บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในระดับขยายส่วน คือในถังหมักขนาด 30 และ 300 ลิตร โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้เป็นแนวทางการผลิตในระดับขยายส่วน ซึ่งในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรนั้น ประเสริฐ หาญเมืองใจ (2537) ได้ทำการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวไว้แล้ว ดังนั้นในขั้นแรก จึงได้ทำการทดลองผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารและภาวะการหมักของประเสริฐ (2537) แต่ได้ทำการปรับปรุงเล็กน้อยคือใช้สารสกัดจากยีสต์ที่ผลิตโดยสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย(IBGE) และแคลเซียมคาร์บอเนตใช้ในรูปเกรดทางการค้า (OMEGA) เนื่องจากการรายงานของเชาวรีย์ เรืองวิไลทรัพย์ (2539) พบว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ทั้งของเกรดทางห้องปฏิบัติการและเกรดทางการค้ามาเลี้ยงเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ และอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวนั้น ให้ผลการเจริญและการผลิตกรดมะนาวอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน อีกทั้งยังศึกษาชนิดของแคลเซียมคาร์บอเนตเกรดทางการค้าที่ผลิตในประเทศไทยที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวเทียบกับเกรดทางห้องปฏิบัติการ พบว่าสามารถผลิตกรดมะนาวได้ใกล้เคียงกัน ด้วยเหตุนี้จึงสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตได้อีกด้วย จากการทดลองผลิตกรดมะนาวเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3.5 ลิตร ทำการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต และน้ำตาลกลูโคสทั้งหมดตั้งแต่ต้น ควบคุมอัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้เพียง 117.54 กรัมต่อลิตร ที่ระยะการหมัก 96 ชั่วโมง คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 323 กรัม ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 19.14 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากการทดลองนี้ได้กรดมะนาวในปริมาณต่ำกว่าการทดลองของประเสริฐ (2537) ซึ่งสามารถผลิตกรดมะนาวได้ถึง 149.09 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 378.63 กรัม ที่ภาวะการหมักเดียวกัน การที่เชื้อผลิตกรดมะนาวได้ปริมาณต่ำเช่นนี้น่าจะเป็นผลมาจากความหนืดของน้ำหมัก ดังจะเห็นได้ว่าในช่วงแรก ๆ นั้นปริมาณกรดมะนาวจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

แต่หลังจากที่น้ำหมักหนืดมากๆจะทำให้การเพิ่มขึ้นของกรดมะนาวน้อยมาก เนื่องจากออกซิเจนละลายได้น้อยลง จึงไปส่งผลให้เชื้อไม่ได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ และเชื้อไม่สามารถ สัมผัสกับอาหารได้อย่างทั่วถึง ทำให้ผลผลิตที่ได้น้อยกว่าที่ควร ซึ่งสาเหตุหนึ่งของปัญหาความหนืดที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจาก แคลเซียมคาร์บอเนตที่ใส่ทั้งหมดตั้งแต่ต้น ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงได้ทำการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเป็น 7 ครั้ง โดยควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างไม่ให้ต่ำกว่า 5 พบว่าความหนืดของน้ำหมักลดลงเล็กน้อยและเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีขึ้นเล็กน้อยคือ 123.41 กรัมต่อลิตร ที่ระยะการหมัก 96 ชั่วโมง คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมักประมาณ 378.86 กรัมซึ่งปริมาณกรดมะนาวที่ได้ทั้งหมดนั้นเท่ากันกับการทดลองของประเสริฐ (2537) ถึงแม้ว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้จะให้ผลสูงกว่าผลที่ได้ในครั้งแรกค่อนข้างมาก แต่ก็ยังไม่เป็นที่น่าพอใจเนื่องจากน้ำหมักยังคงหนืดอยู่มาก จึงส่งผลให้เกิดอุปสรรคต่อการหมักในระดับถังหมักขนาดใหญ่ได้ พบว่านอกจากแคลเซียมคาร์บอเนตแล้วสาเหตุอีกประการหนึ่งของปัญหาความหนืดที่เกิดขึ้นอาจเป็นเพราะยีสต์สามารถสร้างสารจำพวกโพลีแซคคาไรด์ (Phaff, Miller and Mark, 1978) ซึ่งปัจจัยหนึ่งที่อาจส่งเสริมการสร้างโพลีแซคคาไรด์ของยีสต์คือ การที่อาหารมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูง ๆ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองโดยควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในน้ำหมักไว้ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าน้ำหมักมีความหนืดน้อยลงอย่างเห็นได้ชัดและเริ่มเกิดปัญหาของความหนืดช้าลงคือจะเริ่มหนืดประมาณชั่วโมงที่ 84 ของการหมัก ได้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุด 132.26 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังประมาณ 400 กรัม ถึงแม้ว่าการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร่วมกันกับการควบคุมระดับความเข้มข้นของน้ำตาลในถังหมักจะช่วยลดปัญหาความหนืดลงได้ก็ตาม แต่การแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตและการทำให้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้นก่อนนั้นค่อนข้างยุ่งยากและสิ้นเปลืองเวลา ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงทำการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำหมักด้วยแคลเซียมออกไซด์เกรดทางการค้า เพราะนอกจากการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นตัวควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างแล้วยังมีรายงานการใช้แคลเซียมออกไซด์ได้อีกด้วย จากการรายงานการวิจัยของ ประเสริฐ (2537) และ เชาวรีย์ (2539) พบว่าการใช้แคลเซียมออกไซด์แทนการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตสามารถให้ผลการผลิตกรดมะนาวค่อนข้างดี อีกทั้งแคลเซียมออกไซด์มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าแคลเซียมคาร์บอเนต จึงน่าจะช่วยลดปัญหาของความหนืดลงได้ ซึ่งการควบคุมจะทำการเติมแบบอัตโนมัติ ให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างไม่ต่ำกว่า 5.00 ตลอดการทดลอง (การเลือกควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.00 เนื่องมาจากค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์อยู่ในช่วงประมาณ 4.5-6.5)แต่เนื่อง

จากการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยระบบอัตโนมัติในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นไปได้ยากกว่าการควบคุมในระดับถังหมักขนาด 30 และ 300 ลิตร จึงทำให้ค่าการควบคุมที่ได้นั้นมีค่ามากกว่าที่ควบคุมไว้เล็กน้อย จากผลการทดลองพบว่าน้ำหมักมีความหนืดน้อยมาก และเริ่มหนืดช้าลง โดยปริมาณกรดมะนาวสูงสุดที่ระยะการหมัก 96 ชั่วโมงเป็น 111.51 กรัมต่อลิตร แต่เนื่องจากการเติมแคลเซียมออกไซด์ทำให้น้ำหมักเจือจางลงมาก ดังนั้นจึงต้องพิจารณาจากปริมาณกรดมะนาวที่เหลือทั้งหมดในถังหมักซึ่งได้ประมาณ 379 กรัมต่อลิตร นับว่าเป็นปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับผลการทดลองที่ผ่านมาแม้จะต่ำกว่าการทดลองที่มีการแบ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร่วมกันกับการควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลในถังหมักแต่ไม่มาก ดังนั้นการควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่าง ด้วยแคลเซียมออกไซด์จึงน่าจะเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักในระดับขยายส่วนได้ เนื่องจากเป็นภาวะที่ไม่ยุ่งยากและสามารถลดปัญหาของความหนืดซึ่งเป็นปัญหาสำคัญลงได้มากอีกทั้งยังให้ปริมาณกรดมะนาวในระดับที่น่าพอใจ

ถึงแม้ว่าการทดลองที่ผ่านมาสามารถได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาดใหญ่แล้ว แต่เมื่อกลับไปพิจารณาถึงอายุของหัวเชื้อที่ประเสริฐ (2537) ใช้นั้นจะใช้อายุของเชื้อที่ 15 ชั่วโมงซึ่งอยู่ในช่วงท้ายของการเจริญแบบทวีคูณและเริ่มเข้าสู่ระยะของการเจริญแบบคงที่ โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 7 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อมาพิจารณาในแง่ของค่าจลนพลศาสตร์ พบว่าอายุหัวเชื้อที่ 15 ชั่วโมงไม่ได้ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดคือได้ประมาณ 0.248 ชั่วโมง$^{-1}$ ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงทำการศึกษาอายุของหัวเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ พบว่ารูปแบบการเจริญของเชื้อนั้นสอดคล้องกับการทดลองของประเสริฐ (2537) และเมื่อมาคำนวนหาค่าทางจลนพลศาสตร์แล้ว พบว่าที่เวลา 9 ชั่วโมง เชื้อได้ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด คือได้ประมาณ 0.333 ชั่วโมง$^{-1}$ โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 3.33 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้นั้นจะน้อยกว่า การใช้อายุของหัวเชื้อที่ 15 ชั่วโมงซึ่งไม่ได้ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ดังนั้นในการทดลอง ต่อมาจึงทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อเมื่อให้น้ำหนักเซลล์แห้งต่างกันประมาณ 2 เท่า คือจะใช้หัวเชื้อที่อายุ 9 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด เทียบกับการใช้อายุของหัวเชื้อที่ 12 ชั่วโมง ซึ่งจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่าประมาณ 2 เท่า จากผลการทดลองพบว่า การใช้อายุของหัวเชื้อที่มีน้ำหนักเซลล์แห้งต่างกันประมาณ 2 เท่า ไม่ได้ทำให้ความสามารถในการเจริญและการผลิตกรดมะนาวต่างกันมากนักคือพบว่าในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 100.73 และ 102.92 กรัมต่อลิตร ของการใช้อายุหัวเชื้อที่ 9 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ

เนื่องจากอายุของหัวเชื้อที่ 9 ชั่วโมง ซึ่งให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดนั้นเซลล์จะมีกิจกรรมค่อนข้างสูงถึงแม้ปริมาณเซลล์ที่ได้จะไม่มากนัก ดังนั้นในการทดลองผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาดใหญ่จะใช้หัวเชื้อที่ 9 ชั่วโมงเป็นภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวต่อไปเนื่องจากไม่ได้ส่งผลให้การเจริญและความสามารถในการผลิตกรดมะนาวต่ำลงไป อีกทั้งยังช่วยลดเวลาการผลิตกรดมะนาวได้อีกด้วย สำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาดใหญ่นั้นจำเป็นต้องมีการเตรียมหัวเชื้อหลายขั้นตอนและมีการถ่ายเชื้อลงในถังหมักที่มีขนาดต่าง ๆ เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ให้มากขึ้นก่อนทำการถ่ายเชื้อลงในถังหมักที่ต้องการผลิต ซึ่งในการเตรียมหัวเชื้อหลายขั้นตอนอาจส่งผลให้กิจกรรมของเซลล์ลดต่ำลงได้และเนื่องจากสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต้องพิจารณาประสิทธิภาพของเชื้อคือต้องมีคุณสมบัติที่คงที่ ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงทำการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อเมื่อมีการถ่ายโอนเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเป็นจำนวน 9 ครั้ง โดยการวัดน้ำหนักเซลล์แห้งทุกครั้งหลังจากทำการถ่ายโอนเชื้อ พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้หลังจากทำการถ่ายโอนเชื้อเป็นจำนวน 9 ครั้งมีค่า ใกล้เคียงกันคือ จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นค่าเฉลี่ยประมาณ 5.55 กรัมต่อลิตร ดังนั้นแสดงว่าเชื้อ *Candida oleophila* C-73 เมื่อนำมาผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและต้องมีการถ่ายหัวเชื้อหลายๆ ขั้นตอนนั้นไม่ได้ส่งผลให้กิจกรรมของเซลล์ลดต่ำลงไป การผลิตกรดมะนาวในระดับอุตสาหกรรมนั้นนอกจากสายพันธุ์ของเชื้อจะต้องมีคุณสมบัติคงที่แล้วภาวะที่ใช้ในการผลิตจะต้องเป็นภาวะที่เหมาะสมด้วย จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าภาวะการหมักที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่างด้วยแคลเซียมออกไซด์เป็นภาวะที่เหมาะสมเนื่องจากสามารถลดปัญหาของความหนืดได้ แต่เมื่อมาพิจารณาถึงองค์ประกอบทางเคมีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตามภาวะของประเสริฐ (2537) แล้วส่วนมากเป็นเกรดทางห้องปฏิบัติการทั้งสิ้น ซึ่งต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศและมีราคาแพง ถึงแม้ว่าจะทำการปรับปรุงมาแล้วบ้างคือใช้สารสกัดจากยีสต์ที่ผลิตโดย (IBGE) และใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเกรดทางการค้า (OMEGA) ที่เป็นเกรดทางการค้า ซึ่ง เชาวรีย์ (2539) ได้เคยทำการศึกษามาแล้วว่ามีความแตกต่างกับเกรดทางห้องปฏิบัติการเล็กน้อยเมื่อมาทำการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* NN-39 แต่จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่ายังไม่เคยมีการศึกษาผลของการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต และ แมงกานีสซัลเฟต ซึ่งเป็นองค์ประกอบของอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่เป็นเกรดทางการค้าเทียบกับเกรดทางห้องปฏิบัติการมาก่อน ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงได้ทำการศึกษา

ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ *Candida oleophila* C-73 เมื่อมีการใช้สูตรอาหารที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางการค้าเทียบกับเกรดทางห้องปฏิบัติการในระดับขวดเขย่า ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้พบว่าเชื้อมีความสามารถในการเจริญและการผลิตกรดมะนาวใกล้เคียงกันคือที่ 96 ชั่วโมงของการหมักการใช้อาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางห้องปฏิบัติการจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่าการใช้อาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางการค้าเล็กน้อยคือได้ 20.22 และ 18.78 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณกรดมะนาวที่เชื้อสามารถผลิตได้นั้นพบว่าได้เท่ากับ 109.81 และ 108.25 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนจึงใช้อาหารที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางการค้าทั้งสิ้นเนื่องจากทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตได้มาก อีกทั้งยังไม่ได้ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อนั้นแตกต่างกันมากนัก นอกจากการเปลี่ยนสูตรอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีองค์ประกอบทางเคมีจากเกรดทางห้องปฏิบัติการมาเป็นเกรดทางการค้าจะสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตกรดมะนาวได้ทางหนึ่งแล้วพบว่าการปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อยังเป็นอีกทางหนึ่งที่สามารถลดต้นทุนการผลิตได้ เนื่องจากในการทดลองที่ผ่านมาพบว่าเชื้อ *Candida oleophila* C-73 นั้นสามารถเจริญและสามารถผลิตกรดมะนาวได้ดีเช่นกันเมื่อเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่เป็นเกรดทางการค้า ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงมีแนวคิดว่าอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวน่าจะปรับปรุงให้เป็นอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อได้แทนการใช้อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิม เนื่องจากในสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิมนั้นจำเป็นต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศและมีราคาแพง ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงทำโดยปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวโดยให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากันกับสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิม พบว่าจะต้องใช้สารสกัดจากยีสต์ 5.60 กรัมต่อลิตร และ แอมโมเนียมคลอไรด์ 2 กรัมต่อลิตรจึงทำให้สูตรอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวนั้นมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากันกับสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิม จากนั้นทำการติดตามการเจริญของเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงขึ้นใหม่ทุก ๆ 3 ชั่วโมงพบว่ารูปแบบการเจริญของเชื้อนั้นสอดคล้องกับการเจริญในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิม โดยที่ชั่วโมงที่ 9 ได้ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.356 ชั่วโมง$^{-1}$ แต่น้ำหนักเซลล์ที่ได้จะน้อยกว่าคือได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 2.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงขึ้นมาใหม่นั้นไม่มีองค์ประกอบของสารสกัดจากมอลต์ (ซึ่งในสารสกัดจากมอลต์จะมีน้ำตาลหลายชนิด (Stanbury and Whitaker, 1984) รวมทั้งโปรตีนและวิตามิน (Sikyta, 1983))กับเปปโตน ซึ่งทั้งสารสกัดจากมอลต์และเปปโตนเป็นแหล่งคาร์บอน

และแหล่งไนโตรเจนที่ช่วยส่งเสริมการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์นั้นเอง เนื่องจากน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงขึ้นใหม่นั้นมีค่าเท่ากับ 2.4 กรัมต่อลิตร ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตรเดิมมีค่าเป็น 3.3 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงทำการศึกษาประสิทธิภาพของหัวเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงขึ้นใหม่กับอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิมและนำมาเลี้ยงในอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่า ทำการเก็บตัวอย่างที่ 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่าความสามารถในการเจริญของเชื้อและการผลิตกรดมะนาวนั้นไม่แตกต่างกันมากนัก โดยที่การใช้อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อสูตรเดิมนั้นเชื้อจะให้ปริมาณกรดมะนาวที่มากกว่าเล็กน้อยทั้งในชั่วโมงการหมัก ที่ 96 และ 120 แต่อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงขึ้นใหม่มีราคาถูกกว่าจึงสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ จากการทดลองในระดับขวดเขย่าที่ผ่านมาพบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักที่มีขนาดใหญ่ คือการใช้อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ได้รับการปรับปรุงจากสูตรอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาว โดยใช้อายุหัวเชื้อที่ 9 ชั่วโมงซึ่งเป็นเวลาที่ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด และใช้สูตรอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวที่มีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางการค้า ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงทำการขยายส่วนการผลิตจากระดับขวดเขย่าเป็นระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยทำการหมักดังภาวะที่กล่าวมาแล้ว แต่มีข้อแตกต่างตรงที่จะใช้แคลเซียมออกไซด์เป็นตัวควบคุมค่าความเป็นกรด - ด่างแทนการใช้แคลเซียมคาร์บอเนต เนื่องจากการใช้แคลเซียมออกไซด์แทนการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตนั้นสามารถลดปัญหาของความหนืดได้เมื่อทำการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร (ดังที่ได้ทำการทดลองไว้ในช่วงต้น ๆ ของการทดลอง) โดยการเติมแบบอัตโนมัติและควบคุมไม่ให้มีค่าต่ำกว่า 5.00 ตลอดการทดลอง จากผลการทดลองพบว่าเชื้อมีการเจริญสูงสุดประมาณ 21.18 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณกรดมะนาวเป็น 94.91 กรัมต่อลิตรที่ระยะการหมัก 96 ชั่วโมงและเนื่องจากการเติมแคลเซียมออกไซด์ทำให้น้ำหมักเจือจางลงมาก จึงต้องพิจารณาปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังหมัก ซึ่งจะได้ประมาณ 310.83 กรัม จะสังเกตได้ว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้นั้นค่อนข้างต่ำ และมีปัญหาของความหนืดมากกว่าเมื่อเทียบกับการทดลองที่ซึ่งได้ใช้แคลเซียมออกไซด์เป็นตัวควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเช่นเดียวกัน เนื่องมาจากในการทดลองช่วงต้นของการทดลองได้ใช้อาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเป็นสูตรอาหารเดิมและอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวนั้นมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นเกรดทางห้องปฏิบัติการเป็นส่วนใหญ่จึงให้ปริมาณ กรดมะนาวที่ดีกว่าและทำให้น้ำหมักหนืดน้อยกว่า ซึ่งสาเหตุที่เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้น้อยประกอบกับมีปัญหาด้านความหนืดเกิดขึ้นระหว่างการหมัก อาจเกิดจาก

สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงขึ้นใหม่นั้นเป็นสูตรอาหารที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์จึงส่งผลให้กิจกรรมของเซลล์ที่มีต่อการผลิตกรดมะนาวนั้นลดต่ำลงไปซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ปรับปรุงขึ้นมาใหม่นั้นไม่มีองค์ประกอบของสารสกัดจากมอลต์ (ซึ่งในสารสกัดจากมอลต์จะมี น้ำตาลหลายชนิด รวมทั้งโปรตีน และวิตามิน) กับเปปโตน ซึ่งทั้ง สารสกัดจากมอลต์และเปปโตน เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ช่วยเสริมในการเจริญและการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ได้ ดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น ถึงแม้ว่าในการทดลองในระดับขวดเขย่าของการทดลองที่ผ่านมาจะไม่ได้ให้ผลที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนทั้งทางด้านปริมาณกรดมะนาวที่ได้และความหนืดที่เกิดขึ้น แต่เมื่อมีทำการขยายส่วนการผลิตจากระดับขวดเขย่าเป็นระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรพบว่าจะมีความแตกต่างทางด้านเทคนิคการให้อากาศ การกวน การทำให้น้ำหมักปลอดเชื้อ และชนิดของวัสดุที่ใช้จึงส่งผลให้เห็นความแตกต่างระหว่างความสามารถในการผลิตในระดับขวดเขย่ากับในระดับถังหมักได้อย่างชัดเจน ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาวของเชื้อเมื่อเปลี่ยนสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อจากสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ทำการปรับปรุงมาเป็นสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิม ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าการเปลี่ยนสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อจากที่ได้ทำการปรับปรุงมาเป็นสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเดิมนั้น เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ถึง 108.97 กรัมต่อลิตรที่ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง โดยคิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดในถังประมาณ 359.60 กรัม และได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเป็น 22.18 กรัมต่อลิตรที่ระยะการหมักเดียวกัน นอกจากนี้น้ำหมักมีความหนืดน้อยมาก โดยจะเริ่มหนืดเล็กน้อยที่ประมาณชั่วโมงที่ 96 ซึ่งเป็นชั่วโมง สุดท้ายของการหมัก จากผลที่เกิดขึ้นแสดงให้เห็นว่าสูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ถึงแม้ว่าความสามารถในการผลิตกรดมะนาวจะไม่ได้เท่ากับในภาวะที่ซึ่งใช้แคลเซียมออกไซด์เป็นตัวควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างดังที่ได้ทำมาแล้วในการทดลองครั้งแรก ๆ แต่ก็ไม่มากนัก อีกทั้งต้นทุนการผลิตของการทดลองในภาวะนี้ยังต่ำกว่ามาก เนื่องจากใช้อายุหัวเชื้อที่เวลา 9 ชั่วโมง ในขณะที่ในการทดลองในช่วงต้น ๆ ใช้อายุของหัวเชื้อ 15 ชั่วโมงและอาหารสำหรับผลิตกรดมะนาวในภาวะการหมักนี้มีองค์ประกอบเป็นเกรดทางการค้า ดังนั้นพบว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาดใหญ่ที่ไม่ส่งปัญหาในด้านความสามารถในการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อและปัญหาด้านความหนืดของน้ำหมัก นั้นเป็นภาวะที่ได้กล่าวมาแล้ว ด้วยเหตุนี้ในการทดลองต่อไปจึงนำภาวะการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรดังกล่าวมาทำการขยายส่วนในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตรต่อไป แต่เนื่องจากการ

ผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตรนั้น จำเป็นต้องทำการเตรียมหัวเชื้อ 2 ขั้นตอนคือ การใช้หัวเชื้อในระดับขวดเขย่ารูปชมพู่เป็นการเตรียมหัวเชื้อขั้นตอนที่ 1 โดยจะใช้อายุของหัวเชื้อที่ 9 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด และใช้หัวเชื้อในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร สำหรับเป็นการเตรียมหัวเชื้อขั้นตอนที่ 2 ดังนั้นจึงต้องทำการหาอายุของหัวเชื้อในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ก่อนการทำการผลิตในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร จากผลการทดลองพบว่ารูปแบบการเจริญของเชื้อในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรนั้นสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อในระดับขวดเขย่าและพบว่าที่ชั่วโมงที่ 4 นั้นมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด คือประมาณ 0.448 ชั่วโมง$^{-1}$ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 2.1 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร จะใช้หัวเชื้อที่มีอายุ 4 ชั่วโมง ของการเตรียมหัวเชื้อในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร หลังจากที่เราได้อายุของหัวเชื้อในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรแล้ว ต่อมาจึงทำการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตรโดยใช้ภาวะการหมักที่เหมาะสมในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร จากผลการทดลองพบว่าที่ระยะการหมัก 96 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 123 กรัมต่อลิตร คิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดในถังหมักได้ 2,932 กรัม และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเป็น 22.18 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้น้ำหมักมีความหนืดน้อยมากโดยจะเริ่มหนืดที่เวลา 96 ชั่วโมงของการหมัก ซึ่งจากการนำผลที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับการทดลองในถังหมักระดับ 5 ลิตรพบว่าความสามารถในการเจริญของเชื้อ และความสามารถในการผลิตกรดมะนาวนั้นจะสูงกว่า ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าการนำภาวะการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร มาใช้ในการขยายส่วนการผลิตในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร เป็นภาวะที่เหมาะสมเนื่องจากภาวะดังกล่าวไม่ได้ทำให้ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวนั้นต่ำลง อีกทั้งยังไม่ส่งปัญหาด้านความหนืดด้วย แต่เมื่อมาพิจารณาถึงอัตราการกวนที่ใช้ในภาวะการหมักนี้พบว่าจะต้องใช้ความเร็วรอบของการกวนที่ 600 รอบต่อนาทีตลอดการทดลอง ซึ่งถ้านำภาวะการหมักนี้ไปทำการผลิตในระดับถังหมักที่มีขนาดใหญ่ขึ้นอาจเกิดความเสียหายกับถังหมักได้เนื่องจากเป็นภาวะการหมักที่ค่อนข้างรุนแรง ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงภาวะการผลิตให้เหมาะสมสำหรับการผลิตเมื่อมีการขยายส่วนการผลิตอีกทั้งทำการศึกษาหาเกณฑ์ที่เหมาะสมเมื่อทำการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้น

เนื่องจากการขยายส่วนนั้นมีเกณฑ์ที่นิยมให้คงที่ในการขยายส่วนของเครื่องหมักแบบถังกวน ได้แก่ ค่าเรโนลนัมเบอร์ ค่าความเร็วรอบปลายใบพัด ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจน และค่าเวลาที่ใช้ในการกวนผสม แต่สำหรับการผลิตกรดมะนาวไม่มีรายงานที่ใช้กำหนดเป็นเกณฑ์ในการขยายส่วน ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงทำการผลิตกรดมะนาวโดยกำหนดเกณฑ์ต่อไปนี้ให้มีค่าคงที่ในถังหมักขนาด

5 ลิตร และ 30 ลิตร คือ ค่าเรโนลนัมเบอร์ ค่าความเร็วรอบปลายใบพัด ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมัก ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจน พบว่าเมื่อกำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์ ค่าความเร็วรอบของปลายใบพัด ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักของถังหมักขนาด 30 ลิตรมีค่าเท่ากันกับถังหมักขนาด 5 ลิตร จะให้ปริมาณกรดมะนาวในชั่วโมงที่ 96 ของการหมักนั้นต่ำกว่าการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ทั้งสิ้น โดยที่ภาวะการหมักที่กำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์คงที่นั้นเป็นภาวะที่ให้ปริมาณกรดมะนาวต่ำที่สุด เมื่อมาพิจารณาถึงค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักพบว่าภาวะการหมักนี้จะมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำหมักต่ำสุด ที่ชั่วโมง 24 ของการหมักเป็น 5 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว ซึ่งต่ำกว่าทุก ๆ ภาวะที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการขยายส่วนเช่นกัน จึงอาจเป็นสาเหตุให้ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวนั้นต่ำกว่าทุก ๆ ภาวะได้ เนื่องจากเมื่อมาพิจารณาการผลิตในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดมะนาวจะมีปริมาณออกซิเจนต่ำสุดเป็น 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว และที่ภาวะการหมักที่กำหนดให้ค่าเรโนลนัมเบอร์เป็นค่าคงที่ส่งผลให้มีปริมาณออกซิเจนละลายได้ต่ำสุดดังกล่าวเป็นผลมาจากการที่ใช้ความเร็วรอบของการกวนที่ไม่เหมาะสมคือใช้เพียง 300 รอบต่อนาทีในการกำหนดค่า 100 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว ในขณะที่การผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรใช้ความเร็วรอบถึง 600 รอบต่อนาที นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ต่ำสุดของการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวยังเป็นตัวบอกจุดวิกฤตของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักของเชื้อได้ ส่วนเกณฑ์การกำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรเท่ากันกับระดับถังหมักขนาด 30 ลิตรนั้นพบว่าไม่สามารถทำการทดลองได้เนื่องจากเมื่อทำการคำนวนให้ค่าอยู่ในรูปของอัตราการกวนแล้วจะให้ค่าที่ค่อนข้างสูงมากที่ซึ่งไม่สามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการผลิตในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตรได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าในการคำนวณเกณฑ์การขยายส่วนโดยให้สัมประสิทธิ์การถ่ายการเทออกซิเจนในถังหมักขนาด 5 ลิตร เท่ากันกับถังหมักขนาด 30 ลิตรนั้น เราได้ตั้งสมมุติฐานผิดไปจากความจริงคือ เราได้สมมุติฐานให้ถังหมักขนาด 5 ลิตรมีรูปร่างทางเรขาคณิตเหมือนกันกับถังหมักขนาด 30 ลิตร ซึ่งในความเป็นจริงถังหมักที่เราใช้ในการทดลองนั้นมีรูปร่างทางเรขาคณิตไม่เหมือนกัน เนื่องจากเราไม่ได้ทำการสร้างถังหมักเอง แต่ใช้ถังหมักที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการมาทำการทดลองตามทฤษฎี ดังนั้นจึงส่งผลให้ค่าการคำนวนที่ได้นั้นสูงเกินความเป็นจริง เนื่องจากการผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าจุดวิกฤตที่สำคัญในการขยายส่วนการผลิตนั้นมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเพียง 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัว

ประกอบกับอาจเป็นไปได้ว่าในการทดลองการหาค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนนั้นอาจเกิดจากการผิดพลาดขณะทำการวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักได้ จึงทำให้ค่าการคำนวณที่ออกมานั้นสูงเกินความเป็นจริง จากการกำหนดให้เกณฑ์การขยายส่วนต่าง ๆ คงที่นั้นไม่สามารถกำหนดเป็นเกณฑ์ที่ใช้ในการขยายส่วนการผลิตกรดมะนาวได้เนื่องจากให้ปริมาณกรดมะนาวที่ค่อนข้างต่ำ อีกทั้งยังส่งผลของปัญหาความหนืดเกิดขึ้นระหว่างการหมักด้วย ส่วนการหมักภายใต้ภาวะที่เหมือนกันกับถังหมักขนาด 5 ลิตรในการผลิตในถังหมักขนาด 30 ลิตร เป็นภาวะที่ให้ปริมาณกรดมะนาวที่ค่อนข้างสูงกว่าการหมักในภาวะการหมักที่มีการกำหนดเกณฑ์ในการขยายส่วน ดังนั้นที่ภาวะการหมักนี้น่าจะเป็นภาวะที่เหมาะสมในการขยายส่วน แต่เมื่อมาพิจารณาถึงภาวะที่จะนำไปใช้ในการขยายส่วนการผลิตเป็น 300 ลิตร พบว่าการใช้ความเร็วรอบถึง 600 รอบต่อนาทีตลอดการทดลองเป็นภาวะที่ค่อนข้างรุนแรงซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อถังหมักได้ เนื่องจากในการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนนั้นจะต้องคำนึงให้ภาวะการผลิตเหมาะสมทั้งทางกายภาพและชีวภาพ ดังนั้นด้วยเหตุนี้ในการทดลองต่อมาจึงทำการศึกษาผลิตกรดมะนาวในถังหมักขนาด 30 ลิตร โดยอาศัยภาวะการหมักเหมือนการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร และทำการพิจารณาถึงปัจจัยอื่น ๆ ร่วม ซึ่งพบว่าเมื่อมาพิจารณาการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร จะเห็นได้ว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักมีความสำคัญ โดยเฉพาะในชั่วโมงที่ 12 ของการหมักปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจะลดลงต่ำสุดแล้วจึงเพิ่มขึ้น ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักในปริมาณที่ต่ำสุดนี้มีค่าเท่ากับ 30 % ที่ซึ่งปริมาณออกซิเจนนี้น่าจะเป็นค่าที่พอเพียงต่อความต้องการของเชื้อที่สำหรับใช้ในการผลิตกรดมะนาวแล้ว เนื่องจากเมื่อทำการเลี้ยงต่อไปปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจะสูงขึ้นจนสิ้นสุดการหมัก ดังนั้นจึงทำการศึกษาความสามารถในการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ก่อนที่จะศึกษาในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร ในภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 30 % หลังจากทำการเลี้ยงไป 12 ชั่วโมง โดยควบคุมอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศเป็นไปตามอัตโนมัติ โดยใช้อัตราการกวนเริ่มต้น 600 รอบต่อนาที พบว่าที่ระยะการหมัก 96 ชั่วโมงเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 107.10 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดในถังหมักเท่ากับ 358.78 กรัม และเมื่อมาทำการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดมะนาวกับภาวะการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ซึ่งเป็นภาวะการหมักที่เหมาะสมดังข้างต้นแต่ไม่ได้ควบคุมปริมาณออกซิเจนแล้วพบว่าความสามารถในการผลิตกรดมะนาวนั้นใกล้เคียงกัน แต่เนื่องจากการทดลองนี้ได้ควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง จึงเป็นเหตุให้อัตราการกวนนั้นลดลงจาก 600 รอบต่อนาทีเหลือประมาณ

300 รอบต่อนาที ซึ่งทำให้สามารถลดพลังงานในการผลิตลงไปได้มากและนอกจากนี้ยังเป็นภาวะการหมักที่ไม่รุนแรงจึงไม่ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อถังหมักขนาดใหญ่ได้

แต่เนื่องจากในการทดลองการผลิตกรดมะนาวเมื่อกำหนดให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนเป็นค่าคงที่นั้น จำเป็นต้องหาค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนโดยวิธี Dynamic measurement พบว่าหลังจากที่ทำการปิดอากาศแล้วรอให้อากาศลดลงมาถึงประมาณ 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวนั้นจะต้องรีบทำการเปิดอากาศเข้าทันที เนื่องจากที่ 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวเป็นค่าวิกฤตของเชื้อ ซึ่งถ้าเราปล่อยให้ต่ำกว่านี้อากาศอาจไม่พอเพียงต่อการเจริญของเชื้อและอาจส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนนั้นคลาดเคลื่อนไปได้ แต่พบว่าหลังที่ทำการเปิดอากาศเข้าไปแล้วเปอร์เซ็นต์ออกซิเจนที่ละลายใน น้ำหมักยังคงลดลงมาเรื่อย ๆ จนถึงค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 15 % แล้วจึงค่อย ๆ เพิ่มขึ้น ซึ่งหลังจากที่ปริมาณออกซิเจนลดต่ำมาถึงค่าที่ 15 % เชื้อยังสามารถทำการทดลองต่อไปได้โดยไม่มีผลกระทบต่อเซลล์มากนัก จึงเป็นไปได้ว่าการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ 15 % อาจจะเพียงพอต่อความต้องการของเชื้อได้ ด้วยเหตุนี้ในการต่อมาจึงทำการผลิตกรดมะนาวเมื่อมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 15 % และ 23 %(ที่ซึ่งเป็นค่ากลางระหว่างปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % และ 15 %) จากผลการทดลองพบว่าการทำการควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 23 % และ 15 % นั้นจะให้ปริมาณกรดมะนาว และปริมาณเซลล์ค่อนข้างต่ำในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ทั้ง 2 ภาวะ ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากปริมาณออกซิเจนที่ทำการควบคุมตลอดการทดลองนั้นต่ำเกินไปกว่าค่าวิกฤตของเชื้อ จึงทำให้เชื้อใช้อากาศสำหรับกระบวนการเมตาบอลิซึมได้อย่างไม่เต็มที่ และทำให้กิจกรรมของเซลล์นั้นลดลงคือได้ส่งผลให้ความสามารถในการเจริญและการผลิตกรดมะนาวนั้นได้น้อย แต่จะเห็นได้ว่าเมื่อเราทำการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวนั้นไม่ได้ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวและความสามารถในการเจริญนั้นลดต่ำลงไปเลย ดังนั้นพบว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักนั้นมีความสำคัญต่อกิจกรรมของเซลล์ต่อการเจริญและการผลิตกรดมะนาว โดยถ้าปริมาณออกซิเจนต่ำไปกว่าค่าวิกฤตของเชื้อก็จะทำให้กิจกรรมของเชื้อนั้นต่ำลงไปด้วย จากผลการทดลองที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 30% , 23% และ15% ยังแสดงให้ทราบอีกว่าปริมาณออกซิเจนที่ต่ำที่สุดที่เชื้อสามารถเจริญและผลิตกรดมะนาวได้ดีคือปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % ซึ่งจุดนี้ยังเป็นจุดวิกฤตของเชื้อด้วย ดังนั้นในการทดลองมาจึงทำการผลิตกรดมะนาวเมื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไปแล้ว 12 ชั่วโมงในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตรต่อไป พบว่าหลังจากทำการหมักไป

96 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 91.69 กรัมต่อลิตรคิดเป็นกรดมะนาวทั้งหมดในถังเท่ากับ 2,292.2 กรัม ซึ่งเมื่อมาทำการเปรียบเทียบกับการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรแล้วพบว่าการนำภาวะการหมักในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 30 % นั้นมาใช้ในการผลิตในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตร ไม่ได้ทำให้ความสามารถในการผลิตกรดมะนาวนั้นแตกต่างกันมากนัก แต่ถึงอย่างไรเมื่อมาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดมะนาวกับภาวะการหมักในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตรที่มีภาวะเหมือนกับการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนจะให้ปริมาณกรดมะนาวที่ต่ำกว่า แต่เมื่อมาพิจารณาถึงภาวะการผลิตที่เหมาะสมในระดับที่มีขนาดใหญ่ขึ้นพบว่า ถึงภาวะการหมักเหมือนการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนจะให้ปริมาณกรดมะนาวที่ค่อนข้างสูง แต่ภาวะการหมักนั้นเป็นภาวะที่ต้องใช้อัตราการกวนที่ค่อนข้างสูงเช่นกัน ซึ่งอาจจะเกิดความเสียหายต่อถังหมักได้เมื่อมีการขยายส่วนการผลิตที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ในขณะที่ภาวะการหมักที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมงพบว่าความเร็วรอบของการกวนจะลดลงจาก 600 รอบต่อนาทีเหลือประมาณ 300 รอบต่อนาที ซึ่งอัตราการกวนที่ 300 รอบต่อนาทีเป็นภาวะการหมักที่ไม่รุนแรงจึงไม่ส่งผลเสียหายต่อถังหมักได้เมื่อทำการขยายส่วนการผลิตให้ใหญ่ขึ้น และยังสามารถลดพลังงานในการผลิตได้มากอีกด้วย จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าการเลือกภาวะการผลิตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาดใหญ่ ควรจะพิจารณาถึงภาวะการหมักที่เหมาะสมทั้งทางด้านชีวภาพและทางด้านกายภาพ โดยพบว่าภาวะการผลิตกรดมะนาวโดยการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง นั้นเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการขยายส่วนการผลิตทั้งทางกายภาพและทางชีวภาพ ดังนั้นในการทดลองต่อมา จึงนำภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาดใหญ่ดังกล่าวมาทำการผลิตในระดับถังหมักขนาด 300 ลิตรต่อไป แต่เนื่องจากการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 300 ลิตรนั้นจำเป็นต้องทำการเตรียมหัวเชื้อถึง 3 ขั้นตอนคือ การใช้หัวเชื้อในขวดรูปชมพู่เป็นการเตรียมหัวเชื้อขั้นตอนที่ 1 โดยจะใช้อายุหัวเชื้อที่ 9 ชั่วโมงและ ขั้นตอนที่ 2 คือใช้หัวเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยจะใช้อายุหัวเชื้อที่ 4 ชั่วโมง และในถังหมักขนาด 30 ลิตรเป็นการเตรียมหัวเชื้อขั้นตอนที่ 3 ดังนั้นจึงต้องหาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 30 ลิตร ก่อนทำการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 300 ลิตร จากผลการทดลองพบว่า พบว่ารูปแบบการเจริญนั้นสอดคล้องกับการศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อในระดับขวดเขย่าและระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยพบว่าที่ชั่วโมงที่ 4 ได้ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดคือประมาณ 0.579 ชั่วโมง$^{-1}$ ซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 2.53

กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 300 ลิตรจึงใช้อายุของหัวเชื้อที่ 4 ชั่วโมง ของการเตรียมในถังหมักขนาด 30 ลิตร

จากการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 30 ลิตรพบว่าภาวะการหมักที่ควบคุมปริมาณออกซิเจนเป็น 30 % หลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมงเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการขยายส่วนการผลิต ดังนั้นจึงนำภาวะดังที่ได้กล่าวมาแล้วมาทำการผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 300 ลิตร แต่เนื่องจากอัตราการกวนเริ่มต้นของการหมักนั้นจะต้องใช้อัตราการกวนที่ 600 รอบต่อนาที ที่ซึ่งเป็นอัตราการกวนเริ่มต้นที่ค่อนข้างสูง ถึงแม้ว่าความสามารถในการกวนในระดับถังหมักขนาด 300 ลิตร จะสูงสุดได้ถึง 800 รอบต่อนาที ดังนั้นจึงต้องทำการคำนวนความเร็วรอบเริ่มต้นใหม่ โดยในการคำนวนจะกำหนดให้อยู่ในรูปของอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรของน้ำหมักในถังหมักขนาด 300 ลิตรให้เท่ากันกับ ถังหมักขนาด 5 ลิตร แต่เนื่องจากเราไม่สามารถจะวัดกำลังของเครื่องได้โดยตรง อีกทั้งอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักนั้นจะเปลี่ยนแปลงตามความเร็วรอบของการกวน จึงทำการคำนวนให้อยู่ในรูปของการกวน ซึ่งจากการคำนวนพบว่าต้องใช้ อัตราการกวนเริ่มต้นเป็น 300 รอบต่อนาที ซึ่งพบว่าหลังจากที่เราทำการหมักไปถึงชั่วโมงที่ 96 ของการหมักเชื้อสามารถผลิตกรดมะนาวได้ 100.28 กรัมต่อลิตร คิดเป็นปริมาณกรดมะนาวทั้งหมดที่เหลือในถังประมาณ 23,064 กรัม และพบว่าหลังจากที่ทำการหมักไป 12 ชั่วโมงแล้วอัตราการกวนจะลดลงจาก 300 รอบต่อนาทีเหลือ ประมาณ 200 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นภาวะที่สามารถลดพลังงานในการผลิตไปได้มาก นอกจากนี้ยังไม่มีปัญหาทางด้านความหนืด ทำให้การเก็บเกี่ยวผลผลิตเป็นไปได้ง่าย

ดังนั้นจะได้ว่าในการขยายส่วนการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 จะทำการกำหนดให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักเป็นเกณฑ์ที่สำคัญสำหรับการขยายส่วนการผลิต โดยปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำหมักจะต้องควบคุมให้เป็น 30 % ของปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้อิ่มตัวหลังจากทำการหมักไป 12 ชั่วโมง และทำการผลิตร่วมกับการกำหนดให้ค่าอัตราส่วนระหว่างกำลังมอเตอร์ต่อปริมาตรน้ำหมักมีค่าเท่ากับถังหมักขนาด 5 ลิตร มีอัตราการให้อากาศเป็น 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที สำหรับผลการทดลองในเรื่องการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนโดยเชื้อ *Candida oleophila* C-73 ของงานวิจัยนี้ เชื่อว่าสามารถที่จะใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติได้จริงในระดับการหมักที่ใหญ่ขึ้นจนถึงในระดับอุตสาหกรรมได้ แต่เพื่อให้เกิดความแน่ชัดควรจะมีการทำการวิจัยการผลิตกรดมะนาวในระดับขยายส่วนที่มากกว่าถังหมักขนาด 300 ลิตรนี้ขึ้นไปอีก โดยใช้ข้อมูลจากการวิจัยนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทดลองขั้นต่อไป.