บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัย

1. สามารถใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ทั้งในการเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงและการผลิตกรดอิทาโคนิก โดยให้ผลผลิตกรดอิทาโคนิกใกล้เคียงกับเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. สามารถค้นพบวัสดุตรึงชนิดใหม่ซึ่งเป็นเส้นใยธรรมชาติจากพืชที่ไม่เคยมีรายงานว่ามีผู้ใช้ตรึงจุลินทรีย์ วัสดุตรึงนั้นคือ ชิ้นเส้นใยบวบหอม ซึ่งเป็นวัสดุตรึงที่หาได้ง่าย ราคาถูก มีขั้นตอนในการตรึงที่ง่าย

3. ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอม คือ เพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงความหนาแน่น 1 - 2 x 10^8 สปอร์ต่อชิ้นเส้นใยบวบหอมที่มีน้ำหนักแห้ง 2.0 - 2.2 กรัม ความสูง 5 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.0 - 4.2 เซนติเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกซึ่งมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 1.35 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน และน้ำตาลทรายขาว 15 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงนาน 44 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที

4. ไม่จำเป็นต้องมีแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึง

5. การผลิตกรดอิทาโคนิกในระดับขวดเขย่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงที่มีน้ำตาลทรายขาวความเข้มข้น 66 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ให้กรดอิทาโคนิกในปริมาณ 9.71 กรัมต่อลิตรในเวลา 7 วัน

6. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในชิ้นเส้นใยบวบหอมในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง มีปริมาตรใช้งาน 400 มิลลิลิตร คือ ใช้น้ำตาลทรายขาวความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและไม่เติมไนโตรเจน อัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที โดยใช้กล้าเชื้อสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมที่เตรียมจากสปอร์ความหนาแน่น 1 - 2 x 10^8 สปอร์ต่อชิ้นเส้นใยบวบหอมซึ่งมีน้ำหนักแห้งเท่ากับ 2.0 - 2.2 กรัม ความสูง 5 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.0 - 4.2 เซนติเมตร น้ำหนักเปียกของวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึงอยู่เท่ากับ 29.12 กรัม (น้ำหนักแห้งของกล้าเชื้อสายใยตรึงเท่ากับ 3.74 กรัมต่อลิตร) ได้ปริมาณกรดอิทาโคนิกสูงสุด 8.2 กรัมต่อลิตร ในเวลา 9 วัน

คิดเป็น 20.50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เมื่อเทียบกับน้ำตาลตั้งต้น และคิดเป็น 35.15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เมื่อเทียบกับน้ำตาลที่ใช้

7. ภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ใน PUF คือ เพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงความหนาแน่น 1 - 2 x 10^9 สปอร์ต่อ PUF 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกซึ่งมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 2.70 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลทรายขาว 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที

8. ในการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ใน PUF ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง มีปริมาตรใช้งาน 400 มิลลิลิตร ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต คือ ใช้น้ำตาลทรายขาวความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิก อัตราการให้อากาศ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ใช้กล้าเชื้อสายใยตรึงใน PUF ที่เตรียมจากสปอร์ความหนาแน่น 1 - 2 x 10^9 สปอร์ต่อ PUF 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) น้ำหนักวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึงอยู่เท่ากับ 22.5 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (น้ำหนักแห้งของกล้าเชื้อสายใยตรึงเท่ากับ 2.69 กรัมต่อลิตร) ได้ปริมาณกรดอิทาโคนิกสูงสุด 9.88 กรัมต่อลิตร ในเวลา 6 วัน คิดเป็น 39.52 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เมื่อเทียบกับน้ำตาลตั้งต้น และคิดเป็น 84.52 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เมื่อเทียบกับน้ำตาลที่ใช้

9. เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมและใน PUF ของ *A. terreus* I10 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดสำหรับวัสดุตรึงทั้งสองชนิด พบว่า ให้ผลผลิตกรดไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ชิ้นเส้นใยบวบหอมเป็นวัสดุตรึงที่ย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะใช้ในการตรึงและการผลิตกรด เนื่องจากเมื่อสิ้นสุดการทดลองและเป็นของเหลือใช้ก็จะย่อยสลายได้เอง จึงไม่เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม

10. สามารถกระตุ้นผลผลิตกรดอิทาโคนิกในการผลิตซ้ำให้สูงขึ้นได้โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต

11. เมื่อตรวจการเติบโตของสายใยตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่า กล้าเชื้อสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอม สายใยราจะเติบโตคลุมบนแต่ละเส้นของชิ้นเส้นใยบวบหอมและสายใยมีลักษณะเป็นสายใยตรงและยาว ส่วนกล้าเชื้อสายใยตรึงใน PUF สายใยราส่วนใหญ่จะเติบโตภายในรูพรุนของชิ้น PUF สายใยรามีลักษณะงอไปมาและผิวสายใยเป็นคลื่น นอกจากนี้ยังมีขนาดของสายใยเล็กกว่าสายใยราที่ตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอม สำหรับ

สายใยตรึงที่ผ่านการผลิตกรดแล้ว 1 ครั้ง พบว่า สายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมยังคงมีขนาดของสายใยราไม่แตกต่างจากขนาดสายใยของกล้าเชื้อ ในขณะที่สายใยตรึงในชิ้น PUF ขนาดสายใยราเล็กลงกว่าเมื่อเป็นกล้าเชื้อ นอกจากนั้นยังพบลักษณะปุ่มปมเกิดขึ้นด้วย

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการทดลองหาแหล่งคาร์บอนทดแทนน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์สำหรับทั้งการผลิตกรดอิทาโคนิกและการเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 โดยใช้น้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายแดงแทนน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกและในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึง พบว่า สามารถใช้น้ำตาลทรายขาวและน้ำตาลทรายแดงทดแทนน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองสูตร โดยให้ปริมาณกรดอิทาโคนิกไล่เลี่ยกันและมีอัตราการผลิตกรดไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ อุษา กรีอักษร (2539) ซึ่งทำการผลิตกรดอิทาโคนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยสายใยอิสระของ *A. terreus* I10 พบว่า แหล่งน้ำตาลซูโครสทั้งสามชนิดให้ปริมาณกรดอิทาโคนิกไล่เลี่ยกัน แต่การใช้น้ำตาลทรายแดงมีข้อเสีย คือ กล้าเชื้อสายใยตรึงที่ได้มีสีน้ำตาลซึ่งเป็นสีของน้ำตาลทรายแดงที่สายใยราดูดซับไว้นั่นเอง นอกจากนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงมีสีเข้มมาก ซึ่งน่าจะมีผลรบกวนทั้งการวิเคราะห์กรดอิทาโคนิกและการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซึ่งต้องวิเคราะห์จากการเปลี่ยนสีของสารละลาย จึงเลือกใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองดังกล่าวข้างต้น น้ำตาลทรายขาวเป็นผลผลิตจากการเกษตรที่มีมากในประเทศไทย จึงถือว่าเป็นการเพิ่มคุณค่าของผลผลิตจากการเกษตรได้อีกวิธีหนึ่ง

จากผลการทดลองการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในชิ้นเส้นใยบวบหอมภายใต้ภาวะเดียวกันเป็นจำนวน 10 ชุด เมื่อคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ของความผันแปรของน้ำหนักแห้งกล้าเชื้อสายใยตรึง ปริมาณกรดอิทาโคนิกสูงสุดที่ผลิตได้ในวันที่ 7 ของการผลิต และน้ำหนักแห้งของสายใยตรึงเมื่อสิ้นสุดการผลิต พบว่า มีค่าต่ำ แสดงให้เห็นว่ามีความแปรปรวนน้อยหรือมีความสม่ำเสมอดี ดังนั้นการใช้ชิ้นเส้นใยบวบหอมในการตรึงสายใยราในการทดลองนี้จึงมีความเป็นไปได้ จึงถือว่าเป็นการค้นพบวัสดุตรึงชนิดใหม่อีกชนิดหนึ่งที่เป็นผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติที่ไม่ต้องนำมาแปรรูป และวัสดุตรึงที่เหลือจากการผลิตสิ้นสุดลงแล้วก็ย่อยสลายได้ในธรรมชาติจึงไม่เป็นการเพิ่มมลภาวะให้กับสิ่งแวดล้อม

การเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกที่แปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 2.70 1.35 0.81 และ 0.27 กรัมต่อลิตร พบว่า ในช่วงเวลา 9 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง สปอร์เริ่มงอกอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

แต่ยังไม่เกาะกับเส้นใยบวบหอม เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงไม่พบสายใยราในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งสังเกตได้โดยเห็นอาหารเลี้ยงเชื้อใสไม่ขุ่นเช่นเดิมแต่เริ่มสังเกตเห็นสายใยราบาง ๆ บนเส้นใยบวบหอม ลักษณะเช่นนี้เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกที่ทุกความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อทำการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อสายใยตรึงต่อไปจนเข้าสู่ระยะที่มีการเติบโตคงที่จะเห็นว่ากล้าเชื้อสายใยตรึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 2.70 กรัมต่อลิตร จะเกาะกับเส้นใยบวบหอมอย่างหนาแน่นและเติบโตได้ดีมาก แต่ไม่พบสายใยอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความหนาแน่นของสายใยราที่พันอยู่กับเส้นใยบวบหอมจะลดลงเล็กน้อยเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1.35 กรัมต่อลิตร ความหนาแน่นของสายใยราจะลดลงจนมองเห็นได้ชัดเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 0.81 กรัมต่อลิตร และเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.27 กรัมต่อลิตรการเติบโตของสายใยราที่เกาะเส้นใยบวบหอมนั้นมีน้อยมาก พบเพียงลักษณะกลุ่มสายใยราเป็นกระจุกเล็ก ๆ เท่านั้น จะเห็นว่ากล้าเชื้อสายใยตรึงที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตมากกว่าจะให้การเติบโตของสายใยราที่มากกว่าเนื่องจากมีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนซึ่งมีความจำเป็นต่อการเติบโตมากในปริมาณที่มากเพียงพอ

เมื่อนำกล้าเชื้อสายใยตรึงที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 2.70 1.35 และ 0.81 กรัมต่อลิตร อายุ 28 44 และ 60 ชั่วโมงเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิก พบว่า กล้าเชื้อสายใยตรึงที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 2.70 และ 1.35 กรัมต่อลิตร อายุสายใยตรึง 44 ชั่วโมง จะผลิตกรดสูงสุด (9.19 และ 10.08 กรัมต่อลิตร ในเวลา 6 วัน ตามลำดับ)ได้เร็วกว่าสายใยตรึงอายุ 28 ชั่วโมง (11.14 และ 9.89 กรัมต่อลิตร ในเวลา 9 วัน ตามลำดับ) แต่กล้าเชื้อสายใยตรึงที่มีอายุมากเกินไป คือ 60 ชั่วโมงนั้นเป็นอายุที่ไม่เหมาะสมเพราะผลิตกรดสูงสุดต่ำกว่าปริมาณกรดที่ได้จากกล้าเชื้อสายใยตรึงอายุอื่น ๆ ถึง 2 เท่า แม้จะผลิตกรดสูงสุดได้เร็วที่สุดก็ตาม อาจเนื่องมาจากสายใยจากกล้าเชื้อนี้มีความหนาแน่นมากเกินไปและมากกว่ากล้าเชื้ออายุอื่นมากจนแทบไม่มีช่องทางให้อากาศแทรกผ่านไปยังสายใยที่อยู่ด้านในวัสดุตรึงเลย ลักษณะดังกล่าวทำให้ดูดซับไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อในชิ้นวัสดุตรึงไว้ได้มากและไม่สามารถล้างเพื่อกำจัดแหล่งไนโตรเจนให้หมดได้ จึงได้ปริมาณกรดน้อยแต่มีการใช้น้ำตาลมากซึ่งอาจถูกใช้ไปในการเติบโตระหว่างการผลิต ส่วนการผลิตกรดอิทาโคนิกของกล้าเชื้อสายใยตรึงที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกที่มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 0.81 กรัมต่อลิตรปริมาณกรดที่ผลิตได้ต่ำกว่าที่ได้จากกล้าเชื้อที่เตรียมจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่กล่าวมาข้างต้น (6.07 6.79 และ 5.4 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กล้าเชื้ออายุ 28 44 และ 60 ชั่วโมง ตามลำดับ) นอกจากนั้นกล้าเชื้อที่มีอายุมากกว่ากลับผลิตกรดได้ช้ากว่ากล้าเชื้อที่มีอายุน้อยกว่า แต่ปริมาณกรดสูงสุดที่ได้ไม่แตก

ต่างกันมากนัก อาจเนื่องมาจากเวลาในการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ 44 และ 60 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนต่ำเป็นเวลานานเกินไปจนทำให้ความสมบูรณ์ของระบบเอนไซม์ในสายใยราลดลงจึงผลิตกรดได้ช้าและมีปริมาณต่ำ ส่วนกล้าเชื้ออายุ 28 ชั่วโมงระบบเอนไซม์ยังมีความสมบูรณ์อยู่จึงทำให้ผลิตกรดได้เร็วกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อเป็นเวลา 44 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้จะไม่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเหลือเลย แสดงว่ากล้าเชื้อสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนหมดก่อน 44 ชั่วโมง สำหรับการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตส กล้าเชื้อที่อยู่ในระยะที่มีการเติบโตมากและรวดเร็ว คือ กล้าเชื้ออายุ 28 ชั่วโมงจะมีการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสได้หมดเร็วกว่ากล้าเชื้อที่อยู่ในช่วงปลายระยะที่มีการเติบโตมากและรวดเร็ว และกล้าเชื้อที่อยู่ในช่วงที่มีการเติบโตคงที่ อาจเนื่องมาจากกล้าเชื้อในระยะที่มีการเติบโตมากและรวดเร็วระบบเอนไซม์มีความพร้อมที่จะทำกิจกรรมมากกว่า จากการทดลองนี้กล้าเชื้อทุกอายุมีการเติบโตระหว่างการผลิตเพิ่มขึ้นแต่จะมากหรือน้อยตามปริมาณแหล่งไนโตรเจน คือ เมื่อมีแหล่งไนโตรเจนมากจะให้การเติบโตมากและเมื่อลดแหล่งไนโตรเจนลงการเติบโตก็จะลดลงตามไปด้วย แต่การเติบโตระหว่างการผลิตของกล้าเชื้ออายุ 60 ชั่วโมงจะลดลงน้อยกว่ากล้าเชื้ออายุ 44 และ 28 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่พบว่าปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 2.70 และ 1.35 กรัมต่อลิตรเมื่อเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อเป็นเวลา 44 ชั่วโมงไม่แตกต่างกันทั้ง ๆ ที่มีการเติบโตระหว่างการผลิตเพิ่มขึ้นต่างกัน แสดงให้เห็นว่ากล้าเชื้อดูดซับไนโตรเจนไว้ในชิ้นวัสดุตรึงและไม่สามารถล้างออกได้หมดหรือเกิดจากสายใยราดูดซับไนโตรเจนไว้ กล้าเชื้อที่เพาะเลี้ยงนานกว่าจะมีการเติบโตหนาแน่นมากกว่ากล้าเชื้อที่มีอายุน้อยกว่าซึ่งเป็นผลให้มีไนโตรเจนที่ดูดซับไว้ในวัสดุตรึงมีมากกว่าและนำไปสู่การเติบโตระหว่างการผลิตที่มากกว่าด้วย จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1.35 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงพอต่อการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อให้มีประสิทธิภาพของการผลิตกรดอิทาโคนิก ถึงแม้จะต้องเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อนาน 44 ชั่วโมงแต่ก็ให้ผลผลิตกรดสูงสุดในเวลาที่รวดเร็วกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 28 ชั่วโมง

ความหนาแน่นสปอร์ที่ใช้ในการตรึงก็มีความสำคัญเช่นเดียวกันกับเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก เนื่องจากปริมาณสายใยตรึงและอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมจะทำให้การผลิตกรดรวดเร็วและได้ปริมาณกรดสูง จากการแปรผันความหนาแน่นของสปอร์เป็น $1 - 2 \times 10^{6}$ $1 - 2 \times 10^{7}$ $1 - 2 \times 10^{8}$ $1 - 2 \times 10^{9}$ และ $1 - 2 \times 10^{10}$ สปอร์ต่อชิ้นเส้นใยบวบหอมหนัก 2.0 - 2.2 กรัม ความสูง 5 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.0 - 4.2 เซนติเมตร พบว่า เมื่อใช้กล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์ $1 - 2 \times 10^{9}$ สปอร์ให้ปริมาณกรดสูงที่สุด คือ 9.71 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการผลิตซึ่ง

สูงกว่าปริมาณกรดที่ได้จากกล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์ 1 - 2 x 10^8 สปอร์เพียงเล็กน้อย คือ 0.97 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาเทียบกับการเติบโตของสายใยและการใช้น้ำตาล จะเห็นว่าการเติบโตเพิ่มขึ้นระหว่างการผลิตกรดไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนการใช้น้ำตาลกล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์ 1 - 2 x 10^9 สปอร์ใช้น้ำตาลได้มากกว่าเล็กน้อยซึ่งสอดคล้องกับผลผลิตที่ได้ เมื่อความหนาแน่นสปอร์เพิ่มเป็น 1 - 2 x 10^{10} สปอร์ ปริมาณกรดอิทาโคนิกสูงสุดที่ได้ลดลงเป็น 4.5 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการผลิต ซึ่งผลิตได้ช้ากว่ากล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์ 1 - 2 x 10^8 และ 1 -2 x 10^9 สปอร์ ในขณะที่การเติบโตเพิ่มขึ้นระหว่างการผลิตไม่แตกต่างกันมากนัก แต่เมื่อพิจารณาถึงปริมาณน้ำตาลที่ใช้จะน้อยกว่า ซึ่งน้ำตาลที่ใช้น่าจะใช้ในการเติบโตของสายใยตรึงมากกว่าการผลิตกรด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณสปอร์ที่มากเกินไปทำให้ได้กล้าเชื้อที่อัดตัวกันแน่นเกินไป การได้รับอากาศและอาหารของสายใยตรึงไม่ดีพอเป็นผลให้การผลิตไม่สูงมากเท่าที่ควร ส่วนเมื่อใช้กล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์ 1 - 2 x 10^6 และ 1 - 2 x 10^7 สปอร์ให้ปริมาณกรดสูงสุดช้าและต่ำมาก กล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์ 1 - 2 x 10^6 สปอร์ มีการเติบโตเพิ่มขึ้นระหว่างการผลิตกรดและการใช้น้ำตาลจะน้อยที่สุด รองลงมาคือ กล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์ 1 - 2 x 10^7 สปอร์ ซึ่งกล้าเชื้อทั้งสองมีการเติบโตเพิ่มขึ้นระหว่างการผลิตกรดและการใช้น้ำตาลน้อยกว่ากล้าเชื้ออื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณสปอร์ตั้งต้นที่น้อยเกินไปจึงให้สายใยราน้อยทำให้การผลิตต่ำกว่าและช้ากว่าปริมาณสปอร์ที่เหมาะสม สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงขณะทำการผลิตกรดของกล้าเชื้อแต่ละความหนาแน่นสปอร์ไม่แตกต่างกัน ซึ่งมีค่าประมาณ 2.8 จากการทดลองจะเห็นว่าความหนาแน่นสปอร์ในการเตรียมกล้าเชื้อมีผลต่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยกล้าเชื้อสปอร์ความหนาแน่น 1 - 2 x 10^8 สปอร์เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิทาโคนิก แต่จากการทดลองของ Kautola และคณะ (1985) ได้ทำการผลิตกรดนี้โดยสายใยตรึงของ *A. terreus* ในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่า ความหนาแน่นสปอร์ที่ใช้ในการตรึงไม่มีผลต่อผลผลิตกรดอิทาโคนิก

สำหรับการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในชิ้นเส้นใยบวบหอม พบว่า ไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งไนโตรเจนก็สามารถผลิตกรดอิทาโคนิกได้ ถ้ามีการเติมแหล่งไนโตรเจนแม้เพียง 0.2 กรัมต่อลิตรจะพบการเติบโตของสายใยตรึงจะมีมากเกินไปจนกระทั่งหลุดจากวัสดุตรึงทำให้เกิดสายใยอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าทำการผลิตกรดในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างจะทำให้เกิดปัญหาการอุดตันขึ้นได้ นอกจากนั้นการเติบโตที่มากเกินไปยังมีผลให้สายใยตรึงที่อยู่ลึกเข้าไปในวัสดุตรึงไม่ได้รับอาหารและอากาศเป็นผลให้การผลิตกรดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Vassilev และคณะ (1992) ได้รายงานว่าการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* TKK200 - 5 -1 ใน PUF ระดับขวดเขย่า

ใช้น้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ปริมาณกรดอิทาโคนิกสูงสุดถึง 7 กรัมต่อลิตร โดยไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต

การผลิตกรดอิทาโคนิกนั้นต้องการการให้อากาศที่ไม่มากนัก แต่จะไม่สามารถผลิตกรดได้ถ้าการให้อากาศหยุดชะงักลง และการผลิตกรดจะลดลงเมื่อมีการให้อากาศที่รุนแรงเกินไป (Lockwood , 1979 ; Kautola และคณะ, 1985 ; Gyamerah , 1995b) ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องจัดการให้อากาศให้เหมาะสม จากการแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีเพื่อหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม เมื่อผลิตกรดอิทาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในชิ้นเส้นใยบวบหอม ใช้กล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์ 1 - 2 x 10^8 และ 1 - 2 x 10^9 สปอร์ พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศผลผลิตกรดอิทาโคนิกจะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อถึงระดับหนึ่งแล้วผลผลิตกลับต่ำลงหากให้อากาศเพิ่มขึ้นไปอีก ดังจะเห็นได้จากการใช้กล้าเชื้อสายใยตรึงความหนาแน่นสปอร์ 1 - 2 x 10^8 สปอร์ ผลิตกรดอิทาโคนิกทำการเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 1.5 เป็น 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ผลผลิตกรดเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า (9.0 กรัมต่อลิตร) และได้ผลผลิตกรดเร็วขึ้น 1 วัน คือ ในวันที่ 10 ของการผลิต แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศขึ้นไปอีกเป็น 2.5 และ 3.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีปริมาณกรดสูงสุดที่ผลิตได้กลับลดลงเป็น 6.74 และ 6.29 กรัมต่อลิตรในวันที่ 10 ของการผลิต เมื่อพิจารณาถึงการเติบโตเพิ่มขึ้นระหว่างการผลิตและการใช้น้ำตาล พบว่า มีค่าใกล้เคียงกัน แต่ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีให้ปริมาณกรดน้อยที่สุดและเริ่มผลิตกรดในวันที่ 4 ของการผลิต นอกจากนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างยังมีค่าสูงกว่าที่อัตราการให้อากาศค่าอื่นซึ่งอาจเป็นเหตุเนื่องมาจากที่อัตราการให้อากาศค่านี้สายใยราอาจผลิตสารผลิตภัณฑ์อื่นนอกเหนือไปจากกรดอิทาโคนิก ผลการแปรผันอัตราการให้อากาศเมื่อใช้กล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์ 1 - 2 x 10^9 สปอร์ในการผลิตกรดก็เป็นเช่นเดียวกัน คือ เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 1.5 เป็น 2.0 และ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ผลผลิตกรดสูงสุดจะเพิ่มจาก 3.60 เป็น 5.40 และ 7.19 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการผลิต ตามลำดับ แต่ถ้าเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 3.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ผลผลิตกรดกลับลดลงเหลือ 5.85 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 10 ของการผลิต เมื่อพิจารณาถึงการเติบโตเพิ่มขึ้นระหว่างการผลิตและการใช้น้ำตาล พบว่า การเติบโตของสายใยเมื่ออัตราการให้อากาศเป็น 1.5 และ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที มีการเติบโตเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน ส่วนการเติบโตของกล้าเชื้อเพิ่มขึ้นระหว่างการผลิตเมื่ออัตราการให้อากาศเป็น 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อจะมากขึ้นและใกล้เคียงกับเมื่อให้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 3.0 ลิตรต่อลิตรต่อนาที การใช้น้ำตาลเมื่ออัตราการให้อากาศต่ำกว่าจะช้ากว่าเมื่อให้อัตราการให้อากาศสูงขึ้น โดยอัตราการให้อากาศเป็น 3.0

ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที มีการใช้น้ำตาลมากที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่ออัตราการให้อากาศมีค่าสูงขึ้น สายใยราจะใช้น้ำตาลเพื่อการเติบโตมากขึ้นในขณะที่การผลิตกรดก็มากขึ้นด้วยในกรณีของกล้าเชื้อที่มีความหนาแน่นสปอร์ 1 - 2 x 10^9 สปอร์ แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศสูงขึ้นถึง 3.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีซึ่งมีการเติบโตพอ ๆ กับที่อัตราการให้อากาศ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที แต่การใช้น้ำตาลกลับมากกว่าในขณะที่ให้ผลผลิตกรดต่ำกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะที่ค่าอัตราการให้อากาศนี้สายใยตรึงอาจมากเกินไปหรืออาจผลิตสารผลิตภัณฑ์อื่นนอกจากกรดอิทาโคนิก เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดโดยกล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์ 1 - 2 x 10^8 และ 1 - 2 x 10^9 สปอร์ โดยให้อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมสำหรับกล้าเชื้อแต่ละความหนาแน่นสปอร์ซึ่งให้ผลผลิตกรดสูง พบว่า กล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์สูงกว่า คือ 1 - 2 x 10^9 สปอร์ ต้องการอัตราการให้อากาศที่มากกว่า คือ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีให้ผลผลิตกรดต่ำกว่า แต่มีการใช้น้ำตาลมากกว่ากล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์ 1 - 2 x 10^8 สปอร์ อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีอาจเนื่องจากกล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์สูงกว่าใช้น้ำตาลไปในการเติบโตมากกว่า ซึ่งการเติบโตน่าจะมาจากไนโตรเจนที่ดูดซับไว้ในชิ้นวัสดุตรึงหรือสะสมไว้ในสายใย แสดงให้เห็นว่าการผลิตกรดอิทาโคนิกไม่ต้องการสายใยราในการผลิตมากนัก ซึ่ง Lockwood และ Nelson (1946) ได้รายงานถึงการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยอิสระในขวดเขย่า ซึ่งจำนวนสายใยที่มีลักษณะเป็นเม็ดกลม (pellet) ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 1 - 100 เม็ดต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 125 มิลลิลิตร ส่วนอัตราการให้อากาศที่มีค่ามากขึ้นจะทำให้ผลผลิตกรดที่ได้มากขึ้นด้วยนั้นสอดคล้องกับการทดลองของ Okabe และคณะ (1993) ที่พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 0.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีจนกระทั่งเท่ากับ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที จะให้ผลผลิตกรดสูงขึ้นจาก 8 กรัมต่อลิตร เป็น 44 กรัมต่อลิตร โดยใช้สายใยอิสระในการผลิตกรดในปฏิกรณ์แบบแอร์ลิฟท์ จากผลการทดลองนี้เมื่อคำนึงถึงการประหยัดพลังงานแล้วจะเห็นว่าอัตราการให้อากาศ 2.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีเมื่อใช้กล้าเชื้อสายใยตรึงความหนาแน่น 1-2 x 10^8 สปอร์เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดอิทาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

ขนาดของกล้าเชื้อมีผลต่อการผลิตกรดอิทาโคนิกเช่นกัน ถ้าปริมาณสายใยตรึงที่ผลิตกรดมีน้อย ผลผลิตกรดที่ได้ก็จะน้อยด้วย แต่ถ้าปริมาณสายใยตรึงมีมากเกินไปจะทำให้สารอาหารและออกซิเจนบางส่วนถูกนำไปใช้เพื่อการเติบโตและดำรงชีพของสายใยตรึงที่มีปริมาณมาก จากการทดลองแปรผันขนาดชิ้นวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึงอยู่เมื่อผลิตกรดอิทาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยแปรความสูงของชิ้นวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึงเป็น 3 5 และ 7 เซนติเมตร ใช้น้ำตาลทรายขาว 66 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า วัสดุตรึง

ที่มีสายใยตรึงซึ่งมีความสูง 5 เซนติเมตรเหมาะสมที่สุด ให้ผลผลิตกรดและมีอัตราการผลิตกรดที่สูงกว่าวัสดุตรึงขนาดความสูงอื่น ในช่วงแรกของการผลิตชิ้นวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึงขนาดความสูง 5 และ 7 เซนติเมตร มีอัตราการผลิตกรดไม่แตกต่างกันมากนัก จนกระทั่งวันที่ 7 ของการผลิต ชิ้นวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึงขนาดความสูง 7 เซนติเมตรมีอัตราการผลิตต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่ชิ้นวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึงขนาดความสูง 5 เซนติเมตรยังคงมีอัตราการผลิตที่สูงและได้ผลผลิตกรดสูงสุดสูงกว่าผลผลิตกรดที่ได้จากชิ้นวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึงขนาดความสูง 7 เซนติเมตร แต่การใช้น้ำตาลและการเติบโตเพิ่มขึ้นระหว่างการผลิตเมื่อใช้วัสดุตรึงที่มีสายใยตรึงที่มีขนาดสูงกว่ามีมากกว่าเนื่องจากสายใยตั้งต้นที่มีมากกว่าจึงใช้น้ำตาลมากและให้การเติบโตที่มากกว่า ซึ่งจะเห็นได้ว่าขนาดของกล้าเชื้อต้องมีความเหมาะสมจึงจะให้การเติบโตและการผลิตที่สมดุลกัน ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Lockwood (1954) ซึ่งกล่าวว่ากล้าเชื้อขนาดใหญ่จะมีการเติบโตของสายใยมากในขณะที่ให้ผลผลิตกรดน้อย แต่ขนาดกล้าเชื้อที่เล็กกว่าและเหมาะสมจะมีการเติบโตน้อย ให้ผลผลิตกรดสูง นอกจากนี้วัสดุตรึงในคอลัมน์วัสดุตรึงจะอยู่กับที่ส่วนที่หมุนเวียน คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อให้อากาศทางด้านล่างคอลัมน์ก็จะเกิดการหมุนวนของอาหารและอากาศในคอลัมน์ ถ้าชิ้นวัสดุตรึงมีความสูงมากเกินไปอาจมีผลทำให้การหมุนเวียนของอากาศและอาหารไม่สม่ำเสมอและทั่วถึง ซึ่งจะมีผลถึงการผลิตกรดด้วย เนื่องจากการถ่ายเทอาหารและอากาศจากอาหารเลี้ยงเชื้อสู่สายใยรามีน้อยลง ส่วนชิ้นวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึงขนาดความสูง 3 เซนติเมตรให้ผลผลิตกรดต่ำมาก นอกจากนั้นยังมีการใช้น้ำตาลน้อยแต่เมื่อพิจารณาการเติบโตระหว่างการผลิตจะเห็นว่ามีการเติบโตน้อย จากผลดังกล่าวแสดงว่ากล้าเชื้อขนาดนี้คงน้อยเกินไปต่อการผลิตกรดอิทาโคนิกทำให้การผลิตช้าและต้องใช้เวลานานกว่า

จากการทดลองผลิตกรดอิทาโคนิกที่ผ่านมาใช้น้ำตาลทรายขาวความเข้มข้น 66 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรด พบว่า มีน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปริมาณมากถึง 36 กรัมต่อลิตร จึงทำการปรับลดความเข้มข้นของน้ำตาลทรายขาวลงเหลือ 40 กรัมต่อลิตรเพื่อมิให้เป็นการสูญเสียแหล่งคาร์บอนไปโดยเปล่าประโยชน์ ซึ่งก็พบว่า ผลผลิตกรดอิทาโคนิกที่ได้เกือบไม่แตกต่างจากเมื่อใช้น้ำตาลทรายขาวความเข้มข้น 66 กรัมต่อลิตร (9.0 กรัมต่อลิตร) คือ ได้ปริมาณกรดอิทาโคนิกสูงสุด 8.2 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อใช้น้ำตาลทรายขาวความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรสายใยตรึงจะใช้น้ำตาลน้อยกว่าเล็กน้อย และเมื่อพิจารณาควบคู่กับการเติบโตเพิ่มขึ้นระหว่างการผลิตพบว่า เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการปรับลดแหล่งคาร์บอนแล้วมีการเติบโตน้อยกว่าการใช้น้ำตาลทรายขาวเข้มข้น 66 กรัมต่อลิตร ในการผลิตกรด (เติบโตเพิ่มขึ้น 2.02 กรัมต่อลิตร) คือ มีการเติบโตเพิ่มขึ้น 1.29 กรัมต่อลิตร สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะสูงขึ้นเมื่อทำการปรับลดแหล่งคาร์บอน

อาจเป็นผลเนื่องจากการเติบโตที่น้อยลงเล็กน้อยจึงผลิตกรดได้ลดลงเล็กน้อยทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ต่ำลง จากผลการทดลองที่ได้ผลผลิตกรดสอดคล้องกับการใช้น้ำตาลและการเติบโตของสายใยตรึง นอกจากนั้นผลผลิตกรดยังไม่แตกต่างกันมากเพื่อมิให้เป็นการสูญเสียแหล่งคาร์บอนไปโดยเปล่าประโยชน์ ดังนั้นน้ำตาลทรายขาวความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรจึงเหมาะสมกว่าสำหรับการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในชิ้นเส้นใยบวบหอม

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในวัสดุตรึงอีกชนิดหนึ่ง คือ PUF ในการผลิตกรดกล้าเชื้อสายใยตรึงที่ใช้มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพการผลิต ดังนั้นปัจจัยหนึ่งที่ควรคำนึงถึงในการเตรียมกล้าเชื้อ คือ ช่วงเวลาในการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อสปอร์ตรึงเนื่องจากอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมจะทำให้ระบบเอนไซม์ของสายใยมีความสมบูรณ์ ทำให้การผลิตสารผลิตภัณฑ์มีประสิทธิภาพจากการทดลองแปรผันเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อสายใยตรึงและนำสายใยตรึงที่ได้มาผลิตกรดอิทาโคนิกในขวดเขย่า ซึ่งแปรผันอายุกล้าเชื้อเป็น 60 72 และ 84 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วงปลายระยะที่มีการเติบโตมากและรวดเร็วและระยะที่มีการเติบโตคงที่ การเลือกอายุกล้าเชื้อนี้มีเหตุผลมาจากการทดลองที่ใช้สายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมผลิตกรดซึ่งอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสม คือ 44 ชั่วโมงและที่เวลานี้สายใยตรึงมีการเติบโตในช่วงปลายระยะที่มีการเติบโตมากและรวดเร็ว ผลการทดลองพบว่า กล้าเชื้อสายใยตรึงอายุ 72 และ 84 ชั่วโมงให้ผลผลิตกรดสูงสุดไม่แตกต่างกัน คือ 8.32 และ 8.86 กรัมต่อลิตรในเวลา 5 วัน ตามลำดับ ส่วนกล้าเชื้อสายใยตรึงอายุ 60 ชั่วโมงผลผลิตกรดต่ำกว่ากล้าเชื้ออายุอื่น ๆ มากทั้ง ๆ ที่มีการใช้น้ำตาลในช่วง 5 วันแรกมากกว่ากล้าเชื้ออายุอื่นหลังจากนั้นการใช้น้ำตาลจะใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากสายใยใช้สารอาหารในการผลิตสารผลิตภัณฑ์อื่นแต่มิได้ใช้ไปเพื่อการเติบโตเนื่องจากผลการทดลองไม่พบการเติบโตเพิ่มขึ้นที่แตกต่างไปจากการเติบโตของกล้าเชื้ออายุอื่น นอกจากนั้นยังสามารถเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสได้หมดในเวลา 4 วัน เช่นกัน ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าไล่เลี่ยกัน คือ มีค่าเท่ากับ 2.9 จะเห็นว่าอายุกล้าเชื้อสายใยตรึงมีผลต่อการผลิตกรดดังเช่นในการทดลองของ Horitsu และคณะ (1983) ได้ทดลองแปรเวลาในการเพาะเลี้ยงสายใยก่อนทำการตรึงในพอลิอะคริลามายด์เจลเป็น 72 96 120 และ 144 ชั่วโมง พบว่า อายุของสายใยที่เหมาะสมที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด คือ 120 ชั่วโมง สำหรับในการทดลองนี้เมื่อคำนึงถึงการประหยัดพลังงานและเวลา อายุของกล้าเชื้อสายใยตรึงใน PUF ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิทาโคนิก คือ กล้าเชื้อสายใยตรึงอายุ 72 ชั่วโมง

ปริมาณเชื้อต่อวัสดุตรึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ ซึ่งกล้าเชื้อที่เหมาะสมจะต้องมีปริมาณเชื้อต่อวัสดุตรึงที่เหมาะสม นั่นคือ กำหนดได้จากความหนา

แน่นสปอร์ที่ใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อสายใยตรึง จากการทดลองแปรผันความหนาแน่นสปอร์เป็น $1-2 \times 10^{8}$ $1-2 \times 10^{9}$ และ $1-2 \times 10^{10}$ สปอร์ต่อ PUF หนัก 1 กรัม (น้ำหนักแห้ง) พบว่าเมื่อใช้สปอร์ความหนาแน่น $1-2 \times 10^{10}$ สปอร์ในการตรึง จะมีสปอร์บางส่วนเติบโตเป็นสายใยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอก เนื่องจากสปอร์ไม่สามารถเข้าไปภายในชิ้น PUF และเติบโตอยู่ภายในได้หมด จึงไม่นำกล้าเชื้อสายใยตรึงนี้ไปผลิตกรดอิทาโคนิก ความหนาแน่นสปอร์ที่เหมาะสมในการตรึง คือ $1-2 \times 10^{9}$ สปอร์ ให้ผลผลิตกรดอิทาโคนิกสูงสุด 8.32 กรัมต่อลิตรในวันที่ 5 ของการผลิต ซึ่งสูงกว่าและใช้เวลาในการผลิตสั้นกว่าเมื่อใช้กล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์ $1-2 \times 10^{8}$ สปอร์ที่ให้ผลผลิตกรด 6.07 กรัมต่อลิตรในวันที่ 7 ของการผลิต ส่วนการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสกล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์สูงกว่าจะเปลี่ยนได้หมดในเวลาที่เร็วกว่า แต่การใช้น้ำตาลนั้นมีปริมาณใกล้เคียงกันในช่วงแรก แต่กล้าเชื้อความหนาแน่นสปอร์ต่ำกว่าจะใช้น้ำตาลมากในช่วงท้ายของการผลิตซึ่งเป็นไปตามปริมาณกรดที่ผลิตได้ ซึ่งเป็นผลเช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในการผลิตกรดโดยใช้สายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอม ที่ปริมาณสายใยที่น้อยเกินไปจะทำให้การผลิตสารผลิตภัณฑ์เป็นไปได้ช้า สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีค่าใกล้เคียงกัน กล้าเชื้อสายใยตรึงทั้งสองความหนาแน่นสปอร์ไม่มีการเติบโตระหว่างการผลิตซึ่งแตกต่างจากสายใยที่ตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมที่มีการเติบโตตลอดการผลิตซึ่งอาจมาจากมีการดูดซับแหล่งไนโตรเจนไว้ในสายใยที่พันกันแน่น จากเหตุผลนี้จะเห็นว่า PUF เป็นวัสดุตรึงที่เหมาะสมกว่าเนื่องจากสามารถล้างแหล่งไนโตรเจนออกได้หมดจึงไม่มีไนโตรเจนมารบกวนในขั้นตอนการผลิต

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าการให้อากาศเป็นสิ่งสำคัญในการผลิตกรดอิทาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ใน PUF อายุ 72 ชั่วโมง น้ำหนักเปียก PUF ที่มีสายใยตรึงเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้น้ำตาลทรายขาว 66 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน จากการแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 1.25 2.5 และ 5.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที พบว่า อัตราการให้อากาศที่เหมาะสม คือ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ผลผลิตกรดสูงสุดเท่ากับ 7.69 กรัมต่อลิตร ในเวลา 7 วัน ในขณะที่เมื่ออัตราการให้อากาศน้อยหรือมากกว่าอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมปริมาณกรดอิทาโคนิกที่ผลิตได้จะน้อยกว่าและใช้เวลาในการผลิตนานกว่าที่ได้จากอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม คือให้ผลผลิตกรดสูงสุด 4.72 และ 6.48 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 และ 9 ของการผลิตเมื่ออัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.25 และ 5.0 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที สำหรับการใช้น้ำตาลก็จะมีผลไปในทางเดียวกันกับการผลิตกรด ผลผลิตกรดที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Horitsu และคณะ (1983) ที่พบว่าอัตราการให้อากาศที่สูงเกินไปไม่มีผลในการทำให้มีการผลิตกรดอิทาโคนิกสูงขึ้นโดยได้ทำการผลิตกรดโดยใช้สายใยตรึงของ *A. terreus* ที่ตรึงใน

พอลิอะคริลามายด์เจล ทำการแปรอัตราการให้อากาศเป็น 7 และ 14 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที พบว่า ที่อัตราการให้อากาศ 7 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อจะให้ผลผลิตกรดสูงกว่า คือ 4.8 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศขึ้นจะได้ปริมาณกรดอิทาโคนิก 3.6 กรัมต่อลิตร และสอดคล้องกับการทดลองของ Okabe และคณะ (1993) ทำการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยอิสระ พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศผลผลิต กรดอิทาโคนิกก็จะเพิ่มขึ้นด้วย แต่เมื่อเพิ่มจนสูงเกินไปการผลิตจะลดลง

เมื่อแปรผันขนาดกล้าเชื้อสายใยตรึงโดยแปรผันน้ำหนักเปียกของ PUF ที่มีสายใยตรึงเป็น 7.5 15.0 22.5 และ 30.0 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงซึ่งมีน้ำตาลทรายขาวความเข้มข้น 66 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการผลิตกรดในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง อัตราการให้อากาศ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที พบว่า กล้าเชื้อสายใยตรึงใน PUF ที่มีน้ำหนักเปียกเท่ากับ 22.5 กรัมต่อลิตรเป็นขนาดกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดอิทาโคนิกที่ให้ผลผลิตกรดสูงสุด 10.34 กรัมต่อลิตร ในเวลา 6 วัน กล้าเชื้อที่มีขนาดเล็กกว่าจะให้ผลผลิตกรดต่ำกว่า (ให้ผลผลิตกรด 3.96 และ 7.69 กรัมต่อลิตร ในเวลา 4 และ 7 วัน เมื่อใช้ขนาดกล้าเชื้อ 7.5 และ 15.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) โดยเฉพาะกล้าเชื้อสายใยตรึงที่มีน้ำหนักเปียกเท่ากับ 7.5 กรัมต่อลิตรนั้นผลิตกรดได้ในปริมาณที่น้อยมากและใช้น้ำตาลได้น้อยด้วย นอกจากนั้นยังไม่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตสได้หมด จะเห็นได้ว่าปริมาตรของสายใยต่ออาหารเลี้ยงเชื้อที่น้อยเกินไปจะทำให้ผลผลิตที่ได้มีปริมาณต่ำ เช่นเดียวกันกับกล้าเชื้อที่มีขนาดใหญ่เกินไปจะให้ผลผลิตต่ำแต่ใช้น้ำตาลทั้งหมดมากกว่ากล้าเชื้อขนาดเหมาะสม อาจเนื่องมาจากสายใยภายในชิ้นวัสดุตรึงที่มีปริมาณมากทำให้ต้องการสารอาหารไปใช้ในการดำรงชีพมากทำให้ผลผลิตต่ำ

การผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ใน PUF ที่ผ่านมานั้นใช้น้ำตาลทรายขาวความเข้มข้น 66 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลองยังมีน้ำตาลเหลือในน้ำหมักในปริมาณมากคือเหลือ 52 กรัมต่อลิตร จึงลดความเข้มข้นของน้ำตาลทรายขาวลงเหลือ 25 กรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่า เมื่อลดความเข้มข้นของน้ำตาลทรายขาวลงเหลือ 25 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดสูงสุด 9.88 กรัมต่อลิตร ในเวลา 6 วัน ซึ่งปริมาณกรดที่ได้ใกล้เคียงกับเมื่อยังไม่ได้ปรับลดความเข้มข้นของน้ำตาลทรายขาว (10.34 กรัมต่อลิตร) นอกจากนั้นยังมีการใช้น้ำตาลและการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อไล่เลี่ยกัน ดังนั้นน้ำตาลทรายขาว 25 กรัมต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเหมาะสมกว่าในการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ใน PUF

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในชิ้นเส้นใยบวบหอมและสายใยตรึงใน PUF ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดจากสายใยตรึงทั้งสอง พบว่า เวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอม เพื่อให้ได้กล้าเชื้อสายใยตรึงที่มีประสิทธิภาพสูงใช้เวลา 44 ชั่วโมง ซึ่งน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงใน PUF ที่ใช้เวลาถึง 72 ชั่วโมง ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะการตรึงสายใยในชิ้นเส้นใยบวบหอมในช่วงแรกของการเตรียมกล้าเชื้อ สปอร์ราส่วนใหญ่จะงอกอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากช่องว่างระหว่างเส้นใยของชิ้นเส้นใยบวบหอมนั้นห่างกันมากเมื่อเทียบกับชิ้น PUF เมื่อสปอร์รางอกเป็นสายใยได้ระยะหนึ่งก็จะเกาะกับเส้นใยบวบหอม ซึ่งแม้ว่าสายใยราจะเกาะเส้นใยบวบหอมแล้วก็ยังมีช่องว่างให้สารอาหารและอากาศผ่านเข้าออกจากชิ้นเส้นใยบวบหอมได้ แต่ในกรณีของ PUF สปอร์ราจะเข้าไปในรูพรุนของชิ้น PUF และถูกกักไว้ หลังจากนั้นจึงเติบโตเป็นสายใยราอยู่ภายใน เนื่องจากขนาดรูพรุนของ PUF นั้นเล็กมากทำให้อาหารและอากาศผ่านเข้าออกได้ยากกว่าชิ้นเส้นใยบวบหอม จึงเจริญเป็นสายใยตรึงที่มีประสิทธิภาพได้ช้ากว่าสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอม นอกจากนั้นปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกในการเตรียมสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมนั้นมากกว่าปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในการเตรียมสายใยตรึงใน PUF โดยมีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 400 และ 150 มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ความหนาแน่นของสปอร์ที่ใช้เตรียมสายใยตรึงใน PUF นั้นสูงกว่า ทำให้สารอาหารสำหรับการเติบโตของสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมมีมากกว่าเมื่อเทียบกับสารอาหารสำหรับการเติบโตของสายใยตรึงใน PUF และจากผลการตรวจการเติบโตของสายใยตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่า สายใยตรึงของราในชิ้นเส้นใยบวบหอมมีลักษณะเป็นสายใยตรงและยาว นอกจากนั้นขนาดของสายใยยังใหญ่กว่าสายใยตรึงของราในชิ้น PUF ซึ่งสายใยมีลักษณะเป็นคลื่นและงอบิดไปมา อาจเนื่องมาจากสายใยราที่ตรึงใน PUF มีพื้นที่ในการเติบโตที่จำกัดกว่าชิ้นเส้นใยบวบหอม เมื่อนำกล้าเชื้อสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมและกล้าเชื้อสายใยตรึงใน PUF มาผลิตกรดอิทาโคนิก พบว่า ได้ปริมาณกรดอิทาโคนิกต่างกัน คือ 8.2 และ 9.88 กรัมต่อลิตร ในเวลา 9 และ 6 วัน ตามลำดับ จะเห็นว่าสายใยตรึงใน PUF ให้ปริมาณกรดสูงสุดในเวลาที่เร็วกว่าในขณะที่ใช้ปริมาณสายใยตรึงในการผลิตกรดน้อยกว่า ส่วนการใช้น้ำตาลของสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมจะมากกว่าสายใยตรึงใน PUF เนื่องจากสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมมีการเติบโตเพิ่มขึ้นระหว่างการผลิตในขณะที่สายใยตรึงใน PUF แทบจะไม่มีการเติบโตเพิ่มขึ้นเลย จากการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงทั้งสองชนิด ให้ปริมาณกรดอิทาโคนิกที่ได้ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยอิสระในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างโดยมีปริมาตรใช้งานเท่ากับ 400 มิลลิลิตร ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยง

เชื้อ) อัตราการให้อากาศ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ใช้น้ำตาลทรายขาว 66 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งได้ปริมาณกรด 21.31 กรัมต่อลิตร ในเวลา 9 วัน (อุษา กรีอักษร, 2539) ทั้งนี้เนื่องจากในการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมนั้นชิ้นวัสดุตรึงจะถูกตรึงให้อยู่กับที่จึงมีแค่อากาศและอาหารเท่านั้นที่มีการเคลื่อนที่ในระหว่างการผลิตกรดสายใยรามีการเติบโตซึ่งจะเห็นได้ว่าสายใยราที่เกาะบนชิ้นวัสดุตรึงหนาขึ้นทำให้อาหารและอากาศผ่านเข้าไปถึงสายใยภายในชิ้นวัสดุตรึงได้ยากขึ้น จึงทำให้บริเวณที่มีการผลิตกรดอิทาโคนิกจะอยู่ที่บริเวณผิวภายนอกของวัสดุตรึงเท่านั้น และจากการที่วัสดุตรึงมีลักษณะเป็นชิ้นขนาดใหญ่จึงทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสน้อยทำให้ได้ปริมาณกรดที่น้อยกว่าที่ควรจะเป็น สำหรับการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงใน PUF ซึ่งวัสดุตรึงจะมีการเคลื่อนที่อยู่ตลอดเวลาและขนาดของชิ้นวัสดุตรึงที่มีขนาดเล็กทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสมีมาก ซึ่งน่าจะให้ผลผลิตกรดที่ดีกว่าการผลิตกรดโดยสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอม ถึงแม้ว่าสายใยราจะเติบโตอยู่ในรูพรุนของชิ้น PUF ซึ่งจะต้องมีการผ่านเข้าออกของสารอาหารและออกซิเจนเป็นปัจจัยจำกัดก็ตาม แต่กลับให้ผลผลิตกรดใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในการล้างกล้าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ สามารถล้างแหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้สปอร์ตรึงงอกได้เกือบทั้งหมด ซึ่งพิจารณาได้จากระหว่างการผลิตกรดมีการเติบโตของสายใยตรึงเพิ่มขึ้นน้อยมากและในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกไม่มีแหล่งไนโตรเจน แต่เชื้อต้องการไนโตรเจนจำนวนหนึ่งเพื่อใช้ในการดำรงชีพซึ่งจะมีผลต่อการผลิตกรดด้วย นอกจากนั้นจากการตรวจการเติบโตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดยังพบลักษณะของสายใยตรึงใน PUF ที่ผ่านการผลิตกรดอิทาโคนิกมีการเปลี่ยนแปลงโดยเส้นใยรามีขนาดเล็กกว่าเมื่อเป็นกล้าเชื้อ ซึ่งแสดงว่าสายใยราในช่วงหลังของการผลิตอาจไม่สมบูรณ์และอาจเสียกิจกรรมบางอย่างไปเนื่องจากอยู่ในสภาวะที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนนานถึง 10 วันจึงทำให้ผลผลิตกรดต่ำ ซึ่งไม่เหมือนกรณีของสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมที่ไม่สามารถล้างแหล่งไนโตรเจนได้หมดเนื่องจากสายใยพันกันแน่นมาก จึงเหลือไนโตรเจนที่ถูกซับไว้ในวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึงอยู่ จึงมีการเติบโตต่อไปแต่ผลผลิตกลับไม่สูงขึ้น ส่วนการผลิตกรดโดยสายใยอิสระสายใยราจะสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรงทำให้ไม่มีปัจจัยจำกัดที่เกิดขึ้นกับสายใยตรึงทำให้การผลิตกรดของสายใยอิสระมีมากกว่า ซึ่ง Braun และ Vecht - Lifshitz (1991) ได้กล่าวว่า ภายในปฏิกรณ์ที่มีการหมุนเวียนของอาหาร อากาศ และวัสดุตรึงที่มีสายใยตรึงอยู่ภายในปฏิกรณ์ตลอดเวลา ซึ่งน่าจะมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) แต่เมื่อพิจารณาลงไปที่วัสดุตรึงจะพบว่ามีปัจจัยจำกัดในการถ่ายเทมวล (mass - transfer limitation) และการถ่ายเทความร้อน (heat - transfer limitation) จากภายนอกสู่ภายในวัสดุตรึง และการเติบโตของเซลล์หรือสายใยตรึงจะเกิดขึ้นบริเวณผิวของวัสดุตรึงซึ่งจะมีการถ่ายเทออกซิเจนที่ดี ส่วนสายใยที่อยู่

ลึกเข้าไปภายในจะมีสายใยบางส่วนที่สลายไป (lyse) ซึ่งเมื่อตัดเอาชิ้นเส้นใยบวบหอมที่มีสายใยตรึงที่ผ่านการผลิตกรดแล้วตรวจดูลักษณะของสายใยพบว่า บริเวณผิวของชิ้นวัสดุตรึงจะมีลักษณะเป็นสายใยยื่นออกมา แต่เมื่อดูส่วนที่ลึกลงไปในชิ้นเส้นใยบวบหอมสายใยจะเรียบติดกับเส้นใยบวบหอม นอกจากนั้นค่าความเป็นกรด - ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตกรดของสายใยตรึงทั้งสองมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนักและไม่บรรลุค่าความเป็นกรด - ด่างที่เหมาะสมที่จะให้ผลผลิตกรดอิทาโคนิกสูงได้ ดังที่ Rychtera และ Wase (1981) ได้กล่าวว่าเมื่อค่าความเป็นกรด - ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าสูงจะทำให้เกิดการสังเคราะห์กรดอินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ด้วยวิธี HPLC พบว่ามีกรดอินทรีย์อื่นปนเปื้อนจริง

จากการทดลองนี้จะเห็นว่าสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในชิ้นเส้นใยบวบหอมและใน PUF ที่ใช้ในการผลิตกรดอิทาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างให้อัตราการผลิตกรดเท่ากับ 0.038 และ 0.069 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ใช้เวลาในการผลิต 9 และ 6 วัน ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าใช้เวลาในการผลิตน้อยกว่าการทดลองอื่น ๆ ซึ่งได้แสดงในตารางที่ 14 มาก ถ้าใช้เวลาในการผลิตนานเท่ากับการทดลองอื่นในตารางดังกล่าวจะทำให้ได้ผลผลิตกรดรวมจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้มากกว่าผลผลิตที่ได้จากบางการทดลองที่รายงานในตารางข้างต้น

เมื่อทำการผลิตกรดซ้ำโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง พบว่า ทั้งสายใยตรึงในชิ้นเส้นใยบวบหอมและสายใยตรึงใน PUF ให้ผลผลิตกรดต่ำกว่าการผลิตครั้งแรก อาจเป็นเพราะสายใยราดำรงชีวิตอยู่ในสภาพที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนนานเกินไปจนสูญเสียความสามารถไป ซึ่งเชื้อราอาจต้องการไนโตรเจนในการดำรงชีพเมื่อเวลานานขึ้นความสมบูรณ์ของระบบเอนไซม์ในสายใยราจึงลดลงจนกระทั่งไม่สามารถผลิตกรดได้ จึงอาจจะแก้ไขได้โดยเติมไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต ซึ่งอาจทำให้ผลผลิตกรดในการผลิตซ้ำดีขึ้นและอาจจะใช้ผลิตกรดได้มากซ้ำขึ้นด้วย การทดลองของ Kautola และคณะ (1985) ได้ทำการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยใช้สายใยตรึงในวุ้นและแคลเซียมอัลจิเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถใช้สายใยที่ตรึงในวุ้นในการผลิตกรดอิทาโคนิกได้ทั้งหมด 11 ซ้ำ แต่ผลผลิตกรดไม่คงที่ โดยผลผลิตกรดซ้ำแรกเท่ากับ 7.72 กรัมต่อลิตรต่อจากนั้นผลผลิตกรดจะลดลงในซ้ำต่อมาและให้ผลผลิตกรดสูงขึ้นในซ้ำที่ 8 จนให้ผลผลิตกรดสูงสุด ในซ้ำสุดท้ายเท่ากับ 13.80 กรัมต่อลิตร ส่วนสายใยตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตสามารถใช้ผลิตกรดได้ 17 ซ้ำ โดยให้ผลผลิตกรดเท่ากับ 7 กรัมต่อลิตรในซ้ำที่ 1 และผลผลิตกรดจะคงที่ถึงซ้ำสุดท้าย ทั้งนี้อาจสันนิษฐานได้ว่า สายพันธุ์ของจุลินทรีย์อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงในการตรึงซึ่งบางสายพันธุ์อาจไม่เหมาะสมที่จะ

นำมาใช้ผลิตในรูปของเซลล์หรือสายใยตรึงดังเช่นการทดลองนี้ที่ให้ผลผลิตต่ำกว่าสายใยอิสระที่ได้รายงานโดย อุษา กรีอักษร (2539)

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบอัตราการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงในการทดลองต่าง ๆ

วัสดุตรึง	ปริมาณกรดอิทาโคนิก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิตกรด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	เวลาในการผลิตกรด (วัน)	เอกสารอ้างอิง
พอลิอะคริลามายด์เจล	-	1.5 มิลลิกรัมต่อชั่วโมงต่อกรัมเจล	15	Horitsu และคณะ, 1983
ชิ้นพอลิยูรีเทนโฟม	26	0.14	18	Kautola, Vassilev และ Linko, 1990
ชิ้นพอลิยูรีเทนโฟม	51	0.15	14	Kautola และคณะ, 1991
แคลเซียมอัลจิเนต	7	0.06	17	Kautola และคณะ, 1985
ซีไลท์ อาร์ - 626	11.5	1.2	24	Kautola และคณะ, 1985
แผ่นเหล็กปลอดสนิมที่มีรูพรุน	18.2	0.73	30	Ju and Wang, 1986
ชิ้นเส้นใยบวบหอม	8.20	0.038	9	การทดลองนี้
ชิ้น PUF	9.88	0.069	6	การทดลองนี้

เมื่อทดลองทำการผลิตซ้ำโดยสายใยตรึงของ *A. terreus* I10 ใน PUF ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างโดยเติมแหล่งไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกในการผลิตซ้ำ พบว่า ผลผลิตกรดที่ได้ดีกว่าเมื่อไม่ได้เติมแหล่งไนโตรเจนซึ่งได้ทดลองผ่านมาแล้ว (ผลผลิตกรดเท่ากับ 1.98 กรัมต่อลิตร) คือ ให้ผลผลิตกรดสูงสุด 5.4 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังให้ผลผลิตที่เร็วกว่าการผลิตครั้งแรกในช่วงแรกของการผลิต และมีการใช้น้ำตาลมากกว่าด้วย ส่วนการเติบโตพบว่าเมื่อเติมแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้สายใยตรึงมีการเติบโตเพิ่มขึ้นระหว่างการผลิต ดังนั้นน้ำตาลก็จะถูกนำไปใช้เพื่อทั้งการผลิตกรดและการเติบโต นอกจากนั้นการที่มีการเติบโตของสายใยตรึงยังทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำกว่าเมื่อไม่มีการเติบโต จากผลการทดลองจะเห็นว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนในการ

ผลิตกรดซ้ำสามารถปรับปรุงผลผลิตกรดให้ดีขึ้นได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเป็นการกระตุ้นระบบเอนไซม์ของสายใยรายังคงความสมบูรณ์และรักษาความสามารถในการผลิตกรดอิทาโคนิกได้ แต่ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่ใส่ในการทดลองนี้อาจยังไม่เหมาะสมที่จะทำให้ได้ผลผลิตดังเช่นการผลิตครั้งแรกดังนั้นควรจะต้องทำการทดลองหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อไป จากรายงานของ Kautola (1990b) กล่าวว่า ในการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยใช้สายใยตรึงซ้ำ ปริมาณแอมโมเนียมไนเตรตที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดของซ้ำต่อไปจะลดลงจากปริมาณที่เติมในการผลิตครั้งแรก เนื่องจากในการผลิตครั้งแรกเชื้อรายังมีการเติบโต แต่ในซ้ำต่อ ๆ ไปเชื้อราจะต้องการไนโตรเจนเพื่อการดำรงชีพเพียงอย่างเดียว

จากการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่างานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการค้นพบวัสดุตรึงชนิดใหม่ที่ยังไม่มีรายงานว่าเคยใช้ตรึงจุลินทรีย์ชนิดใด วัสดุตรึงนี้ คือ ชิ้นเส้นใยบวบหอม ซึ่งเป็นวัสดุตรึงที่เป็นผลผลิตทางการเกษตร มีราคาถูก หาได้ง่าย ขั้นตอนการตรึงไม่ยุ่งยาก มีความคงทนสามารถใช้ทดแทนวัสดุตรึงที่มีราคาแพงได้ ถึงแม้ว่าผลผลิตกรดที่ได้จากสายใยตรึงยังน้อยกว่าเมื่อผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยอิสระ แต่อาจแก้ไขได้โดยการปรับเปลี่ยนรูปแบบของชิ้นเส้นใยบวบหอมให้มีขนาดเล็กลงเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสให้มากขึ้น ส่วนการผลิตกรดโดยสายใยตรึงใน PUF อาจทำการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงโดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณเหมาะสม การที่ผลผลิตกรดต่ำอาจเป็นไปได้ว่าสำหรับราสายพันธุ์นี้ ชิ้นเส้นใยบวบหอมกับ PUF ยังเป็นวัสดุตรึงที่ไม่เหมาะสม จึงน่าจะมีการทดลองหาวัสดุตรึงที่เหมาะสมต่อไปหรืออาจทดลองผลิตกรดอิทาโคนิกโดยสายใยตรึงในปฏิกรณ์แบบอื่น ๆ เช่น การผลิตกรดอิทาโคนิกแบบต่อเนื่องในปฏิกรณ์แบบแพคเบด เป็นต้น จากการที่มีน้ำตาลเหลืออยู่มากหลังจากสิ้นสุดการผลิต จึงควรปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อรา *A. terreus* I10 ให้สามารถในการใช้น้ำตาลได้มากขึ้นและให้ผลผลิตกรดที่สูงขึ้น เพื่อที่จะใช้น้ำตาลตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูง ๆ ได้ อันจะทำให้ได้ผลผลิตกรดสูงขึ้นด้วย