บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัย

1. ภาวะที่เหมาะสมในการตรึงสปอร์ *Aspergillus* sp.G153 คือ ความหนาแน่นสปอร์ 1.0-2.5 x 10^9 สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ขนาดเม็ดเจลสปอร์ตรึง 3.5 มิลลิเมตร

2. การตรึงสปอร์ *Aspergillus* sp.G153 ในโซเดียมอัลจิเนตของบริษัท ฟลูกา และบริษัทนาคาราอิ ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคใกล้เคียงกัน

3. เม็ดเจลสปอร์ตรึงขนาดเล็กให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงกว่าเม็ดเจลสปอร์ตรึงขนาดใหญ่

4. ภาวะที่เหมาะสมในการทำให้สปอร์ตรึงงอก คือเพาะเลี้ยงเม็ดเจลสปอร์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอก ซึ่งมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตน้อยกว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการทำให้สปอร์อิสระงอก คือใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเพียง 0.8 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน และกลูโคส 250 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เพาะเลี้ยงนาน 66 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

5. ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึง ในระดับขวดเขย่า คือ 0.2 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยอิสระ มีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตสูงถึง 4 กรัมต่อลิตร

6. ความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตรึงที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิคในระดับขวดเขย่า คือ 40 กรัมต่อลิตร

7. ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus* sp.G153 ในระดับขวดเขย่า คือใช้เม็ดเจลสายใยตรึง 40 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึง 1 ลิตรซึ่งมีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมเป็นแหล่งไนโตรเจน และน้ำตาลกลูโคส 250 กรัม เป็นแหล่งคาร์บอน ให้ปริมาณกรดสูงสุด 252.4 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการผลิต เมื่อเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี 200 รอบต่อนาที

ที่อุณหภูมิห้อง

8.เมื่อขยายส่วนการผลิตกรดกลูโคนิคโดยผลิตในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (bubble column)ปริมาตรใช้งาน 400 มิลลิลิตร พบว่า ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 250 200 และ 150 กรัมต่อลิตรเพื่อการผลิตกรดดังกล่าวได้ เนื่องจากเกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตจำนวนมากทำให้รบกวนการหมัก ความเข้มข้นสูงสุดของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เพื่อการผลิตกรดในคอลัมน์แก้ว คือ 100 กรัมต่อลิตร

9. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนด้วยสายใยตรึง *Aspergillus* sp. G153 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน อัตราการให้อากาศ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที ความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตรึง 300 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุด 54 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 98.83 เปอร์เซนต์เมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสตั้งต้น ในเวลา 18 ชั่วโมง

10.สามารถใช้แป้งไฮโดรไลเสตเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนโดยสายใยตรึงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างได้ โดยสามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้สูงสุด 54.5 กรัมต่อลิตร ในเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน

11.สามารถใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคได้โดยไม่ต้องเติม $FeSO_4.7H_2O$ KH_2PO_4 $MgSO_4.7H_2O$ และ $MnSO_4.4H_2O$ ซึ่งให้ปริมาณกรดกลูโคนิคใกล้เคียงกับการใช้น้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ 54.5 กรัมต่อลิตร ในเวลา 18 ชั่วโมง

12. เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วน ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโดยสายใยตรึงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่างซึ่งไม่มีการกวน กับการผลิตโดยสายใยอิสระในถังหมักขนาด 5 ลิตรซึ่งมีการกวน พบว่าในการผลิตเพียงครั้งเดียวโดยสายใยทั้ง 2 แบบให้ผลผลิตใกล้เคียงกัน แต่การผลิตโดยสายใยอิสระซึ่งมีการกวนให้ปริมาณกรดสูงสุดเร็วกว่า คือ 54.5 และ 54.0 กรัมต่อลิตร ในเวลา 18 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ

13. การผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำด้วยสายใยตรึงของ *Aspergillus* sp. G153 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ภายใต้ภาวะเหมาะสม โดยใช้แป้งไฮโดรไลเสตที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตรเป็น

แหล่งไนโตรเจน และใช้น้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า สามารถผลิตกรดโดยใช้สายใยตรึงซ้ำได้รวม 10 ครั้ง โดยผลผลิตกรดไม่ลดลง ได้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุดในช่วง 50.0-54.5 กรัมต่อลิตร ในเวลา 15-18 ชั่วโมง

14. เมื่อใช้น้ำประปาแทนน้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยไม่มีการเติมแร่ธาตุต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดดังกล่าวในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง พบว่า ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการใช้น้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ คือสามารถใช้สายใยตรึงผลิตกรดซ้ำได้รวม 10 ครั้งโดยผลผลิตไม่ลดลง ได้ปริมาณกรดสูงสุดในช่วง 50.0-54.5 กรัมต่อลิตร ในเวลา 15-18 ชั่วโมง

15. เมื่อทดลองใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึง ที่มีแป้งไฮโดรไลเสตที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตครั้งแรก หลังจากนั้นใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวแต่ไม่ใส่แอมโมเนียมซัลเฟตในการผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำอีก 5 ซ้ำ รวมผลิต 6 ครั้ง พบว่า ให้ผลิตกรดกลูโคนิคสูงไล่เลี่ยกันทุกซ้ำคือ 50.0-51.5 กรัมต่อลิตร ในเวลา 15-18 ชั่วโมง

16. เมื่อทดลองผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำรวม 6 ครั้ง โดยอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคสูตรประหยัดซึ่งประกอบด้วย แป้งไฮโดรไลเสตที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรและน้ำประปา โดยไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุอื่นๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเลย พบว่าทุกซ้ำให้ปริมาณกรดกลูโคนิคใกล้เคียงกัน คือให้ปริมาณกรดสูงสุดในช่วง 51-52 กรัมต่อลิตรในเวลา 18 ชั่วโมง

17. เมื่อตรวจการเติบโตของสายใยตรึง โดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่าสายใยเติบโตอยู่บริเวณผิว และลึกจากผิวเม็ดเจลในระดับหนึ่งเท่านั้น คือ 0.5-0.6 มิลลิเมตรจากผิวของเม็ดเจล มิได้เจริญทั่วทั้งเม็ดเจล

18. เมื่อเก็บเม็ดเจลสายใยตรึงไว้ที่ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเม็ดเจลสปอร์ตรึงยังคงมีประสิทธิภาพในการงอก และการผลิตกรดกลูโคนิคใกล้เคียงกับเม็ดเจลสปอร์ตรึงที่นำมาผลิตโดยไม่เก็บไว้ก่อนการผลิต

19. เม็ดเจลสายใยตรึงที่เก็บไว้ที่ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ยังคงประสิทธิภาพการผลิตกรดสูงใกล้เคียงกับการผลิตโดยเม็ดเจลสายใยตรึงที่มิได้เก็บไว้ก่อนการผลิต

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโซเดียมอัลจิเนตในการตรึงสปอร์พบว่า ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตมีผลต่อการงอกของสปอร์ตรึง คือเมื่อใช้ความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนต 1.5 2.0 และ 2.5 เปอร์เซนต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สปอร์ตรึงงอกภายใน 3 วัน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนตเป็น 3.0 เปอร์เซนต์ สปอร์ตรึงไม่งอกตลอด 7 วัน ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต มีผลต่อการผ่านเข้าออกของออกซิเจนและสารอาหารภายในเม็ดเจล เมื่อเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมอัลจิเนตทำให้การผ่านเข้าออกของออกซิเจนและสารอาหารน้อยลงทำให้สปอร์ไม่สามารถงอกได้หรืองอกได้ช้า แต่ถ้าความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตน้อยเกินไปขนาดรู (pore size) ของสารพาหะที่ใช้กักสปอร์มีขนาดใหญ่เกินไปสปอร์บางส่วนหลุดออกจากสารพาหะ ทำให้ผลผลิตกรดที่ได้ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4 และ 5 ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Cheetham และคณะ (1979) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ของขนาดรูของอัลจิเนตและความเข้มข้นอัลจิเนต พบว่าขนาดรูของอัลจิเนตจะลดลงเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น นอกจากนี้ Tramper และคณะ (1983) ทดลองตรึง *Gluconobacter oxydans* ในแคลเซียมอัลจิเนตความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนตการแพร่ผ่านของออกซิเจนจะลดลง แต่ความเสถียรของเม็ดเจลจะเพิ่มขึ้น ส่วน Kopp และ Rehm (1984) ทดลองตรึง *Claviceps purpurea* ในแคลเซียมอัลจิเนตเข้มข้น 2 4 และ 8 เปอร์เซนต์ พบว่าแคลเซียมอัลจิเนตเข้มข้น 4 เปอร์เซนต์สามารถผลิตอัลคาลอยด์ได้สูงสุด ถ้าใช้แคลเซียมอัลจิเนตความเข้มข้นสูงมีผลขัดขวางการแพร่ของออกซิเจนทำให้เชื้อเจริญไม่ดีเท่าที่ควร ผลผลิตลดลง

ความหนาแน่นของสปอร์ที่ตรึงและความจุของสารพาหะ เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงและการผลิตผลิตภัณฑ์จากเซลล์ตรึง จากผลการทดลองแปรผันความหนาแน่นของสปอร์ในการตรึงเป็น 1.7×10^8 1.7×10^9 และ 1.7×10^{10} สปอร์ พบว่า ความหนาแน่นสปอร์ 1.7×10^9 สปอร์ต่อโซเดียมอัลจิเนต 100 มิลลิลิตร ให้ปริมาณกรดกลูโคนิคสูงสุดดังแสดงในรูปที่ 6 เมื่อตรวจปริมาณสปอร์ที่เหลืออยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ พบว่า เมื่อใช้สปอร์หนาแน่น 1.7×10^{10} สปอร์ในการตรึง มีสปอร์เหลืออยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 8.3×10^9 สปอร์ ในขณะที่เมื่อใช้สปอร์หนาแน่น 1.7×10^8 และ 1.7×10^9 สปอร์ ไม่พบสปอร์เหลืออยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ นั่นคือ ความหนาแน่นสูงสุดของสปอร์ที่แคลเซียมอัลจิเนตสามารถกักไว้ได้คือ 8.7×10^9 สปอร์ เมื่อใช้สายใยตรึงที่ได้จากการตรึง

สปอร์ความหนาแน่น 1.7×10^{10} สปอร์ไปผลิตกรดกลูโคนิค พบว่า ให้ปริมาณกรดน้อยกว่าเมื่อใช้สปอร์ตรึงความหนาแน่น 1.7×10^{9} สปอร์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความหนาแน่นสปอร์มากเกินไป ปริมาณสารอาหารและออกซิเจนแพร่ผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้ยากทำให้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อที่ถูกตรึงอยู่ภายในเม็ดเจล เชื้อเจริญไม่ดีเท่าที่ควร เป็นผลให้ผลผลิตน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองตรึง *Gluconobacter oxydans* ในแคลเซียมอัลจิเนตของ Tramper และคณะ (1983) โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างเซลล์และอัลจิเนต (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างเซลล์และอัลจิเนตจะมีผลทำให้ผลผลิตลดลง เนื่องจากการผ่านเข้าออกของออกซิเจนถูกจำกัด Tsay และ To (1987) พบว่าเมื่อตรึงสปอร์ของ *Aspergillus niger* หนาแน่น 2.32×10^{8} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ใน 3 เปอร์เซนต์ แคลเซียมอัลจิเนต โดยใช้สปอร์แขวนลอยปริมาตรน้อยกว่าหรือเท่ากับ 1 มิลลิลิตร จะให้ผลผลิตกรดซิตริกใกล้เคียงกัน แต่ถ้าเพิ่มปริมาตรสปอร์แขวนลอยเป็นมากกว่าหรือเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตร จะผลิตกรดซิตริกได้น้อยลง Gosmann และ Rehm (1988) พบว่า เมื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ตรึง จะมีผลทำให้การแพร่ผ่านของออกซิเจนลดลง

แหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเติบโตของรา และเป็นปัจจัยที่จำกัดปัจจัยหนึ่งในการตรึง จากผลการทดลอง พบว่า เมื่อให้ปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอกเหมาะสมจะทำให้ *Aspergillus* sp.G153 ที่ถูกตรึงเติบโตในระดับเหมาะสม ไม่พบเซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือพบน้อยมาก และผลิตกรดกลูโคนิคได้มาก ถ้าแหล่งไนโตรเจนมากเกินไปจะทำให้ *Aspergillus* sp.G153 เติบโตมาก มีสายใยอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อมาก และผลผลิตกรดกลูโคนิคลดลง เนื่องจากมีการใช้อาหารส่วนใหญ่เพื่อการเติบโตมากกว่าการผลิตกรด แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอกมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนน้อยเกินไป สปอร์ตรึงก็ไม่สามารถงอกได้ ดังในผลการทดลองซึ่งพบว่า เมื่อแปรผันความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอกเป็น 4.0 2.0 1.2 0.8 0.4 และ 0.2 กรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 4.0 2.0 และ 1.2 กรัมต่อลิตร พบสายใยอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวนมาก ถ้าลดความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตลงเหลือ 0.8 และ 0.4 กรัมต่อลิตรไม่พบสายใยอิสระดังกล่าว และเมื่อนำสายใยตรึงที่ได้มาผลิตกรดกลูโคนิค พบว่า สายใยตรึงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงสปอร์ตรึงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอกที่มีความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.8 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดสูงกว่า ส่วนความเข้มข้น

แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร สปอร์ตรึงไม่สามารถงอกได้ (ตารางที่ 3 และรูปที่ 7) ดังนั้น ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการทำให้สปอร์ตรึงงอก คือ 0.8 กรัมต่อลิตร โดยสปอร์ตรึงสามารถงอกได้ในเวลา 66 ชั่วโมง สำหรับปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงนั้น จากผลการทดลองซึ่งแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 10 พบว่า ควรมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนน้อย ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 4.0-0.4 กรัมต่อลิตร สายใยมีการเติบโตมาก พบเซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต และได้ผลผลิตกรดกลูโคนิคน้อย แต่ถ้าลดความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตลงเหลือ 0.2 กรัมต่อลิตร ไม่พบสายใยอิสระ และให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Eikmeier และ Rehm (1984) ซึ่งพบว่าถ้าเพาะเลี้ยงสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* ด้วยอาหารที่มีความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน คือแอมโมเนียมไนเตรตสูง พบสายใยเจริญมากบริเวณผิวเม็ดเจล และเกิดเป็นสายใยอิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าจำกัดความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดซิตริกให้เหมาะสม (100-200 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะสามารถผลิตกรดซิตริกได้ปริมาณสูงกว่าการผลิตโดยสายใยอิสระถึง 1.5 เท่า และในปีเดียวกันนี้ Eikmeier และคณะยังได้ศึกษาลักษณะของ *Aspergillus niger* ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าการเจริญของสายใยถูกจำกัดโดยแหล่งไนโตรเจน ถ้าความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารสูงทำให้เส้นใยบริเวณผิวเจริญหนาแน่นมาก การแพร่ผ่านของสารอาหารและออกซิเจนเข้าไปในเม็ดเจลถูกจำกัด มีผลทำให้การเจริญของสายใยภายในเม็ดเจลลดลง และยังทำให้มีสายใยอิสระในอาหารมาก นอกจากนี้ Gosmann และ Rehm (1988) พบว่าการเจริญของ *Aspergillus niger* ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตขึ้นกับความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าความเข้มข้นแอมโมเนียมต่ำการเจริญของสายใยจะช้ากว่า ความต้องการออกซิเจนน้อยกว่า ปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียงพอต่อการเจริญของสายใยภายในเม็ดเจล ทำให้สายใยภายในเม็ดเจลเจริญทั่วถึง ถ้าความเข้มข้นแอมโมเนียมสูง สายใยบริเวณผิวเม็ดเจลมีการเจริญอย่างรวดเร็ว มีความแออัดของสายใยมาก ออกซิเจนผ่านเข้าไปในเม็ดเจลยาก และสายใยที่หนาแน่นมากบริเวณผิวเม็ดเจลอาจจะหลุดเป็นสายใยอิสระปนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลองหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการทำให้สปอร์ตรึงงอก และนำสายใยตรึงที่ได้มาผลิตกรดกลูโคนิค ดังแสดงในรูปที่ 8 พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมในการทำให้สปอร์

ตรึงงอกและผลิตกรดกลูโคนิคได้สูงสุด คือ 66 ชั่วโมง ช่วงเวลา 10-36 ชั่วโมงให้ผลผลิตต่ำอาจเนื่องมาจากสปอร์ตรึงยังงอกไม่เต็มที่ เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดจะใช้สารอาหารที่มีอยู่เพื่อการเติบโตระยะหนึ่ง และเนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอก ดังนั้นสายใยตรึงจึงไม่สามารถเติบโตได้มากนักเป็นเหตุให้มีปริมาณสายใยตรึงน้อยกว่าที่ควรจะเป็นจึงให้ผลผลิตกรดน้อย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Kuek (1991) ซึ่งพบว่าถ้านำสายใยตรึงอายุน้อย ๆ สปอร์ตรึงยังงอกไม่เต็มที่ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนเหมาะสมสายใยจะสามารถเติบโตได้อีก

ขนาดเม็ดเจลเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งในการผลิตกรดกลูโคนิคด้วยสายใยตรึง เม็ดเจลที่มีขนาดเล็กจะมีพื้นที่ในการสัมผัสอาหารและออกซิเจนมากกว่าเม็ดเจลขนาดใหญ่ทำให้สามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้มากกว่า จากผลการทดลอง (รูปที่ 9) พบว่าเม็ดเจลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 มิลลิเมตร ให้ปริมาณกรดสูงกว่าเม็ดเจลขนาด 4.5 มิลลิเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Tramper และคณะ (1983) ที่ทดลองตรึง *Gluconobacter oxydans* ในแคลเซียมอัลจิเนต โดยให้เม็ดเจลมีขนาดต่างๆกัน พบว่ากิจกรรม (activity) ของเซลล์ตรึงลดลงเมื่อเม็ดเจลมีขนาดใหญ่ขึ้น

ความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตรึงต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตมีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิคเช่นกัน ถ้าความหนาแน่นเม็ดเจลสายใยตรึงน้อย ย่อมมีปริมาณสายใยตรึงที่ผลิตกรดน้อย ผลผลิตกรดที่ได้ก็จะน้อย แต่ถ้าความหนาแน่นเม็ดเจลสายใยตรึงมากเกินไปปริมาณสารอาหารและออกซิเจนจะสัมผัสสายใยได้ยากกว่าความหนาแน่นเม็ดเจลสายใยตรึงพอเหมาะทำให้ผลิตกรดลดลง นอกจากนี้สารอาหารและออกซิเจนบางส่วนถูกแบ่งไปใช้เพื่อการเจริญและการดำรงชีพของสายใยตรึงที่มีปริมาณมากด้วย จากการทดลองพบว่าความหนาแน่นของเม็ดเจลที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดกลูโคนิคในระดับขวดเขย่าคือ 40 กรัมต่อลิตร ถ้าความหนาแน่นของเม็ดเจลมากหรือน้อยกว่านี้ ผลผลิตกรดกลูโคนิคจะน้อยลง (รูปที่ 11) เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Tsay และ To (1987) พบว่า ถ้าเพิ่มปริมาณเม็ดเจลสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* จะมีผลทำให้ผลผลิตกรดซิตริกลดลง

การผลิตกรดกลูโคนิคเป็นกระบวนการที่ต้องการออกซิเจนอย่างเพียงพอ ทั้งนี้เนื่องจากกรดกลูโคนิคเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นการผลิตกรดดังกล่าวจึงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Moresi et al.,1991)

ดังนั้นในการผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Aspergillus* sp.G153 ระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ความหนาแน่นเม็ดเจลสายใยตริง 80 กรัมต่อลิตร แปรผันอัตราการให้อากาศต่าง ๆ กัน คือ 8 10 และ 12 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที เพื่อหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศผลผลิตกรดกลูโคนิคจะเพิ่มขึ้นและเร็วขึ้น โดยอัตราการให้อากาศที่ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงกว่าอัตราการให้อากาศอื่น คือ 10 และ 12 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาทีให้ผลผลิตกรดสูงสุด 104 และ 103 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในเวลา 54 ชั่วโมง (รูปที่ 13) แต่เมื่อคำนึงถึงความประหยัดทางด้านพลังงาน และความเหมาะสมต่อปริมาตรใช้งาน (400 มิลลิลิตร) อัตราการให้อากาศ 10 ลิตรต่อลิตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดกลูโคนิคในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Sakurai และคณะ (1989) และ Vassilev และคณะ (1993) ที่พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศ ผลผลิตกรดกลูโคนิคจะเพิ่มขึ้นด้วย

เมื่อผลิตกรดกลูโคนิคระดับขยายส่วนในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยแปรความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตริงต่าง ๆ กัน คือ 80 และ 200 กรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าผลผลิตกรดกลูโคนิคจากเม็ดเจลสายใยตริงหนาแน่น 80 กรัมต่อลิตรสูงขึ้นอย่างช้า ๆ และต้องใช้เวลานานถึง 54 ชั่วโมงจึงให้ผลผลิตกรดสูงสุดและพบตะกอนขาวข้นของแคลเซียมกลูโคเนตในระบบพอควร จึงเพิ่มความหนาแน่นเม็ดเจลเป็น 200 กรัมต่อลิตรเพื่อลดเวลาการผลิต ซึ่งพบว่าสามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้สูงและเร็วขึ้นแต่เกิดตะกอนแคลเซียมกลูโคเนตจำนวนมาก ทำให้การให้อากาศไม่ทั่วถึง นั่นคือเมื่อเพิ่มความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตริงจะให้ผลผลิตเร็วขึ้น แต่การใช้น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ไม่เหมาะสมสำหรับการทดลองเพิ่มความหนาแน่นเพราะสภาพในคอลัมน์มีความหนืดสูงมาก การให้อากาศทำได้ไม่สม่ำเสมอจึงลดความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสลงเหลือ 50 กรัมต่อลิตรแล้วแปรผันความหนาแน่นของเม็ดเจลสายใยตริงเป็น 80 200 300 และ 400 กรัมต่อลิตร พบว่าความหนาแน่น 80 และ 200 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดสูงสุดน้อยและใช้เวลานาน คือได้ผลผลิตกรดสูงสุด 50 และ 51.4 กรัมต่อลิตร ในเวลา 27 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนความหนาแน่น 300 กรัมต่อลิตรให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคสูงและเร็วที่สุด คือ 54 กรัมต่อลิตรในเวลา 18 ชั่วโมง ถ้าความหนาแน่นของเม็ดเจล

สายใยตรึงมากเกินไป คือ 400 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดน้อยและช้ากว่าความหนาแน่นเม็ดเจล 300 กรัมต่อลิตร คือ 50 กรัมต่อลิตรในเวลา 21 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องจากความหนาแน่นของเม็ดเจลที่สูงเกินไปทำให้การให้อากาศไม่ทั่วถึง การสัมผัสระหว่างสายใยออกซิเจนและสารอาหารไม่สม่ำเสมอ กระบวนการออกซิเดชันเกิดช้าลง เป็นผลให้ผลผลิตกรดน้อยลงและใช้เวลาในการผลิตนานขึ้น นอกจากนี้ ถ้าสายใยปริมาณมากสารอาหารส่วนหนึ่งจะถูกใช้เพื่อการดำรงชีพ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Vassilev และคณะ (1993) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนปริมาตรสายใยตรึงต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อในระดับเหมาะสมจะมีผลเพิ่มผลผลิตกรดกลูโคนิค แต่ถ้าปริมาตรสายใยตรึงต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไป ผลผลิตกรดกลูโคนิคจะลดลง

การใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ Vassilevและคณะ (1993) พบว่าสามารถใช้แป้งข้าวโพดไฮโดรไลเสตเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* แทนน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ได้ สำหรับการทดลองนี้เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังไฮโดรไลเสต เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus* sp.G153 พบว่า ให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคใกล้เคียงกับการใช้น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 16) ซึ่งทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตได้อีกวิธีหนึ่ง และนอกจากนี้แป้งมันสำปะหลังยังเป็นวัตถุดิบจากการเกษตรที่หาได้ง่าย การที่สามารถผลิตกรดกลูโคนิคโดยใช้แป้งมันสำปะหลังไฮโดรไลเสตได้ เป็นการเพิ่มคุณค่าให้กับวัตถุดิบจากการเกษตรอีกด้วย

แร่ธาตุเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดกลูโคนิค กรรณิกา จันทรสอาด (2533) รายงานว่า ปรอท เงิน และทองแดงทำให้ผลผลิตกรดกลูโคนิคโดย *Aspergillus* sp. G153 ลดลงทันทีแม้ปนเปื้อนเพียง 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนเหล็กในรูปเฟอร์รัสซัลเฟตถ้ามีในปริมาณพอเหมาะจะทำให้สามารถผลิตกรดได้ดีกว่ามีน้อยหรือไม่มีเลย แต่ถ้ามีเหล็กในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไป (มากกว่าหรือเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร) จะมีผลทำให้ผลผลิตลดลงเช่นกัน เมื่อเพิ่มปริมาณแมงกานีสในรูปแมงกานีสซัลเฟตจนถึง 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ผลผลิตกรดเพิ่มขึ้นด้วย จากผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำประปา พบว่าในน้ำประปาประกอบด้วยเหล็กในช่วง 0-0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แมงกานีสในช่วง 0-0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมในช่วง 4-8 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณแร่ธาตุที่อยู่ในช่วงที่พอเหมาะต่อการผลิตกรดกลูโคนิค บาจรีย์ จันทราภาณุกร (2536)ได้ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคด้วยสายใยอิสระของ *Aspergillus*

sp.G153 โดยใช้น้ำประปาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่ใส่แร่ธาตุใด พบว่าสามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับการใช้น้ำปลอดประจุในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใส่แร่ธาตุครบสูตร การทดลองนี้จึงทดลองใช้สูตรอาหารที่เตรียมโดยน้ำประปาเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึง *Aspergillus* sp. G153 ในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง พบว่า ให้ผลใกล้เคียงกับการใช้น้ำปลอดประจุและใส่แร่ธาตุครบสูตร ผลการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ บาจรีย์ จันทราภาณุกร (2536) ซึ่งก็เป็นข้อได้เปรียบของการผลิตกรดกลูโคนิคโดยราสายพันธุ์นี้ คือสามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรง่าย ๆ ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และน้ำประปาแต่ให้ผลผลิตกรดสูง ไม่ว่าจะผลิตโดยใช้สายใยอิสระหรือสายใยตรึง ที่สำคัญคือการผลิตโดยสายใยตรึงมิได้ทำให้ผลผลิตลดลง

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยอิสระ *Aspergillus* sp. G153 ในถังหมัก 5 ลิตรและสายใยตรึงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตจากสายใยทั้ง 2 ชนิด พบว่า ได้ผลผลิตกรดสูงไล่เลี่ยกัน แต่การผลิตในถังหมักที่มีการกวนและสูตรอาหารมีปริมาณแหล่งไนโตรเจนสูงกว่า ให้ผลผลิตเร็วกว่าการผลิตกรดดังกล่าวโดยสายใยตรึงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง (รูปที่ 18) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในถังหมัก 5 ลิตร มีการกวนทำให้ออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีขึ้น นอกจากนี้สายใยยังสัมผัสกับอาหาร และออกซิเจนได้ดีกว่าสายใยตรึง ในขณะที่การผลิตโดยสายใยตรึงในคอลัมน์แก้วไม่มีการกวนปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจกระจายไม่ทั่วถึงเท่าในถังหมัก 5 ลิตร การแพร่ผ่านของออกซิเจนและสารอาหารไปยังสายใยถูกกีดขวางโดยสารพาหะ แต่การใช้สายใยตรึงมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้สายใยอิสระในแง่อื่น ๆ คือสามารถใช้ผลิตกรดแบบต่อเนื่องได้ ต้นทุนการผลิตต่ำ ใช้ถังหมักแบบง่าย ๆ ราคาไม่แพง สิ้นเปลืองพลังงานเพียงหนึ่งในสามของถังหมักแบบกวน (Okabe *et al.*,1993) การแยกเม็ดเจลสายใยตรึงออกจากน้ำหมักทำได้ง่าย ขั้นตอนการใช้ซ้ำทำได้ง่าย และสามารถใช้ผลิตซ้ำได้นานกว่าสายใยอิสระ (Sakurai *et al.*, 1989)

จากการผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำ โดยสายใยตรึงในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง พบว่า สามารถใช้สายใยตรึงซ้ำได้รวม 10 ครั้ง ไม่ว่าจะใช้น้ำประปาในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่ใส่แร่ธาตุใด ๆ หรือจะใช้น้ำปลอดประจุโดยใส่แร่ธาตุครบสูตรให้ผลผลิตกรดสูงสุดและเวลาที่ได้ผลผลิตกรดสูงสุดในการใช้ซ้ำแต่ละครั้งใกล้เคียงกันกับซ้ำแรก (รูปที่ 23) แสดงว่าการผลิตกรดดังกล่าวโดยสายใยตรึงซ้ำหลายครั้งเป็นสิ่งที่เป็นไปได้ และให้ผลผลิต

สม่ำเสมอในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรง่าย ๆ สามารถลดต้นทุนการผลิตได้มาก การทดลองของ Sukurai และคณะ (1989) สนับสนุนการทดลองนี้ที่ว่า สายใยตรึงสามารถผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำได้หลายครั้ง โดยผลผลิตไม่ลดลง คือ เมื่อทดลองผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* บนผ้าที่ทอด้วยเส้นใยสังเคราะห์ผสมกับเส้นใยธรรมชาติ พบว่าสามารถใช้ซ้ำได้ 14 ครั้งโดยอัตราการผลิตคงที่ ในขณะที่สายใยอิสระใช้ผลิตกรดซ้ำได้เพียง 4 ครั้ง เช่นเดียวกับ Vassilev และคณะ (1993) ทดลองผลิตกรดกลูโคนิคโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus niger* บนโพลียูรีเทนโฟม พบว่าสามารถใช้ซ้ำได้ 5 ครั้ง โดยความสามารถในการผลิตคงเดิม

เมื่อทำการทดลองลดต้นทุนต่อไปอีกระดับหนึ่ง โดยไม่เติมแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดกลูโคนิค กล่าวคืออาหารเลี้ยงเชื้อมีเพียงแป้งไฮโดรไลเสตที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรและน้ำประปาเท่านั้น โดยทำการทดลองผลิตกรดซ้ำ 6 ครั้ง พบว่า สามารถผลิตกรดได้โดยผลผลิตกรดไม่ลดลงทุกซ้ำ การที่สายใยตรึงสามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้โดยไม่จำเป็นต้องมีแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นอาจเนื่องมาจากเหตุผล 2 ประการ ประการแรก คือเม็ดเจลสายใยตรึงสามารถดูดซับอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการทำให้สปอร์ตรึงงอกซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนอยู่ได้ ทำให้สามารถผลิตกรดต่อไปได้อีกระยะหนึ่ง ซึ่งถ้าเป็นเช่นนี้แล้วเมื่อแหล่งไนโตรเจนที่ถูกดูดซับไว้ภายในเม็ดเจลถูกใช้หมด ความสามารถในการผลิตกรดของเม็ดเจลสายใยตรึงก็จะลดลง จึงต้องกระตุ้นด้วยการนำเม็ดเจลสายใยตรึงไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนพอเหมาะในช่วงระยะเวลาหนึ่งแล้วเม็ดเจลสายใยตรึงจะสามารถผลิตกรดได้ดีดังเดิม ส่วนเหตุผลประการที่สอง คือสายใยตรึงอาจสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนจากน้ำประปาซึ่งอยู่ในรูปของแอมโมเนียมอิสระ (0.0167-0.1077 มิลลิกรัมต่อลิตร) และเกลือไนเตรต (0.0642-0.3360 มิลลิกรัมต่อลิตร) ได้ ทำให้สามารถผลิตกรดได้ปริมาณมาก ซึ่งถ้าเป็นเช่นนี้แล้วจะสามารถใช้เม็ดเจลสายใยตรึงซ้ำในการผลิตกรดได้นานจนกว่าประสิทธิภาพการผลิตกรดของสายใยตรึงจะลดลง หรือเม็ดเจลสายใยตรึงเสียสภาพซึ่งจะใช้ซ้ำได้นานกว่าเหตุผลแรก อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองและจากเหตุผลข้างต้นจะเห็นได้ว่าสามารถผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus* sp. G153 ได้หลายครั้งโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบเพียงแป้งไฮโดรไลเสตและน้ำประปาเท่านั้นได้ ทำให้ต้นทุนและระยะเวลาการผลิตลดลง ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบอย่างมากของการผลิตกรดกลูโคนิคซ้ำโดยสายใยตรึงของเชื้อราสายพันธุ์นี้

การตรวจการเติบโตของสายใยตรึง *Aspergillus* sp. G153 ในแคลเซียมอัลจิเนตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบสายใยตรึงเจริญอยู่บริเวณผิวของเม็ดเจลในระดับหนึ่งเท่านั้นมิได้เจริญทั่วทั้งเม็ดเจล ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Eikmeier และคณะ(1984) Kopp และ Rehm(1984) Eikmeier และ Rehm (1987)

จากผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสปอร์ตรึงของ *Aspergillus* sp.G153 ที่เก็บไว้ที่ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ก่อนนำมาทำให้งอกและนำมาผลิตกรดกลูโคนิค พบว่า สามารถเก็บเม็ดเจลสปอร์ตรึงไว้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส ได้นาน 7 วัน โดยประสิทธิภาพในการงอกและการผลิตกรดกลูโคนิคยังคงเดิม (รูปที่ 37) ซึ่งคาดว่าอาจเนื่องมาจาก สปอร์สามารถทนต่อภาวะที่ไม่เหมาะสมได้เป็นเวลานาน และเมื่อนำสปอร์มาตรึงในสารพาหะตรึง สารพาหะตรึงจะช่วยเพิ่มความคงทนของสปอร์ตรึงให้มากขึ้น(Chibata *et al*., 1978; Chibata and Tosa, 1983)

จากผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสายใยตรึงที่เก็บไว้ที่ 6 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่าง ๆ กัน ก่อนนำมาผลิตกรดกลูโคนิค พบว่า สามารถเก็บเม็ดเจลสายใยตรึงได้ภายในเวลา 5 วัน โดยประสิทธิภาพการผลิตกรดยังคงเดิม แต่ถ้าเก็บไว้นานกว่า 5 วัน ผลผลิตกรดจะลดลง (รูปที่ 38) เนื่องมาจากสายใยขาดสารอาหารเป็นเวลานาน และภาวะต่าง ๆ ไม่เหมาะสม ทำให้สายใยไม่สามารถปรับตัวให้มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดได้ดีดังเดิม แต่อย่างไรก็ตามสายใยตรึงสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส โดยประสิทธิภาพการผลิตกรดยังคงเดิมอยู่ได้นานกว่าสายใยอิสระ จากผลการทดลองของ จินตนา ไกรวัฒนพงศ์ (2536) พบว่า สายใยอิสระของ *Aspergillus* sp. G153 สามารถเก็บไว้ที่ 6 องศาเซลเซียสได้เพียง 3 วันเท่านั้น การที่สายใยตรึงเก็บไว้ได้นานกว่าสายใยอิสระอาจเนื่องมาจาก สารพาหะตรึงช่วยป้องกันสายใยจากสารเคมีบางอย่าง และจากภาวะที่ไม่เหมาะสมต่าง ๆ (Chibata *et al*., 1978; Chibata and Tosa, 1983)

จะเห็นได้ว่าจากการหาภาวะที่เหมาะสมบางประการสำหรับการผลิตกรดกลูโคนิคในรูปแคลเซียมกลูโคเนตโดยสายใยตรึงของ *Aspergillus* sp.G153 ในแคลเซียมอัลจิเนตทั้งในระดับขวดเขย่า และในคอลัมน์แก้วที่มีการให้อากาศด้านล่าง พบว่าสายใยตรึงของ *Aspergillus* sp. G153 ในแคลเซียมอัลจิเนตสามารถผลิตกรดกลูโคนิคได้ปริมาณมาก ใช้ระยะเวลาในการผลิตน้อย อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดดังกล่าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสูตรง่าย ๆ คือประกอบด้วยแป้งไฮโดรไลเสตและน้ำประปาเท่านั้น และสามารถนำสายใย

ตริงมาใช้ซ้ำได้หลายครั้งโดยผลผลิตไม่ลดลงซึ่งเป็นการลดระยะเวลาและต้นทุนการผลิต อันอาจเป็นแนวทางในการผลิตระดับโรงงานต้นแบบโดยใช้สายใยตริงต่อไป จึงน่าจะมีการทดลองตริงในสารพาหะอื่นที่มีราคาถูกกว่านี้ ซึ่งจะมีผลทำให้ต้นทุนการผลิตลดลงอีก