บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อสายพันธุ์กลายของ Candida oleophila ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสซึ่งได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ เป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยในขั้นแรกเป็นการศึกษาในระดับขวดเขย่า เพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ก่อนการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของ Candida oleophila C-73 จำนวน 6 สายพันธุ์ ซึ่งได้จากงานวิจัยของสมศักดิ์ นาคซื่อตรง (2537) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นคือ สายพันธุ์ C-73 ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเกรดทางการค้า OMEGA เป็นสารควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง เกณฑ์ในการคัดเลือกที่สำคัญคือ ปริมาณกรดมะนาว และความหนืดของน้ำหมัก พบว่า สายพันธุ์ที่เหมาะสมที่จะใช้ศึกษาต่อไป ได้แก่ สายพันธุ์ NN-39 และ NNU-62 เนื่องจากให้ปริมาณกรดมะนาวสูง และน้ำหมักไม่หนืดมากนักโดยให้กรดมะนาวประมาณ 131 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง แต่สายพันธุ์ NNU-62 เป็นสายพันธุ์ที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IBGE) ใช้ศึกษาอยู่แล้ว ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือกใช้สายพันธุ์ NN-39 เพื่อให้เกิดความหลากหลายของงาน และสามารถเปรียบเทียบความสอดคล้องหรือแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ สำหรับสายพันธุ์ NNU-48 นั้น แม้ว่าจะให้ปริมาณกรดมะนาวสูงที่สุด ถึง 136.68 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง แต่ก็ทำให้น้ำหมักหนืดมาก ซึ่งจะก่อให้เกิดปัญหาต่อการกวน การละลายของออกซิเจน และการถ่ายโอนสารอาหารในระดับขยายส่วน เมื่อการหมักดำเนินมาถึงชั่วโมงสุดท้าย ยีสต์สายพันธุ์กลายทั้งหก จะผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 96 อีกไม่มากนัก ทั้ง ๆ ที่ยังมีน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปัญหาความหนืดของน้ำหมักทำให้ประสิทธิภาพการผลิตกรดมะนาวของเชื้อลดลงไปมาก แต่สายพันธุ์ C-73 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นและทำให้เกิดความหนืดของน้ำหมักน้อยกว่า สามารถผลิตกรดมะนาวเพิ่มขึ้นได้ถึง 29.32 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามอัตราการผลิตกรดมะนาวของยีสต์สายพันธุ์ C-73 ต่ำกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ มาก หลังจากคัดเลือกสายพันธุ์ได้แล้ว จึงศึกษาลักษณะการเจริญในอาหารสำหรับเตรียม

หัวเชื้อ พบว่า Candida oleophila NN-39 มีรูปแบบการเจริญในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเช่นเดียวกับ Candida oleophila C-73 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น คือเริ่มเข้าสู่ระยะของการเจริญแบบทวีคูณตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 และเข้าสู่ระยะของการเจริญแบบคงที่ที่ 15 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดประมาณ 7 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ดังนั้น จึงใช้อายุหัวเชื้อ 15 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น 0.7 กรัมต่อลิตร ในการผลิตกรดมะนาว เช่นเดียวกับการทดลองของประเสริฐ

เมื่อได้เชื้อที่จะใช้ศึกษา และทราบรูปแบบการเจริญของเชื้อแล้ว จึงเริ่มทดลองหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า โดยปัจจัยแรกที่ศึกษา ได้แก่ การคัดเลือกแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม การผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์จะต่างจาก Aspergillus niger เนื่องจากความสามารถในการทนกรดของยีสต์ต่ำกว่าเชื้อรามาก จึงต้องเติมสารควบคุมค่าความเป็นกรดด่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Moresi et al.,1980) ซึ่งในระดับขวดเขย่านั้น ส่วนใหญ่จะใช้แคลเซียมคาร์บอเนต แต่แคลเซียมคาร์บอเนตชนิดเดิมที่ใช้อยู่ คือผลิตภัณฑ์ของบริษัท FLUKA นั้นเป็นเกรดที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสั่งจากต่างประเทศ และมีราคาแพง จึงไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในอุตสาหกรรม เพราะจะทำให้ต้นทุนการผลิตสูงมาก แม้ว่าการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตของ FLUKA จะให้ปริมาณกรดมะนาวที่ดี และไม่ทำให้น้ำหมักหนืดมากนักก็ตาม สำหรับแคลเซียมคาร์บอเนต เกรดทางการค้าทั้ง 6 ชนิดที่ทดลองนั้น พบว่า OMEGA ค่อนข้างน่าสนใจที่สุด เพราะให้ปริมาณกรดมะนาวสูง คือได้ 131.10 และ 141.65 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ระยะเวลาการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ ให้น้ำหนักเซลล์แห้งมาก รักษาค่าความเป็นกรดด่างของน้ำหมักได้ดี และไม่ทำให้น้ำหมักหนืดมากนัก แคลเซียมคาร์บอเนตชนิด 100 Mesh ก็เป็นอีกชนิดหนึ่งที่ให้ผลผลิตดีใกล้เคียงกับ OMEGA ส่วนชนิด L-208 และ L-039 นั้น ให้ปริมาณกรดมะนาวต่ำมาก โดยได้กรดมะนาวที่ 96 ชั่วโมง เพียง 118.35 และ 120.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อีกทั้งยังทำให้น้ำหมักหนืดมากด้วย การที่แคลเซียมคาร์บอเนตแต่ละชนิดให้ปริมาณกรดมะนาว และความหนืดของน้ำหมักแตกต่างกัน อาจเนื่องจากแคลเซียมคาร์บอเนตเกรดทางการค้าจะมีสารอื่น ๆ ปนเปื้อนอยู่ในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น แมกนีเซียม โซเดียม ทองแดง เหล็ก สังกะสี เป็นต้น ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้มีผลอย่างมากต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ และอาจมีผลต่อการสร้างสารที่ก่อให้เกิดความหนืดในน้ำหมักด้วย ในขณะที่แคลเซียมคาร์บอเนตของ FLUKA จะบริสุทธิ์มากกว่าจึงให้ปริมาณกรดมะนาวที่ดีกว่า และทำให้น้ำหมักหนืดน้อยกว่า ในการทดลองต่อมาได้ติดตามการผลิตกรดมะนาวของเชื้อทุก ๆ 12 ชั่วโมง โดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนต OMEGA เป็นสารควบคุมค่าความเป็นด่าง พบว่าเชื้อเริ่มผลิตกรดมะนาวหลังจาก 12 ชั่วโมง และผลิตกรดมะนาวได้ 131.06

และ 143.85 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 16.86 กรัม และน้ำหมักเริ่มหนืดประมาณชั่วโมงที่ 72

ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ใช้นั้น จะมีสารสกัดจากมอลต์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารสกัดจากมอลต์จะมีแป้งและน้ำตาลหลายชนิด (Stanbury and Whitaker, 1984) รวมทั้งโปรตีนและวิตามิน (Sikyta, 1983) จึงอาจใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นสารช่วยเสริมการเจริญของยีสต์ จากการทดลองหาชนิดของสารสกัดจากมอลต์ที่เหมาะสมโดยใช้สารสกัดจากมอลต์เกรดทางการค้าทั้งชนิดผงและชนิดของเหลวข้นของบริษัท Food Ingredient Specialities (FIS) เปรียบเทียบกับสารสกัดจากมอลต์ของ DIFCO พบว่าสารสกัดจากมอลต์เกรดทางการค้าทั้งสองชนิด ให้ผลการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อไม่แตกต่างจากสารสกัดจากมอลต์ของ DIFCO โดยได้กรดมะนาวประมาณ 131 กรัมต่อลิตรที่ระยะเวลาหมัก 96 ชั่วโมง จึงเลือกใช้สารสกัดจากมอลต์เกรดทางการค้าชนิดของเหลวข้น เนื่องจากมีราคาถูกกว่าสารสกัดจากมอลต์ของ DIFCO มาก ในการทดลองนี้ยังพบว่า อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ไม่เติมสารสกัดจากมอลต์ใด ๆ จะทำให้ยีสต์มีน้ำหนักเซลล์แห้งลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นผลจากปริมาณคาร์บอนในอาหารน้อยลง และการเพิ่มปริมาณสารสกัดจากมอลต์ชนิดของเหลวข้นอีกร้อยละ 50 ของน้ำหนักแห้ง ก็ทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นไม่มากนัก อย่างไรก็ตาม ปริมาณกรดมะนาวที่เชื้อผลิตได้จะไม่แตกต่างจากการใช้สารสกัดจากมอลต์ตามสูตรเดิมคือ 3 กรัมต่อลิตร หากควบคุมปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากัน ดังนั้นอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อในการผลิตกรดมะนาวโดย Candida oleophila NN-39 จึงอาจไม่เติมสารสกัดจากมอลต์ก็ได้ แต่ต้องใช้ปริมาณหัวเชื้อมากขึ้นเพื่อให้ได้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่าเดิม ซึ่งก็เป็นทางเลือกอีกทางหนึ่ง

ต่อจากนั้นได้ศึกษาผลของกากที่เหลือหลังจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ต่อการผลิตกรดมะนาว พบว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วรวมทั้งกาก กับการใช้เฉพาะส่วนใสที่ขจัดกากแล้ว ให้ปริมาณกรดมะนาวใกล้เคียงกัน และผลในด้านอื่น ๆ โดยเฉพาะความหนืดของน้ำหมักก็ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นในการผลิตระดับถังหมักขนาดใหญ่อาจสามารถใช้แป้งที่ย่อยแล้วรวมทั้งกากได้ ซึ่งจะทำให้สะดวกขึ้นมาก เพราะไม่ต้องผ่านขั้นตอนการแยกกากออกก่อน แต่ทั้งนี้ควรมีการศึกษาในระดับถังหมักด้วย เนื่องจากสภาพในถังหมักจะต่างจากขวดเขย่า เช่น ในเรื่องของการให้อากาศ และการกวน เป็นต้น ผลที่ได้จึงอาจต่างกัน ในการทดลองนี้ได้ผลแตกต่างจากรายงานของ Shah และคณะ (1993) ซึ่งพบว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (TSH) ทั้งกากนั้นจะทำให้เชื้อ Yarrowia Lipolytica (DS-1) ผลิตกรดมะนาวได้น้อยกว่าการใช้ TSH ที่ผ่านการแยกกาก ขจัดสีและไอออน ความแตกต่างของผลการทดลองทั้งสองอาจเนื่องมาจากผลของสีและไอออน ตลอดจนเชื้อที่ใช้แตกต่างกัน

ปัจจัยต่อมาที่ศึกษา ได้แก่ ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต และแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตที่เหมาะสม ซึ่งแมกนีเซียมและแมงกานีส เป็นแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการผลิตกรดมะนาวของยีสต์ (Abou-Zeid and Ashy,1984) จากการทดลองพบว่า ปริมาณที่เหมาะสมของแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต และแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต คือ 0.4 และ 0.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ได้กรดมะนาว 137.94 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง ซึ่งผลที่ได้นี้แตกต่างจากที่ ประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ได้รายงานไว้ กล่าวคือ การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila C-73 นั้น ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต และแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตที่เหมาะสมคือ 0.5 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลที่ได้ในการทดลองนี้ดูคล้ายกับว่าแมงกานีสมีความสำคัญต่อการผลิตกรดมะนาวของ Candida oleophila NN-39 มากกว่าแมกนีเซียม โดยเชื้อจะผลิตกรดมะนาวได้น้อยมากในอาหารที่ไม่เติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต แต่ปริมาณของกรดมะนาวที่ได้เมื่อไม่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตนั้นยังคงอยู่ในเกณฑ์ค่อนข้างดี ทั้งนี้อาจเป็นเพราะองค์ประกอบอื่นของอาหารมีแมกนีเซียมเจือปนอยู่แล้ว เช่น แคลเซียมคาร์บอเนต OMEGA ที่ใช้มีแมกนีเซียมออกไซด์อยู่ถึงร้อยละ 0.5 ในขณะที่มีแมงกานีสออกไซด์อยู่เพียงร้อยละ 0.03 (ข้อมูลจากบริษัท ศิลาทิพย์ ประเทศไทย) ดังนั้น ในชุดทดลองที่ไม่เติมแมงกานีสจึงส่งผลรุนแรงกว่าอย่างชัดเจน สำหรับการเจริญของเชื้อนั้นพบว่า การแปรผันปริมาณแร่ธาตุทั้งสองไม่ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อแตกต่างกันมากนัก

ในการทดลองต่อมาได้ศึกษาผลของสารสกัดจากยีสต์ที่มีต่อการเจริญ และการผลิตกรดมะนาว เนื่องจากสารสกัดจากยีสต์ประกอบด้วย กรดอะมิโน และวิตามินหลายชนิด จึงนิยมใช้เป็นสารเสริมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ (Abou-Zeid and Ashy,1984) การทดลองนี้ใช้สารสกัดจากยีสต์ 2 ชนิด คือสารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO และสารสกัดจากยีสต์ที่ผลิตโดยสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ (IBGE) เปรียบเทียบกัน พบว่าให้ผลการเจริญในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อใกล้เคียงกัน และปริมาณที่เหมาะสมคือ 3 กรัมต่อลิตร แต่ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว การใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO จะทำให้เชื้อผลิตกรดมะนาวได้ดีกว่า เมื่อใช้ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง ตัวอย่างเช่น ที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ 1.0 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 135.70 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO และผลิตได้ 118.91 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ของ IBGE แต่เมื่อให้ระยะเวลาการหมักต่อไปถึง 120 ชั่วโมง กลับพบว่า ปริมาณกรดมะนาวที่ได้เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ทั้งสองชนิดใกล้เคียงกันมาก (ตารางที่ 19) การที่เป็นเช่นนี้ อาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากกรรมวิธีการผลิตแตกต่างกัน ซึ่งการผลิตสารสกัดจากยีสต์ของ IBGE นั้น หลังจากผ่านขั้นตอนการทำให้เข้มข้นแล้ว ก็นำมาพ่นให้แห้ง (Spray dry) เลย โดยไม่ได้ขจัดสารโมเลกุลใหญ่ออกก่อน ดังนั้นในสารสกัดจากยีสต์ของ IBGE

จึงอาจมีสารโมเลกุลใหญ่ เช่น โพลีเปปไทด์ อยู่ (จะสังเกตได้ว่าสารสกัดจากยีสต์ IBGE ละลายน้ำยากกว่าของ DIFCO) ทำให้ยีสต์ใช้ลำบาก จึงต้องใช้เวลานานกว่า แต่เนื่องจากสารสกัดจากยีสต์ของ DIFCO มีราคาแพงมาก จึงเลือกใช้สารสกัดจากยีสต์ของ IBGE ในการศึกษาต่อไป ในการทดลองนี้ยังได้แปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว พบว่าปริมาณที่เหมาะสมคือ 1.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ได้รายงานไว้

โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เป็นสารอีกชนิดหนึ่งที่จำเป็นสำหรับการผลิตกรดมะนาวแต่ต้องใช้ในปริมาณที่จำกัด (Kubicek and Rohr,1986) จากการทดลองพบว่า ปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมคือ 0.2 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดมะนาว 121.27 และ 146.37 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ระยะเวลาการหมัก 96 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ การเพิ่มปริมาณโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตจนถึง 0.5 กรัมต่อลิตร ไม่ทำให้ปริมาณกรดมะนาวที่ได้เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งแตกต่างจากผลที่ประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ได้รายงานไว้ กล่าวคือ การผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila C-73 นั้น หากใช้โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณสูงกว่า 0.2 กรัมต่อลิตร จะทำให้การผลิตกรดมะนาวลดลง

จากการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่ผ่านมา ได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila NN-39 ในระดับขวดเขย่า สรุปได้ดังนี้ อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ 1 ลิตร ประกอบด้วย กลูโคส 10.0 กรัม สารสกัดจากยีสต์ IBGE 3.0 กรัม สารสกัดจากมอลต์เกรดทางการค้าชนิดของเหลวข้นคิดเป็นน้ำหนักแห้ง 3.0 กรัม และ เปปโตน 5.0 กรัม ส่วนอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาว 1 ลิตร ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งอาจใช้ทั้งกาก หรือใช้เฉพาะส่วนใส โดยให้มีน้ำตาลกลูโคส 220.0 กรัม แอมโมเนียมคลอไรด์ 2.0 กรัม โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต 0.4 กรัม แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.3 กรัม สารสกัดจากยีสต์ IBGE 1.0 กรัม และแคลเซียมคาร์บอเนต OMEGA 120.0 กรัม เลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ด้วยภาวะดังกล่าวนี้ ในระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 121.27 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 68.00 และผลิตกรดมะนาวได้ 146.37 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตร้อยละ 71.47 เมื่อใช้เวลาการหมัก 120 ชั่วโมง ถึงแม้ว่าภาวะที่ได้จะทำให้การผลิตกรดมะนาวของเชื้อช้าลงไปบ้าง แต่ก็เหมาะสมเนื่องจากใช้สารที่มีราคาถูกลงมาก จึงมีความเป็นไปได้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม อีกทั้งปริมาณกรดมะนาวสูงสุดที่ได้ก็มากกว่าการใช้สูตรอาหารเดิมก่อนการปรับปรุง (ภาคผนวก ก2.1) เล็กน้อย ซึ่งสูตรเดิมนั้นให้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดประมาณ 141 กรัมต่อลิตร

หลังจากได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าแล้ว ในการทดลองต่อไปจึงศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ข้อมูลเบื้องต้นจากผลที่ได้ในระดับขวดเขย่า พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3.5 ลิตร เติมแคลเซียมคาร์บอเนต และน้ำตาลกลูโคสทั้งหมดตั้งแต่ต้น ควบคุมอัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm เชื้อผลิตกรดมะนาวได้ 124.67 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 355.93 กรัม ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 20.83 กรัมต่อลิตร การที่เชื้อผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณต่ำเช่นนี้ น่าจะเป็นผลมาจากความหนืดของน้ำหมัก ดังจะเห็นได้ว่าในช่วงแรก ๆ นั้น ปริมาณกรดมะนาวจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่หลังจากที่น้ำหมักหนืดมาก ๆ แล้วจะได้กรดมะนาวเพิ่มขึ้นน้อยมาก เนื่องจากออกซิเจนละลายได้น้อยลงทำให้เชื้อไม่ได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ และเชื้อไม่สามารถสัมผัสกับอาหารได้อย่างทั่วถึง ทำให้ผลผลิตที่ได้น้อยกว่าที่ควร ซึ่งสาเหตุหนึ่งของปัญหาความหนืดที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากแคลเซียมคาร์บอเนต ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงได้แบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเป็น 7 ครั้ง โดยควบคุมค่าความเป็นกรดด่างไว้ไม่ต่ำกว่า 5.00 พบว่าความหนืดของน้ำหมักลดลงเล็กน้อย และเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีขึ้น คือได้ 131.18 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 406.66 กรัม ซึ่งแม้ว่าจะสูงกว่าผลที่ได้ในครั้งแรกค่อนข้างมาก แต่ก็ยังไม่เป็นที่น่าพอใจ อีกทั้งน้ำหมักยังคงหนืดอยู่มาก และเนื่องจากสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (IBGE) ได้ทดลองผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila NNU-62 ในระดับถังหมัก โดยใช้สูตรอาหารที่มีปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต และแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต 0.2 และ 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาคผนวก ก 2.1) พบว่าน้ำหมักหนืดเพียงเล็กน้อย และเริ่มหนืดช้ามาก (ยังไม่ได้ตีพิมพ์) ซึ่งอาจเป็นเพราะสูตรอาหารที่ใช้แตกต่างกัน ดังนั้น จึงทดลองหมักโดยใช้สูตรอาหารเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้นของ IBGE แต่ผลที่ได้ก็ไม่ดีขึ้น กล่าวคือน้ำหมักยังคงหนืดมาก และได้กรดมะนาวเพียง 127.72 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดในถังหมักประมาณ 391.46 กรัมซึ่งน้อยกว่าการใช้สูตรเดิม แสดงว่าสูตรอาหารนี้เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila NN-39

นอกจากแคลเซียมคาร์บอเนตแล้ว สาเหตุอีกประการหนึ่งของปัญหาความหนืดที่เกิดขึ้นอาจเป็นเพราะยีสต์สร้างสารจำพวกโพลีแซคคาไรด์ (Phaff, Miller and Mrak, 1978) ซึ่งปัจจัยหนึ่งที่อาจส่งเสริมการสร้างโพลีแซคคาไรด์ของยีสต์คือ การที่อาหารมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงๆ จากการทดลองควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในน้ำหมักไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตรร่วมกับการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าน้ำหมักหนืดน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด และเริ่ม

หนืดช้าลงมาก คือประมาณชั่วโมงที่ 72 ได้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดถึง 152.63 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 459.42 กรัม สำหรับการหมักครั้งที่ 1 และได้กรดมะนาว 143.30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 443.51 กรัม สำหรับการหมักครั้งที่ 2 ซึ่งถือเป็นปริมาณที่ค่อนข้างน่าพอใจ และเมื่อทดลองควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 60 กรัมต่อลิตร ก็ได้ผลในลักษณะเดียวกัน โดยได้กรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 439.02 กรัม สำหรับการเจริญของเชื้อ พบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรกเชื้อสามารถเจริญอย่างรวดเร็วกว่าการหมักครั้งก่อน ๆ มาก เนื่องจากที่ความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำ ๆ นี้ เชื้อจะไม่ถูกยับยั้งการเจริญโดยปรากฏการณ์คาตาบอไลท์รีเพรสชัน ดังเช่นที่พบในกรณีที่ใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูง ๆ (Phaff, Miller and Mrak, 1978) นอกจากนี้ปรากฏการณ์ดังกล่าวยังส่งผลด้านลบต่อการทำงานของเอนไซม์ในวัฏจักรเครปส์ด้วย (Tabuchi and Igoshi, 1978) และผลนี้ก็อาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมากกว่าปริมาณที่ได้จากการเติมน้ำตาลทั้งหมดตั้งแต่ต้น

ในการทดลองต่อมา ได้ศึกษาผลของปริมาณน้ำที่เติมเพิ่มลงไปในถังหมักต่อการผลิตกรดมะนาวและความหนืดของน้ำหมัก ซึ่งมูลเหตุจูงใจของการทดลองนี้เนื่องจากการค้นพบว่า การแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตทำให้น้ำหมักหนืดน้อยลง การที่ความหนืดลดลงอาจเป็นผลจากปริมาณน้ำที่เติมเพิ่มลงไปพร้อมกับการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตก็ได้ จึงได้ทดลองเติมแคลเซียมคาร์บอเนตทั้งหมดตั้งแต่ต้น แต่เติมน้ำตามปริมาณและเวลาการเติมเช่นเดียวกับการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตรเช่นเดียวกัน แต่ผลที่ได้พบว่า น้ำหมักหนืดมาก และได้กรดมะนาวเพียง 125.55 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักเพียงประมาณ 390.46 กรัม แสดงว่า การแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีผลช่วยลดความหนืดของน้ำหมักลงได้จริง ไม่ใช่ผลจากการเติมน้ำเพิ่มลงไป แต่การแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นค่อนข้างยุ่งยากและเสียเวลา เนื่องจากไม่สามารถเติมแบบอัตโนมัติได้ ดังนั้น ต่อมาจึงได้ทดลองควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในน้ำหมักด้วยแคลเซียมออกไซด์เกรดทางการค้า โดยใช้การเติมแบบอัตโนมัติ ให้มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.50 ตลอดการทดลอง พบว่า น้ำหมักหนืดน้อยมากและเริ่มหนืดช้าลง ได้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง 129.99 และ 128.04 กรัมต่อลิตร สำหรับการหมักครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ แต่เนื่องจากการเติมแคลเซียมออกไซด์ทำให้น้ำหมักเจือจางลงมาก จึงต้องพิจารณาจากปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมัก ซึ่งได้ประมาณ 464.06 กรัม สำหรับการหมักครั้งที่ 1 และได้ 454.54 กรัม สำหรับการหมักครั้งที่ 2 นับว่าเป็นปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับผลจากการ

ทดลองอื่นๆในระดับถังหมักที่ผ่านมา ดังนั้น การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างด้วยแคลเซียมออกไซด์ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่อาจนำไปใช้ในระดับขยายส่วนได้

จากผลการทดลองทั้งหมดในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร จะเห็นความสัมพันธ์อย่างชัดเจน ระหว่างความหนืดของน้ำหมักและปริมาณกรดมะนาวที่ได้ กล่าวคือ หากในการทดลองใดน้ำหมักหนืดน้อย ก็จะได้ปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดในถังหมักมากกว่าในการทดลองที่น้ำหมักหนืดมากเสมอ จึงอาจสรุปได้ว่า ปัญหาสำคัญของการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila NN-39 คือเรื่องความหนืดของน้ำหมัก ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้พยายามหาทางแก้ไขมาเป็นลำดับ ดังที่กล่าวมาแล้ว และพบว่า ภาวะที่ทำให้น้ำหมักมีความหนืดต่ำ ได้ปริมาณกรดมะนาวมาก ได้แก่ การควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง โดยแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร่วมกับการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส หรือการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างด้วยแคลเซียมออกไซด์ร่วมกับการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส