บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์

สรุปผลการวิจัย

1. การวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดย *Aspergillus oryzae* K13 ด้วยวิธี HPLC ยืนยันว่าเป็นกรดโคจิกเนื่องจากมีช่วงเวลาอยู่ในคอลัมน์ เช่นเดียวกับกรดโคจิกมาตราฐาน

2. การขยายส่วนการผลิตจากภาชนะแก้วรูปทรงกระบอกเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร สูง 10.0 เซนติเมตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 53 มิลลิลิตร (กนิษฐา ภูวนารถนรานุบาล, 2542) ไปเป็นถาดตื้นขนาด 4 ลิตร มีพื้นที่ผิวหน้าถาดเท่ากับ 800 ตารางเซนติเมตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูง 4 เซนติเมตร คิดเป็นปริมาตรเท่ากับ 3200 มิลลิลิตร (ใช้ในงานวิจัยนี้) โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและภาวะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกัน พบว่า ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด 28.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการผลิตกรดโคจิกแบบกะจากภาชนะแก้วรูปทรงกระบอกที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด 30.35 กรัมต่อลิตร นับได้ว่าสามารถขยายส่วนการผลิตได้โดยสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตได้ถึง 60 เท่า

3. ปริมาณของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร ที่มีพื้นที่ผิวหน้าอาหารเหลว 800 ตารางเซนติเมตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูง 4 เซนติเมตร คือ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดโคจิก)

4. การเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 2 เซนติเมตรในอัตราเร็วที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิก คือ 50 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาที จะทำให้ได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงและเร็วกว่าการทดลองที่ไม่มีการเป่าให้อากาศ และการเป่าให้อากาศในอัตราเร็วที่มากกว่านี้ คือให้ผลผลิตกรดโคจิกเท่ากับ 33.27 กรัมต่อลิตรในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยง

5. ภาวะบางประการที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตร คือ ใช้ปริมาณของหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) และมีการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 2 เซนติเมตรในอัตราเร็วเท่ากับ 50 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาที สามารถเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกจากภาวะที่ใช้ตั้งต้น (ใช้ขนาดหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว) จาก 28.7 กรัมต่อลิตรในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยงคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 1.36 กรัมต่อลิตรต่อวันมาเป็น 33.27 กรัมต่อลิตรในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยง

คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 1.96 กรัมต่อลิตรต่อวัน ได้ผลผลิตกรดเพิ่มขึ้น 4.57 กรัมต่อลิตร หรือ 15.92 เปอร์เซ็นต์ และลดระยะเวลาในการให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดลงไป 4 วัน

6. สามารถพัฒนาหรือปรับปรุงการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวระดับขยายส่วนในถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตรได้หลายวิธีโดยยังคงให้ผลผลิตกรดสูง เช่น วิธีการเติมสารอาหารในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงและการใช้สายใยซ้ำ โดยต้องมีการปรับเปลี่ยนภาวะในการผลิตและสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสม

7. เมื่อปรับปรุงการผลิตกรดโคจิกโดยใช้วิธีการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิต พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นที่มีแหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุครบถ้วน แล้วทยอยเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอนในรูปสารละลายกลูโคส ซึ่งให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุดถึง 35.26 กรัมต่อลิตรในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยงคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 2.07 กรัมต่อลิตรต่อวันในระหว่างการผลิตซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่าการผลิตกรดโคจิกแบบกะ (ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด 33.27 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยงคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 1.96 กรัมต่อลิตรต่อวัน) ประมาณ 1.99 กรัมต่อลิตร หรือ 5.98 เปอร์เซ็นต์และมีอัตราการผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้น 0.11 กรัมต่อลิตรต่อวัน

8. ในการปรับปรุงการผลิตกรดโคจิกด้วยการใช้สายใยซ้ำของ *Aspergillus oryzae* K13 พบว่า ปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เติมมีความสำคัญต่อการคงประสิทธิภาพของราในการผลิตกรดโคจิก โดยปริมาณแหล่งไนโตรเจนอย่างน้อย 10 เปอร์เซ็นต์ของแหล่งไนโตรเจนเดิมจะยังคงความคุ้มค่าในการผลิตกรดโคจิกได้ 3 รอบโดยให้ผลผลิตกรดโคจิกรวมทั้ง 3 รอบเท่ากับ 231.04 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 9.6 ลิตร ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงรวมทั้งสิ้น 37 วันคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 6.24 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 9.6 ลิตรต่อวัน ซึ่งเมื่อเทียบวิธีการผลิตแบบกะ 3 รอบการผลิต จะต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงประมาณ 51 วัน ให้ผลผลิตกรดโคจิกรวม 319.38 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 9.6 ลิตรคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 6.26 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 9.6 ลิตรต่อวัน จะเห็นได้ว่ามีอัตราการผลิตกรดโคจิกใกล้เคียงกันมากจึงสามารถผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำได้อย่างคุ้มค่าเทียบเท่ากับการผลิตกรดแบบ

9. เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวโดยมีการเติมสารอาหารเป็นแหล่งคาร์บอนในรูปสารละลายกลูโคสในระหว่างการผลิตกับการผลิตกรดโคจิกแบบกะ (3 รอบการผลิต) และการใช้สายใยซ้ำ (2 ซ้ำ) พบว่ามีค่าเท่ากับ 6.63 6.26 และ 6.24 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 9.6 ลิตรต่อวัน ตามลำดับ

10. สามารถสรุปได้ว่าประสบความสำเร็จในการพัฒนากระบวนการผลิตกรดโคจิกโดยการเพาะเลี้ยง *Aspergillus oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวโดยพบว่า กระบวนการผลิตกรดโคจิกโดยการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิตเหมาะสมที่สุดและเหมาะสมกว่าการผลิตกรดโคจิกแบบกะและการใช้สายใยซ้ำ ตามลำดับ

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากงานวิจัยของกนิษฐา ภูวนารถนรานุบาล (2542) ได้ศึกษาแล้วพบว่า ภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยง *A.oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวเพื่อผลิตกรดโคจิก ควรจะมีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงไม่น้อยกว่า 57 : 1.0 และในงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาการขยายส่วนการผลิตกรดโคจิก จึงได้หาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่จะใช้ผลิตภาชนะเพาะเลี้ยงโดยคำนึงถึงความเป็นไปได้ในการใช้งานจริงในภาควิชาจุลชีววิทยา (ขนาดของหม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ) ดังนั้น จึงกำหนดให้ภาชนะเพาะเลี้ยงที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 200 : 1 โดยเลือกใช้ภาชนะรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าเพื่อช่วยประหยัดพื้นที่ในการเพาะเลี้ยง พบว่า ถาดตื้นขนาด 4 ลิตรที่มีพื้นที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสูงเท่ากับ 800 : 4 บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3.2 ลิตร เป็นขนาดที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้เป็นภาชนะเพาะเลี้ยงในการผลิตกรดโคจิก เนื่องจากให้ผลผลิตกรดไม่แตกต่างจากถาดตื้นขนาดที่เล็กกว่าแต่มีความคุ้มค่าในการผลิตกรดโคจิกในแต่ละครั้งสูงกว่ามาก

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการทดลองที่ไม่มีการกวนหรือเขย่า ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารจึงน้อยกว่าการผลิตโดยมีการกวนและการให้อากาศ การเติบโตของราจึงเป็นไปในลักษณะที่ราจะสร้างสายใยและค่อยๆเจริญขึ้นสู่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อโดยราที่เพาะเลี้ยงในถาดตื้นขนาดเล็กกว่าจะเติบโตสร้างสายใยและเจริญขึ้นสู่ผิวหน้าอาหารเหลวได้เร็วกว่าราที่เพาะเลี้ยงในถาดตื้นขนาดใหญ่ ซึ่งบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสูงกว่าถาดเล็ก เนื่องจากว่าในถาดตื้นขนาดใหญ่จะมีปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า

สำหรับค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า ในช่วง 3 วันแรกของการเพาะเลี้ยงค่าความเป็นกรดด่างลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องมาจากว่าในช่วงแรกของการเติบโต ราจะสร้างผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งมีผลต่อการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะช่วงนี้แทบจะไม่มีการผลิตกรดโคจิก จากนั้นค่าความเป็นกรดด่างจะลดลงอย่างช้าๆ และคงค่าอยู่ที่ประมาณ 2.0 - 2.5 ซึ่งเป็นช่วงที่มีปริมาณกรดโคจิกสูงสุดซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Katagiri และ Kitahara (1933) และรพี โรจนอุไร (2539) ว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกคือ 2.0 - 2.4 หลังจากนั้นค่าความเป็นกรดด่างเริ่มขยับตัวสูงขึ้นจนสิ้นสุดการทดลองทั้งนี้เนื่องจากว่าถ้ามีการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน ปริมาณแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเหลือน้อยลง ราจะใช้กรดโคจิกเป็นแหล่งคาร์บอนแทนดังในรายงานการทดลองของ Wei และคณะ (1991) พบว่าราสามารถใช้กรดโคจิกเป็นแหล่งคาร์บอนได้ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแหล่งคาร์บอนลดลง จึงเป็นเหตุให้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้น

เมื่อทดลองแปรผันปริมาณของหัวเชื้อที่ใช้ในการผลิตกรดโคจิก จะเห็นได้ว่าเมื่อจัดปริมาณของหัวเชื้อให้เหมาะสม จะสามารถเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกได้โดยปริมาณของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในถาดตื้นขนาดความจุ 4 ลิตรคือ 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ซึ่งการใช้ปริมาณของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จะมีน้ำหนักแห้งของสายใยราไม่แตกต่างจากการใช้ปริมาณของหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จากการสังเกตจะพบว่ารามีการสร้างสปอร์น้อยกว่า ดังนั้นน้ำหนักแห้งของการใช้ปริมาณของหัวเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จึงเป็นน้ำหนักของสายใยมากกว่าสปอร์ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการผลิตกรดโคจิก เนื่องจาก Bajpai และคณะ (1981) รายงานว่ากรดโคจิกสร้างมาจากบริเวณส่วนที่เป็นสายใยของรา แต่อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการใช้ปริมาณของหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ราจะมีการสร้างสปอร์มากกว่า 2 เปอร์เซ็นต์เล็กน้อย แต่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงกว่าเช่นกัน จึงอาจกล่าวได้ว่าการสร้างสปอร์เพียงเล็กน้อยของการผลิตที่ใช้หัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ไม่เป็นอุปสรรคต่อการผลิต การใช้ปริมาณของหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จึงมีความเหมาะสมกว่า ขณะที่การเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อเป็น 8 11 และ15 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) จะทำให้รามีการเติบโตเพิ่มมากขึ้นแต่ผลผลิตกรดโคจิกไม่ได้เพิ่มขึ้นไปด้วย ที่เป็นเช่นนี้เป็นเพราะปริมาณของหัวเชื้อที่มากทำให้รามีการเติบโตมากขึ้นและมีการใช้น้ำตาลไปในการเติบโตมากเช่นกัน ทำให้ปริมาณน้ำตาลที่จะใช้สำหรับผลิตกรดโคจิกน้อยลงจึงให้ผลผลิตกรดไม่สูงเท่าที่ควร และมีแนวโน้มไปในการสร้างสายใยมากกว่าและยังมีเซลล์ราบางส่วนยังจมอยู่ในอาหารเหลวจำนวนมาก ซึ่งเกิดจากการเติบโตของราที่มากขึ้นทำให้กลุ่มของสายใยรามีขนาดใหญ่ขึ้นและมีน้ำหนักมากขึ้น สายใยบางส่วนไม่สามารถเจริญขึ้นมาบนผิวหน้าอาหารเหลวได้ทำให้ภาวะในการผลิตไม่เป็นแบบราเจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวอย่างสมบูรณ์

ในช่วงที่มีการผลิตกรดโคจิกค่าความเป็นกรดด่างนี้ได้มีค่าค่อนข้างต่ำ คือประมาณ 2.0 - 2.5 ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิก โดย Arnstein และ Bentley (1951) ได้ศึกษาเกี่ยวกับวิถีการผลิตกรดโคจิกโดยราในสกุล *Aspergillus* พบว่า เอนไซม์ไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดความสมดุลของไดไฮดรอกซีอะซิโตนและกลีเซอรอลดีไฮด์ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการผลิตกรดโคจิกจะถูกทำลายในสภาวะด่างและจะมีความคงตัวในสภาวะกรดซึ่งตรงกับรายงานของ Yabuta และคณะ (1923) และ Katagiri และ Kitahara (1933) และ Kwak และ Rhee (1992b) และ Ogawa และคณะ (1995) และ Ariff และคณะ (1996) ซึ่งพบว่าการผลิตกรดโคจิกจะเกิดในสภาวะกรดเท่านั้น โดยค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 2.0 - 3.0

เมื่อทดลองให้มีการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลว 2 เซนติเมตรในอัตราเร็วต่างกัน พบว่า การเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเหลวจะช่วยลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่สะสมอยู่บริเวณเหนือผิวหน้าอาหารเหลวลงได้มาก แต่ในชุดการทดลองที่มีการเป่าให้อากาศในอัตราเร็วสูง (100 และ 200 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาที) จะมีผลต่อการระเหยของน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงคือทำให้มีการระเหยน้ำมาก แม้การเป่าอากาศจะช่วยลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงลงไปได้มากแต่กลับไม่ช่วยให้การผลิตกรดโคจิกดีขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมบางประการ เช่น ความแรงของอากาศที่พ่นลงไปกระทบกับสายใยที่กำลังเจริญขึ้นมาบนผิวหน้าอาหารเหลว ทำให้ราไม่สามารถลอยอยู่ด้านบนและสร้างสายใยจนเต็มผิวหน้าอาหารเหลวแม้กระทั่งวันที่สิ้นสุดการทดลองซึ่งจะมีผลต่อการผลิตกรดโคจิก เนื่องจากว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิกอยู่ที่สายใยของรา การที่ราเติบโตสร้างสายใยได้ไม่สมบูรณ์จะเป็นเหตุให้ผลผลิตกรดโคจิกต่ำลง นอกจากนี้ยังสิ้นเปลืองพลังงานที่ใช้ไปในการเป่าให้อากาศอีกด้วย โดยถ้าในบรรยากาศมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มากเกินไปมีผลยับยั้งการผลิตกรดโคจิกได้ เนื่องจากว่า Barnard และ Challenger (1949) ได้ศึกษาถึงผลกระทบของปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่อการผลิตกรดโคจิก พบว่าการผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวโดยบริเวณผิวหน้าอาหารเหลวมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ราจะไม่สามารถผลิตกรดโคจิกได้ นอกจากนี้ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยังมีผลต่อการสร้างสปอร์ของราโดยปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะมีผลยับยั้งการเติบโตของ aerial mycelium และมีผลให้ราสร้างสปอร์ได้มากขึ้น (Griffin, 1994) เมื่อมีการสร้างสปอร์มากผลผลิตกรดโคจิกจะลดลงเนื่องจากสารอาหารจะถูกใช้ไปกับการสร้างสปอร์มากกว่าและกรดจะสร้างขึ้นจากส่วนของสายใยราเท่านั้นดังกล่าวแล้วข้างต้น นอกจากนี้การเป่าให้อากาศยังช่วยเพิ่มค่าออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยออกซิเจนจากบรรยากาศจะแพร่และละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงที่สายใยยังมิได้เจริญปกคลุมเต็มผิวหน้าอาหารเหลว ทำให้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณออกซิเจนเพียงพอในการเติบโตของรา และยังช่วยในกระบวนการออกซิเดชันเพื่อผลิตกรดโคจิกอีกด้วย จึงมีผลให้รามีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโคจิกได้สูงและเร็วขึ้น ซึ่งปริมาณออกซิเจนมีความสำคัญต่อการผลิตกรดโคจิกมากเนื่องจากออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่กระตุ้นเซลล์ราให้สร้างเอนไซม์กลูโคส - 6 - ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส และเอนไซม์ 6 – ฟอสโฟกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ช่วยในกระบวนการผลิตกรดโคจิก (Ariff และคณะ, 1996) นอกจากนี้ Bajpai และคณะ (1981) พบว่า การเป่าให้อากาศในระหว่างการเติบโตจะช่วยให้ราสามารถผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดโคจิกโดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี ส่วนในชุดที่ไม่มีการเป่าให้อากาศและที่มีการเป่าให้อากาศในอัตราเร็วที่ต่ำเกินไป (25 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาที) จะมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่สะสมอยู่

เหนือผิวหน้าอาหารเหลวค่อนข้างสูง ซึ่งอาจทำให้สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศลดลงจนอาจเหลือปริมาณไม่เพียงพอต่อการผลิตกรดโคจิกซึ่งต้องอาศัยกระบวนการออกซิเดชั่น

เมื่อทดลองผลิตกรดโคจิกระดับขยายส่วนในถาดความจุ 4 ลิตรภายใต้ภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้ปริมาณของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) และมีการเป่าให้อากาศเหนือผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในอัตราเร็วเท่ากับ 50 ลิตรต่อตารางเมตรต่อนาที พบว่าได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงถึง 33.21 กรัมต่อลิตรในวันที่ 17 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งสูงกว่าผลผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยงราในภาชนะแก้วทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.5 เซนติเมตร ความสูง 10 เซนติเมตรที่ศึกษาโดยกนิษฐา ภูวนารถนรานุบาล (2542) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถขยายส่วนการผลิตได้เป็นผลสำเร็จโดยให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงขึ้นแม้ว่าจะใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงนานกว่า 2 เท่า แต่สามารถขยายส่วนการผลิตเพิ่มขึ้นได้ถึง 60 เท่า และยังให้ผลผลิตกรดโคจิกมากกว่า 16.17 เปอร์เซ็นต์ นับว่าประสบความสำเร็จในการขยายส่วนมากและมีความคุ้มค่าในการผลิตกรดโคจิกแต่ละครั้งสูง

จากผลการทดลองที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่า แม้วันที่สิ้นสุดการทดลองยังมีน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูง ดังนั้นจึงได้ศึกษาวิธีการที่จะลดปริมาณน้ำตาลที่เหลือให้น้อยลงโดยการลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นลง ปรากฏว่าผลผลิตกรดโคจิกก็ลดลงเช่นเดียวกัน เมื่อทดลองผลิตกรดโคจิกโดยมีการทยอยเติมแหล่งคาร์บอนในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ พบว่า แม้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ. วันที่สิ้นสุดการทดลองยังสูงเช่นเดิม แต่กลับได้ผลผลิตกรดโคจิกเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าเซลล์รามีประสิทธิภาพในการผลิตกรดเพิ่มขึ้น การที่ยังคงมีน้ำตาลเหลือมากอาจเนื่องมาจากว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสตั้งต้นมีผลต่อแรงดันออสโมติกในอาหารเหลว ซึ่งจะมีผลต่อเมตาบอลิสมของรา การทยอยเติมแหล่งคาร์บอนจะช่วยลดแรงดันดังกล่าวลง ทำให้ราไม่ต้องเสียเวลาในการปรับตัวเพื่อที่จะดำรงชีวิตอยู่ภายใต้ภาวะนี้ ทำให้ราเริ่มผลิตกรดโคจิกได้เร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของรพี โรจนอุไร (2539) และ May และคณะ (1931) พบว่าการใช้น้ำตาลปริมาณสูงเกินไปจะเกิดแรงดันออสโมติกในอาหารเหลวสูงซึ่งมีผลต่อการผลิตกรดโคจิกทำให้ได้ผลผลิตกรดต่ำลง ส่วนในชุดการทดลองที่มีการทยอยเติมแหล่งคาร์บอนในรูปผงกลูโคสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในระหว่างการเพาะเลี้ยงกลับทำให้ได้ปริมาณกรดโคจิกต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะเสียอีก ทั้งนี้น่าจะเกิดจากราใช้แหล่งคาร์บอนในสถานะของแข็งไม่ได้ต้องใช้แหล่งคาร์บอนในรูปสารละลายกลูโคส นอกจากนี้การเติมผงกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ราอาจต้องใช้เวลาในการละลายพอสมควร คงมิได้ละลายหมดในทันทีราจึงค่อยๆ ใช้ ทำให้ผลผลิตต่ำกว่าการเติมในรูปสารละลาย ดังในงานทดลองของ Ogawa และคณะ (1995) ซึ่งทดลองผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* NRRL484 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวโดยมีเยื่อบางๆให้จุลินทรีย์เกาะ (Membrane - surface liquid culture: MSLC) ซึ่งจะมีการทยอยเติมผงกลูโคสที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2

ถึง 3 ครั้งในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยเติมผงกลูโคสลงใน cylindrial groove ที่บรรจุอาหารเหลว เพื่อให้ผงกลูโคสละลายก่อนแล้วจึงปั๊มอาหารลงในฟลาสก์ที่ใช้เพาะเลี้ยง *A. oryzae* NRRL484 โดยวิธี MSLC เพื่อใช้ในการผลิตกรดโคจิกต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าทุกชุดของการทดลองนี้เมื่อเพาะเลี้ยงหลังจากวันที่ 17 ถึง 18 การผลิตกรดโคจิกในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มลดลงซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wakisaka และคณะ (1998) ที่รายงานว่า อัตราการผลิตกรดโคจิกและอัตราการใช้น้ำตาลจะลดต่ำลงเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 15 วันเป็นต้นไป

ณ.วันที่ให้ผลผลิตกรดโคจิกสูงสุด ชุดการทดลองที่มีการทยอยเติมเฉพาะแหล่งคาร์บอนคือสารละลายกลูโคสที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0 ในวันที่ 6 9 12 และ 15 ของการเพาะเลี้ยง ตรวจพบเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิกสูงสุดถึง 56.6 เปอร์เซ็นต์ซึ่งชุดการทดลองอื่นที่มีการทยอยเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจะมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิกค่อนข้างสูงเช่นกันแต่ต่ำกว่า คืออยู่ในช่วง 50 ถึง 53 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการทดลองของ Katagiri และ Kitahara (1933) ที่พบว่า 50 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง *A. flavus* จะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดโคจิก ส่วนชุดการทดลองที่มีการทยอยเติมแหล่งไนโตรเจนในวันที่ 0 6 และ 9 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งจะมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดโคจิก 44.73 เปอร์เซ็นต์ทั้งนี้อาจเกิดจากการเติบโตของสายใยที่ไม่เต็มที่ในช่วงแรกเนื่องจากได้รับแหล่งไนโตรเจนยังไม่ครบตั้งแต่ช่วงแรกและการเพิ่มให้ในภายหลังอาจทำให้การเติบโตไม่ต่อเนื่อง ทำให้ปริมาณกรดโคจิกที่ได้ต่ำลงไปด้วย

ปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอินทรีย์ไนโตรเจนที่ใช้ในงานวิจัยคือสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งกนิษฐา ภูวนารถนรานุบาล (2542) พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกจะต้องมีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนคือสารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 0.5 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตรซึ่งสารสกัดจากยีสต์จะมีกรดอะมิโน เปปไทด์ และวิตามินที่ละลายน้ำได้ซึ่งเป็นปัจจัยเสริมช่วยในการเติบโต จึงจะทำให้รามีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะผลิตกรดโคจิกได้ปริมาณสูงสุด (Tamiya, 1988; อ้างถึงใน Prescott และ Dunn, 1959; Ogawa และคณะ, 1995; Ariff และคณะ, 1996) และอนินทรีย์ไนโตรเจนที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือแอมโมเนียมไนเตรต ซึ่งมีความสำคัญต่อการเติบโตและการผลิตกรดโคจิกของราเป็นอย่างมาก ดังในงานทดลองของ Murray และคณะ (1993) ได้ศึกษาแล้วพบว่า ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีไนเตรตเป็นองค์ประกอบ จุลินทรีย์จะใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ทำให้สายใยราที่จมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้านล่างมีโอกาสเติบโตสร้างกรดโคจิกได้ ดังนั้นถ้ามีปริมาณไนโตรเจนอย่างเพียงพอ ราจะเติบโตขึ้นไปบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อและผลิตกรดโคจิกโดยใช้ออกซิเจนเหนือผิวหน้าอาหารเหลวเป็นตัวรับอิเล็กตรอน ขณะที่ราส่วนที่จมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไนเตรตอยู่ด้วยจะใช้ไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอนเพื่อเติบโตและผลิตกรดโคจิกได้เช่นกัน และนี่คือเหตุผลที่แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า

ในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นควรจะมีปริมาณไนโตรเจนทั้งอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจนอย่างเพียงพอ ไม่ควรทยอยเติมในระหว่างการเพาะเลี้ยง เพื่อให้รามีการเติบโตที่ดีขึ้นและยังมีผลให้ปริมาณกรดโคจิกเพิ่มขึ้นด้วยและเมื่อพิจารณาปริมาณไนโตรเจนในอาหารเหลวในวันที่สิ้นสุดการทดลอง พบว่าทุกชุดการทดลองจะมีไนโตรเจนเหลืออยู่ในอาหารเหลวน้อยมากอาจเป็นไปได้ว่า รามีการใช้ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดไปแล้ว แต่ที่ยังสามารถวัดปริมาณไนโตรเจนได้เพราะมีราบางเซลล์เกิดการเสียสภาพ ทำให้ส่วนประกอบในเซลล์ที่มีไนโตรเจนอยู่ไหลออกมา ทำให้ยังคงวัดปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้เล็กน้อย

สำหรับการสร้างสปอร์ของราจะเห็นได้ว่าในชุดการทดลองที่ผลิตกรดโคจิกแบบกะ (ชุดการทดลอง ก) ราจะมีการสร้างสปอร์ทั่วผิวหน้าภายในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยงขณะที่ชุดการทดลองที่มีการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิต (ชุดการทดลอง ข ถึง จ) ราจะสร้างสปอร์น้อยมาก อาจเนื่องมาจากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนสูง ราจะใช้สารอาหารไปสำหรับการเติบโตมาก ทำให้ชั้นของสายใยเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อหนา สายใยส่วนบนที่สัมผัสกับอากาศอาจได้รับสารอาหารน้อยลง เนื่องจากสัมผัสกับอาหารเหลวน้อยจึงสร้างสปอร์เพื่อการขยายพันธุ์ ขณะที่การทยอยเติมแหล่งคาร์บอนจะมีข้อดีกว่าตรงที่มีการเติบโตพอเหมาะทำให้ชั้นสายใยไม่หนาเกินไป เมื่อปริมาณแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้หมดจะมีการเติมแหล่งคาร์บอนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทันที ราจึงไม่อยู่ในสภาวะการขาดแคลนสารอาหารจึงไม่จำเป็นต้องสร้างสปอร์

การผลิตกรดโคจิกโดยมีการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิตสามารถเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นได้ ซึ่งในงานวิจัยได้ทดลองเติมแหล่งคาร์บอนในรูปสารละลายกลูโคสในระหว่างกระบวนการผลิตกรดโคจิก พบว่า สามารถเพิ่มผลผลิตกรดโคจิกจากกระบวนการหมักแบบกะได้ 5.98 เปอร์เซ็นต์ โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ogawa และคณะ (1995) ซึ่งได้ทดลองผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยงราให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวโดยวิธี MSLC เทียบกับในขวดเขย่า พบว่า การเติมแหล่งคาร์บอนในระหว่างกระบวนการผลิตทั้ง 2 วิธีจะทำให้ได้ปริมาณผลผลิตกรดโคจิกสูงถึง 100 กรัมต่อลิตร และ 39 กรัมต่อลิตรในวันที่ 20 และ 22 ของการเลี้ยงเชื้อในวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ MSLC และในขวดเขย่าตามลำดับ นอกจากนี้ Ariff และคณะ (1996) ยังพบว่า การผลิตกรดโคจิกโดยมีการเติมแหล่งคาร์บอนในระหว่างการผลิตจะให้ผลผลิตสูงกว่าการผลิตกรดโคจิกแบบกะถึง 23 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้น่าจะเกิดจากการที่กรดโคจิกเป็นสารทุติยภูมิ ซึ่งมีอัตราการผลิตสูงสุดในช่วงที่เซลล์รามีอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย การทยอยเติมแหล่งคาร์บอนซึ่งก็คือน้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดโคจิก จะทำให้มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเหลือเพียงพอสำหรับการผลิตกรดในช่วงกลางถึงช่วงปลายของการเพาะเลี้ยง แต่อย่างไรก็ดี ปริมาณแหล่งไนโตรเจนของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นก็มีความสำคัญต่อผลผลิตกรดโคจิกเช่นกัน กล่าวคือ การทยอยเติมแหล่งไนโตรเจนในระหว่างการเพาะเลี้ยงจะมีผลให้ราเติบโตช้ากว่าการใส่แหล่งไนโตรเจนให้หมดตั้งแต่ครั้งแรก

(Ariff, 1996) ทำให้ได้ปริมาณสายใยน้อยมีผลให้ได้ปริมาณกรดโคจิกต่ำลงไปด้วย เนื่องจากกรดโคจิกผลิตจากส่วนของสายใยรา และแม้ว่าจะมีการทยอยเติมแหล่งไนโตรเจนก็ไม่ได้ทำให้รามีการเติบโตได้เทียบเท่ากับการเติมให้หมดตั้งแต่ครั้งแรก จึงไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรด เนื่องจากเป็นการเติบโตในช่วงเวลาที่ไม่เหมาะสมและยังสิ้นเปลืองแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปอีกด้วย

เมื่อทดลองผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำของ *A. oryzae* K13 พบว่า สามารถผลิตกรดโคจิกได้อย่างมีความคุ้มค่าในการผลิตอยู่ 3 รอบ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมในการผลิตกรดโคจิกซ้ำที่ 1 และ 2 มีผลอย่างยิ่งต่อผลผลิตของกรด กล่าวคือ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เติมในซ้ำที่ 1 และ 2 ควรจะต้องมีแหล่งไนโตรเจนอยู่บ้างอย่างน้อย 10 เปอร์เซ็นต์จากแหล่งไนโตรเจนเดิม ทั้งนี้เนื่องจากว่าการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน ราต้องการใช้แหล่งไนโตรเจนเพื่อคงประสิทธิภาพของสายใยเพื่อให้ราสามารถดำรงชีพและผลิตกรดโคจิกต่อไปได้ แต่อย่างไรก็ดี ปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เติมไม่ควรมีปริมาณมากเกินไป เนื่องจากราจะใช้แหล่งคาร์บอนในการเติบโตมากกว่าการผลิตกรดโคจิก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kwak และ Rhee (1992a) ที่พบว่า การผลิตกรดโคจิกจะเริ่มเมื่อปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อใกล้จะหมดเท่านั้น การเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นสารละลายกลูโคสที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.0 ราจะไม่สามารถคงสภาพสายใยให้มีประสิทธิภาพพอในการผลิตกรดโคจิก จึงมีผลให้ผลผลิตกรดโคจิกลดลงจากครั้งแรกของการผลิตมาก (Bajpai และคณะ, 1982; Ogawa และคณะ, 1995) และเป็นที่น่าสังเกตว่ายิ่งเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนน้อยลง ราจะมีการสร้างสปอร์ได้เร็วขึ้น ทั้งนี้อาจเกิดจากว่าเมื่อแหล่งไนโตรเจนเริ่มน้อยลง ราจะอยู่ในภาวะที่ขาดแคลนสารอาหารจึงสร้างสปอร์เพื่อความอยู่รอด แต่ในกรณีที่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นสูตรเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมโดยใช้ปริมาตรเท่าเดิม ราจะมีการสร้างสายใยเพิ่มมากขึ้นด้วยทำให้ผลผลิตกรดโคจิกรวม 3 รอบน้อยกว่าการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนลดลง 50 เปอร์เซ็นต์จากแหล่งไนโตรเจนเดิมซึ่งการลดปริมาณแหล่งไนโตรเจนลงลดเฉพาะอนินทรีย์ไนโตรเจนเท่านั้น แต่อินทรีย์ไนโตรเจนยังคงปริมาณเท่าเดิมเนื่องจากกนิษฐา ภูวนารถนรานุบาล ได้ศึกษาแล้วพบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดโคจิกต้องมีปริมาณแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (สารสกัดจากยีสต์) เท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร แต่ถ้าอาหารที่ใช้ในซ้ำที่ 1 และ 2 มีประมาณแหล่งไนโตรเจนสูง จะมีผลส่งเสริมให้มีการเติบโตมากกว่าการผลิตกรดโคจิก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ รพี โรจนอุไร (2539) และ Ariff และคณะ (1996)

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน ปริมาณของกรดโคจิกจะลดลงซึ่งเกิดจากภาวะบางอย่างในอาหารเหลวที่เปลี่ยนไปซึ่ง Bajpai และคณะ (1982a) ได้รายงานว่าการผลิตและการย่อยกรดโคจิกในระหว่างการหมักเกิดจากภาวะบางประการที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าเกิดจากระบบของเอนไซม์แต่มิได้รายงานว่าเป็นภาวะใด ดังนั้น การนำวิธีการเพาะเลี้ยงโดยใช้สายใยซ้ำมา

ผลิตกรดโคจิก จึงเหมือนกับการเปลี่ยนภาวะที่ไม่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิมให้ได้ภาวะที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ จึงทำให้รามีประสิทธิภาพในการผลิตกรดโคจิกได้ยาวนานขึ้น

แม้ว่าในซ้ำที่ 1 และ 2 ของการผลิตจะมีปริมาณผลผลิตกรดโคจิกลดลงอย่างมากแต่ข้อดีที่เห็นได้ชัดเจนสำหรับการผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำคือ ในซ้ำที่ 1 และ 2 ราสามารถผลิตกรดโคจิกได้ตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง ราไม่ต้องเสียเวลาในการเติบโตสร้างสายใยในช่วงแรกของการผลิต ทำให้ช่วยลดระยะเวลาลงได้มาก อีกทั้งยังประหยัดค่าใช้จ่ายในการผลิตลงทั้งในแง่ของพลังงาน ค่าใช้จ่าย และการกำจัดของเสีย นอกจากนี้ในซ้ำที่ 1 (รอบที่ 2) ยังมีอัตราการผลิตสูงขึ้นอีกด้วย

จะเห็นได้ว่างานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จเป็นที่น่าพอใจอย่างยิ่ง สามารถปรับขยายส่วนการผลิตโดยผลผลิตไม่ลดลง แต่กลับเพิ่มสูงขึ้น มีความคุ้มค่าในการผลิตมากขึ้น ซึ่งการขยายส่วนการผลิตนี้สามารถกระทำได้ไม่ยุ่งยาก ใช้ต้นทุนต่ำ ไม่สิ้นเปลืองพลังงานมากเหมือนการขยายส่วนการผลิตโดยเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญในอาหารเหลว (submerged culture) และถ้าปรับภาวะในการเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกในระดับขยายส่วนการผลิตได้ดีขึ้น จะทำให้ได้ผลผลิตกรดสูงและช่วยลดระยะเวลาในการผลิตลงได้ อีกทั้งยังสามารถผลิตกรดโคจิกโดยมีการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิตและการใช้สายใยซ้ำ ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยเฉพาะการเติมสารอาหารในระหว่างการผลิตจะช่วยให้ผลผลิตกรดโคจิกเพิ่มขึ้นจากกระบวนการหมักแบบกะ 5.98 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำแม้ในซ้ำที่ 1 และ 2 จะมีผลผลิตตกลงไปมาก แต่เมื่อพิจารณาถึงอัตราการผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำ 2 ซ้ำ (3รอบการผลิต) เทียบกับการผลิตแบบกะ 3 รอบการผลิตเช่นกัน พบว่า มีอัตราการผลิตใกล้เคียงกัน แต่ช่วยลดระยะเวลาได้มากถึง 10 - 12 วัน จึงนับว่ามีความคุ้มค่าในการผลิต วิธีการเพาะเลี้ยงที่เลือกใช้ในงานวิจัยนี้ คือการผลิตกรดโคจิกโดยให้จุลินทรีย์เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลว ซึ่งมีข้อดีมากมาย เช่น ไม่ต้องใช้เทคโนโลยีสูง จึงสามารถลดต้นทุนทั้งในด้านพลังงาน การบำรุงรักษาเครื่องมือและแรงงานในการปฏิบัติงานโดยไม่ต้องพึ่งพานักวิชาการจากต่างประเทศและซื้อเทคโนโลยีจากต่างประเทศ จึงเหมาะสมสำหรับประเทศที่กำลังพัฒนา และสามารถนำไปใช้งานได้จริงในการผลิตกรดโคจิกในระดับอุตสาหกรรมด้วย จึงอาจกล่าวได้ว่าข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้มีคุณค่าอย่างยิ่งต่อการขยายส่วนการผลิตในระดับต่อไปจนถึงระดับโรงงานต้นแบบและเหมาะสมที่จะใช้ผลิตในประเทศไทยที่ยังไม่มีความเจริญทางด้านเทคโนโลยีมากนัก นอกจากนี้ ผลการวิจัยนี้ยังจุดประกายแนวคิดที่เป็นประโยชน์ต่อการขยายส่วนต่อไปว่าน่าจะผสมผสานการผลิตแบบใช้สายใยซ้ำเข้ากับการผลิตแบบเติมสารอาหารระหว่างการผลิต เพื่อให้ได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงขึ้น และคงมีความคุ้มค่าในการผลิตสูง แต่ใช้ต้นทุนต่ำ จึงน่าจะกล่าวได้ว่าเป็นงานวิจัยที่มีคุณค่าอย่างยิ่ง

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการขยายส่วนการผลิตกรดโคจิกโดยวิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวจนถึงระดับโรงงานต้นแบบ เนื่องจากการผลิตโดยวิธีนี้ไม่ทำให้ผลผลิตลดลงเมื่อขยายส่วนการผลิตแต่กลับเพิ่มมากขึ้นถ้าจัดภาวะในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสม อีกทั้งวิธีนี้ยังประหยัดไม่ต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูง และเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบให้มากขึ้นด้วย
2. ควรมีการศึกษาหาอัตราการเติมแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดโคจิกจากการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* K13 ให้เจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวโดยมีการเติมสารอาหารเป็นระยะ ซึ่งจะช่วยให้ได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงขึ้น
3. ควรจะมีการแปรผันหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่น้อยที่สุดที่ยังคงประสิทธิภาพในการผลิตกรดโคจิกโดยใช้สายใยซ้ำของ *A. oryzae* K13 ไม่ให้ลดลงจากรอบแรกของการผลิตมากนัก รวมถึงการลดปริมาณสารอาหารบางอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีความจำเป็นต่อการผลิตกรดโคจิก เพื่อช่วยลดต้นทุนเกี่ยวกับวัตถุดิบ โดยผลผลิตกรดต้องไม่ลดลงไปด้วย
4. น่าจะมีการทดลองการผลิตกรดโคจิกแบบ repeated fed batch fermentation อาจเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่จะช่วยให้ได้ผลผลิตกรดโคจิกสูงขึ้น เนื่องจากการเติมสารอาหารในระหว่างกระบวนการผลิตมีผลให้ได้ปริมาณกรดโคจิกเพิ่มขึ้น ขณะที่การใช้สายใยซ้ำจะช่วยเพิ่มความคุ้มทุนในการผลิตกรดโคจิกแต่ละครั้งอีกด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย