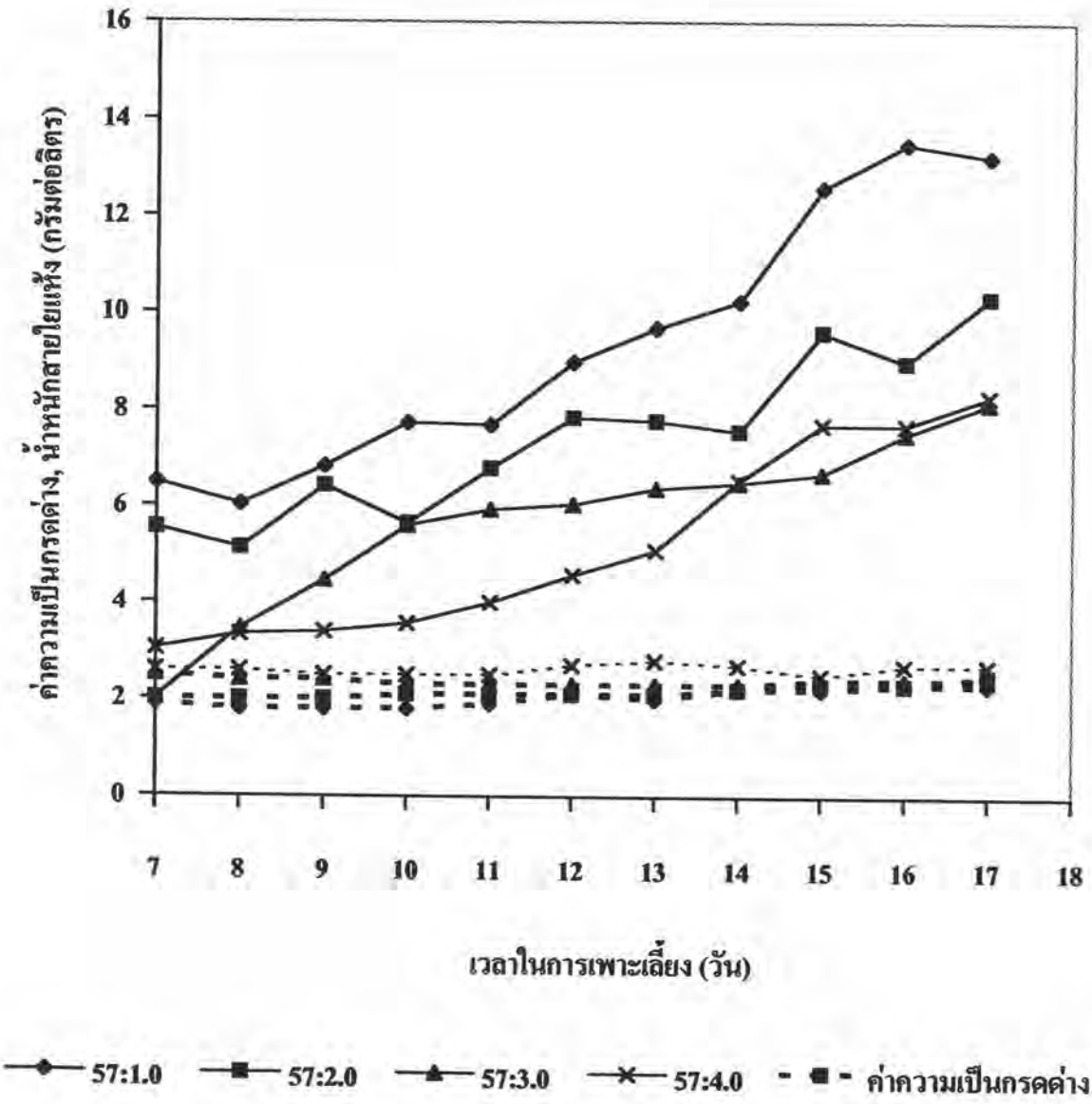
เมื่อทำการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวสูตรเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก12) ในภาชนะแก้วรูปทรงกระบอกที่มีพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 57 ตารางเซนติเมตร แล้วทำการแปรความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1 2 3 และ 4 เซนติเมตร และจัดให้มีปริมาณของสารอาหารและขนาด

หัวเชื้อเท่ากันในทุกๆความสูงที่แปรคือ มีปริมาตรของอาหารเหลวสูตรเหมาะสมเท่ากับ 53 มิลลิลิตร (คิดเป็นปริมาณคาร์บอนเท่ากับ 5.3 กรัม) และความหนาแน่นของหัวเชื้อเท่ากับ $2 - 4 \times 10^7$ สปอร์ ตามลำดับ โดยปริมาตรของ อาหารเหลวที่ 53 มิลลิลิตร เป็นปริมาตรที่ทำให้ได้ความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำปลอดประจุเพื่อให้ได้ความสูงเท่ากับ 2 3 และ 4 เซนติเมตร ซึ่งจากการทดลองดังแสดงในรูปที่ 48 พบว่าเมื่อค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงมีค่าสูง นั่นคือความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยจะให้ผลผลิตกรดโคจิกและการเติบโตของสายใยสูง โดยที่อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 1.0 จะให้ปริมาณกรดโคจิกสูงกว่าอัตราส่วนอื่นคือเท่ากับ 18.97 กรัมต่อน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 100 กรัม ในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง (คิดเป็นอัตราการผลิตกรดเท่ากับ 1.36 กรัมต่อลิตรต่อวัน) (รูปที่ 48) และให้น้ำหนักสายใยแห้งสูงที่สุดคือ เท่ากับ 13.23 กรัมต่อ น้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 100 กรัม (รูปที่ 49) รองลงมาคือที่อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 2.0 57 : 3.0 และ 57 : 4.0 โดยพบว่าจะให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 12.29 10.95 และ 3.05 กรัมต่อน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 100 กรัม ในวันที่ 14 16 และ 15 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ (คิดเป็นอัตราการผลิตกรดเท่ากับ 0.88 0.68 และ 0.21 กรัมต่อลิตรต่อวัน ตามลำดับ) (รูปที่ 48) และให้น้ำหนักสายใยแห้งสูงสุดเท่ากับ 10.31 8.14 และ 8.28 กรัมต่อน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 100 กรัม (รูปที่ 49) ค่าน้ำหนักสายใยแห้งสอดคล้องกับภาพการเติบโตดังแสดงในรูปที่ 50 - 53 คือถ้าค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงมีค่าสูงจะให้การเติบโตของสายใยเต็มผิวหน้าอาหารเหลวมากกว่า และพบว่าอัตราส่วน 57 : 1.0 จะมีการเติบโตเต็มผิวหน้าอาหารเหลวมากที่สุด และมีการสร้างสปอร์สีเหลืองแกมน้ำตาลเป็นบางจุด ในขณะที่การเติบโตของสายใยที่อัตราส่วน 57 : 2.0 57 : 3.0 และ 57 : 4.0 จะมีการเติบโตของสายใยบนผิวหน้าอาหารเหลวบางๆ และมีการสร้างสปอร์บริเวณผิวหน้าอาหารเหลวเป็นจุดๆ รวมทั้งมีการเติบโตของสายใยใต้ผิวการเติบโตมากกว่าที่ผิวหน้าอาหารเหลว ส่วนค่าความเป็นกรดด่างที่อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 1.0 และ 57 : 2.0 พบว่าจะให้ค่าความเป็นกรดด่างต่ำโดยในช่วงที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูง ให้ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 1.8 – 2.2 ในขณะที่ค่าความเป็นกรดด่างที่อัตราส่วน 57 : 3.0 ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงจะมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.5 และจะลดลงเล็กน้อยในช่วงที่ให้ผลผลิตกรดสูง โดยให้ค่า

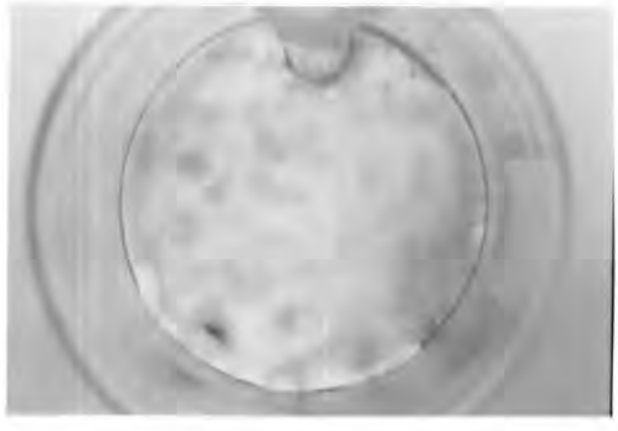
ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.3 – 2.4 ส่วนที่อัตราส่วน 57 : 4.0 พบว่าค่าความเป็นกรดด่างจะอยู่ในช่วง 2.5 – 2.8 (รูปที่ 49)



รูปที่ 48 ปริมาณกรดโคจิกในระหว่างการผลิต จากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่บรรจุในภาชนะแก้วรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร ความสูงเท่ากับ 10.0 เซนติเมตร โดยแปรอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงต่างๆ



รูปที่ 49 การเติบโตและการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างระหว่างการผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่บรรจุในภาชนะแก้วรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร และความสูงเท่ากับ 10.0 เซนติเมตร โดยแปรอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงต่างๆ

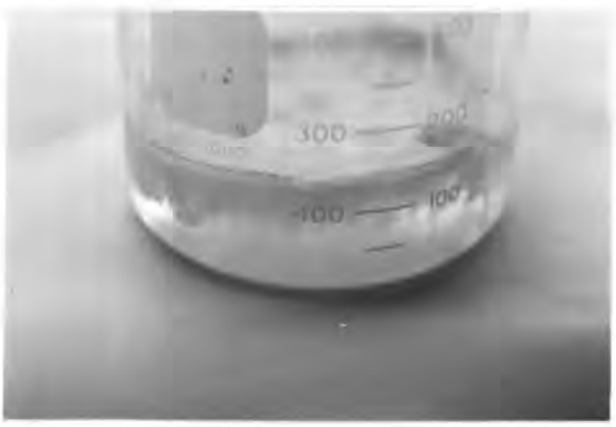


(ก)

(ข)

รูปที่ 50 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวในภาชนะรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร และความสูง 10.0 เซนติเมตร โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 1.0 ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 17 วัน

(ก)



(ข)

รูปที่ 51 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวในภาชนะรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร และความสูง 10.0 เซนติเมตร โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 2.0 ที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2องศาเซลเซียส นาน 17 วัน

(ก)

(ข)

รูปที่ 52 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวในภาชนะรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร และความสูง 10.0 เซนติเมตร โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 3.0 ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 17 วัน

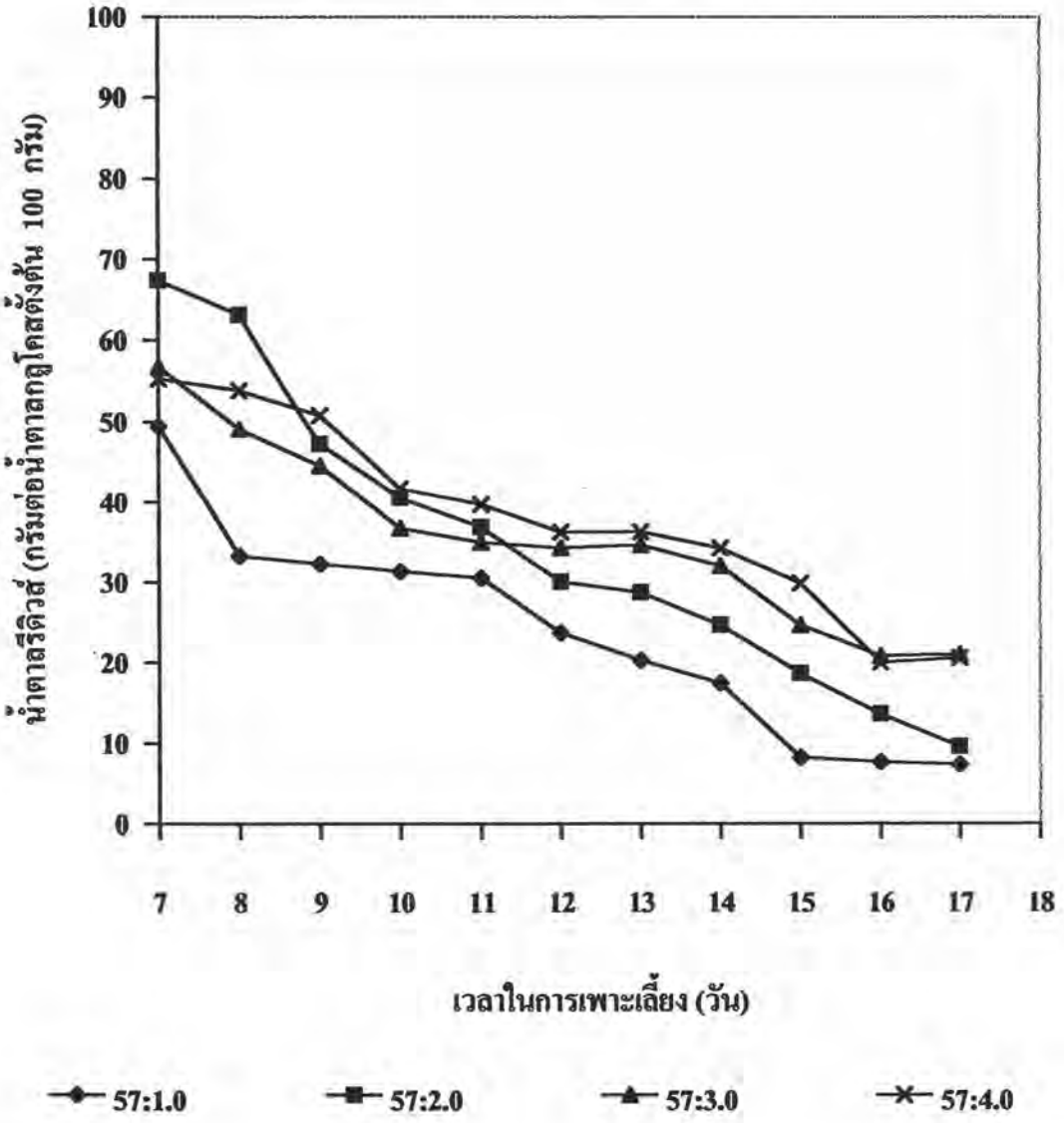
(ก)

(ข)

รูปที่ 53 ภาพถ่ายจากด้านบน (ก) และด้านข้าง (ข) ของภาชนะแสดงลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใย *A. oryzae* K13 ที่เพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวในภาชนะรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร และความสูง 10.0 เซนติเมตร โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 4.0 ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 17 วัน

สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ พบว่าที่อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงที่สูงจะให้การเติบโตสูงดังกล่าวแล้วข้างต้นจึงทำให้ใช้น้ำตาลมากกว่าที่อัตราส่วนอื่น และพบว่าการใช้น้ำตาลโดยรวมของทุกอัตราส่วนมีแบบแผนการใช้น้ำตาลเดียวกัน และอัตราส่วนที่มีการใช้น้ำตาลมากจะมีผลทำให้ผลิตกรดและสร้างสายใยสูง เมื่อสิ้นสุดการทดลองอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 1.0 57 : 2.0 57 : 3.0 และ 57 : 4.0 เหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เท่ากับ 7.38 9.57 21.07 และ 20.06 กรัมต่อน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น 100 กรัม (รูปที่ 54)

เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดโคจิก พบว่าที่อัตราส่วน 57 : 1.0 สายใยมีประสิทธิภาพสูงที่สุดคือมีค่า $Y_{p/x}$ เท่ากับ 1.85 รองลงมาคือที่อัตราส่วน เท่ากับ 57 : 2.0 57 : 3.0 และ 57 : 4.0 โดยจะให้ค่า $Y_{p/x}$ เท่ากับ 1.63 1.46 และ 0.40 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 13 จะเห็นได้ว่าที่ค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงที่มีค่าสูงนั่นคือความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อน้อย จะส่งเสริมการเติบโตของสายใยทำให้มีการใช้น้ำตาลมากขึ้นซึ่งจะส่งผลต่อการผลิตกรดโคจิกให้สูงขึ้นด้วย



รูปที่ 54 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในระหว่างการผลิตกรดโคจิก จากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่บรรจุในภาชนะแก้วรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตรและความสูงเท่ากับ 10.0 เซนติเมตร โดยแปรอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงต่างๆ

ตารางที่ 13 ประสิทธิภาพในการผลิตกรดโคจิก ณ วันที่ให้ผลผลิตสูงสุด เมื่อแปรอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงต่างๆกัน

พื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูง	พื้นที่ผิวต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ	อาหารเหลว (มิลลิลิตร)			ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร) *		ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อน้ำตาลกลูโคส 100 กรัม) *	อัตราการผลิตกรดโคจิก (กรัมต่อลิตรต่อวัน) *	น้ำหนักสายใยแห้ง (กรัมต่อน้ำตาลกลูโคส 100 กรัม) *	$Y_{p/x}$ *
		A	B	C	ตั้งต้น (วัน)	ที่ถูกใช้ (วันที่ให้ผลผลิตกรดสูง)				
57 :1.0	1.08	53	0	53	100 (0)	82.56(14)	18.97	1.36	10.24	1.85
57:2.0	0.54	53	52	105	100 (0)	75.32 (14)	12.29	0.88	7.56	1.63
57:3.0	0.36	53	105	158	100 (0)	79.14 (16)	10.95	0.68	7.50	1.46
57:4.0	0.27	53	157	210	100 (0)	70.14 (15)	3.09	0.20	7.70	0.40

หมายเหตุ A หมายถึง ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ

B หมายถึง ปริมาตรของน้ำปลอดประจุที่ใช้เติม

C หมายถึง ปริมาตรรวม

* หมายถึง คิดจากวันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด

จะเห็นได้ว่าจากการแปรค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูง 4 ค่า ดังการทดลองข้างต้น อัตราส่วนที่ให้ผลผลิตสูงกว่าอัตราส่วนอื่นๆคือ 57 : 1.0 (ก) ซึ่งทั้งค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูง และความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้ออาจมีผลกระทบต่อการผลิต เนื่องจากที่อัตราส่วนอื่นมีการเติมน้ำปลอดประจุเพื่อให้ได้ระดับความสูงที่แปร จึงอาจเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละความสูงจะแตกต่างกันทำให้ที่อัตราส่วนอื่นผลิตกรดได้น้อย ดังนั้นจึงทำการทดลองอีกครั้งเพื่อยืนยันเรื่องผลกระทบของความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร

เหมาะสม (ภาคผนวก ก12) เท่ากับ 105 มิลลิลิตร ทำให้ได้ความสูงเท่ากับ 2 เซนติเมตร คิดเป็นอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 2.0 และใช้หัวเชื้อ 1 มิลลิลิตร (ข.1) พบว่าการทดลอง ข.1 ให้ผลผลิตกรดสูงกว่าการทดลอง ก คือให้ผลผลิตเท่ากับ 22.15 กรัมต่อลิตรในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง ดังตารางที่ 14 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกกับผลการทดลอง ก ที่ใช้ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมลดลงครึ่งหนึ่งของการทดลอง ข.1 คือ 53 มิลลิลิตร ทำให้ได้ความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1 เซนติเมตร คิดเป็นอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 1.0 และใช้ปริมาตรหัวเชื้อเท่ากันคือ 1 มิลลิลิตร พบว่าการทดลอง ก ให้ผลผลิตน้อยกว่าการทดลอง ข.1 คือให้ผลผลิตเท่ากับ 18.97 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง ดังตารางที่ 14 จึงยืนยันให้เห็นได้ว่าแม้เพิ่มสารอาหารและความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 2 เท่า ภายใต้พื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาตรของหัวเชื้อเท่ากัน แต่ผลผลิตกรดก็ไม่ได้สูงขึ้นเป็น 2 เท่าแต่กลับสูงไม่แตกต่างกันมากนักคือสูงเพียง 3.18 กรัมต่อลิตร แสดงว่าภายใต้การทดลองนี้อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ 57 : 1.0 ยังเป็นอัตราส่วนที่ดีกว่าการทดลอง ข.1 ถึงอย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ว่าการเพิ่มปริมาณสารอาหารเป็น 2 เท่า อาจจำเป็นต้องใช้หัวเชื้อในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดโคจิกเพิ่มด้วย ดังนั้นจึงนำผลการทดลอง ก ไปเทียบกับผลการทดลองข้อ 3 ซึ่งใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ทำให้ได้ความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1.9 เซนติเมตร คิดเป็นอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 1.9 ใช้ปริมาตรของหัวเชื้อเท่ากับ 2 มิลลิลิตร (ข.2) พบว่าให้ผลผลิตกรดไล่เลี่ยกับการทดลอง ข.1 คือ เท่ากับ 23.26 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง นั่นคือแม้เพิ่มปริมาณของหัวเชื้อเป็น 2 เท่า ก็ไม่ได้ทำให้ผลผลิตสูงขึ้นกว่าเดิม แสดงว่าที่ปริมาณของหัวเชื้อ 1 มิลลิลิตร เป็นปริมาณที่เพียงพอแล้วสำหรับการผลิตกรดโคจิก ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันได้ว่าอัตราส่วน 57 : 1.0 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมกว่าอัตราส่วนอื่นในการทดลองนี้ (เมื่อเพาะเลี้ยงในภาชนะแก้วรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร และความสูง 10 เซนติเมตร)

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิก ณ วันที่ให้ผลผลิตสูงสุด เพื่อศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และความหนาแน่นของหัวเชื้อ

อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูง	ความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ (เซนติเมตร)	ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสม (มิลลิลิตร)	ความหนาแน่นของหัวเชื้อ (สปอร์)	ปริมาณกรดโคจิก (กรัมต่อลิตร)	วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด (วัน)
57 : 1.0	1.0	53	$2-4 \times 10^7$	18.97	14
57 : 2.0	2.0	105	$2-4 \times 10^7$	22.15	15
57 : 1.9	1.9	100	$4-8 \times 10^7$	23.26	15

5. ผลการหาขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

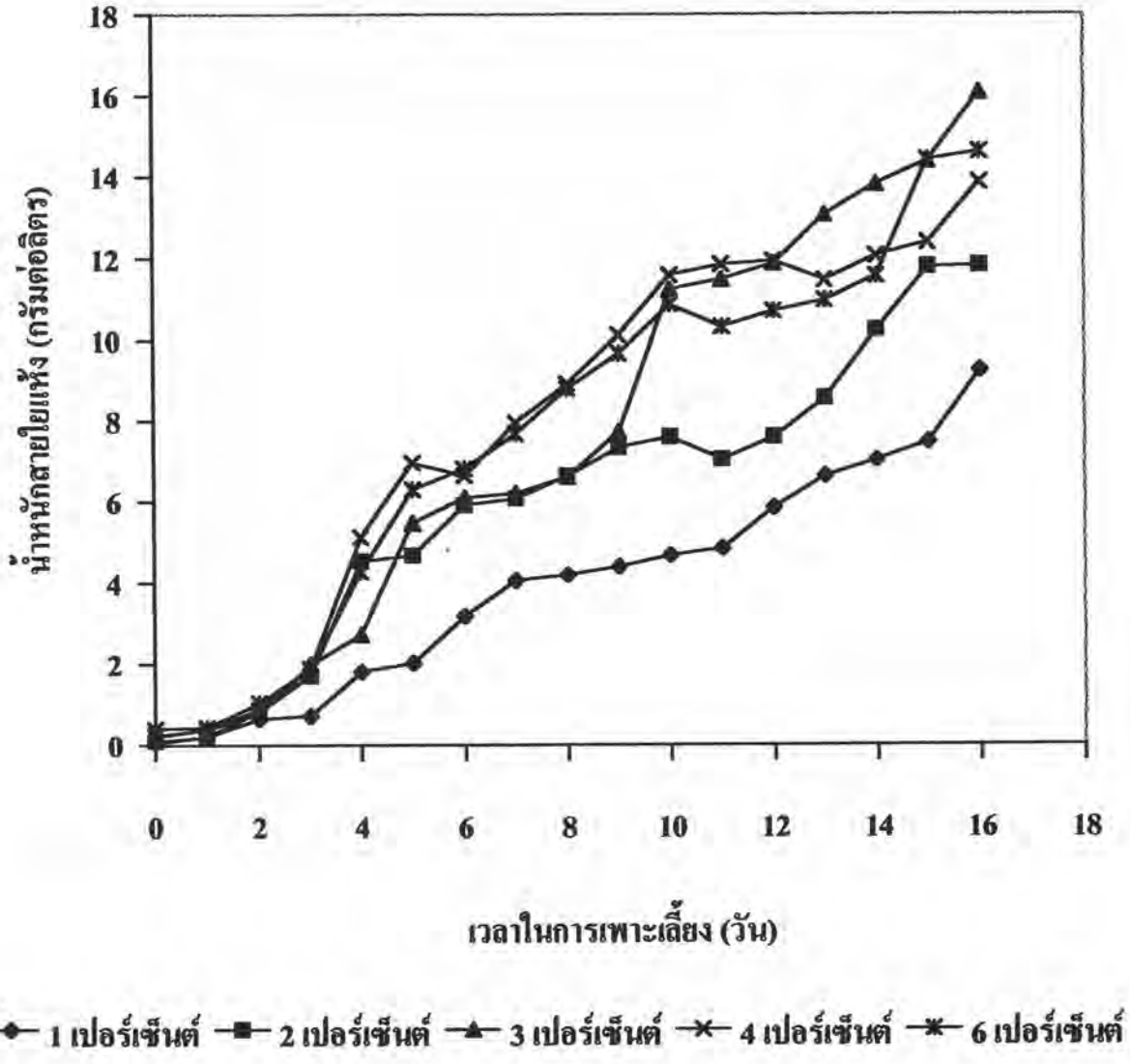
ทำการทดลองแปรขนาดของหัวเชื้อโดยการถ่ายหัวเชื้อที่มีความหนาแน่นเท่ากับ $2 - 4 \times 10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก12) ปริมาตร 53 มิลลิลิตร โดยจัดให้มีขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 1 2 3 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่างๆจากผลการทดลองข้อ 1 - 4 คือ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก12) ใช้อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 1.0 ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมื่อใช้ขนาดของหัวเชื้อมากจะส่งให้ผลิตกรดโคจิกได้สูงขึ้นและมีการใช้น้ำตาลมากขึ้น แต่ถ้าใช้ขนาดของหัวเชื้อมากเกินไป ถึงแม้จะมีการใช้น้ำตาลมากขึ้นแต่ผลผลิตกรดกลับลดลง ในขณะที่ถ้าใช้ขนาดของหัวเชื้อน้อยเกินไปราจะใช้น้ำตาลได้ช้าส่งผลให้ผลิตกรดได้ช้าด้วย โดยขนาดของหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จะให้ผลผลิตกรดสูงกว่าขนาดของหัวเชื้ออื่นคือ เท่ากับ 21.02 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 55) รองลงมาคือการผลิตที่ใช้ขนาดของหัวเชื้อ 3 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) โดยให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 18.52 17.67 และ 16.33 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 14 14 และ 12 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ส่วนหัวเชื้อขนาด 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ให้ผลผลิตกรดต่ำมากคือ 11.20 กรัมต่อลิตร โดยให้ผลผลิตสูงสุดในวันที่ 14 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 55) และเมื่อเพาะเลี้ยงจนสิ้นสุดการทดลอง พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 1 2 3 4 และ

6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จะเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เท่ากับ 22.14 4.76 5.85 6.32 และ 10.73 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 56) โดยพบว่าในช่วง 8 วันแรกขนาดของหัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จะใช้น้ำตาลไล่เลี่ยกับที่ขนาดของหัวเชื้อ 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) หลังจากนั้นจะใช้น้ำตาลช้าลง ในขณะที่ขนาดของหัวเชื้อสปอร์งอก 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ราจะใช้น้ำตาลได้รวดเร็วไล่เลี่ยกันและมีแบบแผนการใช้น้ำตาลเดียวกัน ส่วนขนาดของหัวเชื้อ 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) พบว่าในช่วง 10 วันแรกของการเพาะเลี้ยงจะใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วมากกว่าที่ขนาดของหัวเชื้ออื่น แล้วหลังจากนั้นจะมีการใช้น้ำตาลที่มีแบบแผนเดียวกันกับในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ขนาดของหัวเชื้อ 2 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ดังรูปที่ 56

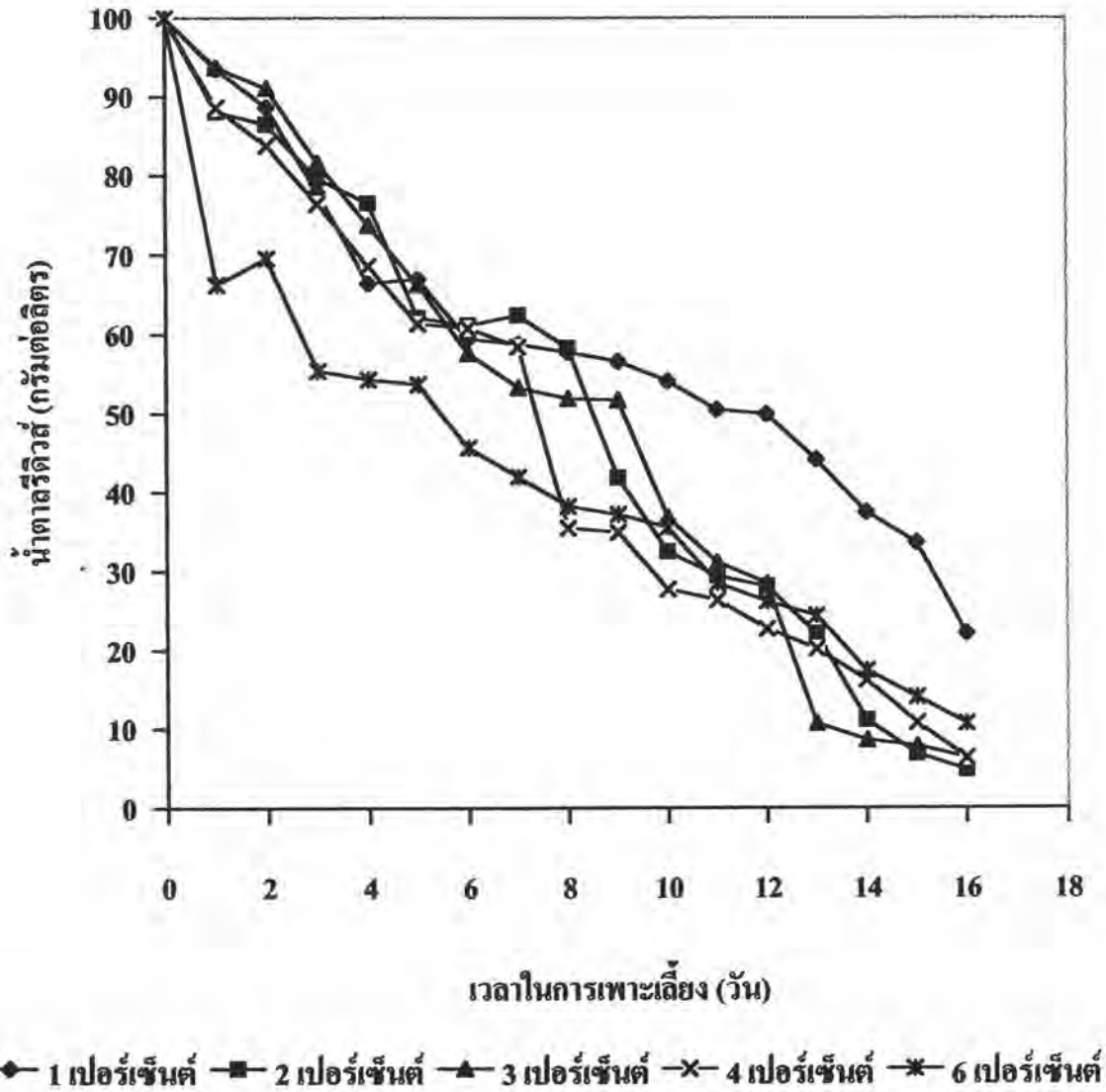
สำหรับการเติบโต พบว่ามีรูปแบบเดียวกันทุกการทดลอง กล่าวคือถ้าขนาดของหัวเชื้อมากจะให้การเติบโตเร็วกว่าที่ขนาดหัวเชื้อน้อย แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าน้ำหนักสายใยแห้งแตกต่างกันไม่มากนัก โดยในช่วงแรกหัวเชื้อสปอร์งอก 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จะมีการเติบโตช้าที่สุด (รูปที่ 57) ในขณะที่ขนาดของหัวเชื้อ 2 3 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จะให้การเติบโตเร็วและใกล้เคียงกัน และเมื่อเพาะเลี้ยงจนครบ 10 วัน พบว่าขนาดของหัวเชื้อสปอร์งอก 3 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) มีการเติบโตเร็วกว่าขนาดของหัวเชื้อ 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ณ วันที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าขนาดของหัวเชื้อสปอร์งอก 3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) กลับให้น้ำหนักสายใยแห้งสูงที่สุดเท่ากับ 16.08 กรัมต่อลิตร โดยจะมีการเติบโตมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดหลังจากวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งเป็นวันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด ในขณะที่ขนาดของหัวเชื้อสปอร์งอก 1 2 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จะให้น้ำหนักสายใยแห้งต่ำกว่าคือ เท่ากับ 9.25 11.83 13.87 และ 14.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 57) และได้แสดงรูปการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ระหว่างการผลิตกรดโคจิก โดยใช้หัวเชื้อขนาดที่เหมาะสม คือ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ไว้ในรูปที่ 59

ส่วนค่าความเป็นกรดด่างพบว่าให้ผลดังรูปที่ 58 โดยค่าความเป็นกรดด่างของทุกการทดลองจะลดลงตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยงจนถึงช่วงวันที่ 5 - 10 จะคงค่าอยู่ประมาณ 2.0 - 2.5 และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปค่าความเป็นกรดด่างจะค่อยๆขยับสูงขึ้นเล็กน้อย จนสิ้นสุดการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ขนาดของหัวเชื้อ 1 2 3 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จะให้ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.2 3.4 3.5 3.3 และ 3.0 ตามลำดับ (รูปที่ 58)

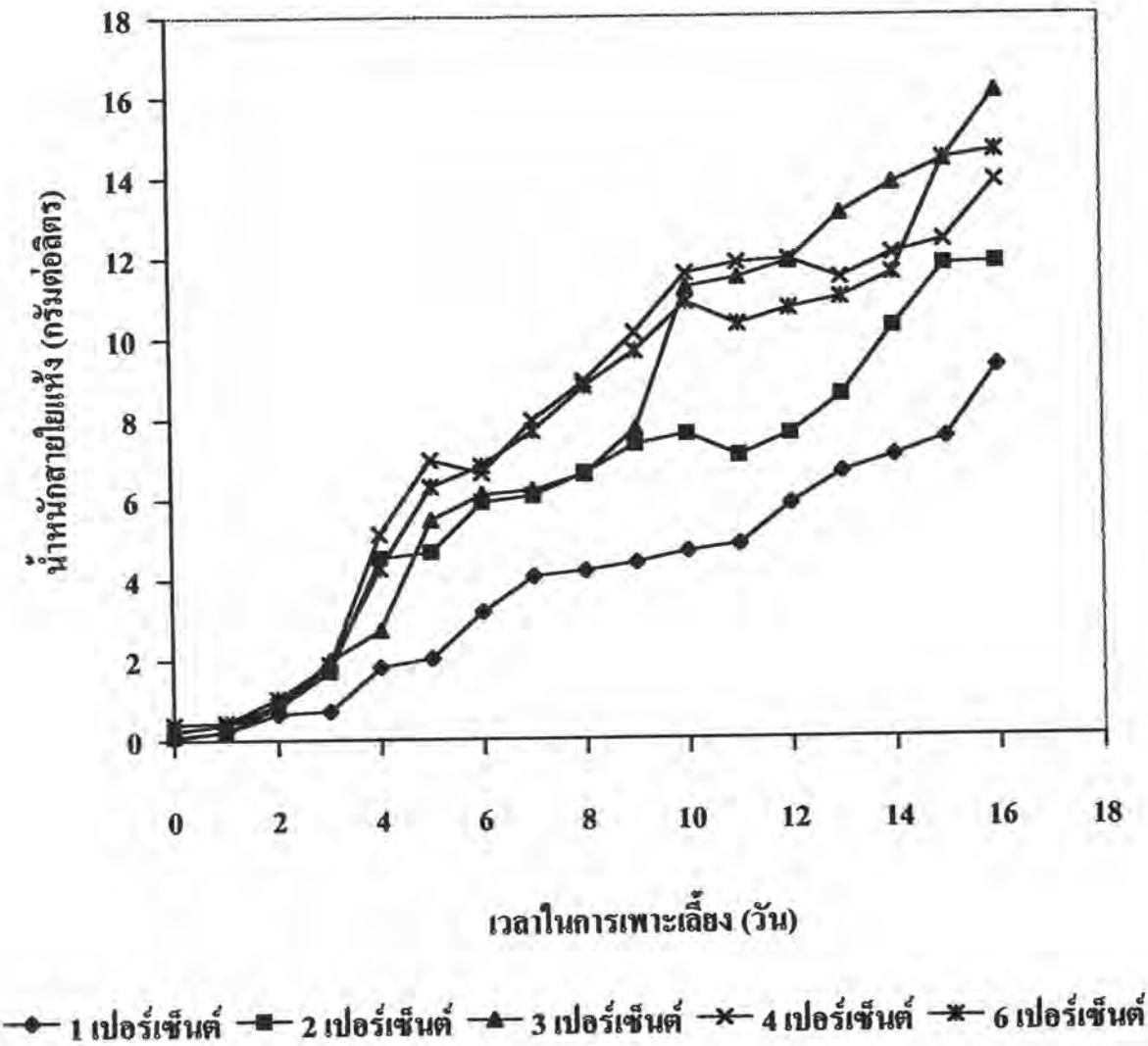
เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดโคจิกดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่าเมื่อใช้ขนาดของหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) สายใยมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดสูงสุด โดยพบว่าเมื่อใช้ขนาดของหัวเชื้อ 1 2 3 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จะให้ผลผลิตกรดโคจิกต่อน้ำหนักสายใยแห้งที่สร้างเท่ากับ 1.59 2.45 1.34 1.43 และ 1.53 ณ วันที่ 14 13 14 14 และ 12 ของการเพาะเลี้ยง ตามลำดับ ดังตารางที่ 15 ซึ่งพบว่าการผลิตที่ใช้ขนาดของหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จะมีการเติบโตของราที่พอเหมาะทำให้ได้ปริมาณกรดโคจิกสูงที่สุด ในขณะที่การทดลองใช้หัวเชื้อขนาด 3 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) นั้นในช่วงแรกรามีการใช้สารอาหารไปในการเติบโตมากกว่าการผลิตกรดโคจิกทำให้ผลิตกรดได้ไม่มากเท่าที่ควร ส่วนที่ขนาดหัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) พบว่าให้ประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดโคจิกรองจากที่ขนาดของหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) แต่เนื่องจากมีขนาดของหัวเชื้อน้อยเกินไปจึงทำให้มีการเติบโตช้าส่งผลให้ผลิตกรดโคจิกได้น้อย (รูปที่ 57)



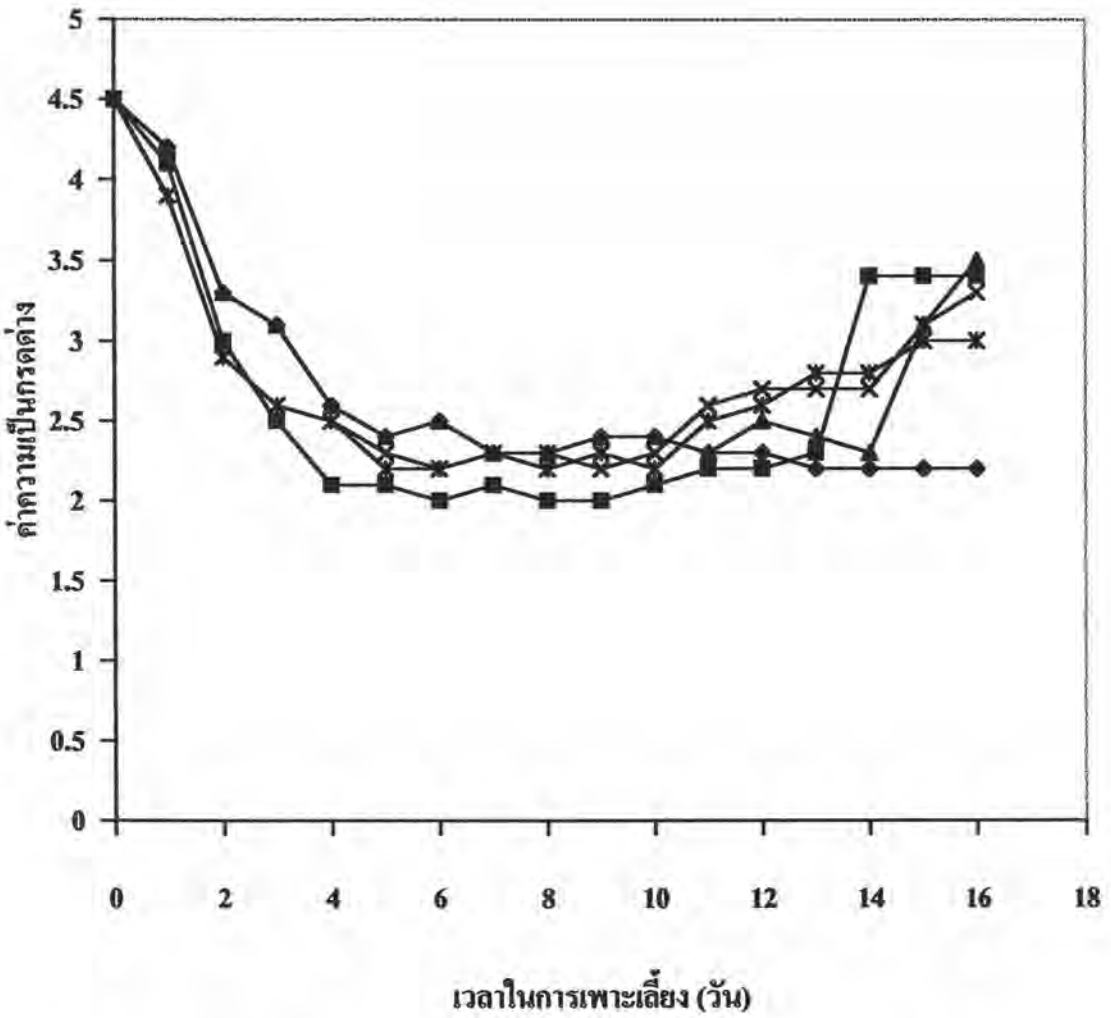
รูปที่ 55 ปริมาณกรดโคจิกในระหว่างการผลิตกรดโคจิก โดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเมื่อแปรขนาดของหัวเชื้อต่างๆกัน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส



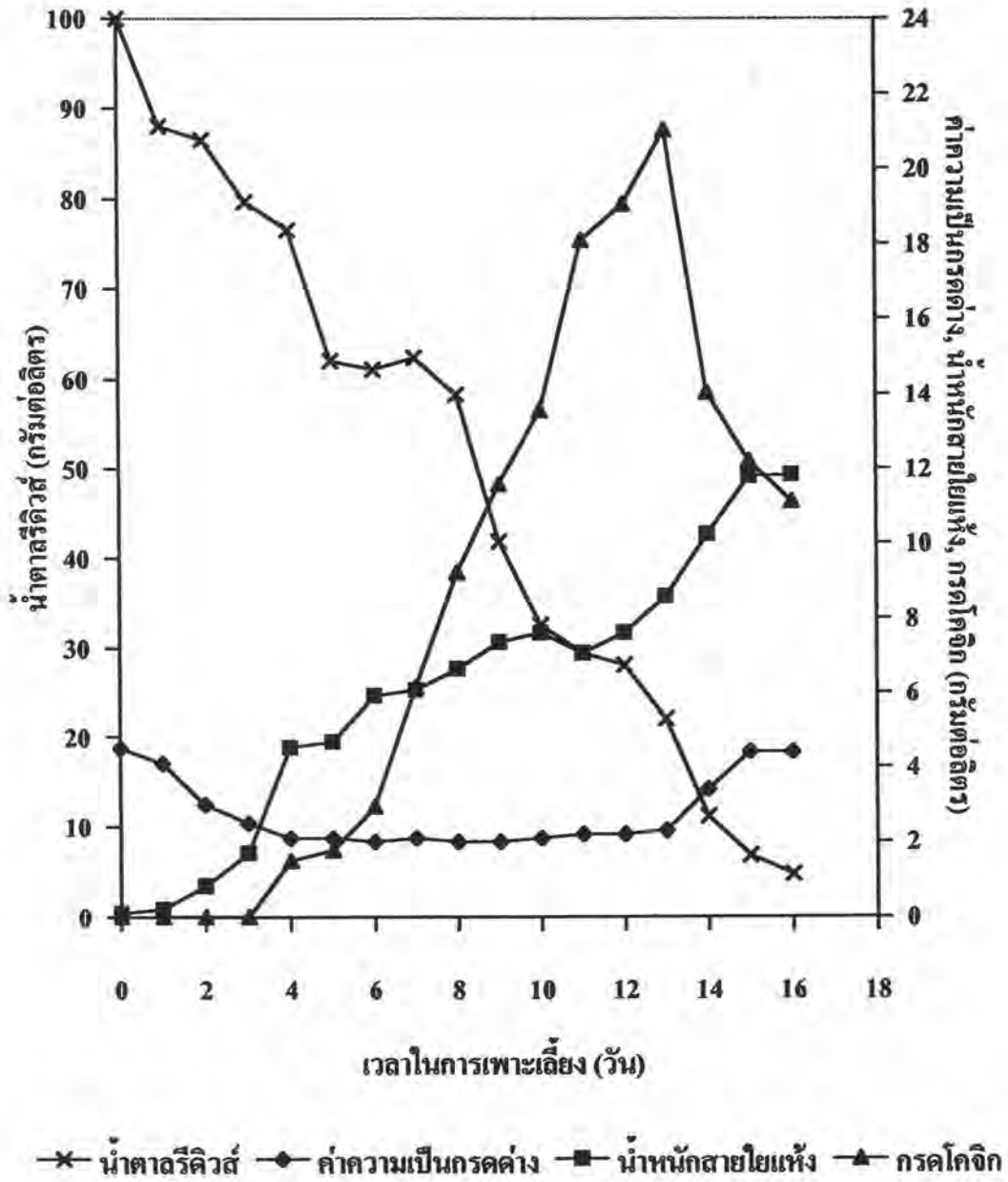
รูปที่ 56 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในระหว่างการผลิตกรดโคจิก โดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเมื่อแปรขนาดของหัวเชื้อต่างๆกัน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส



รูปที่ 57 น้ำหนักสายใยแห้งในระหว่างการผลิตกรดโคจิก โดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเมื่อแปรขนาดของหัวเชื้อต่างๆกัน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส



รูปที่ 58 ค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการผลิตกรดโคจิก โดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเมื่อแปรขนาดของหัวเชื้อต่างๆกัน เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส



รูปที่ 59 ปริมาณกรดโคจิก น้ำหนักสายใยแห้ง การใช้น้ำตาล และค่าความเป็นกรดด่าง ในระหว่างการผลิตกรดโคจิก โดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ที่มีขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 15 ปริมาณกรดโคจิก และน้ำหนักสายใยแห้ง ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด เมื่อใช้ขนาดหัวเชื้อต่างกัน

เปอร์เซ็นต์ขนาดของหัวเชื้อ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ)	ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักสายใยแห้งในวันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด (วัน)	$Y_{p/x}$
1	11.20	7.04	14	1.59
2	21.02	8.58	13	2.45
3	18.52	13.81	14	1.34
4	17.67	12.39	14	1.43
6	16.33	10.71	12	1.53

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าขนาดของหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เป็นหัวเชื้อที่มีขนาดเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยงราให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ซึ่งจะใช้ในการทดลองต่อไป

6. ผลของการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวต่อการเติบโตและการผลิตกรดโคจิก

6.1 ผลของการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวต่อการเติบโตของสายใย

จากรายงานของ Barnard และ Challenger (1949) ที่ศึกษาผลกระทบของปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการเติบโตและการผลิตกรดโคจิก โดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่ควบคุมปริมาณก๊าซไนโตรเจน ออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศที่ใช้เพาะเลี้ยง พบว่าถ้าในบรรยากาศที่ใช้เพาะเลี้ยงมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณที่วัดได้ในบรรยากาศจะมีผลต่อการเติบโตและการผลิตกรดโคจิก ซึ่งโดยปกติแล้วก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะสร้างขึ้นในระหว่างการเติบโตของสายใย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผลิตขึ้นบนผิวหน้าอาหารเหลว โดยวิธีการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว ซึ่งวิธีนี้อาจทำให้ก๊าซออกซิเจนที่อยู่ในบรรยากาศสามารถแพร่เข้ามาแทนที่และสัมผัสกับสายใยราบนผิวหน้าอาหารเหลวได้ดีขึ้นและอาจส่งผลให้สามารถเพิ่มการผลิตกรดได้

จากผลการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวสูตรเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก (ภาคผนวก ก12) ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมที่ศึกษามาแล้วจากผลการทดลองข้อ 1 - 5 คือค่าความเป็นกรดด่างตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5 อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 1.0 (ตารางเซนติเมตรต่อเซนติเมตร) และใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) โดยไม่มีการเป่าและมีการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ176 ลิตรต่อนาทีต่อตารางเมตร (0.02 ลิตรต่อนาทีต่อตารางเซนติเมตร หรือ 20 มิลลิลิตรต่อนาทีต่อตารางเซนติเมตร) 2 ช่วงเวลา คือ เป่าให้อากาศตลอดการทดลอง และเป่าให้อากาศ 5 วัน นับตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยง พบว่าในช่วง 9 วันแรกของการเพาะเลี้ยงทั้ง 3 แบบ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไม่มีผลต่อการเติบโต คือมีการเติบโตของสายใยใกล้เคียงกันและมีรูปแบบเดียวกันคือเริ่มเข้าระยะที่มีอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตายตั้งแต่ประมาณวันที่ 5 - 6 แต่หลังจาก 9 วัน จะพบความแตกต่างของการเติบโตคือ ถ้ามีการเป่าให้อากาศตลอดการทดลองจะมีการเติบโตสูงที่สุดลดหลั่นลงมาจนถึงการทดลองที่ไม่มีการเป่าให้อากาศ ซึ่งการเติบโตช่วงนี้เป็นการเติบโตช่วงที่ 2 หลังเข้าระยะที่มีอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตายในช่วงแรกแล้ว กล่าวคือการทดลองที่มีการเป่าให้อากาศตลอดการทดลองมีการเติบโตอย่างรวดเร็วอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับอีก 2 การทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (13 วัน) ให้น้ำหนักสายใยแห้งสูงสุดเท่ากับ 13.85 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือการเพาะเลี้ยงที่มีการเป่าให้อากาศ 5 วันนับตั้งแต่เริ่มการเพาะเลี้ยง ให้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 12.99 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเป่าให้อากาศให้น้ำหนักสายใยแห้งเท่ากับ 8.58 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 60)

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงด้วยเครื่องวัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แบบเคลื่อนย้ายได้ (portable CO_2 detector) โดยทำการวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ทั้งภายนอกและภายในภาชนะที่ใช้เลี้ยงเชื้อคือ บรรยากาศภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อ บริเวณผิวด้านนอกของผ้าที่ใช้ปิดปากภาชนะเพาะเลี้ยง และบริเวณเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 1 เซนติเมตร ซึ่งจากการทดลองพบว่าในระหว่างการเพาะเลี้ยงราสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา โดยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผลิตขึ้นจากการเติบโตของราจะแพร่ผ่านผิวหน้าอาหารเหลวลอยขึ้นสู่ด้านบนแล้วแพร่ออกสู่ผิวผ้าที่ใช้ปิดปากภาชนะด้านนอกออกสู่บรรยากาศภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิซึ่งมีบริเวณกว้าง เนื่องจากพบว่าโดยรวมแล้วปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่วัดได้จากบริเวณเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 1 เซนติเมตร จะมีค่าปริมาณ

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มากที่สุด รองลงมาคือปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่บริเวณผิวด้านนอกของผ้าที่ใช้ปิดปากภาชนะเพาะเลี้ยง ส่วนบรรยากาศภายนอกตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงเชื้อจะมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์น้อยที่สุด ซึ่งการแพร่ของก๊าซในแต่ละวันจะไม่เท่ากัน (ตารางที่ 16) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์(รูปที่ 60) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเป่าให้อากาศ พบว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มสูงอย่างรวดเร็วมากกว่าการทดลองอื่นโดยจะมีปริมาณของก๊าซสูงสุดในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง โดยสามารถวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 เซนติเมตร ได้ถึง 1,125 ส่วนในบรรยากาศล้านส่วน (ppm) หลังจากนั้นลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่การเป่าให้อากาศ 5 วัน นับตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยงวัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ณ วันเดียวกันคือวันที่ 8 ของการผลิต วัดได้ 775 ส่วนในบรรยากาศล้านส่วน ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มขึ้นจากวันเริ่มการผลิตไม่มากนักคือ เพิ่มขึ้น 225 ส่วนในบรรยากาศล้านส่วน หลังจากนั้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ก็เพิ่มขึ้นเล็กน้อยแล้วลดลงหลังวันที่ 10 ของการผลิต ส่วนการทดลองเป่าให้อากาศตลอดการทดลองวัดได้ค่าน้อยที่สุดคือ 550 ส่วนในบรรยากาศล้านส่วน ในวันที่ 8 ของการผลิต แต่น้ำหนักสายใยแห้งที่วัดได้ของทั้ง 3 การทดลองไม่แตกต่างกันมากนัก ถึงแม้การทดลองที่มีการเป่าให้อากาศตลอดการทดลองจะสูงกว่าก็ตาม คือวัดได้เท่ากับ 6.64 6.15 7.89 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 60 และตารางที่ 16) อาจเนื่องมาจากช่วงแรกของทุกการทดลองรามีการเติบโตค่อนข้างสูงจึงผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูง ดังนั้นการทดลองที่ไม่มีการระบายอากาศก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ก็จะสะสมและเพิ่มขึ้นมากกว่าการทดลองอื่น ส่วนการทดลองที่เป่าให้อากาศตลอดการทดลอง พบว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ตลอดการทดลองใกล้เคียงกับวันเริ่มต้นผลิตแต่สูงกว่าเล็กน้อยซึ่งปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายใต้ภาวะนี้จะวัดได้ค่าต่ำกว่าทุกๆการทดลอง นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลกระทบต่อการเติบโตในช่วง 9 วันแรก แต่ถึงอย่างไรก็พบว่าการเป่าให้อากาศมีส่วนช่วยในการลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงได้ คือปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่วัดได้จากการทดลองที่มีการเป่าให้อากาศทั้ง 2 แบบก็มีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่วัดได้จากการทดลองที่ไม่มีการเป่าให้อากาศ โดยพบว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงสุดที่วัดได้เหนือผิวหน้าอาหารเหลว 1 เซนติเมตร สำหรับการทดลองที่มีการเป่าให้อากาศ 5 วัน และการทดลองที่มีการเป่าให้อากาศตลอดการทดลองมีค่าสูงสุดเท่ากับ 1,050 และ 800 ส่วนในบรรยากาศล้านส่วน ในวันที่ 10 และ 4 ของการ

เพาะเลี้ยง ส่วนการทดลองที่ไม่มีการเป่าให้อากาศมีค่าสูงสุดเท่ากับ 1,125 ส่วนในบรรยากาศ ล้านส่วน ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง แต่ผลของการระบายอากาศจะมีผลต่อการเติบโตอีกครั้งในช่วงหลัง 9 วันไปแล้ว กล่าวคือการทดลองที่มีการเป่าให้อากาศตลอดการทดลองจะมีการเติบโตสูงกว่าการทดลองอื่นๆอย่างเห็นได้ชัดในวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง และจะมีการเติบโตมากขึ้นในแต่ละวัน รองลงมาคือการทดลองที่มีการเป่าให้อากาศ 5 วัน จะมีการเติบโตแตกต่างจากการทดลองที่ไม่มีการเป่าให้อากาศ หลังจากวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ส่วนการทดลองที่ไม่มีการเป่าให้อากาศจะมีการเติบโตมากขึ้นหลังจากวันที่ 13 ของการผลิต

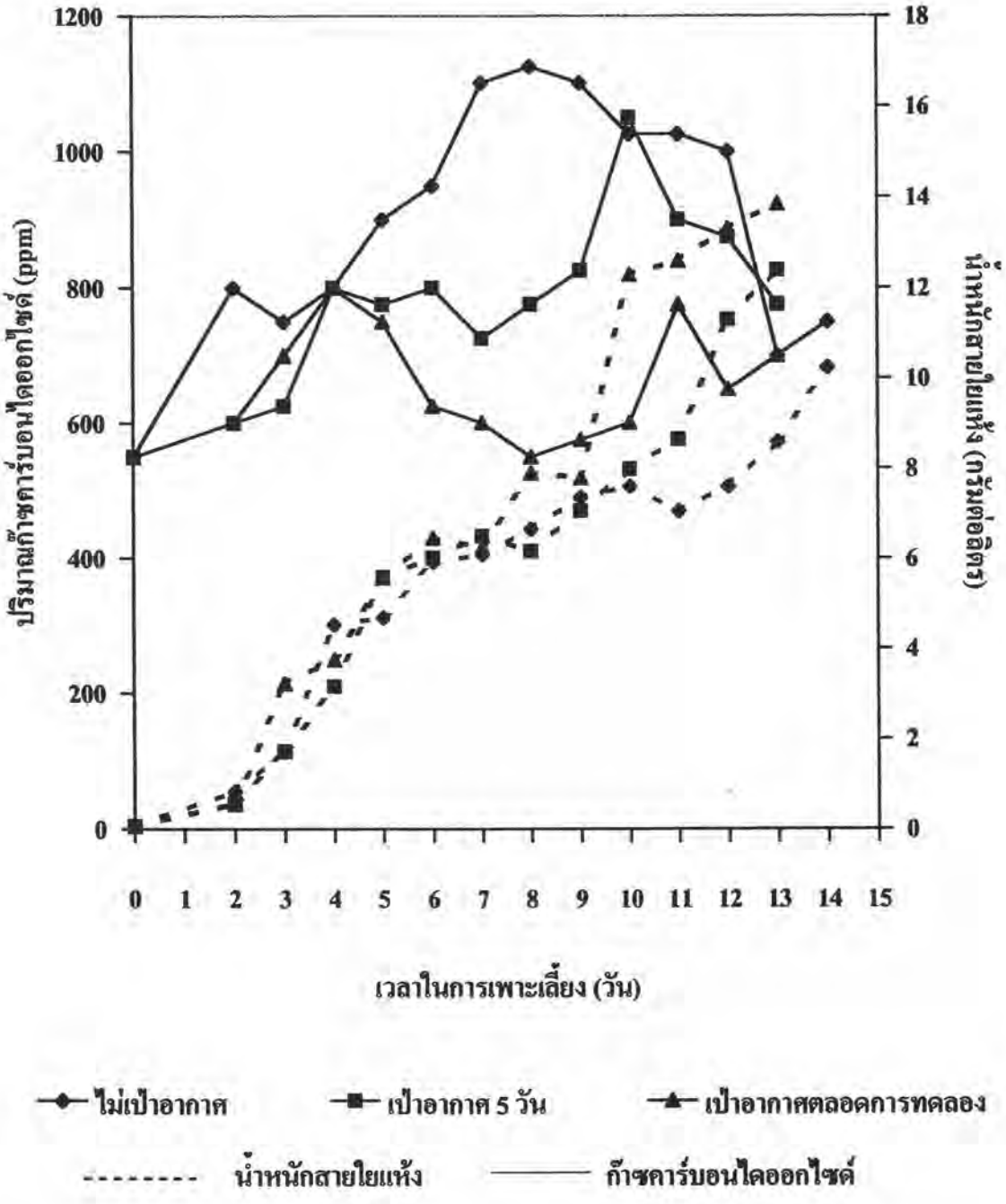
6.2 ผลของการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวต่อการผลิตกรดโคจิก

จากการทดลองพบว่าการทดลองที่มีการเป่าให้อากาศตลอดการทดลองจะให้ผลผลิตสูงกว่าการทดลองอื่นคือ 30.35 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง รองลงมาคือการทดลองที่มีการเป่าให้อากาศในเฉพาะช่วงที่รามีการเติบโตในระยะต้น (5 วัน) จะให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 28.51 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเป่าให้อากาศทั้ง 2 แบบ จะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงกว่าการทดลองที่ไม่มีการเป่าให้อากาศซึ่งจะให้ผลผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 21.02 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 61) และพบว่าในช่วง 5 วันแรกของการเพาะเลี้ยงทุกการทดลองจะให้ผลผลิตกรดไล่เลี่ยกันแต่เมื่อเพาะเลี้ยงจนถึงวันที่ 6 พบว่าการทดลองที่มีการเป่าให้อากาศเริ่มให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงโดยเฉพาะการทดลองที่มีการเป่าให้อากาศตลอดการทดลอง และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร่วมกับการผลิตกรดโคจิก พบว่าการทดลองที่มีและไม่มีการเป่าให้อากาศจะมีความแตกต่างของปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตขึ้นจะผกผันกับปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่สะสมเหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่าการทดลองที่ไม่มีการเป่าให้อากาศจะผลิตกรดได้น้อยและช้าที่สุดคือ เท่ากับ 21.02 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 61) แต่วัดปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่สะสมเหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากที่สุด ในขณะที่การทดลองที่มีการเป่าให้อากาศ 5 วันนับตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยง พบว่าให้ปริมาณกรดสูงและเร็วขึ้นคือ เท่ากับ 28.51 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่สะสมเหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยกว่าการทดลองที่ไม่มีการเป่าให้อากาศ ส่วนการทดลองที่มีการเป่าให้อากาศตลอดการทดลองจะให้ปริมาณกรดโคจิกสูงและเร็วที่สุดคือ เท่ากับ 30.35 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการ

เพาะเลี้ยง ซึ่งวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าน้อยที่สุด และจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการเติบโตในช่วง 9 วันแรกทั้งในการทดลองที่มีและไม่มีการเป่าให้อากาศจะไม่มีความแตกต่างกันมากนัก แต่หลังจากนั้นพบว่าจะมีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 63) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มในช่วง 9 วันแรกไม่มีผลต่อการเติบโตของสายใย แต่จะมีผลต่อการผลิตกรดโคจิก

สำหรับการใช้น้ำตาล พบว่าในการทดลองทั้ง 3 แบบ มีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วตลอดการผลิตและมีรูปแบบการใช้น้ำตาลเดียวกัน แต่ในการทดลองที่มีการเป่าให้อากาศจะมีการใช้น้ำตาลรวดเร็วกว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะเหลือน้ำตาลรีดิวส์ในการทดลองที่ไม่มีการเป่าให้อากาศ เป่าให้อากาศ 5 วัน และเป่าให้อากาศตลอดเท่ากับ 22.06 10.03 และ 10.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 62) ส่วนค่าความเป็นกรดด่าง พบว่าการทดลองทั้ง 3 แบบ จะให้ค่าความเป็นกรดด่างต่ำสุดในช่วงที่ให้ผลผลิตกรดสูงคือ เท่ากับ 2.0 และพบว่าค่าความเป็นกรดด่างก็จะสูงขึ้นเล็กน้อยด้วยเมื่อมีปริมาณกรดโคจิกลดลงและมีการเติบโตเพิ่มขึ้นในช่วงหลัง (รูปที่ 63)

จะเห็นได้ว่าการเป่าให้อากาศไม่มีผลทำให้การเติบโตในช่วง 9 วันแรกเพิ่มขึ้น แต่มีผลต่อการเติบโตอีกครั้งในช่วงหลังจากที่สายใยเข้าสู่ระยะที่มีอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตายไปแล้ว และทำให้ประสิทธิภาพของสายใยในการสร้างกรดโคจิกเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัด



รูปที่ 60 การเติบโต และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บริเวณเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 1 เซนติเมตร ในระหว่างการผลิตกรดโคจิก จากการทดลองที่ไม่มีการเป่าให้อากาศ เป่าให้อากาศ 5 วันนับตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยง และเป่าให้อากาศตลอดการทดลอง

ตารางที่ 16 ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่วัดได้ในระหว่างการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว เมื่อมีการเป่าให้อากาศและไม่มีการเป่าให้อากาศ (ค่าเฉลี่ยจากการวัดภายใน 1 นาที)

วันที่	ไม่เป่าให้อากาศ (ppm)			เป่าให้อากาศ 5 วัน (ppm)			เป่าให้อากาศตลอด (ppm)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	550	550	550	550	550	550	550	550	550
2	800	650	575	600	575	575	600	600	575
3	750	650	550	625	600	575	700	625	575
4	800	775	775	800	600	575	800	600	575
5	900	825	600	775	600	575	750	650	575
6	950	825	625	800	675	525	625	600	600
7	1,100	900	575	725	650	525	600	600	525
8	1,125	925	550	775	675	525	550	500	500
9	1,100	875	575	825	700	600	575	525	525
10	1,025	875	575	1,050	800	600	600	625	600
11	1,025	875	500	900	875	600	775	600	600
12	1,000	825	550	875	725	600	650	525	500
13	700	600	575	775	650	575	700	600	500
14	750	650	575	-	-	-	-	-	-

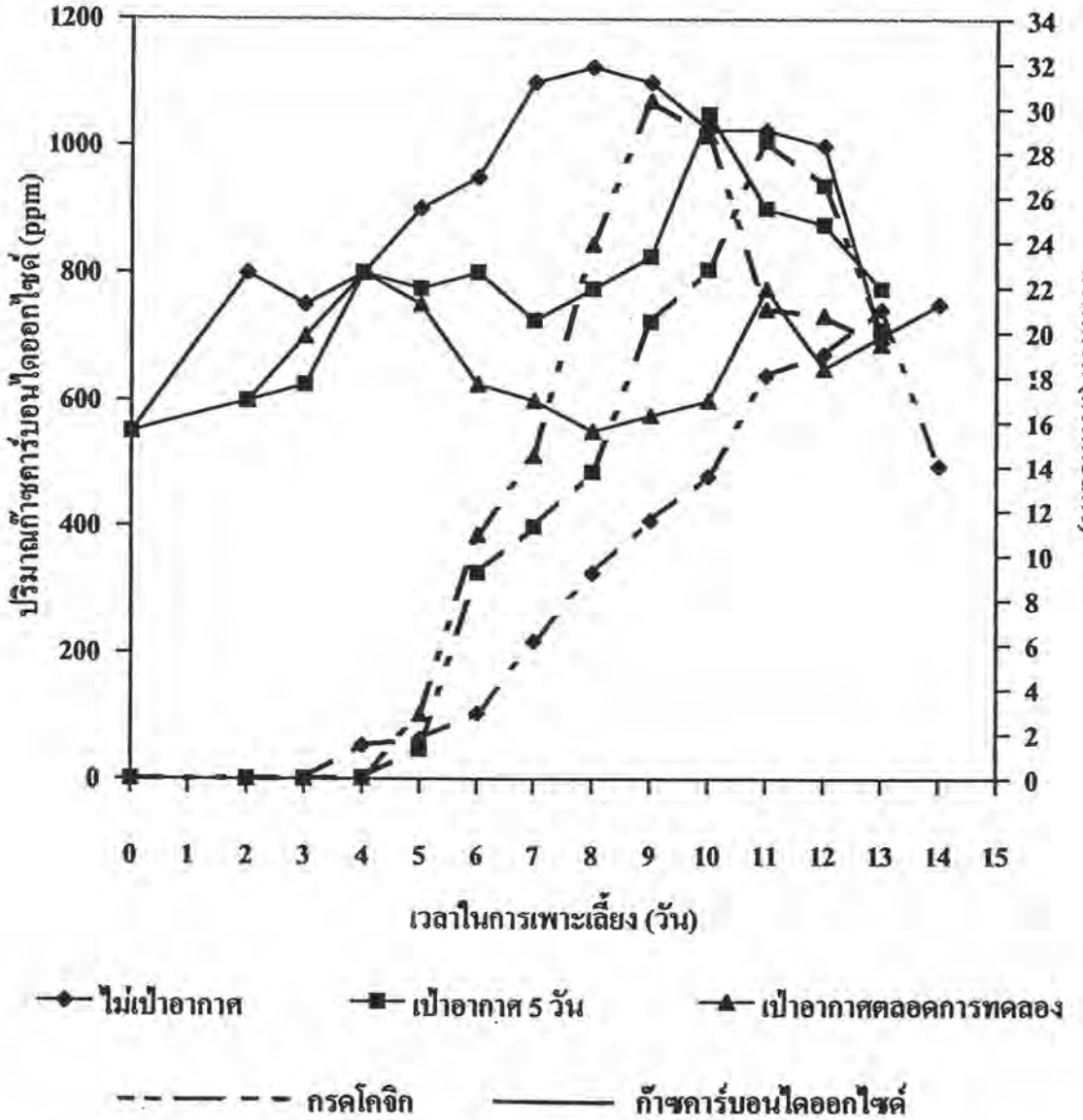
หมายเหตุ ค่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศปกติอยู่ในช่วง 400 - 450 ppm

A หมายถึง ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 เซนติเมตร

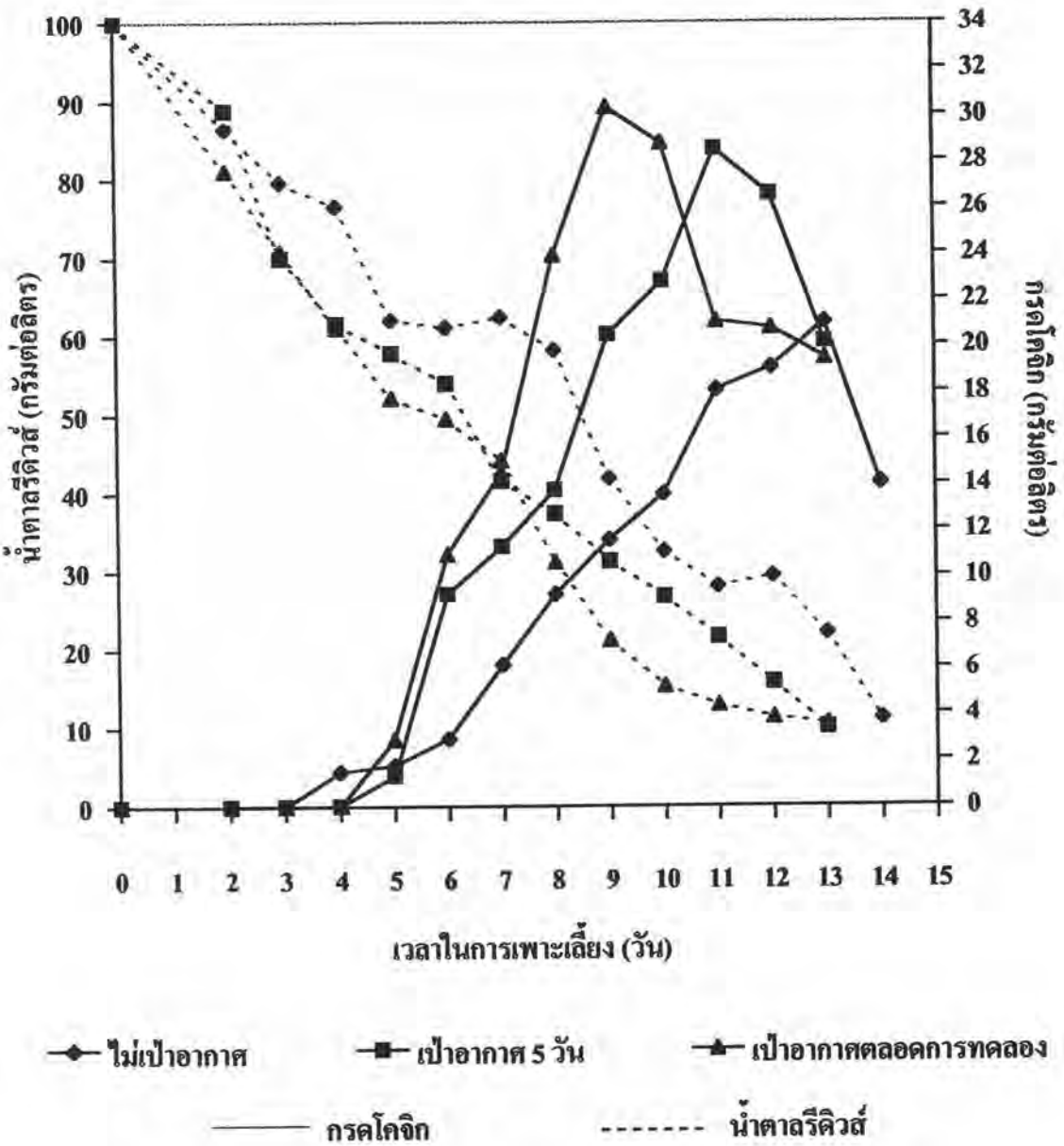
B หมายถึง ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บริเวณผิวด้านนอกของผ้าที่ใช้ปิดปากภาชนะเพาะเลี้ยง

C หมายถึง ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศภายในตู้ควบคุมอุณหภูมิ

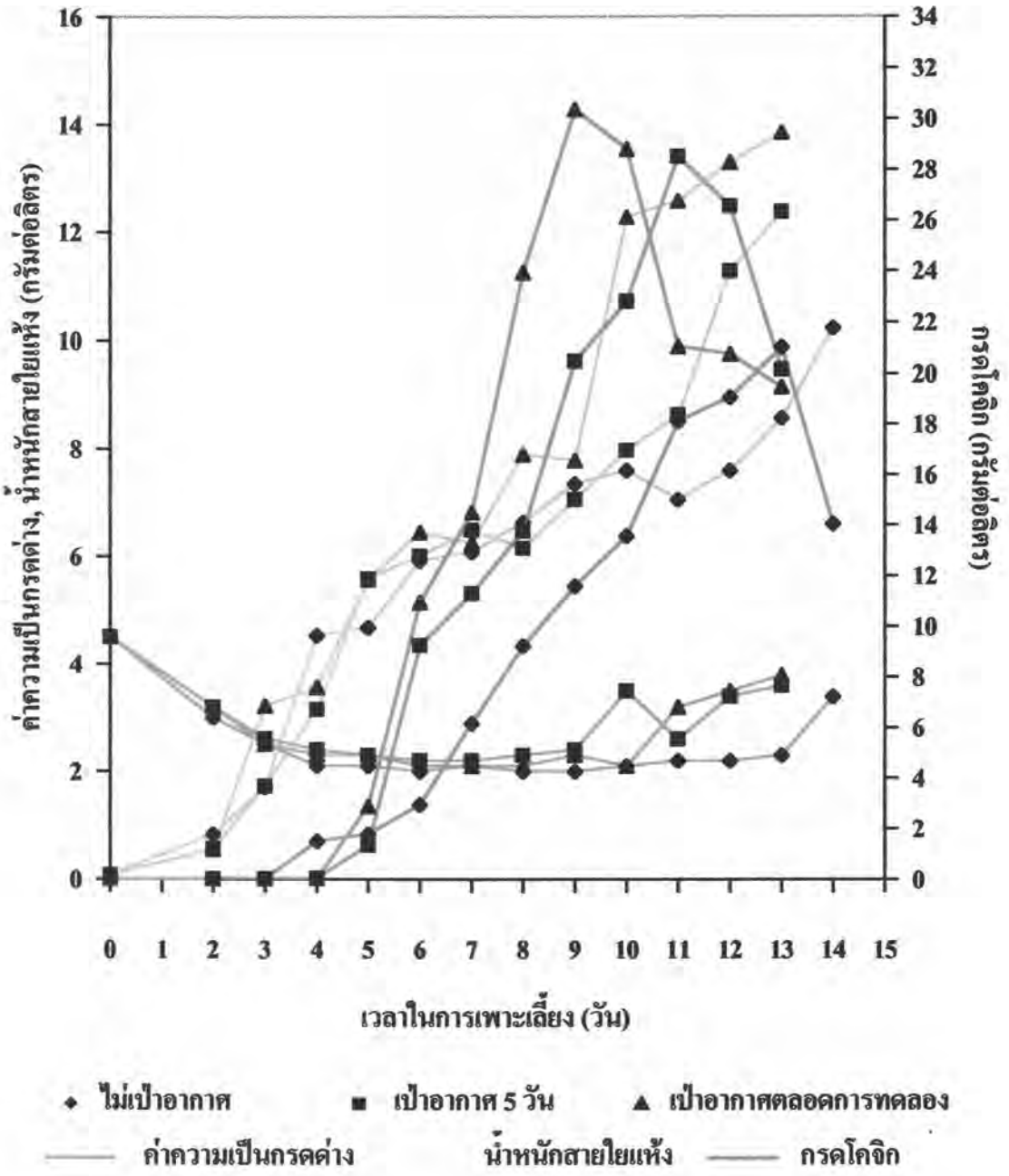
- หมายถึง ไม่ได้ทำการวัดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์



รูปที่ 61 กรดโคจิก และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บริเวณเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 1 เซนติเมตร ในระหว่างการผลิตกรดโคจิก จากการทดลองที่ไม่มีการเป่าให้อากาศ เป่าให้อากาศ 5 วันนับตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยง และเป่าให้อากาศตลอดการทดลอง



รูปที่ 62 ปริมาณกรดโคจิกและน้ำตาลรีดิวส์ ในระหว่างการผลิตโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่ไม่มีการเป่าให้อากาศ เป่าให้อากาศ 5 วัน นับตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยง และเป่าให้อากาศตลอดการทดลอง



รูปที่ 63 เปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างและการเติบโตในระหว่างการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่ไม่มีการเป่าให้อากาศ เป่าให้อากาศ 5 วันนับตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยง และเป่าให้อากาศตลอดการทดลอง

7. ผลการเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกเมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวก่อนและหลังการจัดสูตรอาหารและภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

หลังการคัดเลือกและปรับปรุงสูตรอาหาร พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณกรดโคจิกจากเดิมที่ผลิตได้สูงสุดในสูตรดั้งเดิม (ภาคผนวก ก3) คือเท่ากับ 1.52 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง (คิดเป็นอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 0.06 กรัมต่อลิตรต่อวัน) ดังแสดงในรูปที่ 64 มาเป็น 23.26 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง (คิดเป็นอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 1.55 กรัมต่อลิตรต่อวัน) ดังแสดงในรูปที่ 64 นั่นคือปริมาณกรดโคจิกเพิ่มขึ้น 21.74 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอน องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสัดส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมจะมีผลในการเพิ่มผลผลิตกรดโคจิก เมื่อจัดภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก คือ ใช้อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 1.0 ใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ($4 - 8 \times 10^8$ สปอร์/งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก 1 ลิตร) ทำการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 2 เซนติเมตร ตลอดการทดลองที่อัตราเร็วเท่ากับ 176 ลิตรต่อชั่วโมงต่อตารางเมตร (0.02 ลิตรต่อนาทีต่อตารางเซนติเมตร หรือ 20 มิลลิลิตรต่อนาทีต่อตารางเซนติเมตร) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกและลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงที่ยังไม่ได้จัดภาวะให้เหมาะสม คือผลิตกรดได้เท่ากับ 30.35 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง (คิดเป็นอัตราการผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 3.37 กรัมต่อลิตรต่อวัน) (รูปที่ 64)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ในระดับขวดเขย่าภายใต้สูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกที่ศึกษาโดย รพี โรจนอุไร (2539) กับการเพาะเลี้ยงแบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในงานวิจัยนี้ภายใต้สูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก ดังนี้

	การเพาะเลี้ยง แบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว	ในระดับขวดเขย่า
จุลินทรีย์ :	*A. oryzae* K13	*A. oryzae* K13
อาหารเลี้ยงเชื้อ:	น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมไนเตรต 1.814 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.1 กรัมต่อลิตร กรดฟอสฟอริก 0.054 มิลลิลิตรต่อลิตร	น้ำตาลทรายขาว 100 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.24 กรัมต่อลิตร
ภาวะที่เหมาะสม:	ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 53 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขนาดของหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ พื้นที่ผิว : ความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 57 : 1.0 อัตราการให้อากาศ 176 ลิตรต่อนาทีต่อตารางเมตร	ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขนาดของหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที
ปริมาณกรดโคจิก:	30.35 กรัมต่อลิตร	40.03 กรัมต่อลิตร
อัตราการผลิตกรดโคจิก:	3.37 กรัมต่อลิตรต่อวัน	2.11 กรัมต่อลิตรต่อวัน
วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด:	วันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง	วันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง

จะเห็นได้ว่าวิธีการที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงทั้ง 2 แบบ ใช้ปริมาณของน้ำตาล (แหล่งคาร์บอน) ในการผลิตกรดเท่ากันคือ 100 กรัมต่อลิตร ใช้ขนาดของหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เท่ากัน และมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกพอๆกัน แต่ให้ผลผลิตและใช้เวลาในการผลิตต่างกัน โดยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวให้ผลผลิตกรดน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าเพียง 9.68 กรัมต่อลิตร แต่ใช้ระยะเวลาในการผลิตเร็วกว่าถึง 10 วัน (รูปที่ 65) และให้อัตราการผลิตกรดโคจิกสูงกว่า 1.26 กรัมต่อลิตรต่อวัน

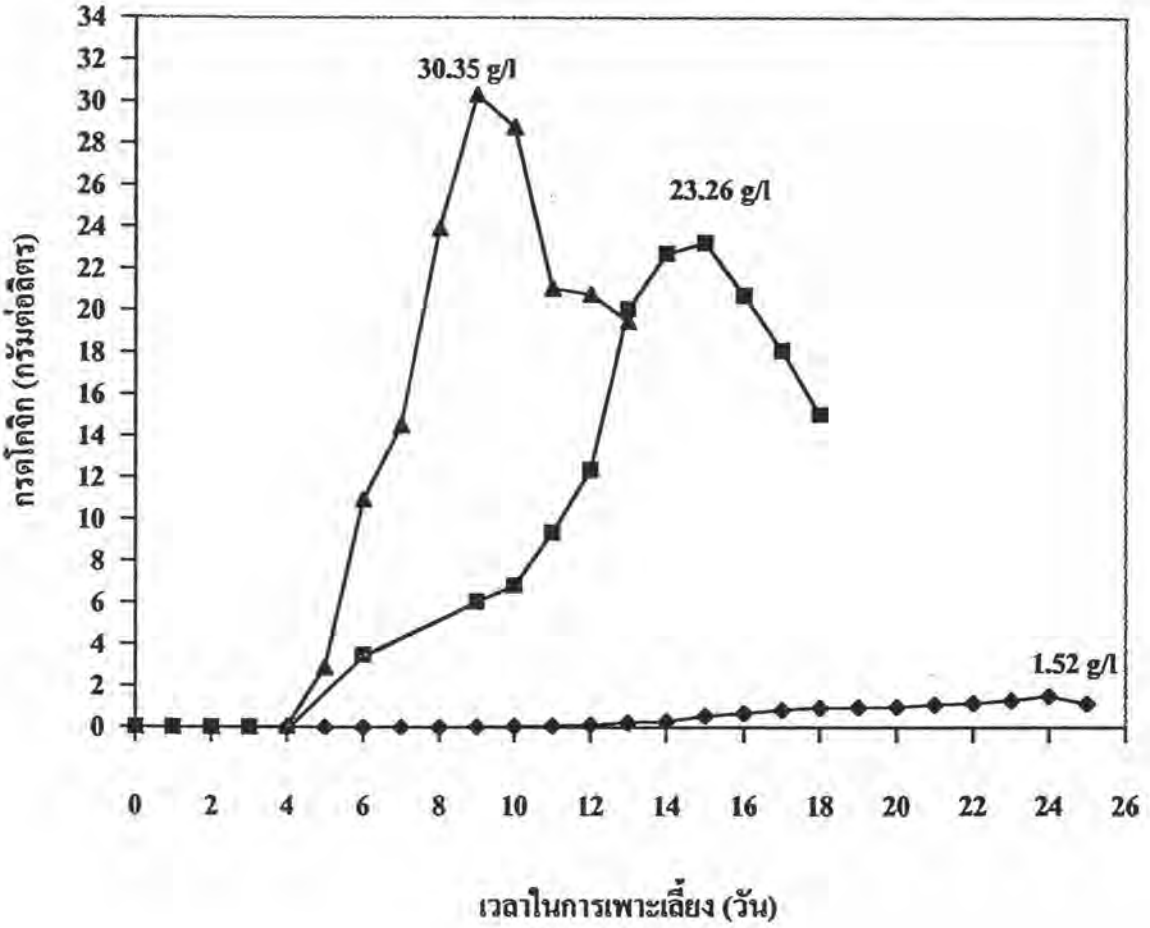
8. ผลการวิเคราะห์กรดโคจิกที่สร้างขึ้นจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

8.1 ผลการวิเคราะห์ชนิดของกรดอินทรีย์ที่สร้างโดย *A. oryzae* K13

เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของกรดอินทรีย์เป็นระยะๆตลอดการทดลองจากตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว พบว่ากรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นนั้นมีช่วงเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ Zorbax C-8 และ Spherisorb C-18 เช่นเดียวกับกรดโคจิกมาตรฐาน และเมื่อใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 20 นาที พบว่าไม่มีการปนเปื้อนของกรดอินทรีย์ชนิดอื่นเลย ซึ่งในที่นี้จะแสดงตัวอย่างผลการวิเคราะห์น้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสม (ภาคผนวก ก12) อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 1.0 ใช้หัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 66 และ 67 ตามลำดับ

8.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดโคจิกด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

เมื่อนำตัวอย่างน้ำหมักจากข้อ 8.1 มาทำการวิเคราะห์และคำนวณหาปริมาณของกรดโคจิกโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดโคจิก เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (ภาคผนวก ค2) และใช้วิธีการคำนวณในภาคผนวก ง1 พบว่าน้ำหมักดังกล่าวมีปริมาณกรดโคจิก 21.95 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณกรดโคจิกที่วิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี (Bentley, 1957) คือ เท่ากับ 21.02 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรดโคจิกที่วิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง จะมีค่าสูงกว่าปริมาณกรดโคจิกที่วิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี 0.93 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณกรดโคจิกจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีมีค่าสูงกว่าเท่ากับ 4.24 เปอร์เซ็นต์ จึงแสดงให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ทางเคมี (Bentley, 1957) เป็นวิธีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการวัดปริมาณกรดโคจิก แต่การวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูงมีความไวสูงกว่า

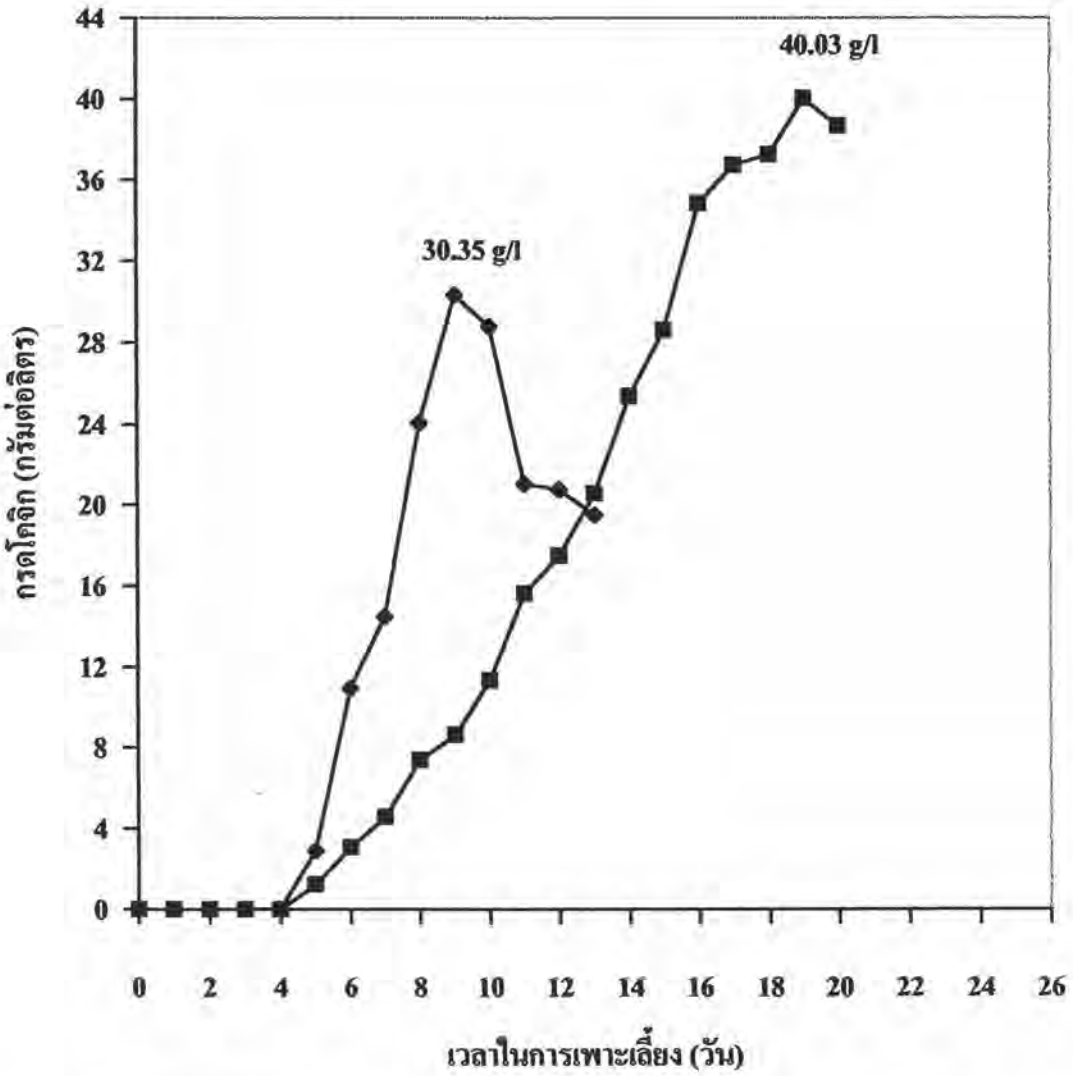


◆ ปริมาณกรดโคจิกจากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดั้งเดิม (รพี โรจนอุไร, 2539)

■ ปริมาณกรดโคจิกจากสูตรอาหารที่เหมาะสมจากงานวิจัยนี้ (ภาคผนวก ก12) ก่อนการจัดภาวะการผลิต

▲ ปริมาณกรดโคจิกจากสูตรอาหารที่เหมาะสมจากงานวิจัยนี้ (ภาคผนวก ก12) หลังจัดภาวะให้เหมาะสม

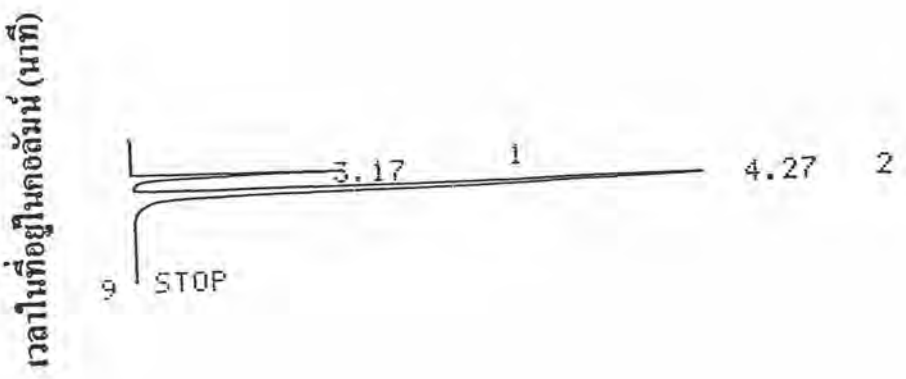
รูปที่ 64 เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ภายใต้สูตรอาหารและภาวะการเพาะเลี้ยงก่อนและหลังการจัดให้เหมาะสม



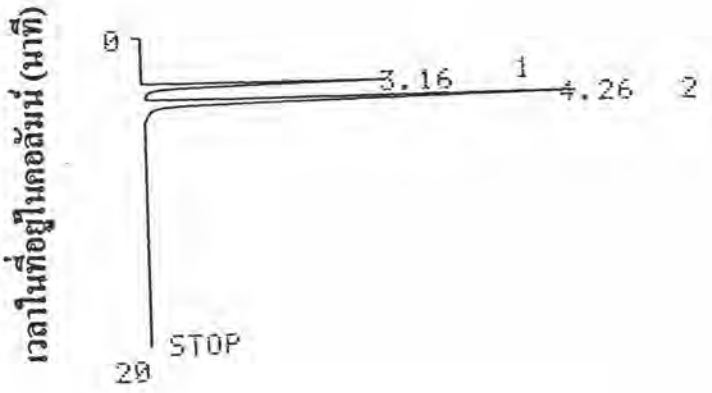
◆ ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตโดย *A. oryzae* K13 เมื่อเพาะเลี้ยงแบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ภายใต้สูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสม

■ ปริมาณกรดโคจิกที่ผลิตโดย *A. oryzae* K13 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า ภายใต้สูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสม

รูปที่ 65 เปรียบเทียบปริมาณกรดโคจิกภายใต้สูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวและในอาหารเหลวระดับขวดเขย่า



(ก)



(ข)

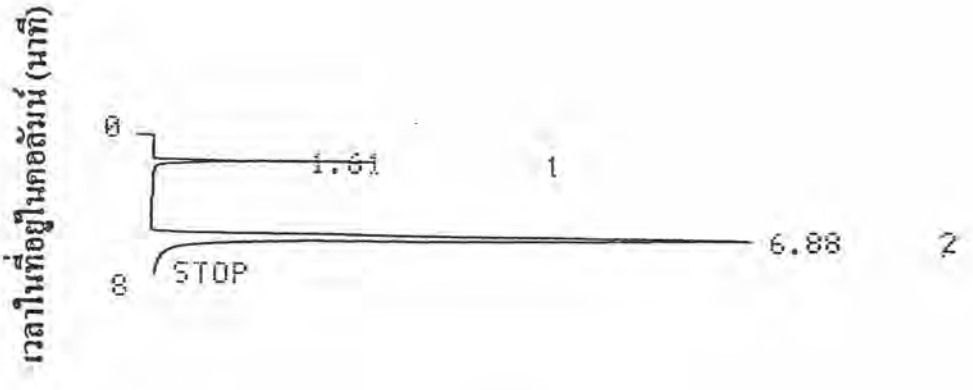
รูปที่ 66 โครมาโตแกรมของกรดโคจิกมาตรฐานและกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Zorbax C-8

(ก) กรดโคจิกมาตรฐานผสมกับกรดกลูโคนิกมาตรฐาน

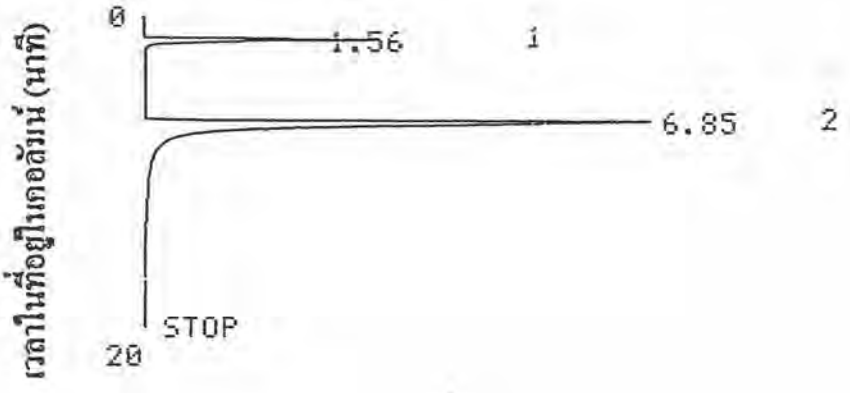
(ข) กรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดย *A. oryzae* K13 ผสมกับกรดกลูโคนิกมาตรฐาน ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 20 นาที

1 หมายถึง กรดกลูโคนิก (สารมาตรฐานภายใน)

2 หมายถึง กรดโคจิก



(ก)



(ข)

รูปที่ 67 โครมาโตแกรมของกรดโคจิกมาตรฐานและกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Spherisorb C-18

(ก) กรดโคจิกมาตรฐานผสมกับกรดกลูโคนิกมาตรฐาน

(ข) กรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดย *A. oryzae* K13 ผสมกับกรดกลูโคนิกมาตรฐาน ซึ่งใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน 20 นาที

1 หมายถึง กรดกลูโคนิก (สารมาตรฐานภายใน)

2 หมายถึง กรดโคจิก