บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

<u>สรุปผลการวิจัย</u>

1. การวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่สร้างขึ้นโดย *A. terreus* I 10 ด้วยวิธี HPLC HPLC ยืนยันว่าเป็นกรดอิตาโคนิก เนื่องจากมีช่วงเวลาอยู่ในคอลัมน์เช่นเดียวกับกรดอิตาโคนิกมาตรฐาน

2. น้ำตาลซูโครสปริมาณ 66 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก

3. อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 300 ต่อ 4 ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 25.99 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลซูโครสตั้งต้น 66 กรัมต่อลิตร เมื่อผลิตในระดับขวดเขย่า

4. ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตกรดอิตาโคนิกคือ 4.5 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 27.39 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลซูโครสตั้งต้น 66 กรัมต่อลิตร เมื่อผลิตในระดับขวดเขย่า

5. อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมสปอร์ของ *A. terreus* I 10 คือ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรส

6. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมหัวเชื้อสปอร์งอกที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอิตาโคนิกสูงคือ เพาะเลี้ยงสปอร์ของ *A. terreus* I 10 ความหนาแน่น 5-10x10^{6} สปอร์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเติมเม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิลิตร หนัก 15 กรัม โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง (ได้สปอร์งอกความหนาแน่น 1-2x10^{8} สปอร์งอกต่อมิลลิลิตร)

7. สามารถใช้น้ำตาลทรายขาว เป็นแหล่งของน้ำตาลซูโครสแทนน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ในการผลิตกรดอิตาโคนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยปริมาณกรดอิตาโคนิกไม่ลดลง

8. คอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง เป็นเครื่องปฏิกรณ์ที่น่าจะเหมาะสมในการผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับขยายส่วน มากกว่าถังหมักขนาด 5 ลิตร ภายใต้ภาวะที่ใช้ในการทดลอง

9. ขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้ว ที่มีการให้อากาศด้านล่าง และในถังหมักที่มีการให้อากาศและการกวน ขนาด 5 ลิตร คือ 2 เปอร์เซ็นต์ และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเท่ากับ 19.06 และ 15.88 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากน้ำตาลทรายขาวตั้งต้น 66 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง

10. สำหรับการผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมคือ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเท่ากับ 21.31 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลทรายขาวตั้งต้น 66 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการทดลองผลิตกรดอิตาโคนิก โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก โดยใช้ปริมาณของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 66 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโครส น้ำตาลทรายแดง และน้ำตาลทรายขาวให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงใกล้เคียงกัน รองลงมาคือ น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลแลกโตส ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า *A. terreus* I 10 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้ทั้ง น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลแลกโตสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีจำนวนคาร์บอน 6 อะตอม และน้ำตาลไซโลสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีจำนวนคาร์บอน 5 อะตอม โดยให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกแตกต่างกัน ดังแสดงในรูปที่ 5 สำหรับการใช้น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลแลกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้การเติบโตสูงแต่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่ำ

ไม่มีการผลิตกรดอิตาโคนิกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลมอลโตส และกรดซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอน จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแหล่งคาร์บอนทั้งสองให้น้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 7.60 และ 8.70 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดที่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงชนิดอื่น แต่น้ำตาลมอลโตสและกรดซิตริกนั้นไม่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกเลย ซึ่งตรงกับรายงานของ Calam และคณะ (1939) และรายงานของ Larsen และ Eimhjellen (1955) ที่รายงานว่าน้ำตาลมอลโตสและกรดซิตริกให้การเติบโตของสายใยดี แต่ไม่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิก ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แหล่งคาร์บอนมีผลกระทบต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก มากกว่ามีผลกระทบต่อการเติบโตของ *A. terreus* สำหรับการใช้กรดซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอน Larsen และ Eimjellen (1955) อธิบายว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ต่ำพอสำหรับระบบเอนไซม์ที่นำกรดซิตริกไปใช้ในการผลิตกรดอิตาโคนิกได้ แต่ยังไม่มีหลักฐานยืนยันแน่ชัดถึงข้อสันนิษฐานนี้

งานวิจัยนี้ไม่ทำการทดลองแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ก่อนการตัดสินใจเลือกใช้น้ำตาลซูโครสในการผลิตต่อไป เพราะนอกจากน้ำตาลซูโครสจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุด ดังผลการทดลองแล้ว น้ำตาลซูโครสยังเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก และมีแหล่งผลิตคืออ้อยซึ่งเป็นผลผลิตจากภาคเกษตรกรรมในประเทศ จึงเหมาะสมที่จะเลือกใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อ ๆ ไป

แหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญในการเติบโตของรา จากการทดลองเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูง ดังแสดงในรูปที่ 6 และเมื่อพิจารณาการเติบโตของสายใยจะเห็นได้ว่า แอมโมเนียมซัลเฟตให้การเติบโตของสายใยไม่มากนัก และแอมโมเนียมไนเตรตให้การเติบโตของสายใยมากกว่าเล็กน้อย ส่วนโซเดียมไนเตรตให้การเติบโตของสายใยสูงมากแต่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่ำ ดังแสดงในรูปที่ 6 จะเห็นได้ว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดที่ให้การเติบโตของสายใยมากเกินไป แต่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่ำ จึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Elnaghy และ Megalla (1975) ที่พบว่าโซเดียมไนเตรตจะยับยั้งการผลิตกรดอิตาโคนิก แต่ให้การเติบโตของสายใยสูง และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Moyer และ Coghill

(1945) และ Nowakowska-Waszczuk และคณะ (1969) ซึ่งพบว่าไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมจะเหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก แต่ไนโตรเจนในรูปไนเตรตจะเหมาะสมต่อการเติบโตของสายใยเท่านั้นโดย Nowakowska-Waszczuk และคณะ (1969) อธิบายว่าที่เป็นเช่นนี้เพราะไนเตรตจะส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมรีดักเตส ซึ่งมีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของน้ำตาลกลูโคส ทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่จะนำไปใช้ในการผลิตกรดอิตาโคนิกลดลง เป็นผลให้มีการผลิตกรดอิตาโคนิกน้อยลง หรืออาจจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์กรดอิตาโคนิก

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากการเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน จะเห็นได้ว่า การใช้โซเดียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจนจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มจาก 4.10 เป็น 5.02 ในวันแรกของการเพาะเลี้ยง และค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง และได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกน้อยมาก ซึ่งต่างกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง และลดลงเหลือเพียง 1.68 และ 1.91 ตามลำดับ ในวันสิ้นสุดการทดลอง เนื่องจากกรดอิตาโคนิกที่ผลิตขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Tandon และ Mehrotra (1970) ซึ่งพบว่าการใช้โซเดียมไนเตรตจะให้การเติบโตของสายใยสูง แต่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่ำ และได้ให้เหตุผลว่าอาจเป็นเพราะค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นที่ไม่ลดลง หรืออาจเกิดจากผลของอัลคาไลน์เมตอลอิออน ซึ่งก็คือโซเดียมอิออน และนอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การสะสมกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* จะเกิดขึ้นที่สภาวะกรดเท่านั้น และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก คือประมาณ 2.0 (Lockwood and Reeves, 1945; Moyer and Coghill, 1945; Lockwood and Nelson, 1946) ดังนั้นแอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต ซึ่งให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ และใกล้เคียง 2.0 ตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยง จึงเหมาะในการนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดอิตาโคนิก แต่สำหรับโซเดียมไนเตรตซึ่งให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อสูง และไม่ลดลงมาใกล้เคียง 2.0 ตลอดการเพาะเลี้ยง จึงไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรด

อิตาโคนิก

เมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และปริมาณแอมโมเนียมไนเตรตต่าง ๆ กัน พบว่าเมื่อให้แอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณน้อยจะได้น้ำหนักแห้งของสายใยต่ำ และเมื่อเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตก็จะได้น้ำหนักแห้งของสายใยมากขึ้น และได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงขึ้นด้วย แต่เมื่อเพิ่มปริมาณจนถึง 2.62 กรัมต่อลิตร น้ำหนักแห้งของสายใยเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณกรดอิตาโคนิกจะลดลง แสดงว่าต้องให้แอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณที่เหมาะสม จึงได้การเติบโตของสายใยไม่มากเกินไป และได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุด สำหรับแอมโมเนียม-ไนเตรตเมื่อให้ในปริมาณมากจะได้น้ำหนักแห้งของสายใยมาก และได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูง แต่การเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมไนเตรต จะทำให้น้ำหนักแห้งของสายใยเพิ่มขึ้นได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น โดยเมื่อเพิ่มปริมาณของแอมโมเนียมไนเตรตจนเท่ากับ 1.5874 กรัมต่อลิตร จะได้น้ำหนักแห้งของสายใยใกล้เคียงกับการใช้แอมโมเนียมไนเตรต 0.7938 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 9-12 จากการทดลองจะเห็นได้ว่า แอมโมเนียมไนเตรตให้การเติบโตของสายใยมากกว่าแอมโมเนียมซัลเฟตในทุกปริมาณที่ให้ปริมาณไนโตรเจนเท่ากัน แต่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกน้อยกว่าในทุกปริมาณ ดังแสดงในรูปที่ 13 ดังนั้นแอมโมเนียมซัลเฟตจึงเป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก ซึ่งต้องใช้ในปริมาณเหมาะสมที่ไม่ให้การเติบโตของสายใยมากเกินไปจึงจะผลิตกรดอิตาโคนิกได้สูง

จากผลการทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสม ระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการลดลงของปริมาณน้ำตาลสัมพันธ์กับการผลิต และการเติบโตของสายใย เมื่อแปรผันปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตให้ได้อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนต่าง ๆ กัน เท่ากับ 300 ต่อ 1 300 ต่อ 2 300 ต่อ 3 และ 300 ต่อ 4 ปริมาณการใช้น้ำตาล ปริมาณกรดอิตาโคนิก และการเติบโตของสายใยจะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนจนได้อัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 300 ต่อ 5 และ 300 ต่อ 6 ปริมาณกรดอิตาโคนิกจะลดลง แต่ปริมาณการใช้น้ำตาลและน้ำหนักแห้งของสายใยจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 14-15 จะเห็นได้ว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมคือ 300 ต่อ 4 ซึ่งให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเมื่อเทียบกับอัตราส่วนอื่น ๆ เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร

เลี้ยงเชื้อ จะเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของอัตราส่วน 300 ต่อ 3 300 ต่อ 4 300 ต่อ 5 และ 300 ต่อ 6 จะลดลงมากกว่าอัตราส่วน 300 ต่อ 1 และ 300 ต่อ 2 ทั้งนี้เพราะมีการผลิตกรดอิตาโคนิกมากกว่า ดังแสดงในรูปที่ 16 จึงทำให้เข้าสู่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม จึงผลิตกรดอิตาโคนิกได้มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lockwood และ Reeves (1945) Moyer และ Coghill (1945) และ Lockwood และ Nelson (1946) ที่พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* จะมีค่าประมาณ 2.0 และเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 17 พบว่า เมื่อใช้อัตราส่วน 300 ต่อ 1 และ 300 ต่อ 2 *A. terreus* I 10 จะใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอย่างรวดเร็ว และหมดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับอัตราส่วน 300 ต่อ 3 แอมโมเนียมซัลเฟตหมดในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ทำให้ทั้ง 3 อัตราส่วน มีไนโตรเจนไม่เพียงพอต่อการเติบโตของสายใย เป็นผลให้ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่ำ แต่เมื่อใช้อัตราส่วน 300 ต่อ 4 มีแอมโมเนียมซัลเฟตเพียงพอสำหรับการเติบโตจนได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุด ส่วนอัตราส่วน 300 ต่อ 5 และอัตราส่วน 300 ต่อ 6 มีแอมโมเนียมซัลเฟตเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อในวันสิ้นสุดการทดลอง แสดงว่ามีไนโตรเจนมากเกินไป ทำให้ *A.terreus* I 10 มีแนวโน้มในการเติบโตมากกว่าการผลิตกรดอิตาโคนิก ปริมาณกรดอิตาโคนิกที่ได้จึงลดลง ซึ่งจะเห็นได้ว่าอัตราส่วน 300 ต่อ 4 เหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีความสมดุลระหว่างการเติบโตและการผลิตกรดอิตาโคนิก จึงทำให้ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุด

จากผลการทดลองหาปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งคาร์บอนเมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกโดยใช้อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณคาร์บอนต่อปริมาณไนโตรเจน พบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสตั้งต้นปริมาณต่าง ๆ กัน จะมีการใช้น้ำตาลทั้งหมดในวันที่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดในปริมาณที่ไล่เลี่ยกัน ดังแสดงในรูปที่ 21 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกในวันที่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดพบว่า การใช้น้ำตาลซูโครสตั้งต้น 76 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกมากกว่าการใช้น้ำตาลซูโครสตั้งต้น 66 กรัมต่อลิตร เพียงเล็กน้อย ทั้งที่ควรให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกมากขึ้นเป็นสัดส่วนกับปริมาณน้ำตาลที่มากขึ้น อาจเนื่องมาจากความสามารถในการนำน้ำตาลซูโครสเข้าไปใช้ของ *A. terreus* I 10 ภายใต้สภาวะที่ทำการ

ทดลองสูงสุดเพียงเท่านี้ ดังนั้นไม่ว่าจะเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสไปอีกเท่าไร ก็จะไม่สามารถเพิ่มปริมาณกรดอิตาโคนิกขึ้นได้มากนัก น้ำตาลซูโครสที่เกินความสามารถในการนำไปใช้จึงเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนั้นการใช้น้ำตาลความเข้มข้นเหมาะสมยังเป็นการประหยัด และปริมาณน้ำตาลที่เหลือในน้ำหมักจะน้อยกว่าเมื่อใช้น้ำตาลมากเกินไป ซึ่งจะลดการรบกวนในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลผลิต (lockwood and Nelson, 1946) และเมื่อพิจารณาถึงความคุ้มค่าแล้ว ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก คือ 66 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองหาค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นที่เหมาะสม ของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก พบว่าการเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นต่างกันในช่วง 2.5-5.0 มีรูปแบบเดียวกันและมีค่าใกล้เคียงกัน ดังแสดงในรูปที่ 22 ทั้งนี้อาจเนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *A. terreus* 110 มีช่วงกว้าง ซึ่งเป็นข้อดีของจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ ทำให้ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงไม่ต้องมีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเคร่งครัดนัก และสอดคล้องกับรายงานของ Lockwood และ Reeves (1945) ซึ่งศึกษาผลกระทบของค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก และการเจริญของ *A. terreus* NRRL 1960 โดยทำการทดลองแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 1.6 ถึง 3.5 พบว่าการเติบโตของสายใยจะเพิ่มขึ้นเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเพิ่มขึ้นจนถึง 2.7 และที่ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นสูงกว่านี้ การเติบโตของสายใยจะไล่เลี่ยกัน เมื่อพิจารณาถึงค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจนเหลือประมาณ 2.16 ตั้งแต่วันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง ยกเว้นค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 5.0 ซึ่งพบว่าในวันที่ 1 วัดค่าความเป็นกรด-ด่างได้เท่ากับ 2.24 จะเห็นได้ว่าทุกค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้น จะเริ่มมีการผลิตกรดอิตาโคนิก หลังวันที่ 1 ของการเพาะเลี้ยง ดังแสดงในรูปที่ 22 จากนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงอีกเล็กน้อย แล้วคงที่ในช่วง 1.92-2.00 จนสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4 ที่ช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างนี้มีการผลิตกรดอิตาโคนิกสูง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่าการสะสมกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* จะเกิดขึ้นที่สภาวะกรดเท่านั้น และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกคือประมาณ

2.0 (Lockwood and Reeves, 1945; Moyer and Coghill,1945; Lockwood and Nelson, 1946) นอกจากนี้มีรายงานที่สนับสนุนรายงานดังกล่าวโดยพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกของ *A. terreus* เพราะค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่ำมีความจำเป็นต่อการสร้างระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดอิตาโคนิก (Larsen and Kimjellen, 1955)

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังแสดงในรูปที่ 23 และ 24 พบว่า การทดลองที่ใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเท่ากัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน แสดงให้เห็นว่าไม่มีน้ำตาลซูโครสเหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์น้ำตาล ด้วยวิธี HPLC ซึ่งพบว่าน้ำตาลซูโครสเหลือน้อยมาก หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 วัน และตรวจไม่พบน้ำตาลซูโครสในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง แสดงว่าน้ำตาลซูโครสถูกใช้หมดในระหว่างวันที่ 1 ถึงวันที่ 2 เช่นกัน รองลงมาคือค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 4.5 (รูปที่ 23 และ 24) ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 2.5 ถึง 4.0 น้ำตาลซูโครสจะถูกทำให้แตกตัวจนหมด ช้ากว่า เมื่อเทียบกับผลการวิเคราะห์น้ำตาลด้วย วิธี HPLC พบว่า ทั้ง 5 ค่าความเป็นกรด-ด่างนี้ ตรวจไม่พบน้ำตาลซูโครสในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง จะเห็นได้ว่าวันที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าใกล้กัน (รูปที่ 23 และ 24) มีความแตกต่างกับวันที่น้ำตาลซูโครสหมดเล็กน้อย (จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC) ซึ่งอาจเป็นความคลาดเคลื่อนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมี

จะเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก และการแตกตัวของโมเลกุลน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส นั่นคือมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เตสนั่นเอง ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการแตกตัวของโมเลกุลน้ำตาลซูโครสคือ 5.0 และค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นเท่ากับ 4.5 มีความเหมาะสมรองลงมา เมื่อน้ำตาลซูโครสแตกตัวไปเป็นน้ำตาลกลูโคสกับน้ำตาลฟรุกโตสแล้ว น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสจะถูกนำไปใช้ในการผลิตกรดอิตาโคนิก ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ลดลงจนเหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก การผลิตจะดำเนินไปอย่างรวดเร็ว ดังจะเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เท่ากับ 4.5 เหมาะต่อการแตกตัวของน้ำตาลซูโครส และเหมาะที่จะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบ เข้าสู่ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม จึงทำให้ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงกว่าค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งต้นค่าอื่น นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Rosenberg และคณะ (1992) ที่ได้ศึกษาการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เตส ที่เป็นเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการแตกตัวของโมเลกุลน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส ในเชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เตส อยู่ในช่วง 4.5-5.0

อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเติบโต และการผลิตกรดอิตาโคนิกของ *A. terreus* I 10 จากผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุด รองลงมาคือ การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (31-33 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกและน้ำหนักแห้งของสายใยต่ำ จึงเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะต่อการเติบโตและการผลิตกรดอิตาโคนิก ดังแสดงในรูปที่ 25 เมื่อพิจารณาการเติบโตพบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ให้การเติบโตสูงกว่าอุณหภูมิอื่นตลอดการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่อุณหภูมินี้ให้การเติบโตสูงสุด แต่การผลิตกรดไม่สูงสุด จึงเป็นอุณหภูมิที่เหมาะแก่การเติบโตมากกว่าการผลิตกรดอิตาโคนิก แต่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง ให้การเติบโตไล่เลี่ยกันแต่น้อยกว่าที่ 35 องศาเซลเซียส และให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกไล่เลี่ยกันและสูงสุดเมื่อเทียบกับอุณหภูมิอื่น ๆ จึงเป็นอุณหภูมิที่ให้การเติบโตที่สมดุลกับการผลิตกรดอิตาโคนิก ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Elnaghy และ Negalla (1975) ที่ทำการทดลองผลิตกรดอิตาโคนิกโดย *A. terreus* NRRL 1960 ที่อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกคือ 30 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Moyer และ Coghill (1945) ที่ได้ทดลองผลิตกรดอิตาโคนิกโดยแปรผันอุณหภูมิเป็น 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่าในช่วง 6 วันแรกของการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะให้การเติบโตของสายใยและปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงกว่า หลังจากวันที่ 9 การผลิตกรดอิตาโคนิกและการเติบโตใกล้เคียงกันทั้งสองอุณหภูมิ และหลังวันที่ 11 อุณหภูมิ

30 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกมากกว่า จากผลการทดลองข้างต้น มีข้อเสนอแนะว่าควรจัดอุณหภูมิให้เท่ากับ 35 เซลเซียส ในระยะแรกของการผลิตซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของสายใย หลังจากนั้นปรับอุณหภูมิลดลงเป็น 30 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดอิตาโคนิก อาจจะสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตกรดอิตาโคนิกได้

จากผลการทดลองหาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ทำให้ *A. terreus* I 10 สร้างสปอร์จำนวนมาก พบว่าอาหารเลี้ยงแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรสให้จำนวนสปอร์มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิกอย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในรูปที่ 27 และ 28 แสดงว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรสเหมาะสำหรับการสร้างสปอร์มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงสูตรเหมาะสมเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก ซึ่งเหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกและการสร้างสายใยเท่านั้น

จากการทดลองเพาะเลี้ยง *A. terreus* I 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกที่ไม่ใส่เม็ดแก้ว และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่เม็ดแก้ว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 และ 4 มิลลิเมตร โดยใช้เม็ดแก้ว หนัก 15 กรัมเท่ากัน พบว่าการใส่เม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร จะทำให้สปอร์ที่งอกแล้วกระจายตัวได้ดีกว่าการใช้เม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 5 เนื่องจากเม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร หนัก 15 กรัม มีจำนวนเม็ดมากกว่าเม็ดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ถึง 7.5 เท่า ทำให้จำนวนครั้งของการชนระหว่างเม็ดแก้วกับสปอร์และสปอร์งอกเกิดขึ้นมากกว่า เป็นเหตุให้สปอร์กระจายตัวดีกว่า

ความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดอิตาโคนิกมีผลต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกเช่นกัน ถ้าใช้ความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกน้อย ย่อมมีปริมาณสายใยที่ผลิตกรดน้อย ปริมาณกรดอิตาโคนิกที่ได้ก็จะน้อย แต่ถ้าความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอก มากเกินไปจะมีแนวโน้มที่จะมีการเติบโตมากกว่าการผลิต นอกจากนี้ปริมาณสารอาหารและ ออกซิเจนจะสัมผัสสายใยได้ยากกว่าการใช้ความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกที่เหมาะสม ทำให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกที่ได้ลดลง จากการทดลองพบว่าความหนาแน่นที่เหมาะสมของหัวเชื้อสปอร์งอกต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คือ $1-2 \times 10^{8}$

สปอร์งอก ถ้าความหนาแน่นของหัวเชื้อสปอร์งอกมากหรือน้อยกว่านี้ ปริมาณกรดอิตาโคนิกที่ได้จะน้อยลง ดังแสดงในรูปที่ 29

จากการทดลองผลิตกรดอิตาโคนิก โดยแปรผันอายุของหัวเชื้อสปอร์งอกต่าง ๆ กัน โดยอาศัยลักษณะการเติบโตของ *A. terreus* I 10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอก จะเห็นได้ว่าการใช้หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 24 36 48 และ 60 ชั่วโมง ในการผลิตกรดอิตาโคนิกจะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดในวันเดียวกันคือวันที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง แต่หัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 36 ชั่วโมงจะให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงกว่าหัวเชื้ออายุอื่น ดังแสดงในรูปที่ 32 ดังนั้นหัวเชื้อสปอร์งอกอายุ 36 ชั่วโมงจึงเป็นหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก ทั้งนี้เนื่องจาก *A. terreus* I 10 ที่เติบโตอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่อการผลิตหัวเชื้อสปอร์งอกเป็นเวลา 36 ชั่วโมง มีการเติบโตอยู่ในระยะที่มีการเติบโตมากและรวดเร็ว ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีกิจกรรมและประสิทธิภาพสูง (รูปที่ 31) นอกจากนั้นหัวเชื้อระยะนี้ยังเป็นระยะที่นิยมนำมาใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในระดับอุตสาหกรรม (Tortora et al., 1986)

จากผลการทดลองขยายส่วนการผลิตกรดอิตาโคนิก จากการผลิตในระดับขวดเขย่าเป็นถังหมักขนาด 5 ลิตร ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเนื่อการผลิตกรดอิตาโคนิก (ภาคผนวก ก 4) โดยใช้แหล่งน้ำตาลซูโครส 3 แหล่งคือ น้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ น้ำตาลทรายขาว และ น้ำตาลทรายแดง พบว่าสามารถใช้น้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ได้ โดยปริมาณกรดอิตาโคนิกไม่ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 34 แต่สำหรับการใช้น้ำตาลทรายแดง พบว่าได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่ำกว่าการใช้น้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์เล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในน้ำตาลทรายแดงอาจมีสารปนเปื้อน ที่มีผลทำให้การผลิตกรดอิตาโคนิกลดลง จะเห็นได้ว่าน้ำตาลทรายขาวเป็นแหล่งคาร์บอนที่น่าสนใจมากเพราะ นอกจากให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงแล้วยังเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกที่เป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปจากอ้อย ซึ่งเป็นวัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถผลิตได้เองในประเทศ และน้ำตาลทรายขาวยังเป็นวัตถุดิบที่ไม่ก่อให้เกิดสีน้ำตาลเข้มในอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนการใช้น้ำตาลทรายแดงเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งอาจเป็นปัญหาในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลผลิตอีกด้วย

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอิตาโคนิกที่ผลิตได้ในระดับขวดเขย่า และถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที และอัตราการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาที เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์เช่นเดียวกัน จะเห็นได้ว่าการผลิตในระดับขวดเขย่าได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงกว่า โดยให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 31.93 กรัมต่อลิตร (จากการทดลองผลิตกรดอิตาโคนิกโดยใช้หัวเชื้ออายุ 36 ชั่วโมง ซึ่งได้จากการทดลองแปรผันอายุของหัวเชื้อต่าง ๆ กัน ดังแสดงในรูปที่ 32) ในขณะที่การผลิตกรดอิตาโคนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเพียง 15.58 กรัมต่อลิตร (จากการทดลองผลิตกรดอิตาโคนิกโดยแปรผันชนิดของแหล่งน้ำตาลซูโครสต่าง ๆ กัน ดังแสดงในรูปที่ 34) สำหรับการใช้น้ำตาล พบว่าการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่ามีการใช้น้ำตาลได้ดีกว่า โดยมีน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียง 0.99 กรัมต่อลิตร ในวันที่ให้ผลผลิตกรดอิตาโคนิกสูงสุด (รูปที่ 33) ส่วนการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่ามีน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่เท่ากับ 14.67 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 35 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Park และคณะ (1994) ที่พบว่าเมื่อขยายส่วนการผลิตจากระดับขวดเขย่าไปสู่การผลิตในระดับถังหมักที่มีการให้อากาศ และการกวน โดยใช้เซลล์อิสระของ *A. terreus* IFO-6365 จะได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกลดลง เนื่องจากการผลิตด้วยเซลล์อิสระในถังหมักปริมาณออกซิเจนจะค่อย ๆ ลดลง เนื่องจากความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องเพิ่มอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศเพื่อให้ออกซิเจนเพียงพอ แต่การกวนด้วยใบกวนจะเป็นผลให้เซลล์เกิดความเสียหายทำให้ความสามารถในการผลิตกรดอิตาโคนิกลดลง นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Nelson และคณะ (1952) และ Pfeifer และคณะ (1952) ที่พบว่าอัตราการกวนที่เหมาะสมในการผลิตกรดอิตาโคนิกเท่ากับ 115 รอบต่อนาที และ 125 รอบต่อนาที ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าอัตราการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาที ซึ่งใช้ในการทดลองนี้อาจเป็นอัตราการกวนที่มากเกินไปและอาจทำให้สายใยของ *A. terreus* I 10 เกิดความเสียได้ จึงได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่ำดังผลการทดลองในข้อ 4.1 และ 4.2.2

ขนาดของหัวเชื้อมีผลต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก จากรายงานของ Lockwood และ Nelson (1946) พบว่าขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิกในระดับขวดเขย่าคือ 2 เพลเล็ท (pellet) ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่อมา Nelson และคณะ (1952) ทดลองใช้ขนาดของหัวเชื้อในสัดส่วนเดียวกับการทดลองของ Lockwood และ Nelson (1946) มาผลิตกรดอิตาโคนิกในถังหมักขนาด 20 ลิตร พบว่าได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่ำมาก และพบว่าขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดอิตาโคนิกเท่ากับ 0.8 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) แสดงให้เป็นว่าขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมในเครื่องปฏิกรณ์ต่างชนิดกัน มีความแตกต่างกัน การทดลองนี้จึงทดลองหาขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมในเครื่องปฏิกรณ์ 2 ชนิด คือ ถังหมักขนาด 5 ลิตร และคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

เมื่อผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยแปรผันขนาดของหัวเชื้อต่าง ๆ กัน คือ 1 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ใช้น้ำตาลซูโครสตั้งต้นเท่ากับ 66 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที พบว่าเมื่อใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ มีการใช้น้ำตาลสูงสุด ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดคือ 19.06 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการผลิต และมีการเติบโตของสายใยมากกว่าการใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ แต่น้อยกว่าการใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 36 การใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ จะให้สายใยของ *A. terreus* I 10 น้อย ไม่พอเหมาะกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่ำกว่า และมีน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าการใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ มีการเติบโตของสายใยมากที่สุด และมีการใช้น้ำตาลไปเพื่อการเติบโต และดำรงชีพ แต่การผลิตกรดอิตาโคนิกน้อยจึงเหลือน้ำตาลอยู่มากกว่าการใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 37 จะเห็นได้ว่าขนาดของหัวเชื้อที่เหมาะสมจำเป็นจะต้องมีความสมดุลระหว่างการเติบโตของสายใย และการผลิตกรดอิตาโคนิก

สำหรับการผลิตกรดอิตาโคนิกในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยแปรผันขนาดของหัวเชื้อที่ใช้ในการผลิตต่าง ๆ กัน ใช้น้ำตาลซูโครสตั้งต้นเท่ากับ 66 กรัมต่อลิตร อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที อัตราการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ จะได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่ำกว่า และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่มากกว่าการใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่เท่ากับ 22.32 กรัมต่อลิตร ในวันสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดเท่ากับ 15.88 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการผลิต และมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่เท่ากับ 12.45 กรัมต่อลิตร ในวันสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 38 และ 39 ซึ่งน้อยกว่าการผลิตโดยใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ ในการผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ซึ่งเหลือน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 34.15 กรัมต่อลิตร ในวันสิ้นสุดการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 37 แต่ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกสูงสุดไล่เลี่ยกัน ในวันเดียวกัน (รูปที่ 36 และ 38) จะเห็นได้ว่าการผลิตโดยใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกไล่เลี่ยกับการใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ทั้ง ๆ ที่เมื่อใช้ขนาดหัวเชื้อเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ ในคอลัมน์แก้วให้การเติบโตน้อยกว่า คือมีน้ำหนักแห้งของสายใยเพียง 4.78 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การใช้ขนาดของหัวเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร มีการเติบโตมากกว่า คือให้น้ำหนักแห้งของสายใยเท่ากับ 9.8 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของสายใยจากหัวเชื้อขนาด 1 เปอร์เซ็นต์ ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง สูงกว่าประสิทธิภาพของสายใยจากหัวเชื้อขนาด 5 เปอร์เซ็นต์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Okabe และ คณะ (1993) ที่พบว่า เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักแบบแอร์ลิฟท์ (Air-lift reactor) ซึ่งเป็นถังหมักที่มีการให้อากาศจากด้านล่างแต่ไม่มีการกวน จะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอิตาโคนิก ดีกว่าเซลล์ในถังหมักที่มีการกวน ทั้งนี้เพราะความเหมาะสมทางด้านสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่มีลักษณะกึ่งเม็ดสาคู กึ่งสายใย ซึ่งแตกต่างจากเซลล์ในถังหมักซึ่งจะมีลักษณะเป็นสายใยเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Park และคณะ (1994) ได้รายงานว่าสายใยของ *A. terreus* ไม่ค่อยมี

ความทนทานต่อแรงกระแทก โดยพบว่าการปั่นเหวี่ยงด้วยแรง 3,500 เท่าของแรงดึงดูดโลก เป็นเวลา 15 นาที ก็สามารถทำให้ *A. terreus* ตายได้ และการกวนด้วยใบกวนอัตราเร็วสูง ก็สามารถทำให้สายใยถูกทำลายเนื่องจากแรงเฉือนได้

ดังนั้นจากการทดลองแปรผันขนาดของหัวเชื้อในการผลิตกรดอิตาโคนิก จึงแสดงให้เห็นว่าเครื่องปฏิกรณ์ที่ไม่มีการกวน น่าจะเหมาะสมต่อการผลิตกรดอิตาโคนิก มากกว่า เครื่องปฏิกรณ์ที่มีการกวน และนอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าการใช้ถังหมักแบบ แอร์ลิฟท์ (มีหลักการผสมและให้อากาศโดยพ่นอากาศเข้าทางด้านล่างเช่นเดียวกับคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง) ใช้พลังงานเพียง 1 ใน 3 ของการผลิตโดยใช้ถังหมักที่การให้อากาศและการกวน (Trager et al., 1989) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกที่จะทำการทดลองต่อไปในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง

จากผลการทดลองผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 2.5 5 และ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที แสดงให้เห็นว่า อัตราการให้อากาศเท่ากับ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที จะให้การเติบโตของสายใยใกล้เคียงกับการเติบโตของสายใยที่เพาะเลี้ยง โดยใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที แต่ปริมาณการใช้น้ำตาลน้อยกว่า และปริมาณกรดอิตาโคนิกที่ผลิตได้จะน้อยกว่า ดังแสดงในรูปที่ 40 และ 41 และจากผลการวิเคราะห์กรดอินทรีย์ที่มีอยู่ในน้ำหมักด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีการผลิตกรดอินทรีย์ชนิดอื่นร่วมกับกรดอิตาโคนิกดังแสดงในรูปที่ 46 ทำให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกลดลงเนื่องจาก *A. terreus* ใช้น้ำตาลไปในการผลิตกรดอินทรีย์ชนิดอื่นร่วมด้วย ส่วนการใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที จะมีการใช้น้ำตาล และได้ปริมาณกรดอิตาโคนิก มากกว่าการใช้อัตราการให้อากาศเป็น 5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีเล็กน้อย แต่มีการเติบโตน้อยกว่าการให้อากาศ 5 และ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที (รูปที่ 40 และ 41) ซึ่งจะเห็นได้ว่าเซลล์น้อยกว่า แต่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดอิตาโคนิกสูง และเนื่องจากไม่สามารถลดอัตราการให้อากาศลงต่ำกว่านี้ได้ นอกจากจะมีการปรับปรุงคอลัมน์แก้วที่ใช้ ดังนั้นอัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.5 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที จึงเป็นอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดอิตาโคนิกในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างที่ใช้ใน

การทดลอง

จากข้อมูลที่ได้ จะเห็นได้ว่าการขยายส่วนผลิตเป็นสิ่งที่เป็นไปได้ ถึงแม้ให้ปริมาณกรดอิตาโคนิกลดลงบ้าง ก็เป็นธรรมดาของการขยายส่วนผลิต จึงควรมีการศึกษาเพื่อปรับภาวะบางประการให้เหมาะสมยิ่งขึ้นเพื่อเพิ่มผลผลิต สำหรับในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีการกวนควรจะมีการทดลองโดยใช้อัตราการกวนลดลงและอาจจะเพิ่มอัตราการให้อากาศเพื่อให้มีออกซิเจนเพียงพอ แต่เซลล์ไม่เสียหายเนื่องจากแรงเฉือนของใบพัด ส่วนกรณีคอลัมน์แก้วที่ใช้ในการทดลองนี้ควรปรับปรุงคอลัมน์แก้วให้มีระยะเวลาที่ฟองอากาศอยู่ในน้ำหมักได้นานขึ้น โดยการปิดจุกยางและทำทางออกของอากาศใหม่ หรืออาจใช้ถังหมักแบบ แอร์ลิฟท์ ซึ่งมีช่องให้อากาศ (sparger) เล็กกว่า แทนคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง นอกจากนั้นยังอาจศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้สายใยตริงในการผลิตเพื่อให้ใช้สายใยซ้ำได้หลายครั้ง เพราะจากรายงานของ Park และคณะ (1994) พบว่าการใช้สายใยอิสระจะใช้ซ้ำได้เพียง 4 ครั้ง สายใยจะติดกับช่องให้อากาศ ทำให้การให้อากาศไม่ดี และปริมาณกรดอิตาโคนิกลดลงมาก ขณะเดียวกันก็เสนอแนะให้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ *A. terreus* I 10 ให้มีความสามารถทนต่อน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง ๆ ได้ ซึ่งจะทำให้ได้ปริมาณกรดอิตาโคนิกต่อการผลิต 1 ครั้งมากขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย