บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสซึ่งได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ เป็นแหล่งของคาร์บอน ทั้งในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ในขั้นตอนแรกเป็นการศึกษาในระดับขวดเขย่า โดยปัจจัยแรกที่ศึกษาคือ ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของหัวเชื้อ พบว่าการเลี้ยงหัวเชื้อที่อุณภูมิ 28 และ 30 องศาเซลเซียส มีการเจริญใกล้เคียงกัน ส่วนที่ 25 องศาเซลเซียส เชื้อจะอยู่ในระยะพักตัวนานกว่า ได้เลือกใช้อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ เนื่องจากอุณหภูมิดังกล่าว Iizuka และคณะ(1971) ได้รายงานว่า เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมหัวเชื้อและการผลิตกรดมะนาวจากน้ำตาลกลูโคสโดยเชื้อ *C. oleophila* Shah และคณะ(1993)ได้ใช้อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเช่นกัน ในการเตรียมหัวเชื้อและการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวจากน้ำตาลกลูโคสและแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้ว โดยใช้เชื้อ *Y. lypolitica*(DS-1) สำหรับอายุของหัวเชื้อนั้น การใช้หัวเชื้ออายุ 12,15 และ 18 ชั่วโมงโดยใช้ปริมาณเซลล์แห้งเริ่มต้นเท่ากันคือ 0.7 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวสูงสุดได้ใกล้เคียงกันประมาณ 132 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมงของการหมัก แต่การใช้หัวเชื้ออายุ 12 ชั่วโมง ต้องใช้ปริมาณสูงถึงร้อยละ 16 ปริมาตรต่อปริมาตร เนื่องจากความหนาแน่นของเซลล์ต่ำ ส่วนหัวเชื้ออายุ 15 และ 18 ชั่วโมง ใช้ปริมาณเพียงร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร และให้อัตราการผลิตกรดมะนาวเท่ากัน ดังนั้นการใช้หัวเชื้ออายุ 15 ชั่วโมง ก็เพียงพอสำหรับใช้ในการผลิตกรดมะนาวเพราะช่วยลดเวลาในการเตรียมหัวเชื้อด้วย

จากการศึกษาผลของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่มีต่อการผลิตกรดมะนาว พบว่าการใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 0.7 กรัมต่อลิตรหรือปริมาณร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 ถึงแม้ว่าการเพิ่มปริมาณ

หัวเชื้อเริ่มต้นสูงขึ้น เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้เร็วขึ้นตัวอย่างเช่นที่ 96 ชั่วโมงของการหมัก เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 95.23, 101.38 และ 110.93 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 0.7, 1.4 และ 2.1 กรัมต่อลิตรตามลำดับ แต่อัตราเร็วในการผลิตกรดมะนาวเท่ากันคือ 1.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมด กรดมะนาวสูงสุดที่ได้นั้นใกล้เคียงกันคือประมาณ 131 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว พบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 28 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเจริญและอัตราการผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกัน และสามารถผลิตกรดมะนาวได้ประมาณ 130 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อสูงขึ้นเป็น 30 และ 33 องศาเซลเซียส การเจริญและการผลิตกรดมะนาวจะลดลง ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวจะใช้อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิเดียวกันกับที่ใช้ในการเตรียมหัวเชื้อ และใกล้เคียงกับอุณหภูมิของประเทศไทยอีกด้วย

จากการทดลองหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสม สำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 200 กรัมต่อลิตร ได้กรดมะนาว 130.82 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร น้ำตาลกลูโคสถูกใช้เกือบหมดในชั่วโมงที่ 108 ของการหมัก ทำให้การผลิตกรดมะนาวต่ำกว่าคือได้ 118.20 กรัมต่อลิตรที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง แสดงว่าน้ำตาลกลูโคสไม่เพียงพอ ส่วนน้ำตาลรีดิวส์ที่ยังเหลือในน้ำหมักเป็นพวกไดแซคคาไรด์และโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งเชื้อไม่สามารถนำไปใช้ได้(เรวดี เลิศไตรรักษ์, 2535) เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเป็น 220 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 131.20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง ซึ่งได้กรดมะนาวใกล้เคียงกันกับการทดลองที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร แต่ยังมีน้ำตาลกลูโคสเหลือในน้ำหมัก การใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเป็น 250 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 125.82 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง จะเห็นว่าการผลิตกรดมะนาวจะช้ากว่าและยังมีน้ำตาลกลูโคสเหลือในน้ำหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญของเชื้อจะช้ากว่าด้วย ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับที่ Shah และคณะ(1993)ได้รายงานไว้ อนึ่งการใช้น้ำตาล

กลูโคสเริ่มต้น 200, 220 และ 250 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง จะได้น้ำหมักที่มีลักษณะข้นมาก

แหล่งของอนินทรีย์ไนโตรเจน เป็นสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์ แต่ต้องใช้ในปริมาณที่จำกัดเนื่องจากการผลิตกรดมะนาวจะเกิดขึ้นหลังจากที่ ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกใช้หมดแล้ว(Kubicek and Rohr,1986) จากการทดลองพบว่า ทั้งชนิดและปริมาณของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน มีผลการเจริญและการผลิตกรดมะนาว การเพิ่มปริมาณของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน สูงกว่า 2.0 กรัมต่อลิตร จะทำให้การเจริญของเชื้อเพิ่มสูงขึ้นแต่การผลิตกรดมะนาวจะลดลง เมื่อเปรียบเทียบกรดมะนาวที่เชื้อผลิตขึ้นในระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง จะเห็นว่าแอมโมเนียมไนเตรตหรือแอมโมเนียมคลอไรด์ปริมาณ 2.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งของอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดมะนาว โดยได้กรดมะนาวสูงใกล้เคียงกันคือประมาณ 130 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรีย ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับที่ เรวดี เลิศไตรรักษ์(2535) ได้รายงานไว้ แต่แอมโมเนียมไนเตรตนั้นไม่เหมาะสมสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อเนื่องจากมีราคาแพงและเป็นสารที่ห้ามมีไว้ในความครอบครอง แอมโมเนียมคลอไรด์ปริมาณ 2.0 กรัมต่อลิตร จึงเป็นแหล่งของอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นสารอีกชนิดหนึ่ง ที่จำเป็นสำหรับการผลิตกรดมะนาวแต่ต้องใช้ในปริมาณที่จำกัด(Kubicek and Rohr,1986) จากการทดลองพบว่าโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวคือได้กรดมะนาว 136.20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง การเพิ่มปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ทำให้การเจริญของเชื้อเพิ่มสูงขึ้น แต่ถ้าใช้ปริมาณสูงกว่า 0.2 กรัมต่อลิตร การผลิตกรดมะนาวจะลดลง ผลการทดลองที่ได้แตกต่างจากที่ เรวดี เลิศไตรรักษ์(2535)ได้รายงานไว้ กล่าวคือการผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล-พาราฟฟินส์ ปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมคือ 0.1 กรัมต่อลิตร ส่วนผลของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตและแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตนั้น พบว่าปริมาณที่เหมาะสมคือ 0.5 และ 0.2 กรัมต่อลิตรตามลำดับโดยได้กรดมะนาว 137.40 และ 136.71 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมงซึ่งสอดคล้องกับที่ เรวดี เลิศไตรรักษ์(2535)รายงานไว้

การใช้สารเสริมบางชนิดจะทำให้เชื้อยีสต์สามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีขึ้น สารที่นิยมใช้กันมากได้แก่ สารสกัดจากยีสต์เนื่องจากประกอบด้วยกรดอะมิโนและวิตามินหลายชนิด(Abou-Zeid and Ashy, 1984) จากการทดลองพบว่าปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 คือ 1.0 กรัมต่อลิตร ได้กรดมะนาว 137.12 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับที่ เรวดี เลิศไตรรักษ์(2535) ได้รายงานไว้

ได้มีรายงานเกี่ยวกับผลของแร่ธาตุบางชนิดที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์ เช่น เรวดี เลิศไตรรักษ์(2535)ได้รายงานว่า การผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล-พาราฟฟินส์โดยเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารที่เติมเหล็กซัลเฟต 0.01 กรัมต่อลิตร, คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรต 0.005 กรัมต่อลิตร และซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.2 กรัมต่อลิตร การผลิตกรดมะนาวต่ำกว่าอาหารที่ไม่เติมสารดังกล่าว Furukawa และคณะ(1977) ได้รายงานว่าการเลี้ยงเชื้อ *C. citrica* ในอาหารที่มีนอร์มัล-พาราฟฟินส์ เมื่อเติมเหล็กซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อเพียง 1 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลงและผลิตกรดไอโซซิตริกสูงขึ้น Marison(1988)ได้รายงานว่า การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์นั้นปริมาณเหล็กอิออนในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวเช่นเดียวกับการใช้เชื้อรา *A. niger* ดังนั้นจึงได้ทดลองเพื่อศึกษาผลของการเติมเหล็กซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการผลิตกรดมะนาวจะลดลง เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมเหล็กซัลเฟต ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับที่ Furukawaและคณะ(1977)ได้รายงานไว้ ส่วนผลของไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ปริมาณ 0.001 กรัมต่อลิตร แทนการใช้สารสกัดจากยีสต์ เชื้อสามารถสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 134.78 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง แต่ปริมาณกรดมะนาวต่ำกว่าชุดควบคุมที่เติมสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 1.0 กรัมต่อลิตรซึ่งได้กรดมะนาว 137.36 กรัมต่อลิตร

การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *A. niger* นั้น เชื้อราสามารถทนต่อสภาพความเป็นกรดได้สูง ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ(Kubicek and Rohr,1986) แต่การผลิตกรดมะนาวโดยใช้เชื้อยีสต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดลงเมื่อมีการสะสมกรดมะนาวจะไปยับยั้งการทำงานของเซลล์ ทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลง(Moresi et al.,1980) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเติมสารบางชนิดเพื่อควบคุม

ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงในระหว่างการหมัก การผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าส่วนใหญ่ใช้แคลเซียมคาร์บอเนต โดยเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่เริ่มต้น แต่ปริมาณที่เหมาะสมขึ้นกับปริมาณกรดมะนาวที่เชื้อผลิตขึ้น จากการทดลองพบว่า ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวอยู่ในช่วง 100-120 กรัมต่อลิตร

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าสรุปได้ว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 200.0 กรัม แอมโมเนียมคลอไรด์ 2.0 กรัม โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.5 กรัม แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.2 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัม และแคลเซียมคาร์บอเนต 100.0 กรัม เลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที การเลี้ยงเชื้อด้วยสภาวะดังกล่าวเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 138.36 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 68.92 เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป

จากการนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในระดับขวดเขย่า มาเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 131.20 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 84 ชั่วโมง และเชื้อผลิตกรดมะนาวได้สูงสุด 136.28 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 68.37 เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป การเจริญและการผลิตกรดมะนาวในถังหมักเกิดได้เร็วกว่าในระดับขวดเขย่า โดยลดระยะเวลาการหมักจาก 120 ชั่วโมงเหลือ 96 ชั่วโมง แต่ได้กรดมะนาวใกล้เคียงกัน ส่วนสภาพของน้ำหมักจะเริ่มข้นหลังจากการหมัก 72 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำหมักลดลงเหลือประมาณ 3.7 ที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมงเป็นต้นไป แสดงว่าการใช้แคลเซียมคาร์บอเนต 100 กรัมต่อลิตร ไม่เพียงพอกับปริมาณกรดที่เกิดขึ้น ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงได้เพิ่มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 120 กรัมต่อลิตร พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 138.74 กรัมต่อลิตร(กรดมะนาวทั้งหมดประมาณ 361 กรัม)ในระยะเวลาการหมัก 84 ชั่วโมง คิดเป็น

ผลผลิตร้อยละ 68.96 กรัมต่อลิตร และที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง ได้กรดมะนาว 139.17 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 69.05 เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป จะเห็นว่าที่เวลา 84 ชั่วโมงเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงใกล้เคียงกับการเลี้ยงในอาหารที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 100 กรัมต่อลิตร แต่ใช้เวลาในการหมักสั้นกว่าถึง 12 ชั่วโมง

การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์ในระดับถังหมัก นอกจากใช้แคลเซียมคาร์บอเนตแล้ว ยังมีรายงานการใช้สารที่เป็นด่างแก่บางชนิดเช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์(Nakanishi et al.,1972; Wejtatowicz et al., 1991)และแคลเซียมไฮดรอกไซด์(Rottini and Cardini,1981)เป็นต้น จากการทดลองเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.4 โดยการป้อนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล พบว่าที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง เชื้อผลิตกรดมะนาวได้ 93.03 กรัมต่อลิตร แต่การเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้น้ำหมักเจือจางลง จึงต้องเปรียบเทียบโดยใช้ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดในถังหมักซึ่งได้ประมาณ 298 กรัม จะเห็นว่าเชื้อมีการผลิตกรดมะนาวได้ช้าและต่ำกว่าการใช้แคลเซียมคาร์บอเนต เนื่องจากกรดมะนาวที่สะสมในระหว่างการหมัก อยู่ในรูปของเกลือโซเดียมซิเตรตซึ่งละลายในน้ำได้(soluble citrate) โซเดียมไอออนที่อยู่ในน้ำหมักจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดและทำให้โปรตีนเสียสภาพด้วย(Maiorella,Blanch and Wilke,1984) ส่วนผลของการป้อนแคลเซียมไฮดรอกไซด์ เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 6.4 พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 118.08 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง เนื่องจากการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์จะทำให้น้ำหมักเจือจางลง จึงต้องเปรียบเทียบโดยใช้ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดในถังหมักซึ่งได้เท่ากับ 354.24 กรัม จะเห็นว่าได้กรดมะนาวใกล้เคียงกับผลการทดลองที่ใช้แคลเซียมคาร์บอเนต 120 กรัมต่อลิตร แต่ใช้เวลาในการหมักมากกว่าถึง 12 ชั่วโมง ดังนั้นการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนต จึงเหมาะสมและสะดวกกว่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์และแคลเซียมไฮดรอกไซด์

การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อยีสต์เป็นการหมักในสภาวะที่ต้องการออกซิเจน การผลิตกรดมะนาวจะได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอ(Tabuchi et al., 1975 อ้างถึงใน Abou-Zeid and Ashy,1984) การกวนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น

เป็นวิธีการหนึ่งที่ทำให้การละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดได้ดีขึ้น จากการทดลองพบว่าที่อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที การเจริญของเชื้อและการผลิตกรดมะนาวเกิดได้เร็วกว่าการใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาทีเล็กน้อยแต่สูงกว่าโดยตลอด โดยได้กรดมะนาว 140.36 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 84 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 69.80 เมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป

จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำหมัก เมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดในเวลา 84 ชั่วโมงของการหมัก การเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นสูงขึ้นอาจจะทำให้เชื้อสามารถสร้างกรดมะนาวได้เพิ่มขึ้นกว่าเดิม จากการทดลองพบว่าการเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเป็น 220 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตกรดมะนาวได้ 138.82 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 84 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 64.93 เมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป และที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง เชื้อผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นเป็น 149.09 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 67.20 เมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป โดยที่น้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมด แต่ผลผลิตที่ได้ต่ำกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเป็น 250 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตกรดมะนาวได้ 120.78 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 84 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 62.62 เมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป ที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้เพิ่มขึ้นเป็น 152.11 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 66.01 เมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป แต่ยังมีน้ำตาลกลูโคสเหลือในน้ำหมัก 18.82 กรัมต่อลิตร คาดว่าการผลิตกรดมะนาวยังคงเกิดขึ้นต่อไปในอัตราที่ต่ำลงเนื่องจากน้ำหมักอยู่ในสภาพที่ข้นมาก ทำให้เสียเวลาและพลังงานมากขึ้น ดังนั้นการใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร จึงไม่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการผลิตกรดมะนาว นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสให้สูงขึ้นจะทำให้การผลิตกรดมะนาวช้าลงอีกด้วย

ดังนั้นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคส 220 กรัม แคลเซียมคาร์บอเนต 120 กรัม ส่วนองค์ประกอบอื่นๆ เหมือนกับในระดับขวดเขย่า เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบ

ต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวซึ่งแสดงในตารางที่ 24 จะเห็นว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีนอร์มัล-พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน ในระดับขวดเขย่า เชื้อผลิตกรดมะนาวได้ 131.50 กรัมต่อลิตรในระยะเวลาการหมัก 144 ชั่วโมง(เรวดี เลิศไตรรักษ์, 2535) ส่วนผลที่ได้จากการทดลองนี้ เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้ว ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 200.0 กรัม เป็นแหล่งของคาร์บอน เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 138.36 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง จะเห็นว่าเชื้อผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณสูงและใช้เวลาในการหมักสั้นกว่า การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีนอร์มัล-พาราฟฟินส์ การเลี้ยงเชื้อในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรนั้น เชื้อผลิตกรดมะนาวได้ 140.36 กรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลาการหมักลดลงเหลือ 84 ชั่วโมง และการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักเพิ่มสูงขึ้นเป็น 149.09 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมงเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 24 เปรียบเทียบปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *C. oleophila* C-73 ในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมัก

แหล่งของคาร์บอน	ระดับการหมัก	เวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	กรดมะนาวที่ได้ (กรัมต่อลิตร)
นอร์มัล-พาราฟฟินส์ (เรวดี เลิศไตรรักษ์ ,2535)	ขวดเขย่า	144	131.50
น้ำตาลกลูโคส (200 กรัมต่อลิตร)	ขวดเขย่า	120	138.36
	ถังหมัก	84	140.36
น้ำตาลกลูโคส (220 กรัมต่อลิตร)	ถังหมัก	96	149.09