บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัย

1.เมื่อเปลี่ยนวิธีการผลิตกรดโคจิกโดย *A. oryzae* KI3 คือจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเขย่า (รพี โรจนอุไร, 2539) เป็นการเพาะเลี้ยงแบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว (ใช้ในงานวิจัยนี้) จำเป็นต้องเปลี่ยนสูตรอาหารให้สอดคล้องกับวิธีการที่ใช้ในการผลิตด้วย

2.แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวและการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแตกต่างกันคือ

น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร เหมาะสำหรับการผลิตแบบให้จุลินทรีย์เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว (ในงานวิจัยนี้)

น้ำตาลทรายขาว 100 กรัมต่อลิตร เหมาะสำหรับการผลิตในอาหารเหลว (รพี โรจนอุไร, 2539)

3.อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตโดยให้จุลินทรีย์เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวคือ 102 : 1.75 โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสในปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร และใช้แหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด คือ สารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมไนเตรตในปริมาณ 1.814 กรัมต่อลิตร

4.เมื่อปรับปรุงสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกพบว่าสูตรอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมไนเตรต แมกนีเซียมซัลเฟต โปแตสเซียมคลอไรด์ และกรดฟอสฟอริกในปริมาณ 100 กรัมต่อลิตร 0.5 กรัมต่อลิตร 1.814 กรัมต่อลิตร 0.5 กรัมต่อลิตร 0.1 กรัมต่อลิตร และ 0.054 มิลลิลิตรต่อลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นองค์ประกอบ ให้ผลผลิตสูงกว่าสูตรอื่น

5.เมื่อจัดสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตกรดจากสูตรตั้งต้น (อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3) คือ เท่ากับ 1.52 กรัมต่อลิตร ใช้เวลาในการผลิต 24 วัน มาเป็น 23.26 กรัมต่อลิตร ใช้เวลา 16 วัน คิดเป็นผลผลิตกรดที่เพิ่มขึ้น 15.30 เท่า

6.อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงเมื่อเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่บรรจุอยู่ในภาชนะรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางและความสูงเท่ากับ 8.5 และ 10.0 เซนติเมตร ตามลำดับ คือ 57 : 1.0 (ตารางเซนติเมตรต่อเซนติเมตร) ซึ่งสูงกว่าค่าอัตราส่วนอื่นที่ใช้ในการทดลอง

7.ขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิก)

8.การเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลอง ทำให้สามารถผลิตกรดโคจิกได้เร็วและสูงที่สุดและเหมาะสมกว่าการเป่าให้อากาศ 5 วันนับตั้งแต่เริ่มเพาะเลี้ยง

9.เมื่อผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวภายใต้ภาวะที่เหมาะสมจะให้ผลผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 30.35 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งให้ผลผลิตกรดสูงกว่าการเพาะเลี้ยงเบื้องต้นที่ยังไม่ได้จัดภาวะให้เหมาะสมถึง 1.3 เท่า และเมื่อเปรียบเทียบผลผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ในอาหารเหลวที่มีการเขย่าซึ่งศึกษาโดยรพี โรจนอุไร (2539) ที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 40.03 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 19 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าแม้จะให้ผลผลิตกรดน้อยกว่า 9.68 กรัมต่อลิตร แต่ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดสั้นกว่าถึง 10 วัน คือใช้เวลาน้อยลงครึ่งหนึ่ง และเมื่อคิดเป็นอัตราการผลิตกรดโคจิกพบว่าการเพาะเลี้ยงแบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่มีการเป่าให้อากาศตลอดการทดลองจะให้อัตราการผลิตกรดสูงกว่าคือ เท่ากับ 3.37 กรัมต่อลิตรต่อวัน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเขย่าจะให้อัตราการผลิตกรดต่ำกว่าคือ เท่ากับ 2.11 กรัมต่อลิตรต่อวัน

วิจารณ์ผลการวิจัย

สำหรับงานวิจัยนี้เมื่อเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตร พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 และ 2 ซึ่งมีองค์ประกอบอื่นๆในอาหารเหลวเหมือนกันแต่ต่างกันที่ชนิดของแหล่งคาร์บอน (มีแอมโมเนียมซัลเฟตและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน) นั้นราสามารถใช้น้ำตาลทรายขาวในการผลิตกรดโคจิกได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคส ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 และ 4 ที่มีองค์ประกอบต่างๆเหมือนกันแต่ต่างกันที่ชนิดของแหล่งคาร์บอน (มีแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน) พบว่าราใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดโคจิกได้ดี

กว่าน้ำตาลทรายขาว แต่เมื่อเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 และ 4 ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลทรายขาวเหมือนกัน แต่องค์ประกอบอื่นๆต่างกัน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 ให้ผลผลิตกรดสูงกว่า ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 2 และ 3 ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเหมือนกันแต่มีองค์ประกอบอื่นๆต่างกัน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 ให้ผลผลิตกรดสูงกว่า และอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 ก็ให้ผลผลิตกรดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 ซึ่งแตกต่างจากรายงานที่ศึกษาหาสูตรอาหารและภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในระดับขวดเขย่าที่ใช้ราสายพันธุ์เดียวกัน (รพี โรจนอุไร, 2539) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 ให้ผลผลิตกรดสูงที่สุด จึงอาจกล่าวได้ว่าแม้จะใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์เดียวกันในการผลิตกรดโคจิกเหมือนกัน แต่ถ้าวิธีที่ใช้ในการผลิตเปลี่ยนไปทั้งแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและองค์ประกอบอื่นจะมีผลต่อการผลิตกรดโคจิกด้วย

และเมื่อพิจารณาถึงการใช้น้ำตาล พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นการใช้น้ำตาลเป็นไปอย่างรวดเร็ว อาจเนื่องมาจากงานวิจัยนี้เป็นการทดลองที่ไม่มีการปั่นกวนหรือเขย่า ออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงน้อยดังนั้นน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจึงถูกนำไปใช้ได้ง่ายและเร็วกว่า แต่น้ำตาลทรายขาวเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ต้องมีการสลายพันธะให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนจึงจะถูกนำไป ซึ่งแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงที่มีการเขย่าซึ่งออกซิเจนจะสามารถละลายในอาหารเหลวได้ดีกว่า จึงสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ทั้งน้ำตาลทรายขาว น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรักโทส (รพี โรจนอุไร, 2539) อีกทั้งโครงสร้างของน้ำตาลกลูโคสมีลักษณะคล้ายกับโครงสร้างของกรดโคจิกจึงนำไปใช้ในการผลิตกรดโคจิกได้โดยตรงโดยไม่ต้องแตกตัว แต่จะอาศัยเอนไซม์ที่ช่วยในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดโคจิกคือ กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส เฮกโซไคเนส และกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส (Challenger และคณะ, 1931; Arnstein และ Bentley, 1953; อ้างถึงใน Prescott และ Dunn, 1959; อ้างถึงใน Bajpai และคณะ, 1982a) และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะการเติบโตและปริมาณของสายใยพบว่า ถึงแม้ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 1 และ 2 (0.101 กรัมไนโตรเจน) จะมีปริมาณน้อยกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 และ 4 (0.394 กรัมไนโตรเจน) แต่พบว่ากลับให้การเติบโตของสายใยสูงกว่า อาจเนื่องมาจากปัจจัยหนึ่งคือชนิดของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน

กล่าวคือราอาจใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียได้ง่ายกว่าในรูปของไนเตรต และมีสารสกัดจากยีสต์ซึ่งเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่มีกรดอะมิโน เปปไทด์ และวิตามินที่ละลายน้ำได้ ซึ่งเป็นปัจจัยเสริมช่วยในการเติบโต (สมใจ ศิริโภค, 2539; Tamiya, 1928; อ้างถึงใน Prescott และ Dunn, 1959; อ้างถึงใน Bajpai และคณะ, 1982a; Carlile และ Watkinson, 1994; Ogawa และคณะ, 1995; Ariff และคณะ, 1996) สำหรับการผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 พบว่าให้ผลผลิตกรดสูงที่สุด อาจเนื่องมาจากในอาหารเหลวประกอบไปด้วยเกลืออนินทรีย์ต่างๆที่สามารถกระตุ้นกิจกรรมในการสร้างเอนไซม์เพื่อผลิตกรดโคจิก ซึ่งมีรายงานว่าการเพาะเลี้ยงแบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวที่มีสารอนินทรีย์หรือแร่ธาตุเป็นองค์ประกอบแม้เพียงเล็กน้อยก็จะทำให้เพิ่มผลผลิตกรดได้ดี (อ้างถึงใน Gray, 1959; อ้างถึงใน Bajpai และคณะ, 1982a)

เมื่อทดลองเติมสารสกัดจากยีสต์ 0.5 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 3 รวมทั้งทดลองเพิ่มปริมาณน้ำตาลเป็น 200 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลผลิตกรดน้อยมาก แสดงว่าน้ำตาลทรายขาวไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกโดยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ซึ่งต่างจากงานวิจัยที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเขย่าที่ใช้ราสายพันธุ์เดียวกัน (รพี โรจนอุไร, 2539) พบว่าน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก จึงอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อวิธีที่ใช้ในการผลิตและองค์ประกอบในอาหารเหลวเปลี่ยนไปจะมีผลต่อการนำแหล่งคาร์บอนเข้าเซลล์ดังอธิบายไว้ข้างต้นหรืออาจเป็นเพราะองค์ประกอบบางชนิดในอาหารเหลวจะมีผลในการกระตุ้นการเติบโตและการผลิตกรดโคจิกแตกต่างกัน และเมื่อพิจารณาถึงการใช้น้ำตาลในวันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 มีปริมาณน้ำตาลน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 7 แต่รากลับใช้ไปอย่างมีประสิทธิภาพ จึงอาจจะเป็นไปได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 มีปริมาณของคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสัดส่วนที่พอเหมาะกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 7 ซึ่งเห็นได้จากการเพาะเลี้ยงในช่วงแรกในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 จะผลิตกรดได้ดี แต่เมื่อเพาะเลี้ยงจนถึงวันที่ 12 การผลิตกรดโคจิกจะเริ่มน้อยลง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 7 ช่วงแรกการผลิตกรดค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงจนถึงวันที่ 12 พบว่ามีการสร้างกรดโคจิกสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอื่น แต่การผลิตจะเป็นไปอย่างช้าๆ โดยสังเกตได้จากความชันของกราฟในการผลิต

กรดโคจิก อาจเนื่องมาจากประสิทธิภาพของสายใยในการผลิตกรดเริ่มลดลงแม้ยังผลิตกรดได้บ้างแต่ไม่มากนักในแต่ละวัน ซึ่งปริมาณกรดโคจิกที่ได้ในแต่ละวันจะเกิดจากการสะสมของกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยงที่ผ่านมา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ได้มีการทดลองแปรปริมาณน้ำตาลโดยใช้ราสายพันธุ์เดียวกัน (รพี โรจนอุไร, 2539) พบว่าถ้าปริมาณของน้ำตาลมากเกินไปจะทำให้ผลิตกรดโคจิกได้น้อยแต่จะมีการสร้างสายใยมากขึ้น และจากการทดลองพบว่าปริมาณกรดโคจิกจะลดลงเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานซึ่งอาจเกิดจากภาวะบางอย่างในอาหารเหลวเปลี่ยนไปทำให้มีการนำกรดโคจิกไปใช้เมื่อแหล่งคาร์บอนเริ่มเหลือน้อยลงซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wei และคณะ (1991) ซึ่ง Baipai และคณะ (1982a) ได้รายงานว่าการผลิตและการย่อยกรดโคจิกในระหว่างการหมักจะเกิดจากภาวะบางประการที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าเกิดจากระบบของเอนไซม์ นอกจากนี้ Ogawa และคณะ (1995)ได้รายงานว่าการลดลงของกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยงแบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวจะลดลงเร็วกว่าการเพาะเลี้ยงที่มีการเขย่าซึ่งไม่มีเหตุผลที่แน่นอนในการอธิบายปรากฏการณ์ลักษณะนี้ รวมทั้ง Imose และคณะ (1970) ได้ทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยกรดโคจิกคือโคจิกเอซิดออกซิเดส จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Arthrobacter ureafacien* K-1 บนผิวหน้าอาหารเหลวและในขวดเขย่า ซึ่งพบว่าการเพาะเลี้ยงแบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเอนไซม์จะมีประสิทธิภาพในการย่อยกรดโคจิกสูงกว่าและวิถีการย่อยกรดโคจิกจะทำให้ได้สารมัธยันต์ต่างๆจนสุดท้ายเข้าสู่วัฏจักรเครป

และเมื่อทำการทดลองเปลี่ยนแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต และกำหนดให้มีปริมาณไนโตรเจนรวมในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกเท่าเดิมทำให้ได้สูตรอาหารใหม่คืออาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 9 พบว่าให้ผลผลิตกรดลดลงเกือบครึ่งหนึ่งของผลผลิตที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิกสูตรที่ 5 และพบว่าสูตรอาหารที่มีแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนจะให้การเติบโตของสายใยมากทำให้มีตัวกลางในการผลิตกรดมากจึงได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงและการที่ต้องการเซลล์ในการผลิตด้วยวิธีนี้มากอาจเป็นเพราะเป็นการทดลองที่ไม่มีการเขย่า ออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลวน้อยจึงต้องการสายใยเพื่อใช้ในการผลิตกรดมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ รพี โรจนอุไร (2539) รวมทั้ง May และคณะ (1931) ที่ว่าแอมโมเนียมไนเตรตจะส่งเสริมการเติบโตของ *A. oryzae* K13 และ *A. flavus* ตามลำดับ ได้ดีกว่าแอมโมเนียมซัลเฟต อีกทั้งไนเตรตยังเป็นสารอนินทรีย์ที่เป็นตัวรับอิเลคตรอนจากขบวนการหายใจในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อให้ได้

พลังงาน (Murray และคณะ, 1993) โดยจุลินทรีย์อาจจะใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเลคตรอนในขณะที่มีออกซิเจนละลายในอาหารเหลวต่ำหรือในภาวะที่ขาดออกซิเจน ซึ่งน่าจะเกิดขึ้นในช่วงหลังของการผลิต ดังนั้นถ้ามีไนเตรตเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้สายใยด้านล่างมีโอกาสเติบโตสร้างกรดโคจิกได้

จากการทดลองแปรอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน พบว่าอัตราส่วน 102 : 1.0 กลับให้น้ำหนักสูงสุดทั้งๆที่มีแหล่งไนโตรเจนน้อยกว่า ซึ่งเมื่อพิจารณาจากการเติบโตในภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง พบว่ามีสายใยไม่มากนักแต่มีการสร้างสปอร์หนาแน่นมากซึ่งอาจเกิดจากการขาดไนโตรเจนในช่วงหลังของการผลิตเมื่อมีไนโตรเจนน้อยไนโตรเจนจึงหมดเร็วทำให้อยู่ในภาวะที่อาจเสี่ยงต่อการอยู่รอดจึงสร้างสปอร์ ดังนั้นน้ำหนักที่เพิ่มสูงมากอาจมาจากน้ำหนักของสปอร์ที่สร้างขึ้นจำนวนมากเนื่องจากมีการสร้างสปอร์มากที่สุด ส่วนอัตราส่วน 102 : 1.25 102 : 1.5 และ 102 : 1.75 พบว่ามีน้ำหนักสายใยแห้งใกล้เคียงกัน แต่ก็ยังพบว่าที่ปริมาณไนโตรเจนต่ำจะส่งเสริมการสร้างสปอร์ โดยพบว่าจะมีการสร้างสปอร์มากกว่าในอาหารที่มีไนโตรเจนสูงซึ่งสอดคล้องกับ Moore - Landecker (1996) ที่รายงานว่าการใช้ไนเตรต ยูเรีย และกรดอะมิโนบางชนิด เป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้ราสร้างสปอร์ได้ดี และพบว่าการใช้ปริมาณไนโตรเจนต่ำจะทำให้เกิดการสร้างสปอร์มากกว่าการใช้ไนโตรเจนสูงๆ ซึ่งอาจเป็นเพราะเมื่อราอยู่ในภาวะที่ขาดแคลนสารอาหารราจะสร้างสปอร์เพื่อความอยู่รอด สำหรับอัตราส่วน 102 : 2.0 พบว่ามีการสร้างสายใยหนามาก อาจเป็นเพราะมีปริมาณไนโตรเจนสูงทำให้ราใช้ไนโตรเจนไปในการเติบโตของสายใย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ รพี โรจนอุไร (2539) และ Ariff และคณะ (1996) ที่พบว่ายิ่งมีปริมาณไนโตรเจนสูงจะส่งเสริมให้มีการเติบโตมากกว่าการผลิตกรดโคจิก

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณไนโตรเจนในอาหารเหลวเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าในทุกๆ การทดลองมีไนโตรเจนเหลืออยู่ในอาหารเหลวน้อยมากในช่วงวันที่ 12 – 15 คือ เท่ากับ 0.02 – 0.05 กรัมต่อลิตร จึงอาจเป็นไปได้ว่ารามีการใช้ไนโตรเจนในอาหารเหลวหมดไปแล้ว แต่การที่ยังสามารถวัดปริมาณไนโตรเจนได้อาจเป็นเพราะไนโตรเจนบางส่วนอาจมาจากผนังเซลล์ของราบางเซลล์เกิดการเสียสภาพทำให้สารประกอบภายในเซลล์ซึ่งจะมีไนโตรเจนรวมอยู่ด้วยไหลออกมา แล้วเซลล์ของราบางส่วนที่ยังไม่เสียสภาพจะใช้ไนโตรเจนที่เหลือเพื่อคงประสิทธิภาพและเพิ่มการเติบโตของเซลล์ ซึ่ง Ogawa และคณะ (1995)ได้รายงานว่าราต้องการไนโตรเจนเพื่อคงประสิทธิภาพของเอนไซม์สำหรับการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานคือทำการเพาะเลี้ยงแบบมีการเติมสารอาหารในระหว่างการทดลอง(fed batch) นอกจากนี้ยังพบว่ารามีการสร้างกรด

โคจิกสูงเมื่อมีการเติบโตคงที่ จึงแสดงให้เห็นว่ากรดโคจิกน่าจะจัดเป็นสารทุติยภูมิ เนื่องจากมีการผลิตกรดโคจิกสูงในช่วงที่รามีการเติบโตเต็มที่ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของรพี โรจนอุไร (2539) ว่ากรดโคจิกที่ผลิตโดย *A. oryzae* K13 ในอาหารเหลวจัดเป็นสารทุติยภูมิ และเมื่อเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยงแบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว (งานวิจัยนี้) พบว่าใช้ไนโตรเจนมากกว่าการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าที่ศึกษาโดย รพี โรจนอุไร (2539) โดยการผลิตแบบเพาะเลี้ยงให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว (งานวิจัยนี้) จะใช้คาร์บอนในน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร แต่ใช้ไนโตรเจนรวมในสารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมไนเตรตสูงถึง 0.687 กรัมไนโตรเจน ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าใช้คาร์บอนในน้ำตาลทรายขาวเท่ากับ 42 กรัมต่อลิตร แต่ใช้ไนโตรเจนรวมในสารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมซัลเฟตน้อยกว่าคือ เท่ากับ 0.101 กรัมไนโตรเจน อาจเนื่องมาจากการเพาะเลี้ยงแบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวออกซิเจนส่วนใหญ่จะอยู่เหนือผิวหน้าอาหารเหลวและออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลวมีน้อย ดังนั้นราจึงต้องการการเติบโตมากกว่าเพื่อใช้สำหรับผลิตกรดโคจิกและเมื่อต้องเติบโตมากก็ต้องใช้ไนโตรเจนมาก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ogawa และคณะ (1995) ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยงราบนแผ่นฟิลม์ที่ลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลว(MSLC) กับการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่า พบว่าการเพาะเลี้ยงบน MSLC จะผลิตกรดโคจิกได้สูงที่สุด เท่ากับ 29.0 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้ไนโตรเจนคือสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณ 2.5 – 5.0 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าจะให้ผลผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 20.6 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ในปริมาณน้อยกว่าคือ 0.5 – 2.5 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าจะใช้ปริมาณไนโตรเจนน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ MSLC ถึง 2 เท่า นั่นเพราะว่าการผลิตโดยไม่มีการปั่นกวนและให้อากาศจะต้องการสายใยที่เป็นตัวการในการผลิตมากกว่า

ส่วนค่าความเป็นกรดด่าง พบว่าในช่วง 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยง ค่าความเป็นกรดด่างลดลงค่อนข้างเร็วเป็นผลเนื่องมาจากในช่วงแรกรามีการเติบโตทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอาจเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากเมตาบอลิซึมแต่ไม่ใช่กรดโคจิกเพราะในช่วงนี้มีการผลิตกรดน้อยมากคือเท่ากับ 0.01 - 0.04 กรัมต่อลิตร หลัง 3 วันของการเพาะเลี้ยงค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างช้าๆและค่อนข้างคงที่ในช่วงหลังวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง จนสิ้นสุดการทดลองพบว่าทุกการทดลองให้ค่าความเป็นกรดด่างคงที่ในช่วง 2.0 - 2.5 ซึ่งสอดคล้องกับ

รายงานของ Katagiri และ Kitahara (1933) และ รพี โรจนอุไร (2539) ว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 2.0 – 2.4

ณ วันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดของอัตราส่วน 102 : 1.75 รามีประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลเพื่อการผลิตกรดโคจิกค่อนข้างสูง แต่ให้การเติบโตต่ำที่สุดเพราะฉะนั้นจึงคาดได้ว่าใช้น้ำตาลไปเพื่อการเติบโตไม่มากนัก ในขณะที่อัตราส่วน 102 : 1.5 แม้จะมีประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลเพื่อการผลิตกรดโคจิก ($Y_{p/s}$) สูงที่สุด แต่เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพของสายใยราในการผลิตกรดโคจิก ($Y_{p/x}$) พบว่าให้ค่าต่ำกว่าที่อัตราส่วน 102 : 1.75 จึงแสดงให้เห็นว่าที่อัตราส่วน 102 : 1.75 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่อัตราส่วน 102 : 1.75 มีสัดส่วนที่สมดุลย์ระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนมากกว่าที่อัตราส่วนอื่น โดยมีไนโตรเจนที่พอเหมาะต่อการใช้เพื่อการเติบโตและการผลิตกรดโคจิก และแม้ว่าที่อัตราส่วน 102 : 1.75 ใช้เวลาในการผลิตนาน 1 วัน แต่เมื่อพิจารณาในแง่การลงทุนแล้วที่อัตราส่วน 102 : 1.75 น่าสนใจกว่า เนื่องจากไนโตรเจนมีราคาถูกกว่ากรดโคจิกที่ผลิตได้ อีกทั้งปริมาณไนโตรเจนที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการทดลองก็มีปริมาณน้อยเท่ากับ 0.04 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิก ซึ่งเป็นปริมาณที่เพียงพอให้สายใยคงประสิทธิภาพในการดำรงชีพ เซลล์ของราไม่ถูกทำลายจึงอาจสามารถใช้เป็นสายใยซ้ำในการผลิตครั้งต่อไปได้เป็นการลดระยะเวลาและต้นทุน อีกทั้งไม่เป็นภาระที่จะนำมาบำบัดในภายหลังเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง และใช้วิธีการเพาะเลี้ยงที่ไม่ต้องใช้เทคโนโลยีสูงจึงไม่สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมากนัก ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 102 : 1.75 เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

จากการทดลองหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นที่เหมาะสม พบว่าเมื่อใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นสูงจะส่งเสริมให้มีการสร้างสายใยมาก และพบว่าเมื่อใช้ปริมาณน้ำตาลตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 100 กรัมต่อลิตร การเติบโตของราจะเข้าสู่ระยะการเติบโตคงที่ในช่วงสั้นๆหลังจากนั้นจะเติบโตมากขึ้นในแต่ละวันจึงผลิตกรดโคจิกได้น้อยกว่าที่ควรจะเป็น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ รพี โรจนอุไร (2539) และ May และคณะ (1931) พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณของแหล่งคาร์บอนจะทำให้มีการเติบโตของราสูงเกินไปส่งผลให้ผลิตกรดโคจิกได้น้อยลง แต่ถ้าปริมาณน้ำตาลตั้งต้นที่มากเกินไปคือ 200 กรัมต่อลิตร จะให้การเติบโตของสายใยต่ำอาจเนื่องมาจากเกิดแรงดันออสโมติกในอาหารเหลวสูงจึงอาจมีผลต่อเมตาบอลิซึมของรา ซึ่งอาจส่งผลเสียต่อประสิทธิภาพของราคือราต้องทนและต้องการเวลาในการปรับตัวเพื่อจะ

ทำให้ดำรงชีพอยู่ภายใต้ภาวะนี้ โดยราสามารถเติบโตได้ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นการเติบโตของราจะเริ่มช้าลงส่งผลให้ผลิตกรดโคจิกได้น้อยลงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ รพี โรจนอุไร (2539) และ May และคณะ (1931) พบว่าการใช้ปริมาณน้ำตาลสูงเกินไปจะมีผลต่อการผลิตกรดโคจิกโดยอาจเกิดแรงดันออสโมติกในอาหารเหลว จึงแสดงให้เห็นว่าที่ปริมาณน้ำตาลตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดสมดุลย์ระหว่างการเติบโตและการผลิตกรดโคจิก โดยพบว่ารามีการเติบโตเข้าสู่ระยะที่มีอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตายหลังจากการเพาะเลี้ยงได้ 9 วัน จึงทำให้ราใช้น้ำตาลไปในการสร้างกรดโคจิกผลผลิตกรดจึงสูง นอกจากนี้ยังพบว่าในทุกๆการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยงหลังวันที่ 15 - 16 การผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเริ่มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wakisaka และคณะ (1998) ที่รายงานว่าอัตราการผลิตกรดโคจิก และอัตราการใช้น้ำตาลจะลดต่ำลงเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 15 วัน

เนื่องจากการผลิตกรดโคจิกในงานวิจัยนี้เป็นการเพาะเลี้ยงแบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวซึ่งแหล่งออกซิเจนที่สำคัญคือ ออกซิเจนในอากาศเหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงจึงเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดโคจิก จึงทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยงราในภาชนะแก้วรูปทรงกระบอกที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร และความสูง 10.0 เซนติเมตร พบว่าที่อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 57 : 1.0 ให้ผลผลิตสูงกว่าอัตราส่วนอื่นๆที่ใช้ในการทดลองนี้ ส่วนอัตราส่วนอื่นๆให้ผลผลิตกรดต่ำมากที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากอัตราส่วนอื่นที่ไม่ใช่ 57 : 1.0 ให้การเติบโตน้อยกว่า กล่าวคือเมื่อสังเกตจากการเติบโตหลังจากการเพาะเลี้ยง 2 วัน พบว่ารามีการเติบโตงอกเส้นใยจากสปอร์ที่ก้นภาชนะโดยที่ในระยะแรกจะมีการเจริญเกาะกลุ่มกันบริเวณด้านล่างของอาหารเหลวในภาชนะแก้วหลังจากนั้นก็จะเจริญขึ้นสู่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งพบว่าอัตราส่วน 57 : 1.0 ให้การเติบโตของสายใยเต็มผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจเป็นเพราะมีความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อน้อย ทำให้ *A. oryzae* K13 เติบโตขึ้นสู่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเร็วกว่า จึงสามารถรับออกซิเจนจากอากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวไปพร้อมๆกับการใช้สารอาหารจากด้านล่างทำให้ผลิตกรดโคจิกได้สูงกว่า ในขณะที่อัตราส่วนอื่นๆพบว่ามีการเติบโตช้ามากโดยจะเติบโตเกาะกลุ่มบริเวณด้านล่างของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีความสูงมากกว่า จึงใช้ระยะเวลาในการเติบโตขึ้นสู่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อนานกว่า หรือบางกรณีไม่สามารถขึ้นมาเติบโตอยู่ที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อได้ทำให้

สายใยที่เจริญอยู่ใต้อาหารเลี้ยงเติบโตช้าเพราะได้รับออกซิเจนน้อย และเมื่อเติบโตมากขึ้นทำให้กลุ่มของสายใยมีขนาดใหญ่ขึ้นทำให้มีน้ำหนักมากขึ้น สายใยบางส่วนจึงไม่สามารถขึ้นมาเจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ทำให้ภาวะในการผลิตไม่เป็นแบบราเจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวอย่างสมบูรณ์ ซึ่งจะเห็นได้จากปริมาณของสายใยที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้อยมากจึงทำให้ได้ผลผลิตต่ำมาก อีกทั้งงานวิจัยนี้เป็นการทดลองที่ไม่มีการปั่นกวนดังนั้นออกซิเจนที่ได้จึงมาจากด้านบนของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยถ้าความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อมากราจะสัมผัสกับออกซิเจนได้น้อย ซึ่งในการผลิตกรดโคจิกต้องใช้ออกซิเจนในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนั้นการเพาะเลี้ยงที่อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงต่ำจะให้ผลผลิตกรดน้อย และจากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าไม่สามารถแปรอัตราส่วนโดยจัดความสูงของอาหารเลี้ยงเชื้อให้น้อยกว่า 1 เซนติเมตรได้ เนื่องจากเป็นความสูงค่าต่ำสุดที่ยังคงทำให้ได้ภาวะแบบเจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ดังนั้นจึงควรขยายส่วนการผลิตให้ใหญ่ขึ้นและแปรอัตราส่วนให้มีค่าสูงกว่านี้เพื่อหาอัตราส่วนที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด ซึ่งจะมีผู้ทำการทดลองต่อไป

จากผลการทดลองแปรขนาดของหัวเชื้อจะเห็นได้ว่าเมื่อจัดขนาดของหัวเชื้อให้เหมาะสมจะสามารถเพิ่มผลผลิตกรดได้ และพบว่าขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เมื่อเพิ่มขนาดของหัวเชื้อ (3 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์) จะให้การเติบโตเพิ่มขึ้นแต่ไม่ได้เพิ่มปริมาณการผลิตกรดโคจิกที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะขนาดของหัวเชื้อที่มากทำให้มีการเติบโตมากอีกทั้งใช้น้ำตาลไปมากทำให้ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ผลิตน้อย จึงผลิตกรดได้ไม่สูงเท่าที่ควรและมีแนวโน้มในการสร้างสายใยมากกว่าการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ขนาดของหัวเชื้อ 3 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) หลังจากวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง พบว่ามีการเติบโตของสายใยมากกว่าที่ขนาดของหัวเชื้ออื่นๆ อาจเนื่องมาจากเป็นขนาดหัวเชื้อที่มากที่สุดที่ทำให้สายใยมีการเติบโตดี แต่ถ้าขนาดหัวเชื้อมากเกินไปคือ ที่ขนาดของหัวเชื้อ 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เซลล์ของราอาจเกิดการแข่งขันแย่งอาหารเพื่อการดำรงชีวิตจึงเติบโตช้ากว่า แต่ที่ขนาดของหัวเชื้อ 6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) เมื่อเพาะเลี้ยงในช่วงวันที่ 14 - 16 การเติบโตของสายใยจะช้ากว่าที่ขนาดของหัวเชื้อ 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) หลังจากนั้นจึงมีการเติบโตมากขึ้นอาจเนื่องมาจากปริมาณของหัวเชื้อที่มากเกินไป ราต้องแย่งกันเติบโตจึงเติบโตช้าในช่วงแรกและเซลล์ของราบางเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานอาจเกิดการเสียสภาพทำให้สาร

ประกอบภายในไหลออกมาแล้วเซลล์ที่ยังเหลือจึงใช้สารประกอบนั้นเพื่อการเติบโตจึงให้การเติบโตสูงในช่วงหลัง หรือมีการใช้กรดโคจิกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ 2 เนื่องจากปริมาณกรดโคจิกเริ่มลดลงหลังจากวันที่ 13 ของการเพาะเลี้ยง ดังรายงานของ รพี โรจนอุไร (2539) ที่พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานปริมาณกรดโคจิกจะลดลงและมีการสร้างสายใยมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นเพราะ *A. oryzae* K13 สามารถใช้กรดโคจิกเป็นแหล่งคาร์บอนได้ และถ้าขนาดของหัวเชื้อน้อยเกินไปเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ก็จะทำให้การเติบโตที่น้อยเกินไป มีเซลล์ไม่เพียงพอที่จะใช้ในการผลิตกรดโคจิก ดังจะเห็นได้จากการใช้น้ำตาลพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ลดลงอย่างช้าๆทำให้ผลิตกรดโคจิกได้น้อย ในขณะที่ขนาดของหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) พบว่ามีการเติบโตของสายใยที่พอเหมาะต่อการใช้น้ำตาลและการผลิตกรดโคจิกทำให้ผลิตกรดได้สูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานอื่นที่พบว่าความหนาแน่นของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดควรอยู่ในช่วง $10^7 - 10^{10}$ สปอร์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดโคจิก 1 ลิตร (Lin และคณะ, 1976; Bajpai และคณะ, 1982a; Coupland และ Niehaus, 1987; Ariff และคณะ, 1996; Ariff และคณะ, 1997; Takamizawa และคณะ, 1996; Rosfarizan และคณะ, 1998a)

สำหรับค่าความเป็นกรดด่าง พบว่าในช่วงที่มีการผลิตกรดโคจิก ค่าความเป็นกรดด่างที่วัดได้ค่อนข้างต่ำ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานเมื่อปริมาณกรดโคจิกลดลง ค่าความเป็นกรดด่างจะค่อยๆสูงขึ้น อาจเนื่องมาจากมีการลดลงของกรดโคจิกซึ่งอาจถูกนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อให้มีการเติบโตเพิ่ม

เมื่อทำการทดลองผลิตกรดโคจิกในภาวะที่มีและไม่มีการเป่าให้อากาศ พบว่าในช่วงแรกของทุกการทดลองมีการเติบโตไล่เลี่ยกันแต่เริ่มมีการเติบโตต่างกันหลังจากวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง อาจเป็นเพราะเมื่อเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวส์น้อยลงราอาจเริ่มใช้กรดโคจิกในการเติบโตซึ่งสังเกตได้จากปริมาณกรดโคจิกที่ลดลงในช่วงที่รามีการเติบโตเพิ่มขึ้น โดยพบว่ามีการเติบโตสูงมากอย่างเห็นได้ชัดหลังจากวันที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด และการที่ราเติบโตไล่เลี่ยกันในช่วงแรกไม่ว่าจะมีการเป่าให้อากาศหรือไม่ก็ตามแต่กลับเติบโตได้อีกครั้ง (หลังจากเข้าระยะที่มีอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตายแล้ว) ในช่วงหลัง อาจเนื่องมาจากปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการทดลองที่ไม่เป่าให้อากาศยังไม่มากพอที่จะมีผลในทางที่จะกดหรือกระตุ้นการเติบโตของสายใยระยะที่มีกิจกรรมสูงที่มาจากหัวเชื้อ อีกประการในระยะแรกซึ่งเป็นช่วงที่รามีการเติบโตมากและรวดเร็วรายังมีประสิทธิภาพดีทำให้แม้จะไม่มีการเป่าให้อากาศ

ราก็ยังคงประสิทธิภาพในการเติบโตได้ เนื่องจากออกซิเจนที่อยู่เหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อก็ไม่ได้น้อยมากจนขาดแคลนราจึงคงประสิทธิภาพได้ แต่เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานประสิทธิภาพของสายใยอาจลดลงราจึงต้องการปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอจึงจะกลับมาเจริญได้อีกครั้ง นอกจากนี้ยังพบว่าถ้ามีการเป่าให้อากาศจะทำให้ผลผลิตกรดสูงและเร็วขึ้น ซึ่งเห็นได้ชัดหลังจากวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง อาจเป็นเพราะการทดลองที่ไม่มีการเป่าให้อากาศปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผลิตขึ้นจากสายใยในระหว่างการเติบโตจะสะสมอยู่บริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศลดลงจนอาจไม่เพียงพอต่อการผลิตกรดโคจิกซึ่งต้องอาศัยกระบวนการออกซิเดชัน ในขณะที่การทดลองที่มีการเป่าให้อากาศจะเป็นการไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่สะสมบริเวณผิวหน้า และเพิ่มค่าออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากการเป่าให้อากาศบริเวณผิวหน้าอาจทำให้สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศเพิ่มขึ้น ซึ่งออกซิเจนจากบรรยากาศจะแพร่และละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณออกซิเจนเพียงพอต่อการเติบโตของสายใยและเกิดกระบวนการออกซิเดชันในการสร้างกรดโคจิกมากกว่าในบรรยากาศที่มีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูง ได้มีรายงานเกี่ยวกับผลกระทบของการให้อากาศต่อการเติบโตของราและต่อการผลิตกรดโคจิก ดังเช่น Bajpai และคณะ(1981) และ Ariff และคณะ (1996) พบว่าการให้อัตราการให้อากาศที่สูงในระหว่างการเติบโตจะช่วยให้ราสามารถผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิกโดยสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี นอกจากนี้ Woodhead และ Walker (1975) ได้รายงานว่าถ้ามีการให้อากาศในอัตราสูงๆจะช่วยให้รา *Penicillium expansum* มีการเติบโตเร็วขึ้น และส่งเสริมการสร้างเอนไซม์ กลูโคส - 6 - ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์ 6 - ฟอสโฟกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ช่วยในการย่อยน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นในการทดลองที่เป่าให้อากาศตลอดอาจช่วยให้ราสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้เร็วขึ้นจึงผลิตกรดได้เร็วและสูงขึ้นกว่าเดิม สำหรับปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีผลกระทบลดการผลิตกรดโคจิกนั้น Barnard และ Challenger (1949) ได้รายงานว่าการผลิตกรดโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว โดยมีเอทธิลแอลกอฮอล์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าราสามารถผลิตกรดโคจิกได้ในบรรยากาศที่มีปริมาณของก๊าซไนโตรเจน ก๊าซออกซิเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในปริมาณ 65 25 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยพบว่าถ้าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ (300,000 ส่วนในบรรยากาศล้านส่วน) ราไม่สามารถผลิตกรดโคจิกได้ แต่จากงานวิจัยนี้พบว่าปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงสุด

ในบรรยากาศที่ใช้เลี้ยงเชื้อที่วัดได้เหนือผิวหน้าอาหารเหลว 1 เซนติเมตร จากการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเป่าให้อากาศมีค่าสูงสุด เท่ากับ 1,125 ส่วนในบรรยากาศล้านส่วน ซึ่งมีค่าน้อยกว่างานวิจัยของ Barnard และ Challenger (1949) ประมาณ 267 เท่า จึงไม่น่ามีผลกระทบต่อการเติบโต

และจากผลการทดลอง พบว่าผลิตกรดโคจิกได้สูงสุดในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องมีการเป่าให้อากาศตลอดการทดลอง เพียงแต่ทำการเป่าให้อากาศจนถึงช่วงที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุดแล้วเก็บเกี่ยวผลผลิตทันที เนื่องจากถึงแม้จะเป่าให้อากาศต่อไป การผลิตกรดก็ลดลง อาจเป็นเพราะปริมาณออกซิเจนมีค่าเท่ากับออกซิเจนในบรรยากาศก็เพียงพอแล้วที่ทำให้ได้ผลผลิตกรดสูง หรือภาวะในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนไปส่งผลต่อการผลิตกรดโคจิก

จะเห็นได้ว่างานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จเป็นที่น่าพอใจอย่างยิ่ง โดยให้ผลผลิตกรดสูงและช่วยลดระยะเวลาในการผลิตได้ ซึ่งวิธีการที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไม่ต้องใช้เทคโนโลยีสูงจึงสามารถลดต้นทุนทั้งในด้านพลังงาน การบำรุงรักษาเครื่องมือและแรงงานในการปฏิบัติ และทำได้โดยไม่ต้องพึ่งนักวิชาการจากต่างประเทศและไม่ต้องซื้อเทคโนโลยีจากต่างประเทศ จึงเหมาะสำหรับประเทศที่กำลังพัฒนา และที่สำคัญจะสามารถใช้เป็นพื้นฐานเบื้องต้นสำหรับการพัฒนาการผลิตโดยกระบวนการหมักต่อไปได้

ข้อเสนอแนะ

1. น่าจะมีการขยายส่วนการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว เนื่องจากในงานวิจัยนี้ให้ผลผลิตกรดสูงน่าสนใจ วิธีการเพาะเลี้ยงไม่ยุ่งยาก ไม่ต้องใช้เทคโนโลยีสูง เสียค่าใช้จ่ายในการผลิตน้อย และทำการหาอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูง ซึ่งถ้าขยายภาชนะให้ใหญ่ขึ้นอาจทำให้สามารถแปรอัตราส่วนได้สูงขึ้นจนได้อัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดที่ทำให้ได้กรดโคจิกสูงที่สุดก็ได้ อันจะเป็นการพัฒนากระบวนการผลิตต่อไปในระดับอุตสาหกรรม

2. น่าจะมีการทดลองใช้สายใยเดิมซ้ำของ *A. oryzae* K13 โดยเพาะเลี้ยงแบบให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว เนื่องจากสายใยรามีการเติบโตบริเวณผิวหน้าอาหารเหลวอยู่แล้ว ถ้านำน้ำหมักออกจากทางด้านล่างของภาชนะแล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เข้าไปแทนที่สายใยก็ยังลอย

อยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจทำให้สามารถผลิตกรดได้เลยโดยไม่ต้องเสียเวลารอให้สายใยเติบโตหรือแยกสายใยใหม่ให้ยุ่งยากซึ่งอาจช่วยลดระยะเวลาในการผลิตได้ อีกทั้งยังสามารถใช้ภาชนะเดิมในการผลิตกรดต่อได้ โดยไม่เสียค่าใช้จ่ายในการเตรียมอุปกรณ์ใหม่