# บทที่ 4
# สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

## สรุปผลการวิจัย

1.การวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ด้วยวิธี HPLC ยืนยันว่าเป็นกรดโคจิก เนื่องจากมีช่วงเวลาอยู่ในคอลัมน์เช่นเดียวกับกรดโคจิกมาตรฐาน

2.การวิเคราะห์จุดหลอมเหลวของกรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดย *Aspergillus oryzae* K-13 โดยเครื่อง Differentail Scanning Colorimetry มีค่าเท่ากับ 156.2 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับกรดโคจิกมาตรฐานซึ่งมีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 157.1 องศาเซลเซียส

3.น้ำตาลทรายขาวปริมาณ 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

4.อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกคือ 840 : 2 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนรวม 2 ชนิดคือสารกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตราส่วนน้ำหนัก 0.5 : 0.24 ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 37.95 กรัมต่อลิตร

**5.ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกมีค่าเท่ากับ 4.5**

**6.การใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดโคจิกให้ผลผลิตต่ำกว่าการใช้น้ำปลอดประจุ**

**7.อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดโคจิกประกอบด้วยน้ำตาลทรายขาว 100 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.24 กรัมต่อลิตร**

**8.อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกที่สุดคืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส**

9.อายุและขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตรคือ หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมงความหนาแน่น 4-8 x $10^7$ สปอร์งอก

10.สามารถใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกได้โดยให้ผลผลิตกรดโคจิกใกล้เคียงกัน

11.เมื่อผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดถึง 40.03 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งสูงกว่าผลผลิตกรดโคจิกเริ่มต้นเมื่อยังไม่ได้จัดภาวะในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมถึง 10.64 กรัมต่อลิตร

## วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการทดลองผลิตกรดโคจิกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกแตกต่างกัน 5 สูตร คือ โมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่หนึ่ง (Modified Czapex-dox I) โมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่สอง (Modified Czapex-dox II) ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครส (YES) โมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์สูตรที่หนึ่ง (Modified YES I) และ โมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สอง (Modified YES II) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สองให้ปริมาณกรดโคจิกสูงที่สุด รองลงมาคือโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่หนึ่งและโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่สอง ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสและโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่หนึ่งจะให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำมากจนอาจกล่าวได้ว่าไม่มีการผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อสองสูตรนี้ ดังแสดงในรูปที่ 14 ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สูตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสและโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่หนึ่ง (ซึ่งให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำมาก) จะมีปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากันและมีปริมาณสูงที่สุดเมื่อเทียบกับปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอื่นที่ทำการทดลอง คือ 2.0 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ รองลงมาคือปริมาณไนโตรเจนในอาหาร

เลี้ยงเชื้อโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่หนึ่งและโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่สอง ส่วนปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สองจะมีปริมาณน้อยที่สุด ( 0.2 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งปริมาณไนโตรเจนดังกล่าวมีผลทำให้การเติบโตของสายใยในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่หนึ่งและยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูงเป็นอันดับหนึ่งและสอง (รูปที่ 14) ส่วนการเติบโตของสายใยในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่สองและโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่หนึ่งจะมีการเติบโตมากเป็นลำดับที่สามและสี่ แม้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่หนึ่งจะมีปริมาณไนโตรเจนรวมสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่สองซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่หนึ่งใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนเสริม ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่สองใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้การเติบโตของรา *Aspergillus oryzae* K-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่สองสูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tamiya (1928) ได้ทำการศึกษาพบว่ารา *Aspergillus oryzae* มีความสามารถใช้ไนโตรเจนจากแอมโมเนียมได้เร็วกว่าไนโตรเจนจากไนเตรตจึงมีการเติบโตสูงกว่า ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงจะให้การเติบโตของสายใยสูงและจะให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Coupland และ Niehaus (1987) และ Kwak และ Rhee (1992b) และ Ogawa และคณะ (1995) ที่สรุปว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงจะให้การเติบโตของสายใยสูงมีผลทำให้การผลิตกรดโคจิกลดลง

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 สูตรพบว่าโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่สองซึ่งให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารลดลงต่ำที่สุดคือ 2.5 ส่วนโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่หนึ่งและโมดิฟายซาเพ็กซ์ดอกซ์สูตรที่สองจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงต่ำสุดเท่ากับ 3.5 และ 4.0 ตามลำดับในขณะที่ยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์

ซูโครสและโมดิฟายยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครสสูตรที่หนึ่งจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 - 5.5 (รูปที่ 15) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kwak และ Rhee (1992a) และ Ogawa และคณะ (1995) และ Ariff และคณะ (1996) ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* จะอยู่ในช่วง 2.5 - 3.0 นอกจากนี้ Katagiri และ Kitahara (1933) รายงานว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงจะทำให้มีการเติบโตสูงมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างไม่ลดลงถึงระดับที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

แหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญต่อการผลิตกรดโคจิก จากการทดลองผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยทำการแปรผันชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่างๆพบว่า *Aspergillus oryzae* K-13 มีความสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งน้ำตาลโมเลกุลคู่ซึ่งได้แก่มอลโตสและซูโครส และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวซึ่งได้แก่กลูโคสและฟรุคโตส และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีจำนวนคาร์บอน 5 อะตอมได้แก่น้ำตาลไซโลส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Morton และคณะ (1945) ที่รายงานว่าระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิกสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด และจากผลการทดลองที่พบว่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนทุกชนิดที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกดีที่สุดคือปริมาณคาร์บอน 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยน้ำตาลซูโครสจะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดรองลงมาได้แก่กลูโคส มอลโตส ฟรุคโตสและไซโลสตามลำดับ (รูปที่ 16 ) สำหรับการใช้น้ำตาลพบว่ากลูโคส มอลโตส ฟรุคโตส และไซโลสจะให้การเติบโตของสายใยรา *Aspergillus oryzae* K-13 สูงกว่าน้ำตาลซูโครสมีผลทำให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำกว่า แม้ว่าจะมีการใช้น้ำตาลในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แสดงว่าน้ำตาลต่างชนิดกันจะส่งเสริมการเติบโตของรา *Aspergillus oryzae* K-13 แตกต่างกันด้วย ซึ่ง Bajpai และคณะ (1982) รายงานว่าถ้าแหล่งคาร์บอนถูกออกซิไดส์ไปเพื่อใช้ในการเติบโตมากจะทำให้ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่จะใช้ในการผลิตกรดโคจิกเหลือน้อยมีผลทำให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าน้ำตาลไดแซคคาไรด์มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกเนื่องจากราจะนำไปใช้ในการเติบโตได้ช้ากว่าพวกโมโนแซคคาไรด์ จึงทำให้เหลือ

ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่จะนำไปใช้ผลิตกรดโคจิกปริมาณมาก (อ้างถึงใน Beelik , 1956) นอกจากทดลองแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนแล้วงานวิจัยนี้ยังได้ทดลองแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนด้วย พบว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยตั้งแต่วันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยงเป็นต้นไป (รูปที่ 17 - 22) ซึ่งอาจทำให้มีแหล่งคาร์บอนไม่เพียงพอต่อการผลิตกรดโคจิกจึงทำให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำ ส่วนที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นเท่ากับ 150 และ 200 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีปริมาณน้ำตาลมากแต่กลับให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำกว่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่ง May และคณะ (1931) ได้รายงานว่าถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus flavus* มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงจะมีผลทำให้ค่าแรงดันออสโมติกในอาหารเลี้ยงเชื้อสูง ซึ่งเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีพของราจึงทำให้กิจกรรมต่างๆภายในเซลล์ลดลง มีผลทำให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำ

จากการทดลองใช้น้ำตาลทรายขาวแทนน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์เพื่อผลิตกรดโคจิก พบว่าสามารถใช้น้ำตาลทรายขาวแทนน้ำตาลซูโครสได้โดยที่ผลผลิตกรดโคจิกไม่แตกต่างกันมาก โดยน้ำตาลซูโครสให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 31.39 กรัมต่อลิตรในขณะที่น้ำตาลทรายขาวให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 29.95 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงความบริสุทธิ์ของน้ำตาลทรายขาวซึ่งมีความบริสุทธิ์เฉลี่ยเท่ากับ 99.89 เปอร์เซ็นต์ (กระทรวงอุตสาหกรรม , 2540) ซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงมากจึงสามารถใช้แทนน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ได้ จึงนับว่าเป็นข้อดีที่สำคัญมากเนื่องจากการตรวจสอบราคาท้องตลาดของน้ำตาลทั้งสองชนิดพบว่าน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์จะมีราคาสูงกว่าน้ำตาลทรายขาวถึงประมาณ 30 เท่า ซึ่งถ้าเป็นการผลิตในระดับอุตสาหกรรมการใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกแต่ให้ผลผลิตดีถือว่าเป็นสิ่งสำคัญมาก

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญเพื่อการเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ของรา ซึ่งงานวิจัยนี้ได้ทำการแปรผันปริมาณแหล่งไนโตรเจนและอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนพร้อมๆกัน ซึ่งจากผลการทดลองใช้น้ำตาลทรายขาว 100 กรัมต่อลิตรเป็น

แหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตรซึ่งคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 2 จะให้ผลผลิตกรดโคจิกดีที่สุด (รูปที่ 27) และเมื่อพิจารณาการเติบโตของสายใยพบว่าถ้าความเข้มข้นของสารสกัดยีสต์เพิ่มมากขึ้น การเติบโตของสายใยก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วย (รูปที่ 28) ในขณะที่ผลผลิตกรดโคจิกจะลดลง (รูปที่ 27) แต่พบว่าการใช้น้ำตาลไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 29) แสดงว่าในอาหารที่มีปริมาณสารสกัดจากยีสต์มากราจะใช้น้ำตาลเพื่อการเติบโตมากกว่าที่จะนำไปใช้เพื่อการผลิตกรดโคจิก เนื่องจากในสารสกัดจากยีสต์จะมีทั้งแหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุที่ส่งเสริมการเติบโตอยู่ในปริมาณมากโดยมีแมกนีเซียม กรดอะมิโน และวิตามินต่างๆหลายชนิด (Cantarelli and Lanzarini , 1989) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ogawa และคณะ (1995) ซึ่งทดลองผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อแปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ต่างๆกัน พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณสารสกัดจากยีสต์ปริมาณมาก ราจะใช้น้ำตาลกลูโคสไปพื่อการเติบโตเป็นผลให้การผลิตกรดโคจิกลดลง และจากผลการทดลองนี้ยังพบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 5 และ 10 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่างจะเพิ่มขึ้นจากค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 4.5 เป็น 5.0 และ 5.7 ตามลำดับระหว่างการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 30) ซึ่งเป็นภาวะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกทำให้ได้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Katagiri และ Kitahara (1933) และ Barham และ Smith (1936) และ Kwak และ Rhee (1992b) และ Ogawa และคณะ (1995) ซึ่งพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกจะมีค่าอยู่ในช่วง 2.0 - 3.5 และเมื่อพิจารณาถึงปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าเมื่อใช้สารสกัดยีสต์ปริมาณ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนในวันสิ้นสุดการทดลองจะมีปริมาณไนโตรเจนเหลือเท่ากับ 0.06 และ 0.144 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (รูปที่ 31) ซึ่งอาจเป็นสาเหตุให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำเนื่องจากมีรายงานว่าการผลิตกรดโคจิกจะเริ่มเมื่อปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงใกล้จะหมด

เท่านั้น ( Kwak and Rhee , 1992a ; Ariff et.al. , 1996 ) เนื่องจากกรดโคจิกจัดอยู่ในกลุ่มของสารเมตะโบไลต์ที่จะสร้างขึ้นหลังจากรามีการเติบโตสูงสุดแล้ว (อ้างถึงใน Arnstein และ Benyley , 1951 ; อ้างถึงใน Beelik , 1956 ; อ้างถึงใน Bajpai 1982 )

หลังจากได้ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 แล้วคือเท่ากับ 1.0 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งคิดเป็นปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 2 การทดลองต่อมาจึงได้ทดลองลดปริมาณสารสกัดจากยีสต์ลงครึ่งหนึ่งแล้วเสริมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์แทนเนื่องจากมีราคาถูกกว่าสารสกัดจากยีสต์มาก ซึ่งได้ทำการทดลองเสริมแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน 2 ชนิด ได้แก่แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรต ผลการทดลองพบว่าที่อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 840 : 2 ก็ยังคงให้ผลผลิตกรดโคจิกดีที่สุดและพบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เสริมจะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เสริม (รูปที่ 33) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Kwak และ Rhee ( 1992a ) ซึ่งทดลองผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนรวม 2 ชนิดได้แก่ สารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก และเมื่อพิจารณาถึงน้ำหนักแห้งของสายใยพบว่าในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งอนินทรีย์เสริมจะมีการเติบโตมากมีผลทำให้การผลิตกรดโคจิกลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ May และคณะ (1931) ซึ่งทดลองผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus flavus* แล้วแปรผันแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิดได้แก่แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรต พบว่าแอมโมเนียมไนเตรตจะส่งเสริมให้รามีการเติบโตดีกว่าแอมโมเนียมซัลเฟต และจากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและแอมโมเนียมไนเตรตในปริมาณที่สูงขึ้นจะทำให้ผลผลิตกรดโคจิกลดลง (ตารางที่ 9) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Coupland และ Niehaus (1987) ซึ่งทำการแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus parasiticus* เขาพบว่าถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณแอมโมเนียมอิออนมากจะมีผล

ทำให้การผลิตกรดโคจิกถูกยับยั้ง แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด แต่จากรายงานของ Yabuta (1913) กล่าวว่าปริมาณแอมโมเนียมอิออนที่มากเกินไปจะเปลี่ยนรูปไปเป็นแอมโมเนียมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก

จากการทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมของปริมารณสารสกัดจากยีสต์ต่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตสำหรับการผลิตกรดโคจิก พบว่าแม้จะจัดให้มีปริมาณไนโตรเจนรวมในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากัน คือเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร แต่ถ้าอัตราส่วนระหว่างปริมาณสารสกัดจากยีสต์ต่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตต่างกัน จะมีผลทำให้การเติบโตของสายใยและผลผลิตกรดโคจิกแตกต่างกันด้วย (ตารางที่ 10) จะเห็นได้ว่ากรณีที่สารสกัดจากยีสต์มีปริมาณน้อยกว่า 0.5 กรัมต่อลิตรจะให้น้ำหนักแห้งสายใยเพียง 5.43 กรัมต่อลิตรและให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 18.42 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ถ้าให้สารสกัดยีสต์สูงกว่า 0.5 กรัมต่อลิตรจะให้น้ำหนักแห้งสายใยเป็น 6.28 กรัมต่อลิตรและให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 35.64 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนระหว่างปริมาณสารสกัดยีสต์ต่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลกระทบต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 โดยถ้ามีสารสกัดจากยีสต์ปริมาณน้อยเกินไปก็จะทำให้การเติบโตของ *Aspergillus oryzae* K-13 น้อยเกินไปทำให้มีปริมาณสายใยไม่เพียงพอต่อการให้ผลผลิตสูงจึงส่งผลให้ได้ปริมาณกรดโคจิกน้อยลงด้วย แต่ถ้ามีปริมาณมากเกินไปจะทำให้การเติบโตของ *Aspergillus oryzae* K-13 มากเกินไปมีผลทำให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำเช่นกันเนื่องจากมีความโน้มเอียงจะเป็นการเติบโตมากกว่าการผลิตซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kwak และ Rhee (1992a) ที่ได้ทดลองแปรผันปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* NRRL-484 พบว่าถ้าในอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนน้อยหรือมากเกินไปจะมีผลทำให้ผลผลิตกรดโคจิกลดลง นอกจากนี้จากการทดลองนี้ยังพบว่าเมื่ออัตราส่วนระหว่างปริมาณไนโตรเจนในสารสกัดจากยีสต์ต่อปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.025 : 0.075 จะให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำมากในขณะที่อัตราส่วนระหว่างปริมาณไนโตรเจนใน

สารสกัดยีสต์ต่อปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.075 : 0.025 ให้ปริมาณกรดโคจิกต่ำกว่าเมื่ออัตราส่วนปริมาณไนโตรเจนในสารสกัดยีสต์ต่อปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.05 : 0.05 เพียงเล็กน้อยซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าที่อัตราส่วน 0.025 : 0.075 นอกจากจะมีปริมาณสารสกัดจากยีสต์น้อยจึงทำให้มีไนโตรเจนและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเติบโตน้อยเกินไปจึงทำให้ได้ปริมาณสายใยน้อยซึ่งส่งผลให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำแล้วยังอาจมีผลมาจากมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไปทำให้มีปริมาณแอมโมเนียมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงซึ่งมีรายงานว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแอมโมเนียมสูงการผลิตกรดโคจิกจะถูกยับยั้งเนื่องจากแอมโมเนียมจะเปลี่ยนรูปไปเป็นแอมโมเนียทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ลดลงจนถึงระดับที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก (Coupland and Niehaus , 1987) ซึ่งจากผลการทดลองนี้พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตมากคือที่อัตราส่วนปริมาณไนโตรเจนในสารสกัดยีสต์ต่อปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.025 : 0.075 จะไม่ลดลงต่ำกว่า 4.0 ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนปริมาณไนโตรเจนในสารสกัดยีสต์ต่อปริมาณไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.05 : 0.05 และ 0.075 : 0.025 จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงต่ำสุดเท่ากับ 2.5 (ตารางที่ 11) จึงทำให้ได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงกว่า

จากการทดลองหาค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 4.0 - 5.0 จะให้ปริมาณกรดโคจิกสูงใกล้เคียงกันและมีการเติบโตของสายใยใกล้เคียงกันด้วย (รูปที่ 43 และ 44) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lin และคณะ (1976) ที่ทดลองผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus parasiticus* UNBF-A12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์เอ็กซ์แทรกซ์ซูโครส แล้วแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในช่วง 3.0 - 8.2 พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 4.0 - 5.0 จะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูง ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นในช่วง 5.5 - 7.5 จะมีการเติบโตมากมีผลทำให้การผลิตกรดโคจิกลดลง นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับรายงานของ Katagiri และ Kitahara (1933) พบว่า

ค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 5.0 จะเป็นค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *Aspergillus oryzae* จากการทดลองนี้เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ (รูปที่ 45 และ 46) พบว่าที่ช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 - 5.0 น้ำตาลทรายขาวจะถูกสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมดภายในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยงส่วนที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 2.5 - 3.5 น้ำตาลทรายขาวจะถูกสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมดภายในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 - 7.5 น้ำตาลทรายขาวจะถูกสลายเป็นน้ำตาลรีดิวซ์หมดภายในวันที่ 3-4 ของการเพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดโคจิกมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เตสซึ่งทำหน้าที่สลายโมเลกุลน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตสซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rosenberg และคณะ (1992) ซึ่งพบว่าเอนไซม์อินเวอร์เตสในกลุ่มรา *Aspergillus* จะทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.0 - 5.0 นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกของงานวิจัยนี้พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นในช่วง 4.0 - 4.5 จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่างการผลิตลดต่ำมากกว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นค่าอื่น (รูปที่ 47) ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหมาะสมต่อระบบการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิกจึงให้ผลผลิตกรดสูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Arnstein และ Bentley (1951) ซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับวิถีการผลิตกรดโคจิกโดยราในกลุ่ม *Aspergillus* พบว่าเอนไซม์ไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดความสมดุลย์ของไดไฮดรอกซีอะซีโตนและกลีเซอรอลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่ใช้สำหรับการผลิตกรดโคจิกจะถูกทำลายในสภาวะด่างและจะมีความคงตัวในสภาวะกรดซึ่งตรงกับรายงานของ Yabuta (1923) และ Katagiri และ Kitahara (1933) และ Kwak และ Rhee (1992b) และ Ogawa และคณะ (1995) และ Ariff และคณะ (1996) ซึ่งพบว่าการผลิตกรดโคจิกจะเกิดในสภาวะกรดเท่านั้นโดยค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 2.0 - 3.0

เมื่อทดลองใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ผลปรากฏว่าเมื่อใช้น้ำประปาเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแทนน้ำปลอดประจุทำให้ผลผลิตกรดโคจิกลดลงประมาณ 2.5 เท่า แต่ให้การเติบโตของสายใยมากกว่าประมาณ 1.5 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 48 เมื่อพิจารณาปริมาณสารอาหารในน้ำประปาในกรุงเทพมหานครซึ่งวิเคราะห์โดยการประปานครหลวงประจำปีงบประมาณ 2539 (ในช่วงเดือนตุลาคม 2538 - กันยายน 2539) ซึ่งเป็นช่วงที่ทำการวิจัยพบว่ามีปริมาณไนโตรเจนอยู่ประมาณ 0.402 มิลลิกรัมต่อลิตร (การประปานครหลวง, 2540) มีผลทำให้ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมโดยน้ำประปามีมากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมโดยน้ำปลอดประจุ นอกจากนี้ในน้ำประปายังมีแมกนีเซียมและซัลเฟตอยู่ในปริมาณ 8.20 และ 43.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งมีรายงานว่าแมกนีเซียมและซัลเฟตจะเป็นแร่ธาตุเร่งการเติบโตของสายใยรา (May et. al. , 1931 ; Coupland and Niehaus , 1987) ซึ่ง ทั้งสองปัจจัยที่กล่าวมาคือปริมาณไนโตรเจนและแร่ธาตุที่มีในน้ำประปาอาจจะกระตุ้นให้รา *Aspergillus oryzae* K-13 ที่เพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมโดยน้ำประปามีการเติบโตมากกว่ารา *Aspergillus oryzae* K-13 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมโดยน้ำปลอดประจุ มีผลทำให้การผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมโดยน้ำประปาลดลงเนื่องจากราใช้แหล่งคาร์บอนไปเพื่อการเติบโตมากกว่าที่จะใช้ผลิตกรดโคจิก นอกจากนี้ในน้ำประปายังมีคลอไรด์ไอออนและไซยาไนด์ ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่มีผลทำให้การผลิตกรดโคจิกลดลงโดยมีรายงานของ Gould (1938) พบว่าคลอไรด์จะยับยั้งขบวนการฟอสโฟรีเลชั่นของเซลล์ราทำให้เซลล์ไม่สามารถนำคาร์บอนไปใช้ได้ดีมีผลทำให้การผลิตกรดโคจิกลดลง นอกจากนี้ Kitada และ Fukimbara (1970) รายงานว่าไซยาไนด์จะไปยับยั้งขบวนการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* โดยไซยาไนด์จะไปยับยั้งขบวนการนำกลูโคสไปใช้ของเซลล์ ซึ่งจากผลการทดลองนี้อาจทำให้กล่าวได้ว่าปริมาณกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมโดยน้ำประปาต่ำเนื่องจากสองปัจจัยคือ

1.มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเติบโตของสายใยมาก ทำให้มีการเติบโตของสายใยสูงแหล่งคาร์บอนจึงถูกใช้ไปเพื่อการเติบโตมากกว่าที่จะนำไปใช้ผลิตกรดโคจิก

2.มีแร่ธาตุที่ยับยั้งขบวนการนำแหล่งคาร์บอนไปใช้ของเซลล์เพื่อการผลิตกรดโคจิก ซึ่งได้แก่ ไซยาไนด์และคลอไรด์ มีผลทำให้การผลิตกรดโคจิกลดลง

ดังนั้นจึงน่าจะมีงานวิจัยต่อไปที่จะทดลองใช้แหล่งน้ำอื่นๆทดแทนน้ำประปาและน้ำปลอดประจุซึ่งอาจทำให้ลดต้นทุนการผลิตได้

เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเติบโตและผลิตกรดโคจิกดังนั้นจึงทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* K-13 ซึ่งพบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่ให้ปริมาณกรดโคจิกสูงสุดคือ 30 องศาเซลเซียส รองลงมาคือการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส อุณหภูมิห้อง (30 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียสให้น้ำหนักแห้งของสายใยน้อยจึงเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการเติบโตและผลิตกรดโคจิก ส่วนที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสแม้ว่าจะมีน้ำหนักแห้งของสายใยใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูง (30 องศาเซลเซียส และ 32 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้อง) แต่กลับให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำจึงน่าจะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการเติบโตมากกว่าการผลิตกรดโคจิก (รูปที่ 50) ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในวันสิ้นสุดการทดลองคือเหลือปริมาณ 18.05 กรัมต่อลิตร แสดงว่าน้ำตาลถูกใช้เพื่อการผลิตกรดโคจิกน้อย ในขณะที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยงเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส 32 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ซึ่งมีการผลิตกรดโคจิกสูงจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในวันสิ้นสุดการทดลองเพียง 2.54 3.02 และ 2.87 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (รูปที่ 51) และเมื่อพิจารณาน้ำหนักแห้งและผลผลิตกรดโคจิกที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยงเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ 32 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้อง พบว่าให้น้ำหนักแห้งเท่ากับ 6.92 6.74 และ 6.10 กรัมต่อลิตรและให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 39.96 37.89 และ 37.95

กรัมต่อลิตรตามลำดับดังนั้นที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยงเท่ากับ 30 องศาเซลเซียสจึงเป็นอุณหภูมิที่ให้การเติบโตที่สมดุลกับการผลิตกรดโคจิกมากที่สุด ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ May และคณะ (1931) ที่ทดลองผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus flavus* แล้วแปรผันอุณหภูมิเพาะเลี้ยงเท่ากับ 22 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีความเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตกรดโคจิก โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจะเป็นอุณหภูมิที่ให้การเติบโตของสายใยที่พอเหมาะต่อการผลิตกรดโคจิกปริมาณสูง และพบว่าที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยงเท่ากับ 35 องศาเซลเซียสอัตราเมตะบอลิสึมสูงทำให้น้ำตาลถูกนำไปใช้เพื่อการเติบโตจึงมีการเติบโตของสายใยมาก ผลผลิตกรดโคจิกจึงน้อย นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Arnstein และ Bentley (1951) และ Bajpai และคณะ (1982) และ Kwak และ Rhee (1992a และ 1992b) และ Ogawa และคณะ (1995) และ Ariff และคณะ (1996) ว่าที่อุณหภูมิเพาะเลี้ยง 30 องศาเซลเซียสมีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยรา *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus flavus*

จากการทดลองผลิตกรดโคจิกโดยแปรผันอายุหัวเชื้อสปอร์ต่างๆกันได้แก่ หัวเชื้อสปอร์แขวนลอย และหัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 12 24 36 และ 46 ชั่วโมงของรา *Aspergillus oryzae* K-13 ซึ่งอยู่ในระยะการเติบโตต่างๆคือ ระยะต้นของระยะที่มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว ระยะกลางที่มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว ระยะปลายของระยะที่มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว และระยะที่มีการเติบโตคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 52 พบว่าเมื่อใช้สปอร์แขวนลอยในการผลิตกรดโคจิกจะให้ผลผลิตกรดโคจิกและน้ำหนักแห้งของสายใยต่ำสุด (รูปที่ 53) และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในวันสิ้นสุดการทดลองสูงคือ 15.32 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 58) ทั้งนี้เนื่องจากการสลายน้ำตาลทรายขาวเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ช้ากว่าสปอร์งอกเพราะต้องใช้เวลาระยะหนึ่งเพื่อการงอกของสปอร์ก่อนจึงจะมีกิจกรรมต่อไปได้ ในขณะที่หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 12 24 26 และ 48 ชั่วโมงจะให้น้ำหนักแห้งของสายใยใกล้เคียงกันแต่หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมงจะให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงที่สุดคือเท่ากับ 38.12 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 55) และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยที่สุดในวันสิ้น

สุดการทดลอง (รูปที่ 58) ดังนั้นหัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 ชั่วโมงจึงเป็นหัวเชื้อที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกเนื่องจากรา *Aspergillus oryzae* K-13 ที่เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะมีการเติบโตอยู่ในระยะกลางของช่วงที่มีการเติบโตมากและรวดเร็ว ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีประสิทธิภาพในการทำกิจกรรมของเซลล์สูง แต่จากการสืบค้นข้อมูลยังไม่มีรายงานการใช้หัวเชื้อสปอร์งอกเมื่อใช้สายใยอิสระผลิตกรดโคจิก (Beelik , 1956 ; Crueger and Crueger , 1990 ; Ariff et.al. , 1996) แต่มีรายงานการผลิตกรดโคจิกโดยใช้หัวเชื้อสปอร์งอกในรูปสายใยตรึง เช่น การตรึงสายใยในเม็ดเจลอัลจิเนต (Kwak and Rhee , 1992(a),(b)) และการใช้เยื่อบางๆเป็นพาหะสำหรับให้ราเกาะยึด (Ogawa et.al. , 1995) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าราที่มีระยะการเติบโตในช่วงที่มีการเติบโตมากและรวดเร็ว (log phase) จะมีระบบเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพและความคงตัวสูงที่จะผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆของเซลล์ (อ้างถึงใน Kwak and Rhee , 1992b)

ความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกจะมีผลต่อการผลิตกรดโคจิก โดยถ้าใช้ความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกน้อยจะมีผลทำให้ปริมาณสายใยที่จะผลิตกรดโคจิกน้อยทำให้ปริมาณกรดโคจิกที่ได้น้อย ในทางกลับกันถ้าใช้ความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกมากเกินไป จะมีผลทำให้มีการเติบโตของสายใยมากทำให้ผลผลิตกรดโคจิกน้อย จากผลการทดลองพบว่าความหนาแน่นที่เหมาะสมของหัวเชื้อสปอร์งอกคือ 4-8 x $10^7$ สปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิกปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นความหนาแน่นของสปอร์ที่ใกล้เคียงกับปริมาณความหนาแน่นของสปอร์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกที่ได้มีรายงานไว้โดย Lin และคณะ 1976 และ Bajpai และคณะ 1982 และ Ogawa และคณะ 1995 ที่พบว่าความหนาแน่นของสปอร์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยราในสกุล *Aspergillus* จะอยู่ในช่วง $10^5$ - $10^6$ สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อมีการเติบโตสูง จะทำให้ปริมาณออกซิเจนและสารอาหารสัมผัสกับสายใยได้ยากกว่าการใช้ความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกที่เหมาะสม ส่งผลให้ผลผลิตกรด

โคจิกลดลง ซึ่งปริมาณออกซิเจนมีความสำคัญต่อการผลิตกรดโคจิกมากเนื่องจากออกซิเจนจะเป็นปัจจัยสำคัญที่กระตุ้นให้เซลล์ราสร้างเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนสและเอนไซม์กลูโคเนตดีไฮโดรจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีการผลิตกรดโคจิก (Ariff et.al. , 1996)

จากการทดลองใช้น้ำประปาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกแทนน้ำปลอดประจุ ผลปรากฏว่าสามารถใช้น้ำประปาแทนได้โดยที่ผลผลิตกรดโคจิกใกล้เคียงกันมากแสดงให้เห็นว่าปริมาณแร่ธาตุหรือองค์ประกอบบางอย่างในน้ำประปาไม่มีผลกระทบในทางลบต่อการเติบโตและการเตรียมระบบเอนไซม์เพื่อการผลิตกรดโคจิกของ *Aspergillus oryzae* K-13 ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของการใช้ราสายพันธุ์นี้คือสามารถลดค่าใช้จ่ายสำหรับการเตรียมน้ำปลอดประจุในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อได้ และเมื่อทดลองผลิตกรดโคจิกภายใต้ภาวะที่เหมาะสมพบว่าได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 40.03 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นปริมาณกรดโคจิกที่สูงที่สุดซึ่งแสดงให้ทราบว่าชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตลอดจนภาวะของการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็น-กรดด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก รวมทั้งอายุและปริมาณของกล้าเชื้อมีผลต่อการผลิตกรดโคจิกโดยตรง

เมื่อทดลองผลิตกรดโคจิกภายใต้ภาวะที่เหมาะสมพบว่าได้ผลผลิตกรดโคจิกสูง 40.03 กรัมต่อลิตรในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นผลผลิตที่สูงกว่าการทดลองที่ได้มีรายงานโดยผู้อื่นได้แก่ Kwak และ Rhee (1992a) ผลิตกรดโคจิกโดยสายใยอิสระของ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 พบว่าให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด 25 กรัมต่อลิตรในวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง Ogawa และคณะ (1995) ผลิตกรดโคจิกโดยสายใยอิสระของ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 พบว่าให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด 20.5 กรัมต่อลิตรในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง Lin และคณะ (1976) ผลิตกรดโคจิกโดยสายใยอิสระของ *Aspergillus parasiticus* UNBFA 12 พบว่าให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดเท่ากับ 23.23 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วทำให้ทราบว่าข้อดีของ

สายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* K-13 คือให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงแต่ข้อเสียก็ยังคงมีคือใช้เวลาเพาะเลี้ยงนานคือต้องใช้เวลาเพาะเลี้ยง 20 วัน

**ข้อเสนอแนะ**

1.ควรจะมีการวิจัยใช้แหล่งน้ำอื่นๆ เช่นน้ำบาดาลหรือน้ำที่ผ่านการบำบัดจากโรงงานอุตสาหกรรมทดแทนน้ำปลอดประจุสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกและอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก เพื่อลดต้นทุนการผลิต

2.ควรมีงานวิจัยขั้นต่อไป คือขยายส่วนผลิตในถังที่มีการกวนและการให้อากาศ

3.เนื่องจากการผลิตกรดโคจิกโดย *Aspergillus oryzae* K-13 ใช้ระยะเวลาในการผลิตนาน ดังนั้นอาจมีการวิจัยเพื่อหาวิธีการเพาะเลี้ยงแบบอื่นมาใช้ เช่น การเพาะเลี้ยงแบบไม่มีการเขย่า (stationary culture) ซึ่งอาจลดค่าใช้จ่ายของขั้นตอนการกวนและการให้อากาศลงได้