บทที่ 5

วิจารณ์ผล

การแยกเชื้อจุลินทรีย์ในลูกแป้ง และการจำแนกเชื้อรา

จุลินทรีย์ที่พบในเชื้อหมัก มี 3 ประเภท คือ แบคทีเรีย ยีสต์ และ รา สำหรับราพบทั้งพวกที่สร้างสายใยที่มีผนังกั้น และไม่มีผนังกั้น จากตัวอย่างลูกแป้ง หรือเชื้อหมัก จำนวน 52 ตัวอย่าง ได้พบราที่สร้างสายใย 5 สกุล คือ Amylomyces sp. Aspergillus sp. Rhizopus sp. Mucor sp. และ Absidia sp. แต่จากการวิจัยของจิราภรณ์ สุขุมาวาสี (2518) ได้พบราที่สร้างสายใยเพียง 2 สกุล คือ Aspergillus sp. และ Rhizopus sp. ทั้งนี้อาจเป็นเพราะจำนวนตัวอย่างลูกแป้งที่แยกเชื้อมีเพียง 6 ตัวอย่าง

เชื้อ Rhizopus sp. จำแนกได้ถึงชนิดโดย Identification Services Commonwealth Mycological Institute ได้ผลว่า ทุกสายพันธุ์ที่พบในการสำรวจเป็น R. oryzae ยกเว้นสายพันธุ์ R_9 ที่อาจเป็น R. microsporus ซึ่งตรงกับที่มีผู้รายงานไว้ว่า ราที่พบในรากิ คือ R. oryzae และ Chlamydomucor oryzae (Went และ Geerligs, 1896) สำหรับเชื้อ Chlamydomucor oryzae ภายหลังได้มีผู้จำแนกได้ว่าเป็น Amylomyces oryzae (Ellis, Rhodes และ Hesseltine, 1976) Morita และคณะ (1966) ได้รายงานว่า ราที่มีในโคจิ คือ Aspergillus oryzae

จากผลการวิจัยนี้ ได้พบว่าสกุลของราที่พบในลูกแป้งต่างชนิดกัน คือ ลูกแป้งข้าวหมัก ลูกแป้งเหล้า และส่าน้ำส้ม ไม่มีความแตกต่างกัน คือ ในลูกแป้งแต่ละตัวอย่างได้พบราสกุลใดสกุลหนึ่ง หรือมากกว่าหนึ่งสกุล ในจำนวน 5 สกุลดังกล่าวแล้ว

และชนิดของเชื้อที่พบก็มีความแตกต่างไปตามภูมิประเทศบ้าง ดังในตารางที่ 1 คือ ภาคเหนือ พบ Amylomyces sp. Aspergillus sp. Mucor sp. แต่ไม่พบ Rhizopus sp. ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบทั้ง Amylomyces sp. Aspergillus sp. Mucor sp. และ Rhizopus sp. ส่วนภาคใต้ พบแค่ 2 สกุล คือ Amylomyces sp. และ Rhizopus sp.

การตรวจหาปริมาณรีดิวซิงชูการ์ทั้งหมดเพื่อใช้คัดสายพันธุ์

จากผลการทดลองในกราฟที่ 2 ได้ผลว่า R. oryzae 10 สายพันธุ์ และ R. microsporus 1 สายพันธุ์ ให้รีดิวซิงชูการ์ทั้งหมดปริมาณไม่เท่ากัน เมื่อหมักเชื้อด้วยสปอร์จำนวน 50 x 10^5 สปอร์/มล. กับข้าวเหนียว 20 กรัม ปริมาณรีดิว-ซิงชูการ์ทั้งหมดที่ได้ในวันที่ 4 จากสายพันธุ์ R_8 R_3 R_2 R_5 R_9 R_7 เท่ากับ 1.66 มก/มล. 1.59 มก./มล. 1.20 มก./มล. 1.15 มก./มล. 1.10 มก./มล. และ 0.98 มก./มล. ตามลำดับ โดยที่ปริมาณรีดิวซิงชูการ์ทั้งหมดที่ได้มีปริมาณสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก และลดลงในวันที่ 6 8 และ 10 ของการหมักเช่นเดียวกันทุกสายพันธุ์ แสดงว่า แอมิเลสที่ได้จาก R. oryzae ทุกสายพันธุ์มีแบบแผนในการทำงานอย่างเดียว แต่ความสามารถของแต่ละสายพันธุ์ที่จะปล่อยแอมิเลสอาจไม่เท่ากัน จึงทำให้ปริมาณของรีดิวซิงชูการ์ทั้งหมดของแต่ละสายพันธุ์ไม่เท่ากัน แอมิเลสที่ถูกปล่อยจากรานี้จะย่อยสลาย สารประเภทแป้ง ได้น้ำตาลที่มีคุณสมบัติเป็นรีดิวซิงชูการ์ น้ำตาลบางส่วนจะถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของเซล ดังนั้น ในระยะหลังของการเจริญ ปริมาณรีดิวซิงชูการ์ทั้งหมดจึงลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากสารตั้งต้น มีปริมาณน้อยลง และจากวันที่ 4 ไปแล้วรามีการเจริญเติบโตมาก จึงมีการใช้รีดิวซิงชูการ์ไปมาก เพื่อการเจริญหรืออาจเนื่องมาจากในระยะหลัง รามีการสร้างสารชนิดที่ 2 (secondary metabolite) เช่น แอลกอฮอล์ ซึ่งมีรายงานว่า Rhizopus sp. มีเอนซายม์ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ที่หมักกลูโคสแล้วได้เอททานอล(Gleason, 1971)

การศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโต ช่วงระยะเวลาในการสร้างอับสปอร์ การเปลี่ยนแปลงสีของอับสปอร์ ของ Rhizopus sp.11 สายพันธุ์

จากกราฟที่ 3 ได้พบว่า Rhizopus sp. ทั้ง 11 สายพันธุ์ มีอัตราการเจริญเติบโตในระยะเวลา 60 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 ± 2° ซ. ใกล้เคียงกัน นอกจากสายพันธุ์ R_9 ที่มีการเจริญช้ากว่าสายพันธุ์อื่น ๆ มาก Commonwealth Mycological Institute ได้รายงานว่า สายพันธุ์ R_9 มีการเจริญเติบโตดีที่ 45° ซ จากการวิจัยนี้พบว่า สายพันธุ์ R_3 มีอัตราการเจริญดีกว่าสายพันธุ์ R_8 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแป้งข้าวจ้าว และรีดิวซิงชูการ์ที่ได้จากการหมักข้าวเหนียวโดยสายพันธุ์ R_8 มีปริมาณสูงกว่ารีดิวซิงชูการ์ที่ได้จากสายพันธุ์ R_3 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแอมีเลสกับการเจริญเติบโตของ Monascus purpureus พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโต กับความสามารถของแอมีเลส (สุมาลี พิชญางกูร, 2520)

การสร้างอับสปอร์ และการเปลี่ยนสีของอับสปอร์ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5 ได้พบว่า สายพันธุ์ที่เริ่มสร้างอับสปอร์ก่อน คือ R_1 R_3 R_4 R_5 R_6 R_7 ซึ่งสร้างอับสปอร์ในชั่วโมงที่ 18 และสายพันธุ์ R_2 R_8 R_9 สร้างอับสปอร์ในชั่วโมงที่ 21 สีของอับสปอร์ของทุกสายพันธุ์ เริ่มเปลี่ยนเป็นสีเทาในชั่วโมงที่ 24 และเปลี่ยนเป็นสีดำ ในชั่วโมงที่ 27 การศึกษาในเรื่องนี้ อาจเป็นประโยชน์ในการทำลูกแป้ง โดยที่จะสามารถคาดคะเนจำนวนสปอร์ที่มีในลูกแป้งได้

การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณรีดิวซิงชูการ์ที่สร้างโดย R. oryzae สายพันธุ์ R_3 และ R_8 เมื่อใส่เชื้อด้วยจำนวนสปอร์แตกต่างกัน

ได้เลือกสายพันธุ์ R_8 และ R_3 ซึ่งให้ปริมาณรีดิวซิงชูการ์สูงเป็นอันดับหนึ่ง และสองตามลำดับ จากตารางที่ 4 มาทดลอง โดยการหมักข้าวเหนียว 20 กรัม ด้วย

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

สปอร์ของสายพันธุ์ R_3 จำนวนแตกต่างกัน ดังแสดงในกราฟที่ 4

รีดิวซิงชูการ์ที่ได้จากการหมักด้วยสปอร์จำนวนมาก มีปริมาณมากกว่ารีดิวซิง-ชูการ์ที่ได้จากการหมักด้วยสปอร์จำนวนน้อย ในเวลา 2 และ 4 วัน และจะเริ่มให้ปริมาณน้อยลงในเวลา6 8 และ 10 วัน โดยที่รีดิวซิงชูการ์ที่ตรวจได้ในเวลา 6 8 และ 10 วัน มีปริมาณใกล้เคียงกัน และไม่มีความแตกต่างกันตามจำนวนสปอร์ที่ใช้หมัก จากกราฟที่ 5 พบว่าสายพันธุ์ R_8 ได้ผลเช่นเดียวกัน คือได้ปริมาณรีดิวซิงชูการ์สูง เมื่อหมักด้วยสปอร์จำนวนมาก ในระยะเวลา 2 และ 4 วัน ในระยะ6 8 และ 10วัน ปริมาณรีดิวซิงชูการ์เริ่มลดลงมาอยู่ในระดับใกล้เคียงกัน อาจเป็นเพราะในระยะแรกของการหมัก ปริมาณสารตั้งต้นมีมาก เมื่อใส่สปอร์จำนวนแตกต่างกัน สปอร์จะงอกแล้วเจริญให้จำนวนสายใยแตกต่างกัน ตามหลักที่ว่า เมื่อปลูกเชื้อด้วยจำนวนเชื้อมาก ราจะมีการเจริญเติบโตมากกว่า เมื่อปลูกเชื้อด้วยจำนวนเชื้อน้อย (Cochrane, 1958) แต่ในระยะหลังของการหมัก ปริมาณสารตั้งต้นลดน้อยลง และเชื้ออยู่ในระยะที่เจริญมากแล้ว การเจริญจึงใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างชัดเจน เป็นสัดส่วนกับจำนวนเชื้อที่ใช้ปลูก ในการผลิตลูกแป้งหรือเชื้อหมักโดยทั่วไป ใช้เวลาบ่มเชื้อก่อนที่จะทำให้แห้ง เพื่อหยุดการเจริญนั้นใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน ซึ่งยังอยู่ในช่วงต้นของการเจริญ ดังนั้นเมื่อใช้สปอร์จำนวนมาก และถ้ามีสารตั้งต้นมากพอ ก็ยอมจะได้สายใยจำนวนมาก และควรได้เอนซายม์ปริมาณมากอยู่ในลูกแป้ง หรือเชื้อหมักนั้น

<u>การศึกษาสูตรอาหารที่กระตุ้นให้เพิ่มการสร้างจำนวนสปอร์</u>

ก. <u>แหล่งคาร์บอน</u> แหล่งคาร์บอนมีอิทธิพลต่อการสร้างจำนวนสปอร์ของ <u>R. oryzae</u> ทั้ง 5 สายพันธุ์ และ R_9 ดังแสดงไว้ในตารางที่ 8 และแสดงให้เห็นชัดเจน ดังกราฟที่ 7 โดยใช้สายพันธุ์ R_8 เป็นตัวแทน เปรียบเทียบอิทธิพลของอาหารแหล่งคาร์บอนทั้ง 5 สูตร จะเห็นว่าอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งมีแป้งข้าวจ้าว 5% กลูโคส

2% และอาหารสูตรที่ 5 ซึ่งมีแป้งข้าวจ้าว 5 % ซูโครส 3 % เป็นสูตรอาหารที่ทำให้ R. oryzae ทั้ง 5 สายพันธุ์ และ R_9 สร้างสปอร์จำนวนมากกว่าสูตรอาหารทั้ง 5 สูตร อาหารสูตรที่ 1 ซึ่งมีแป้งข้าวจ้าว 5% อาหารสูตรที่ 2 ซึ่งมีแป้งข้าวจ้าว 3% แป้งข้าวเหนียว 2 % และอาหารสูตรที่ 4 ซึ่งมีแป้งข้าวจ้าว 5% ซูโครส 1% เป็นสูตรอาหารที่ทำให้ราทั้ง 6 สายพันธุ์ดังกล่าวสร้างสปอร์จำนวนใกล้เคียงกัน เมื่อเลี้ยงบนอาหารทั้ง 3 สูตรนี้ การที่ได้พบว่า อาหารสูตรที่ 3 ให้ผลดีในการสร้างสปอร์อาจเนื่องจากอาหารสูตรนี้มีกลูโคส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ ถูกนำไปใช้ภายในเซลได้ทันที เพื่อให้มีการเจริญเติบโต และสังเคราะห์เอนซายม์ที่จำเป็น คือ แอมีเลส โปรตีเอส (protease) และเอนซายม์อื่น (Hesseltine, 1965) หลังจากราสร้างแอมีเลสแล้ว จะใช้แป้งซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ มีโมเลกุลซับซ้อนในอันดับต่อไป เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Lilly และ Barnett (1953) ซึ่งได้พบว่า เมื่อเลี้ยง Sordaria fimicola ด้วยซูโครส และเมลิไบโอส ราน้ำไม่ค่อยมีการเจริญถึงแม้จะเลี้ยงอยู่เป็นเวลา 15 วัน แต่เมื่อเติมน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ เช่น ฟรุคโตส กาแลคโตสลงไป พบว่า มีการเจริญภายใน 5 วัน ส่วนอาหารสูตรที่ 5 ซึ่งมีซูโครสเป็นองค์ประกอบ และให้ผลในการสร้างสปอร์จำนวนมาก แม้ว่าซูโครสจะเป็นน้ำตาลไดแซคคาไรด์ ซูโครสบางส่วนได้ถูกย่อยสลายด้วยความร้อน และความดัน ในขณะที่นึ่งฆ่าเชื้อ ดังในตารางที่ 7 ซูโครส 1% ถูกย่อยสลายได้รีดิวซิงชูการ์ 0.005 มก./มล. แต่น้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายด้วยความร้อนและความดันนี้ มีปริมาณน้อย อาจเป็นไปได้ว่า R. oryzae 5 สายพันธุ์ และ R_9 มีเอนซายม์ซูเครส(sucrase) หรือ อินเวอร์-เตส (invertase) ที่ย่อยสลายซูโครสได้ กลูโคส และฟรุคโตส ซึ่งน้ำตาล 2 ชนิดนี้ ถูกนำไปใช้ได้ทันที ทำให้มีการเจริญเติบโต มีผู้พบว่า ดี-กลูโคส และ ดี-ฟรุคโตส เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับเลี้ยงเชื้อ Aphanomyces euteiches ให้มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศ (Papavizas และ Ayers, 1964) ในการทำรากิ ใช้แป้งข้าวจ้าว และเติมน้ำตาลอ้อย (Went และ Geerligs, 1896) ซึ่งส่วนประกอบที่สำคัญใน

น้ำตาลอ้อย คือ ซูโครส แต่การที่พบว่าอาหารสูตรที่ 4 ไม่ดีเท่าอาหารสูตรที่ 5 อาจเนื่องจากอาหารสูตรที่ 4 มีซูโครสปริมาณน้อยกว่าอาหารสูตรที่ 5 อาหารสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน ราจะนำแป้งไปใช้ได้ภายหลังจากที่สร้างแอมีเลสขึ้นแล้ว จึงเห็นได้ว่า ราที่เจริญบนอาหาร 2 สูตรนี้ สร้างสปอร์ได้จำนวนมากขึ้น ในระยะหลังของการเจริญ ดังแสดงในตารางที่ 8 และการที่เลือกใช้อาหารสูตรที่ 5 เพราะโดยปกติ ซูโครสมีราคาถูกกว่ากลูโคส

ข. <u>แหล่งไนโตรเจน</u> พบว่า แหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดที่ศึกษา คือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต และแคซามิโนแอซิด มีอิทธิพลต่อการสร้างสปอร์ของ<u>R. oryzae</u> 5 สายพันธุ์ และ R_9 แต่ไม่มากเท่าอิทธิพลของแหล่งคาร์บอน จากตารางที่ 10 และกราฟที่ 9 ซึ่งใช้สายพันธุ์ R_8 เป็นตัวแทนในการเปรียบเทียบอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณต่างกัน 5 สูตร มีผลให้ราสร้างสปอร์จำนวนแตกต่างกันไม่มากนัก โดยที่อาหารสูตรที่ 2 ซึ่งมี แอมโมเนียมซัลเฟต 0.03% ให้จำนวนสปอร์มากกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ

จากตารางที่ 12 และกราฟที่ 11 เมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตปริมาณต่างกัน 5 สูตร พบว่า อาหารสูตรที่ 3 ซึ่งมีแอมโมเนียมไนเตรต 0.05% ให้จำนวนสปอร์มากกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ และมีความแตกต่างกับสูตรอาหารที่มีปริมาณแอมโมเนียมไนเตรตที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า หรือ สูงกว่า แสดงว่า แอมโมเนียมไนเตรตมีอิทธิพลต่อการสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศ ของ <u>Rhizopus sp.</u> สายพันธุ์ดังกล่าวมากกว่าแอมโมเนียมซัลเฟต

จากตารางที่ 14 และกราฟที่ 13 เมื่อใช้แคซามิโนแอซิด ปริมาณต่างกัน 5 สูตร พบว่า อาหารสูตรที่ 2 ซึ่งมีแคซามิโนแอซิด 0.05% ให้จำนวนสปอร์มากกว่าสูตรอาหารอื่น ๆ และมีความแตกต่างกับสูตรอาหารอื่น ๆ ค่อนข้างชัดเจน แสดงให้เห็นว่า อินทรีย์ไนโตรเจนมีอิทธิพลต่อการสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศ เช่นเดียวกับอนินทรีย์ไนโตรเจน

จากการที่มีผู้พบว่า แหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของ R. oryzae และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับการเจริญเติบโตของรา (Thöni, 1963) และแหล่งไนโตรเจนที่ดี สำหรับการเจริญของ R. oligosporus คือ เกลือแอมโมเนียม ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียม-คลอไรด์ และกรดอมิโนบางชนิด (Sorrenson และ Hesseltine, 1966) และจากผลการวิจัยนี้ทำให้อาจสรุปได้ว่า แหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับ R. oryzae ควรเป็นเกลือแอมโมเนียม ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต หรือ แอมโมเนียมซัลเฟต และกรดอมิโน เช่น แคซามิโนแอซิด จากการทดลองนี้ พบว่า แอมโมเนียมไนเตรต มีอิทธิพลต่อการสร้างสปอร์แบบไม่มีเพศ ได้ดีกว่าแอมโมเนียมซัลเฟต และอินทรีย์ไนโตรเจน มีผลต่อการเพิ่มจำนวนสปอร์ ได้ดีเท่า ๆ กับอนินทรีย์ไนโตรเจน แต่การที่ได้เลือกแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนในการศึกษาต่อไป เนื่องจากใช้ปริมาณน้อยกว่าปริมาณแอมโมเนียมไนเตรต และแคซามิโนแอซิด

ค. แหล่งแร่ธาตุที่สำคัญ จากการทดลอง พบว่า แหล่งแร่ธาตุมีอิทธิพลต่อการสร้างสปอร์มากกว่า แหล่งอาหารอื่นดังกล่าวมาแล้วตอนต้น โดยพบว่า อาหารที่เติมโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 0.03% 0.05% และ 0.10% ทำให้ราสร้างสปอร์เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมาก จากตารางที่ 16 เมื่อเปรียบเทียบกับตารางที่ 10 12 และ 14 ซึ่งมีแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต และแคซา-มิโนแอซิด เป็นแหล่งไนโตรเจน แสดงให้เห็นว่า โปตัสเซียมและฟอสฟอรัสมีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวนสปอร์แบบไม่มีเพศโดยตรง และอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งมีโปตัส-เซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05% เป็นปริมาณพอเหมาะที่ให้จำนวนสปอร์มากกว่าความเข้มข้นอื่น ดังตารางที่ 16 และกราฟที่ 15 และได้มีรายงานว่า ในการทำโคจิ มีการเติมเถ้าที่ได้จากใบไม้ และต้นไม้บางชนิด เพื่อให้เป็นแหล่งแร่ธาตุสำหรับเชื้อรา (Shibasaki และ Hesseltine, 1962)

ง. เครื่องเทศ เครื่องเทศ 15 ชนิดที่ใช้ทดลอง ได้ถูกจัดเป็นกลุ่ม ชนิดและปริมาณของเครื่องเทศที่ใช้ถือหลักจากความรู้พื้นฐาน ซึ่งได้จากการสอบถามผู้มีอาชีพทำเชื้อหมัก พบว่าเครื่องเทศ โดยชนิดและปริมาณที่ใช้ส่วนใหญ่ไม่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มหรือยับยั้งการสร้างสปอร์ของสายพันธุ์ R_3 และ R_8 หลังจากที่ได้เปรียบเทียบจำนวนสปอร์ที่สร้างบนอาหารสูตรที่เหมาะสมแต่ไม่มีเครื่องเทศผสม กับสูตรที่มีเครื่องเทศผสม ดังในตารางที่ 19 ยกเว้น อาหารที่ผสมเครื่องเทศสูตรที่ 3 ที่มีผลต่อรา 2 สายพันธุ์ดังกล่าว โดยทำให้สร้างสปอร์ได้จำนวนน้อยกว่าสูตรอาหารที่มีเครื่องเทศสูตรที่ 1 2 และ 4 ดังแสดงในตารางที่ 18 จากกราฟที่ 16 แสดงให้เห็นว่า เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์ R_3 และ R_8 บนสูตรอาหารที่ผสมเครื่องเทศสูตรที่ 1 ราทั้ง 2 สายพันธุ์สร้างสปอร์ได้จำนวนมากกว่าเมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหารที่ผสมเครื่องเทศสูตรที่ 3 และจากกราฟที่ 17 เมื่อใช้สายพันธุ์ R_8 เป็นตัวแทนเปรียบเทียบอาหารเหมาะสมและไม่มีเครื่องเทศ กับอาหารที่มีเครื่องเทศสูตรที่ 1 2 3 และ 4 ผสมอยู่ จะเห็นได้ว่า จำนวนสปอร์ที่สร้างเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสมและไม่มีเครื่องเทศ ใกล้เคียงกันกับจำนวนสปอร์ที่สร้างเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสมและผสมเครื่องเทศสูตรที่ 1 2และ4 และมีจำนวนมากกว่าจำนวนสปอร์ที่สร้างเมื่อเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสมผสมเครื่องเทศสูตรที่ 3 แสดงว่าเครื่องเทศสูตรที่ 3 ซึ่งมีลูกจันทร์ 2% พริกขี้หนู 2% กระเทียม 2% ขิง 2% มีอิทธิพลต่อการสร้างสปอร์ของรา 2 สายพันธุ์ โดยทำให้ราสร้างสปอร์ได้จำนวนน้อยลง ดังที่มีรายงานว่า น้ำมันสีเหลืองที่สกัดได้จากกระเทียม สามารถยับยั้งการเจริญของ Aspergillus flavus ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ประสิทธิ์ เรืองไรรัตนโรจน์ และไมตรี สุทธจิตต์, 2520) ดังนั้นก็อาจจะเป็นไปได้ว่า กระเทียมซึ่งประกอบอยู่ในเครื่องเทศสูตรที่ 3 อาจเป็นส่วนที่มีอิทธิพลต่อการเจริญ และการสร้างสปอร์ของรา แต่ก็มีรายงานว่า เครื่องเทศบางชนิดส่งเสริมการเจริญของรา เช่น ขมิ้นขาว ส่งเสริมการเจริญของ Rhizopus sp. และ Penicillium sp. กระเทียมส่งเสริมการเจริญของ Aspergillus sp. Penicillium sp. และ Rhizopus sp. (บัญญัติ สุขศรีงาม,

2518) ดังนั้น จึงอาจสรุปได้ว่า อิทธิพลของเครื่องเทศต่อ Rhizopus oryzae น่าจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อรา ชนิดและส่วนของเครื่องเทศ รวมทั้งปริมาณของเครื่องเทศที่นำมาใช้ แต่ในการทำลูกแป้งหรือเชื้อหมักโดยทั่วไป มีการใส่เครื่องเทศอยู่เสมอ เช่น ในการทำรากิ มีการเติมเหง้าของข่า และน้ำมะนาว (Went และ Geerligs, 1896) การทำลูกแป้งของไทย มีการใส่เครื่องเทศบางชนิด เช่น กระเทียม พริกไทย ข่า (Stithnimarnkarn, 1949) แต่มิได้รายงานว่า ใส่เครื่องเทศเพื่อจุดประสงค์ใด หรือมีอิทธิพลอย่างไรต่อเชื้อหมัก อย่างไรก็ดี อาจตั้งข้อสันนิษฐานได้ว่า เครื่องเทศที่มีในลูกแป้งนั้น อาจทำหน้าที่เป็นสารรักษาสภาพของเอนซายม์ที่มีอยู่ในลูกแป้ง และหรือป้องกันการรบกวนจากสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น แมลง ไร ที่จะทำลายเอนซายม์ และเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในลูกแป้ง

จากการศึกษาอิทธิพลของอาหารแหล่งต่าง ๆ ที่มีต่อการสร้างสปอร์ของ R. oryzae นี้ จะเห็นได้ว่า ส่วนใหญ่จำนวนสปอร์ของ R. oryzaeทุกสายพันธุ์สูงที่สุดในวันที่ 4 และค่อนข้างคงที่ หรือลดลงในวันที่ 5 และวันที่ 6 ของการเจริญ ดังแสดงในกราฟที่ 7 9 11 13 15 และ 17 การที่จำนวนสปอร์ลดลงในระยะหลังนี้อาจเนื่องจากสปอร์ที่ถูกสร้างในระยะแรก มีการงอกให้สายใย และการที่จำนวนสปอร์ไม่เพิ่มขึ้น เนื่องจากขนาดของภาชนะที่เลี้ยงเชื้อ มีขอบเขตจำกัด และปริมาณสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง หรือราอาจสร้างสารบางอย่างที่มีผลยับยั้งการสร้างสปอร์ (Gottlieb, 1971)

จากกราฟที่ 6 8 10 12 14และ 16 แสดงให้เห็นว่า ราแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันในการสร้างสปอร์ แม้ว่าจะเลี้ยงบนอาหารสูตรเดียวกัน ของแหลงอาหารแต่ละชนิด โดยพบว่า ส่วนใหญ่สายพันธุ์ R_2 สร้างสปอร์จำนวนสูงสุด ยกเว้นเมื่อเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ประกอบด้วยแคซามิโนแอซิด พบว่า สายพันธุ์ R_9 สร้างสปอร์จำนวนสูงสุด ดังแสดงในกราฟที่ 12 และจากกราฟที่ 16 ซึ่งเปรียบเทียบ

เพียง 2 สายพันธุ์ คือ R_3 และ R_8 พบว่า สายพันธุ์ R_3 สร้างสปอร์ได้จำนวนมากกว่าสายพันธุ์ R_8

การศึกษาอายุของสปอร์ที่สามารถงอกได้ ช่วงเวลาที่ใช้ในการงอก และผลของอาหารที่มีต่อการงอกของสปอร์ของสายพันธุ์ R_8

จากผลการทดลอง พบว่า สปอร์ที่สามารถงอกได้ เมื่อปลูกบนอาหาร 4 ชนิด ดังตารางที่ 21 เป็นสปอร์ที่มีอายุไม่ต่ำกว่า 27 ชั่วโมง แต่สปอร์ที่เริ่มเกิดเมื่อชั่วโมงที่ 21 จนถึง ชั่วโมงที่ 26 ของการปลูก ไม่สามารถงอกได้ และสปอร์ที่สามารถงอกได้นั้น ใช้เวลาในการงอก 10 ชั่วโมง เมื่อปลูกสปอร์นั้นบนอาหารสูตรที่เหมาะสม และอาหารที่เหมาะสมผสมเครื่องเทศสูตรที่ 1 จึงเห็นว่า สูตรอาหารทั้งสอง นี้มีผลต่อการเร่งการงอกของสปอร์ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารอีก 2 สูตร คือ สูตรอาหารที่มีแป้ง–ข้าวจ้าวเพียงอย่างเดียว และอาหารสูตรที่เหมาะสมผสมเครื่องเทศสูตรที่ 3 สปอร์งอกได้เมื่อชั่วโมงที่ 12 การศึกษานี้ทำให้ทราบว่า หลังการปลูกเชื้อแล้ว มีสปอร์อยู่ในลูก–แป้งจำนวนเท่าใด และสปอร์ที่มีอยู่ในลูกแป้งจะต้องมีอายุไม่ต่ำกว่า 6 ชั่วโมง นับตั้งแต่ถูกสร้าง จึงจะงอกได้ และทำให้เห็นว่า อาหาร 4 สูตรที่ใช้ทดลอง ไม่มีอิทธิพลต่ออายุการแก่ของสปอร์ แต่มีอิทธิพลต่อการงอกของสปอร์

เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ R_3 และ R_8 เมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหาร 4 ชนิด และศึกษาช่วงระยะเวลาในการสร้างสปอร์ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงสีของอับสปอร์

จากผลการทดลอง ได้พบว่าสูตรอาหาร 4 ชนิด คือ อาหารที่เหมาะสมจากการทดลอง อาหารที่เหมาะสมจากการทดลองผสมกับเครื่องเทศสูตรที่ 1 อาหารที่เหมาะสมจากการทดลองผสมกับเครื่องเทศสูตรที่ 3 และอาหารแป้งข้าวจ้าว มีอิทธิพลต่อการเจริญ การสร้างอับสปอร์ และการเปลี่ยนสีของอับสปอร์ ดังแสดงในตารางที่ 22 ได้

พบว่า อาหารสูตรที่เหมาะสมจากการทดลอง และอาหารสูตรที่เหมาะสมผสมเครื่องเทศสูตรที่ 1 มีผลทำให้รา 2 สายพันธุ์นี้ มีการเจริญเติบโต การสร้างอับสปอร์ รวมทั้งการเปลี่ยนสีของอับสปอร์เร็วกว่าเมื่อเลี้ยงบนอาหารอีก 2 สูตร ดังนั้นถ้าใช้อาหารสูตรที่เหมาะสม หรืออาหารสูตรที่เหมาะสมผสมเครื่องเทศสูตรที่ 1 เลี้ยงราทั้งในการผลิตลูกแป้ง ก็น่าจะได้ผลดีในด้านการเจริญของสายใย และการสร้างสปอร์ แต่อาหารอีก 2 สูตร คือ อาหารสูตรที่เหมาะสมผสมเครื่องเทศสูตรที่ 3 และอาหารแป้งข้าวจ้าว ซึ่งไม่มีผลดีในด้านการเจริญและการสร้างสปอร์ แต่มีผลดีในด้านยับยั้งการเปลี่ยนสีของสปอร์ ทำให้เป็นสีดำช้าลง ซึ่งในการทำลูกแป้งหรือเชื้อหมัก ไม่นิยมให้ได้สปอร์ดำ ซึ่งก็อาจจะนำสูตรอาหาร 2 ชนิดหลังนี้ ไปปรับปรุงในการผลิตเชื้อหมักที่ดีต่อไป

การเปรียบเทียบจำนวนสปอร์ที่สร้างบนสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง และสูตรอาหารที่ใช้กันเป็นพื้นฐานในอุตสาหกรรมย่อย

สูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลอง ซึ่งประกอบด้วย แป้งข้าวจ้าว 5% ซูโครส 3 % แอมโมเนียมซัลเฟต 0.03 % โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05% สามารถทำให้ R. oryzae สายพันธุ์ R_3 และ R_8 สร้างสปอร์จำนวนมากกว่าสูตรอาหารที่ใช้พื้นฐานในอุตสาหกรรมย่อย ดังแสดงในตารางที่ 23 และกราฟที่ 18 พบว่า ในวันที่ 4 ซึ่งได้จำนวนสปอร์สูงสุดนั้น ราสายพันธุ์ R_8 สร้างสปอร์ได้ 19×10^6 สปอร์/มล. เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่เหมาะสม และสร้างสปอร์ได้ 11.75×10^6 สปอร์/มล. และ 9.25×10^6 สปอร์/มล. เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารปลายข้าวจ้าว ผสมปลายข้าวเหนียวและ รำ และสูตรอาหารปลายข้าวจ้าว ตามลำดับ ซึ่งทำให้เกิดแนวทางที่จะใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองนี้ไปใช้ในการผลิตเชื้อหมัก ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป เนื่องจากการผลิตเชื้อหมักในอุตสาหกรรม ต้องปลูกเชื้อด้วยสปอร์จำนวนมากเพื่อป้องกันไม่ให้มีการปะปนจากเชื้ออื่น และเพื่อให้ราเจริญมาก (Underkofler และ

Hickey, 1954) และจากการวิจัยนี้ ได้พบว่า เมื่อปลูกเชื้อด้วยสปอร์จำนวนมาก โดยมีสารอาหารที่เหมาะสมมากพอ ราจะมีการเจริญให้จำนวนสายใยมาก ซึ่งแปรตามปริมาณเอนซายม์ที่สร้าง ดังนั้นถ้านำหลักการนี้ไปปรับปรุงการผลิตลูกแป้ง หรือเชื้อหมักควรที่จะได้ลูกแป้ง หรือเชื้อหมักที่มีเอนซายม์ปริมาณมาก รวมทั้งมีสปอร์จำนวนมาก ซึ่งเป็นลักษณะของลูกแป้งที่มีคุณภาพดี