หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์

จากรายงานต่างๆที่รวบรวมโดย P.Kubicek และ Rohr[1] เกี่ยวกับการหมักเพื่อผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อจุลินทรีย์นั้นสรุปว่า กระบวนการผลิตกรดมะนาวจะประสบผลสำเร็จหรือไม่ขึ้นกับปัจจัยหลัก 2 ประการคือ 1) สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก 2) องค์ประกอบของอาหารและสภาวะที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสม ดังนั้นในการทดลองขั้นแรกจึงเป็นการคัดเลือกสายพันธุ์ของยีสต์ที่สามารถเติบโต และผลิตกรดมะนาวได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนอร์มัลพาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน ในกรณีที่เชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมีหลายสายพันธุ์ วิธีการที่ใช้ในการคัดเลือกจึงจำเป็นต้องเป็นวิธีการที่สามารถที่จะแยกเชื้อได้ครั้งละหลายๆสายพันธุ์ ดังนั้นในการทดลองขั้นต้นนี้จึงใช้วิธีการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารแข็งก่อน พบว่ายีสต์จำนวน 16 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 25 สายพันธุ์สามารถเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีนอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นแหล่งคาร์บอน(ตารางที่ 8) โดยสังเกตเห็นการเกิดเป็นโคโลนีของยีสต์ขึ้นหลังการถ่ายเชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงนำเชื้อทั้ง 16 สายพันธุ์ ดังกล่าวมาทำการคัดเลือกเพื่อหาสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดได้บนอาหารแข็งก่อน เป็นการคัดเลือกเชื้อแบบปฐมภูมิ เพื่อจะทำการคัดเลือกได้คราวละหลายๆสายพันธุ์ โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ J.W.Foster[57] ที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตกรดได้ จากผลการทดลองที่แสดงใน ตารางที่ 9 พบว่าเชื้อทั้ง 16 สายพันธุ์สามารถผลิตกรดได้ทั้งสิ้น โดยสังเกตเห็นการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์จากสีน้ำเงินอมฟ้าเป็นสีเหลืองรอบๆโคโลนีของยีสต์ แต่ขนาดของวงสีเหลืองรอบๆโคโลนีของยีสต์ทั้งหมดมีขนาดเล็ก แสดงให้เห็นว่าปริมาณกรดที่ผลิตขึ้นในสภาวะดังกล่าวข้างต้น(ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ) มีปริมาณต่ำซึ่งอาจเกิดขึ้นจากการที่เราไม่สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมในระหว่างการหมัก และนอกจากนั้นยังไม่สามารถบอกชนิดของกรดที่เกิดขึ้นได้อีกด้วย จากการศึกษาของ Rohr และคณะ [1] พบว่าการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดมะนาวโดยวิธีนี้มีข้อจำกัด อันเกิดขึ้นเนื่องจากแคทไอออนที่มีในอาหาร

เลี้ยงเชื้อ หรือจากกรดอินทรีย์จำพวกอื่นที่เป็นผลพลอยได้(by-product)เช่นกรดกลูโคนิค กรดออกซาลิก เป็นต้น ทำให้จำเป็นต้องมีการคัดเลือกซ้ำอีกที ดังนั้นการทดลองขั้นต่อไปจึงทำการคัดเลือกยีสต์ทั้ง 16 สายพันธุ์ อีกในอาหารเหลวสูตรเดียวกับอาหารแข็งแต่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวสะเทินกรดที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก และช่วยรักษาค่าความเป็นกรดด่างให้ไม่ต่ำกว่า 4.0 โดยจัดเป็นการคัดเลือกเชื้อแบบทุติยภูมิ ทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดมะนาวโดยวิธีเพนตาโบรโมอะซีโตน พบว่า (ตารางที่ 10) Candida oleophila C-73 ผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดคือ 29.5 หรือ 27.0 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนอร์มัล พาราฟฟินส์ หรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ การทดลองขั้นต่อไป จึงเป็นการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila C-73 ในระดับขวดเขย่า ซึ่งในการหมักเพื่อผลิตสารชนิดใดก็ตาม ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อนับว่า เป็นขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่ง โดยหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการหมักนั้นจะคำนึงถึงจำนวนของเซลล์ และรูปแบบการเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น ควรมีระยะพักตัว(lag phase)สั้น เป็นต้น[40]

จากการรวบรวมรายงานการผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัลพาราฟฟินส์โดยยีสต์สายพันธุ์ต่างๆนั้น พบว่า ขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อจะมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ในปริมาณต่างๆขึ้นกับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ โดยทั่วไปแล้วค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับยีสต์ในการเติบโต และการผลิตกรดมะนาวจะอยู่ในช่วง 4.5-6.5[1] ซึ่งเชื้อ Candida oleophila C-73 มีรูปแบบการเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตต่างๆกัน ดังแสดงในรูปที่ 8 แสดงว่าแคลเซียมคาร์บอเนตมีผลต่อการเติบโตของเชื้อ Candida oleophila C-73 โดยปริมาณที่เหมาะสมเท่ากับร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.10 เมื่อเพิ่มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตขึ้นเป็นร้อยละ 1.5 หรือ 2.0 พบว่าการเติบโตของเชื้อไม่เพิ่มขึ้นและกลับลดลงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1.0 ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าความเป็นด่างสูงขึ้นจากเดิมเล็กน้อย(7.18 และ 7.23 ตามลำดับ) ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเติบโตของ

ยีสต์ ดังนั้นในการเตรียมหัวเชื้อ Candida oleophila C-73 เพื่อการผลิตกรดมะนาว นั้นจะต้องเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร)ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย เมื่อศึกษาถึงผลของลักษณะการเขย่าให้อากาศแบบเส้นตรงเปรียบเทียบกับการเขย่าแบบวงกลม พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 ในอาหารสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ โดยการเขย่าแบบวงกลมจะมีการเติบโตสูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าแบบเส้นตรงเล็กน้อย ดังแสดงในรูปที่ 9 ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากอัตราการแลกเปลี่ยนออกซิเจนในระบบการเขย่าแบบวงกลม จะสูงกว่าการเขย่าแบบเส้นตรง[40] และนอกจากนั้นแล้ว การเขย่าแบบเส้นตรงยังมีข้อเสียอีกประการหนึ่งคือ นอร์มัล พาราฟฟินส์ที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำจะลอยอยู่ที่ผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเมื่อเขย่าให้อากาศแบบเส้นตรง จะเกิดการกระเด็นของนอร์มัลพาราฟฟินส์ไปเกาะติดตามผนังขวดได้มากกว่าการเขย่าแบบวงกลม ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อขั้นต่อไปคือ ความเร็วรอบในการเขย่า และอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ พบว่า ที่ความเร็ว 300 รอบต่อนาที(รูปที่ 10) และอุณหภูมิ 25 ° ซ.(รูปที่ 11) เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ เนื่องจากเป็นสภาวะที่เชื้อเติบโตได้ดีที่สุด ดังนั้นในการเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila C-73 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตกรดมะนาวจะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติม แคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 1.0(น้ำหนักต่อปริมาตร) เขย่าให้อากาศแบบวงกลมด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25° ซ. โดยใช้ระยะเวลานาน 36 ชั่วโมงก่อนถ่ายหัวเชื้อลงในอาหารสำหรับการผลิตกรดมะนาวขั้นต่อไป

ก่อนการศึกษาถึงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมนั้นจะมุ่งเน้นถึงสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวก่อน โดยพิจารณาถึงปัจจัยต่างๆคล้ายคลึงกับการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมหัวเชื้อ เริ่มต้นตั้งแต่ปัจจัยที่มีผลต่อการแลกเปลี่ยนออกซิเจนระหว่างอากาศกับอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ ลักษณะการเขย่าให้อากาศ และปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ รูปที่ 12 และรูปที่ 13 ตามลำดับ พบว่าการเขย่าให้อากาศแบบวงกลมและใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 12.5 มล. จะให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงกว่าการเขย่าให้อากาศแบบเส้นตรง และที่ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ ตามลำดับ จากผล

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟฟินส์ โดยเชื้อ Candida oleophila C-73 นั้นการให้อากาศมีผลต่อการผลิตกรดมะนาว ซึ่งตรงกับรายงานการวิจัยของ Tabuchi และ Hara[43] เกี่ยวกับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Saccharomycopsis lipolytica จากนอร์มัล พาราฟฟินส์โดยที่ การให้อากาศยิ่งสูง ผลผลิตกรดมะนาวจะเพิ่มมากขึ้นด้วย จากการศึกษาของ Hayaishi และคณะ[61] พบว่า การผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟฟินส์โดยเชื้อยีสต์นั้น ต้องการออกซิเจนปริมาณสูง เนื่องจากเมตาบอลิซึมของการย่อยสลายสารจำพวกนี้ จะต้องมีการนำเอาโมเลกุลของออกซิเจนเข้าไปในโมเลกุลของนอร์มัล พาราฟฟินส์ก่อน ซึ่งแหล่งของออกซิเจน 1 อะตอมนี้มาจากกาซออกซิเจนนั่นเอง ส่วนอีก 1 อะตอมที่เหลือจะรวมตัวกับไฮโดรเจนเกิดเป็นน้ำขึ้น โดยใช้เอ็นไซม์ที่เรียกว่า ออกซิจีเนส(Oxygense) กระบวนการย่อยสลายนอร์มัล พาราฟฟินส์ขั้นต่อไปแสดงในบทนำ(รูปที่ 2) นอกจากนี้แล้ว การใช้ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 12.5 มล.ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยที่สุด ยังมีผลในการทำให้ชั้นของนอร์มัล พาราฟฟินส์ที่เป็นสารแหล่งคาร์บอน และลอยตัวอยู่บนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อมีโอกาสสัมผัสกับเซลล์ของจุลินทรีย์ที่อยู่ในชั้นอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดียิ่งขึ้น ทำให้เซลล์จุลินทรีย์สามารถนำนอร์มัล พาราฟฟินส์ไปใช้ได้ดีขึ้นมาก และเมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตกรดมะนาว ดังแสดงใน รูปที่ 14 พบว่า ที่อุณหภูมิ 25° ซ.จะให้ปริมาณกรดมะนาวสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30°ซ 35° ซ ดังนั้นสภาวะที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟฟินส์โดยเชื้อ Candida oleophila C-73 จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 12.5 มล. และเลี้ยงเชื้อ โดยการเขย่าให้อากาศแบบวงกลมด้วยความเร็ว 300 รอบต่อนาที ซึ่งจากการทดลองขั้นต่อไปจะเป็นการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวในระดับขวดเขย่าต่อไป

องค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปคือ สารแหล่งคาร์บอน ในงานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นไปที่นอร์มัล พาราฟฟินส์ ซึ่งได้รับความเอื้อเฟื้อจากบริษัท Exxon Chemicals จำกัด ซึ่งมีด้วยกัน 3 ชนิดคือ Exxpar 25-D Exxpar 35-D และ Exxpar-451(มีองค์ประกอบแตกต่างกันดังแสดงในภาคผนวกที่ 5) จากผลการทดลอง ตารางที่ 20 พบว่า นอร์มัล พาราฟฟินส์ ซึ่งเชื้อ Candida oleophila C-73 สามารถใช้ได้ดี คือ Exxpar

451 ซึ่งเป็นนอร์มัล พาราฟฟินส์ที่มีจำนวนคาร์บอนระหว่าง 14-17 อะตอม ความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร)โดยจะให้ปริมาณกรดมะนาว 63.0 กรัมต่อลิตร หลังการเลี้ยงเชื้อนาน 7 วัน ซึ่งตรงกับรายงานการวิจัยของ Furukawa และคณะ[20] พบว่านอร์มัล พาราฟฟินส์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวมีจำนวนคาร์บอนเท่ากับ 14-15 อะตอม โดยนอร์มัลพาราฟฟินส์ที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมต่ำ จะมีคุณสมบัติของตัวทำละลายมากเกินไป ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการเติบโต และการผลิตกรดมะนาวของเชื้อจุลินทรีย์ จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มปริมาณนอร์มัล พาราฟฟินส์ขึ้นมากกว่าร้อยละ 10 เป็นร้อยละ 12 ผลผลิตกรดมะนาวกลับลดลงจากเดิมร้อยละ 77.0 เหลือ 73.0 (ตารางที่ 11) เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila C-73 จากสารแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นเปรียบเทียบกับนอร์มัล พาราฟฟินส์ (ตารางที่ 12) พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตเป็นสารแหล่งคาร์บอน Candida oleophila C-73 สามารถใช้ได้เฉพาะน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเท่านั้น คือ กลูโคส กาแลคโตส หรือฟรุคโตส รวมทั้งแป้งที่ย่อยแล้ว(ภาคผนวกที่ 3) ซึ่งจะได้น้ำตาลรีดิวซ์มากถึงร้อยละ 64.3 แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น มอลโตส(กลูโคส+กลูโคส) แลคโตส(กลูโคส+กาแลคโตส) หรือ ซูโครส(กลูโคส+ฟรุคโตส) หรือคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างซับซ้อน เช่น แป้งละลายน้ำ จึงไม่พบทั้งการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวเลย แสดงให้เห็นว่า Candida oleophila C-73 ขาดระบบเอ็นไซม์ที่จะใช้ในการย่อยสลายพันธะที่จับระหว่างน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดต่างๆข้างต้น ได้แก่ พันธะ $\alpha(1\text{--}2)$ ที่จับระหว่างกลูโคส และฟรุคโตส เกิดเป็นซูโครส หรือ พันธะ $\beta(1\text{--}4)$ที่จับระหว่างกาแลคโตสกับกลูโคส เกิดเป็นแลคโตส เป็นต้น[60] หรือเกิดขึ้นจากการที่ Candida oleophila C-73 ขาดระบบการขนส่งน้ำตาลโมเลกุลคู่เข้าสู่เซลล์ ทำให้เซลล์ขาดแหล่งของคาร์บอนที่จะนำไปใช้ในการเติบโตและการผลิตกรด ส่วนสารแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นที่ไม่ใช่สารจำพวกคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ กลีเซอรอล น้ำมันถั่วเหลือง หรือ นอร์มัล พาราฟฟินส์ เป็นสารที่มีคาร์บอนต่อหนึ่งหน่วยน้ำหนักของสารมากกว่าในสารแหล่งคาร์บอนจำพวกน้ำตาลเพราะฉะนั้น ถ้าใช้โดยเทียบจากน้ำหนักที่เท่ากันของสารแหล่งคาร์บอนแล้ว นอร์มัล พาราฟฟินส์ซึ่งเป็นสารอินทรีย์จำพวกนอร์มัล อัลเคนส์(C_nH_{2n+2}) จึงน่าจะให้ผลผลิตกรด

มะนาวต่อกรัมของสารแหล่งคาร์บอนมากกว่าสารจำพวกอื่น[1] ซึ่งจากการทดลองในตารางที่ 12 พบว่าเมื่อใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์ความเข้มข้นร้อยละ 10 จะให้ผลผลิตกรดมะนาว (63.0 กรัมต่อลิตร) สูงกว่าเมื่อใช้สารแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆที่ความเข้มข้นเท่ากันจริง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสหรือน้ำตาลรีดิวซ์ในแป้งที่ย่อยแล้วมากขึ้นกว่าร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดังแสดงในตารางที่ 13 จะเห็นว่าผลผลิตกรดมะนาว (เทียบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ไป) จะสูงขึ้นเท่ากับร้อยละ 54.7 สำหรับกลูโคส หรือร้อยละ 52.5 สำหรับแป้งที่ย่อยแล้ว แต่ก็ยังคงต่ำกว่าผลผลิตกรดมะนาวที่ได้จากการใช้นอร์มัล พาราฟฟินส์ความเข้มข้นร้อยละ 10 (ผลผลิตกรดมะนาวเท่ากับร้อยละ 77.0) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่านอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นสารแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila C-73

โดยทั่วไป การผลิตกรดมะนาวโดยใช้จุลินทรีย์นั้น สารแหล่งไนโตรเจนที่ใช้โดยทั่วไปมักจะเป็นสารอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ โดยเฉพาะพวกเกลือแอมโมเนียม เช่น แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นต้น ซึ่ง Christian P.Kubicek and M.Rohr[1] รายงานถึงประโยชน์ของการใช้สารอนินทรีย์ไนโตรเจนดังกล่าวว่า ในขณะที่เชื้อจุลินทรีย์ มีการใช้สารประกอบไนโตรเจน จะมีโมเลกุลของสารตัวอื่นนอกเหนือไปจากแอมโมเนียมอิออน เกิดขึ้นควบคู่ด้วยกันเสมอ โดยสารดังกล่าวจะไปทำหน้าที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะมีผลต่อกระบวนการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อจุลินทรีย์ด้วย มีรายงานว่าความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงร้อยละ 0.05-0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)[1,8,24] ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับผลการทดลอง (รูปที่ 19) เมื่อใช้เชื้อ Candida oleophila C-73 ผลิตกรดมะนาวโดยใช้อินทรีย์ไนโตรเจนเปรียบเทียบกับการใช้อนินทรีย์ไนโตรเจน พบว่า ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนจะสูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน พบว่า ปริมาณกรดมะนาวสูงสุด (เท่ากับ 78.0 กรัมต่อลิตร) ได้จากเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยมีแอมโมเนียมไนเตรตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (เท่ากับปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 0.07) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมไนเตรตขึ้นมากกว่านี้ การเติบโตของเชื้อจะเพิ่มมากขึ้นแต่ปริมาณการผลิตกรดมะนาวกลับลดลง (ตารางที่ 14) Marchal และ

คณะ [42] ศึกษาถึงผลของสารแหล่งไนโตรเจน ต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ โดยที่การผลิตกรดมะนาวจะสูงขึ้นในช่วงหลังจากการใช้สารแหล่งไนโตรเจนหมด ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องมีการจำกัดสารแหล่งไนโตรเจนให้พอเหมาะ สำหรับการนำไปสร้างเซลล์ในช่วงแรกของการหมักเท่านั้น

ส่วนผลของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการผลิตกรดมะนาว และการเติบโต (รูปที่ 20) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0.01 (น้ำหนักต่อปริมาตร)จะให้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 99.0 กรัมต่อลิตร หลังการหมักนาน 6 วัน แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตมากขึ้น ปริมาณกรดมะนาวจะลดลงในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งกลับเพิ่มสูงขึ้น Furukawa และ คณะ[20] รายงานว่า สารอินทรีย์ฟอสเฟตจะเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวมากกว่าสารอินทรีย์ฟอสเฟต โดยปริมาณที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงร้อยละ 0.01-0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร)[41] ซึ่งผลของฟอสเฟตต่อการผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟฟินส์โดยยีสต์นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ทราบแต่เพียงว่า ฟอสฟอรัสเป็นสารสำคัญตัวหนึ่งในกลไกควบคุมการสร้างสารเมตาบอไลต์แบบทุติยภูมิ (secondary metabolite)[1]และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกรดนิวคลีอิค นิวคลีโอไทด์ชนิดต่างๆ และสารจำพวกฟอสฟอไลปิด ดังนั้นถ้าปริมาณของฟอสฟอรัสสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้มีการดึงเอานอร์มัลพาราฟฟินส์ไปใช้ในการสร้างเซลล์มากขึ้น ปริมาณกรดมะนาวจะลดลง

นอกจากสารแหล่งคาร์บอน สารแหล่งไนโตรเจน และโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวอีก ได้แก่ แมกเนเซียมโดยจะใช้ในรูปของแมกเนเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ซึ่งจากรายงานการศึกษาผลของแมกเนเซียม พบว่า แมกเนเซียมเป็นโคแฟคเตอร์ของเอ็นไซม์หลายชนิด ได้แก่ เอ็นไซม์ไคเนส เอ็นไซม์เอทีพีเอส (ATPase) เป็นต้น[33] ซึ่งจากผลการทดลองรูปที่ 21 พบว่า แมกเนเซียมมีผลต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาว โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแมกเนเซียมเลย การเติบโต และการผลิตกรดมะนาวจะต่ำสุด(70.5 กรัมต่อลิตร) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณแมกเนเซียมขึ้น การผลิตกรดมะนาวและการเติบโตจะสูงเพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อปริมาตร)จะ

ให้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเท่ากับ 99.0 กรัมต่อลิตร หลังการเลี้ยงเชื้อนาน 6 วัน แต่เมื่อเพิ่มปริมาณแมกเนเซียมขึ้นมากกว่าร้อยละ 0.05(น้ำหนักต่อปริมาตร)ปริมาณกรดมะนาวจะลดลง แต่การเติบโตของเชื้อ Candida oleophila C-73 ยังคงเพิ่มขึ้น

จากรายงานการวิจัยต่างๆ ได้แก่ P.Kubicek และM.Rohr[1]หรือ P.E.Misom และ Meer[2] เป็นต้น พบว่าการผลิตกรดมะนาวโดยวิธีการหมักโดยใช้เชื้อรานั้น ปริมาณของอิออนโลหะหนัก 4 ชนิด คือ Fe^{2+} Mn^{2+} Cu^{2+} และ Zn^{2+} มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวอย่างมาก ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องมีการควบคุมปริมาณอิออนของโลหะทั้ง 4 ชนิดนี้อย่างมากโดยปริมาณที่เหมาะสมของอิออนแต่ละชนิดจะขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ และการเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่สามารถทนต่ออิออนโลหะหนักเหล่านี้ได้ดี ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาถึงผลของอิออนโลหะหนักทั้ง 4 ชนิดนี้ด้วย จากผลการทดลอง พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมอิออนของโลหะหนักชนิดใดเลย ปริมาณกรดมะนาวที่ผลิตได้โดยเชื้อ Candida oleophila C-73จะต่ำสุด(90.0 กรัมต่อลิตร) แต่เมื่อมีการเติมเกลือซัลเฟตของโลหะหนักลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทีละชนิด พบว่า ปริมาณของเกลือซัลเฟตของโลหะหนักที่เหมาะสมจะแตกต่างกันออกไป คือ แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ 0.02 (น้ำหนักต่อปริมาตร)ในรูปที่ 22 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตาไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ $5x10^{-3}$(น้ำหนักต่อปริมาตร)ในรูปที่ 23 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ $1.0x10^{-2}$ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในรูปที่ 24 หรือ ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ 0.02(น้ำหนักต่อปริมาตร)ในรูปที่ 25 โดยให้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเมื่อเติมสารข้างต้นทีละชนิดคือ 120.0 กรัมต่อลิตร 96.0 กรัมต่อลิตร 96.0 กรัมต่อลิตร หรือ 99.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของเกลือซัลเฟตของโลหะแต่ละชนิดขึ้น ปริมาณกรดมะนาวจะลดลง โดยปกติแล้วอิออนของโลหะมักจะทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ของเอ็นไซม์ชนิดต่างๆ ในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น Zn เป็นโคแฟคเตอร์ของเอ็นไซม์อัลกอฮอลดีไฮโดรจีเนส คาร์บอกซิเปปทิเดส(carboxy peptidase) Fe เป็นโคแฟคเตอร์ของเอ็นไซม์แคทาเลส (catalase) เปอร์ออกซิเดส(peroxydase) ไนโตรจีเนส(nitrogenase) ไซโตโครม(cytochrome) Cu เป็นโคแฟคเตอร์ของเอ็นไซม์ ไซโตโครมซีออกซิเดส อะมิโนออกซิเดส Mn

เป็นโคแฟคเตอร์ของเอ็นไซม์ ซิตริกซินทีเตส[33] ซึ่งความต้องการอิออนของโลหะหนักแต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป เช่น แมงกานีสจะมีผลต่อการยับยั้ง หรือลดปริมาณการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger[1] แต่การผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟฟินส์โยยีสต์นั้น กลับพบว่ายีสต์บางสายพันธุ์ต้องการแมงกานีสในปริมาณที่ค่อนข้างสูง เช่น จากรายงานผลการทดลองของ H.Hustede et al.[24,25] พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ Candida oleophila นั้นต้องการใช้แมงกานีสซัลเฟตเตตาไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ 0.025 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการวิจัยนี้เช่นกัน ส่วนผลของเฟอร์รัสซัลเฟตนั้น จากรายงานการวิจัยของ Marchal and Metche[42] และ Tabuchi and Hara[43] พบว่า เมื่อปริมาณของเฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตาไฮเดรตเพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 0.04 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ผลผลิตกรดมะนาวจะลดลงจากเดิมถึงร้อยละ 30 เนื่องจากเมื่อปริมาณของเฟอร์รัสอิออนเพิ่มขึ้น กิจกรรมของเอ็นไซม์อะโคนิเตรสจะเพิ่มมากขึ้นด้วย ทำให้ปริมาณกรดมะนาวลดลง แต่สำหรับเชื้อ Candida oleophila C-73 เมื่อมีการเพิ่มปริมาณเฟอร์รัสซัลเฟตมากขึ้นถึงร้อยละ 0.04(น้ำหนักต่อปริมาตร) กรดมะนาวจะลดลงจากเดิมเพียงร้อยละ 10 เท่านั้น อันเป็นผลมาจากการที่เชื้อสายพันธุ์นี้เป็นเชื้อที่มีการทำให้กลายพันธุ์ และคัดเลือกโดยมีระดับกิจกรรมของเอ็นไซม์อะโคนิเตรสต่ำๆ ทำให้มีความทนต่ออิออนของเฟอร์รัสได้มากขึ้น ส่วนผลของคอปเปอร์อิออนนั้น จากรายงานการวิจัยของ T.Furukawa and K.Yamada[20] พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับคอปเปอร์ซัลเฟตเท่ากับร้อยละ $1x10^{-4}$(น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อเพิ่มปริมาณของคอปเปอร์ซัลเฟตมากขึ้นการเติบโตของเชื้อ Candida critica จะเพิ่มมากขึ้นแต่ปริมาณกรดมะนาวจะลดลงกว่าเดิม ซึ่งกลไกการควบคุมยังไม่มีใครทราบแน่นอน เช่นเดียวกับผลของซิงค์ซัลเฟตต่อการผลิตกรดมะนาวโดยยีสต์ ซึ่งเชื้อ Candida oleophila C-73 มีความต้องการปริมาณคอปเปอร์ซัลเฟตต่ำ(ร้อยละ $5x10^{-4}$) นอกจากนั้นแล้วเมื่อเพิ่มปริมาณของคอปเปอร์ซัลเฟตมากกว่านี้แล้ว การผลิตกรดมะนาวจะลดลงในขณะที่การเติบโตจะเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกับเชื้อ Candida critica เมื่อได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของอิออนของโลหะหนักแต่ละชนิดแล้ว การวิจัยขั้นต่อไปจึงเป็นการศึกษาถึงผลของอิออน

เมื่อนำมาผสมรวมกันมากกว่า 1 ชนิดขึ้นไป พบว่า (ตารางที่ 15) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตเพียงชนิดเดียวจะให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุด คือ 120.0 กรัมต่อลิตรหลังการเลี้ยงเชื้อนาน 6 วัน แต่เมื่อใดที่มีการเติมเกลือซัลเฟตของโลหะหนักมากกว่า 1 ชนิดแล้ว ผลผลิตกรดมะนาวจะลดลง ซึ่งผลการทดลองนี้อาจเกิดขึ้นจากการที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมสำหรับการผลิตกรดมะนาวมีการปนเปื้อนของอิออนของโลหะหนักเหล่านี้มากพอ โดยไม่ต้องมีการเติมสารเหล่านี้เพิ่มอีก และอิออนของโลหะหนักชนิดอื่นนอกเหนือจากแมงกานีส คือ คอปเปอร์ ซิงค์ เฟอร์รัสอิออน มีผลกระทบต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อ Candida oleophila C-73 ค่อนข้างต่ำ เมื่อพิจารณาถึงรูปแบบการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวของเชื้อสายพันธุ์นี้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมเกลือโลหะหนักชนิดใดเลย(รูปที่ 26) เปรียบเทียบกับเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตเท่ากับร้อยละ 0.02 พบว่าลักษณะการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวจะมีรูปแบบที่คล้ายคลึงกัน คือ เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 4 วัน การเติบโตของเชื้อ Candida oleophila C-73 ค่อนข้างจะคงที่ แต่การผลิตกรดมะนาวยังคงดำเนินต่อไปจนได้ผลผลิตกรดมะนาวสูงสุดในวันที่ 6 หลังการเลี้ยงเชื้อ แต่จะสังเกตว่าปริมาณนอร์มัล พาราฟฟินส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมแมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรตจะถูกใช้ไปเร็วกว่า และถูกใช้หมดไป ภายหลังการหมักนาน 6 วัน ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมอิออนของโลหะหนักจะมีนอร์มัล พาราฟฟินส์เหลืออยู่เท่ากับ 18.7 กรัมต่อลิตร

การผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟฟินส์โดยวิธีการหมักในอาหารเหลวนั้น พบว่าจะต้องมีการเติมสารที่ช่วยเสริมการเติบโต หรือวิตะมินบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย จากรายงานการวิจัยต่างๆพอจะสรุปถึงสารดังกล่าวได้เป็นดังนี้คือ T.Furukawa et al.[20] ใช้สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.03(น้ำหนักต่อปริมาตร) ในการเลี้ยงเชื้อ Candida citrica H.Hustede and D.Siebert[24,25] ใช้คอร์นสตีปลิเคอร์ชนิดผงความเข้มข้นร้อยละ 0.05(น้ำหนักต่อปริมาตร) ในการเลี้ยงเชื้อ Candida oleophila S.Akiyama and T.Suzuki[20,21] ใช้ไธอะมีนไฮโรคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ $5x10^{-6}$ (น้ำหนักต่อปริมาตร)ในการเลี้ยงเชื้อ Candida lipolytica

S-22 เป็นต้น ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาแหล่งของสารที่ช่วยเสริมการเติบโตชนิดต่างๆ ทั้งในรูปของสารประกอบเชิงซ้อน เช่น สารสกัดจากยีสต์ เป็นต้น จากผลการทดลองในตารางที่ 16 พบว่าการผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟฟินส์โดยใช้ Candida oleophila C-73 จำเป็นต้องมีการเติมสารช่วยเสริมการเติบโตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสังเกตได้จากการที่ชุดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมทั้งสารสกัดจากยีสต์ หรือ ไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์เลย ปริมาณกรดมะนาวจะลดลงต่ำที่สุด คือเท่ากับ 54.0 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับน้ำหนักเซลล์แห้ง(9.6 กรัมต่อลิตร) แต่เมื่อมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้ผลผลิตกรดมะนาวเท่ากับเมื่อเติมทั้งสารสกัดจากยีสต์ และไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 0.1 และ $1.0x10^{-4}$(น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ คือ เท่ากับ 120.0 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเติมเฉพาะไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ $1x10^{-4}$ ปริมาณกรดมะนาว(60.0 กรัมต่อลิตร) จะสูงกว่าเมื่อไม่มีการเติมสารใดๆเลยเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ หรือ ไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้น ต่อการเติบโตและการผลิตกรดมะนาว รูปที่ 28 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มปริมาณไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์ขึ้นจากเดิมร้อยละ $1.0x10^{-4}$ จนถึงความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ $1.0x10^{-3}$(น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณกรดมะนาวจะเพิ่มขึ้นเป็น 87.0 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อพิจารณาถึงผลของการเติมสารสกัดจากยีสต์ พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้ผลผลิตสูงที่สุด (120 กรัมต่อลิตร) เมื่อเพิ่มปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ขึ้น การผลิตกรดมะนาวจะเริ่มลดลง แต่การเติบโตของเชื้อ Candida oleophila C-73 จะเพิ่มมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 29 ดังนั้นแสดงว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเฉพาะสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 0.1 ก็เพียงพอสำหรับการใช้เป็นสารช่วยเสริมการเติบโต ดังนั้นถ้าลองเปรียบเทียบกับการเติมคอร์นสตีปลิเคอร์แทนสารสกัดจากยีสต์ ในปริมาณต่างๆกัน พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของคอร์นสตีปลิเคอร์เท่ากับร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะให้ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดเพียง 111 กรัมต่อลิตร ซึ่งยังต่ำกว่าปริมาณกรดมะนาวที่ได้จากการเติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 0.1 เป็นที่รู้กันทั่วไปว่าคอร์นสตีปลิเคอร์เป็นผลพลอยได้จากการผลิตแป้ง

ข้าวโพด ซึ่งองค์ประกอบต่างๆจะแปรผันขึ้นลงตามสภาพวัตถุดิบอย่างมาก[40] ทำให้ยากต่อการควบคุมรวมทั้งปริมาณโลหะหนักด้วย ดังนั้นในการผลิตกรดมะนาวส่วนใหญ่จึงนิยมใช้สารสกัดจากยีสต์มากกว่าการใช้คอร์นสตีปลิเคอร์ เป็นสารช่วยเสริมการเติบโต

การผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟฟินส์โดยวิธีการหมักโดยใช้ยีสต์ในระดับขวดเขย่านั้น การควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง สามารถทำได้เพียงวิธีเดียวคือ การเติมสารที่ทำหน้าที่ เป็นตัวสะเทิน(neutralizer)กรดที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก โดยทั่วไปแล้วจากการรวบรวมรายงานการวิจัยของนักวิจัยส่วนใหญ่ พบว่าจะใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นตัวสะเทินกรดที่เกิดขึ้นทั้งสิ้น โดยอาศัยคุณสมบัติทางเคมีเกี่ยวกับการละลายของแคลเซียมคาร์บอเนต จะมีที่แตกต่างกันก็คือ การใช้ปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง เช่น Candida oleophila[23,24] จะใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเท่ากับร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) Arthrobacter paraffineus[18] ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเท่ากับร้อยละ 5.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นต้น ซึ่งจากผลการทดลองใน ตารางที่ 17 พบว่า ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสมสำหรับการใช้สะเทินกรดที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักของเชื้อสายพันธุ์นี้เท่ากับร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อเพิ่มปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตสูงขึ้นกว่านี้ การผลิตกรดมะนาวและการเติบโตจะเริ่มลดลง โดยที่ T.Furukawa et al.[20] รายงานไว้ว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตจะทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขุ่นข้น (muddied culture) ทำให้ประสิทธิภาพของการแลกเปลี่ยนออกซิเจนระหว่างอากาศกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ลดลงด้วย

นอร์มัล พาราฟฟินส์เป็นสารจำพวกไฮโดรคาร์บอน มีลักษณะคล้ายกับน้ำมันทั่วไปคือไม่ละลายในน้ำ เมื่อใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอน มักจะลอยอยู่ที่ผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้น ดังนั้นการสัมผัสระหว่างสารแหล่งคาร์บอน กับเซลล์ของจุลินทรีย์ที่อยู่ในชั้นของน้ำจะเกิดขึ้นได้ยากกว่าปกติ ดังนั้นวิธีที่ใช้ในการลดปัญหาดังกล่าว สามารถทำได้โดย (1) การเขย่าให้เข้ากัน ซึ่งวิธีนี้ได้ปฏิบัติอยู่แล้วในการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (2) การใช้สารลดแรงตึงผิว โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้สารลดแรงตึงผิวดังนี้ คือ Triton X -100 Tween-80 และ Corexit-7664 พบว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวทุกชนิดดังกล่าวไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวและการเติบโตของเชื้อ Candida oleophila

C-73 นอกจากนั้นยังพบว่า การเติบโตและการผลิตกรดมะนาวกลับมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวมากขึ้น โดยเฉพาะเมื่อใช้ Triton X-100 หรือ Tween-80 ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจาก Candida oleophila C-73 เป็นจุลินทรีย์เซลล์เดี่ยว ดังนั้น การกระจายตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นไปได้ด้วยดีอยู่แล้วเมื่อมีการเขย่าให้อากาศที่ดี ส่วนที่การเติบโตและการผลิตกรดมะนาวกลับลดลง เมื่อใช้ปริมาณของสารลดแรงตึงผิวเพิ่มขึ้น อาจเป็นเพราะว่าสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นสูงเป็นพิษต่อเซลล์ จึงทำให้การเติบโตและการผลิตกรดมะนาวลดลง

ส่วนการเติมสารแยกการควบคู่เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวนั้น ในการวิจัยนี้ใช้ 2,4-ไดไนโตรฟีนอล โดยปกติแล้วสารชนิดนี้มีความสามารถทำให้เยื่อผนังชั้นในของไมโตรคอนเดรียยอมปล่อยให้โปรตอนเข้าได้สะดวกเป็นเหตุให้แรงเคลื่อนที่ของโปรตอน(Proton-motif force, PMF)ถูกทำลายไป จึงไม่สามารถสร้าง ATP ได้ ซึ่งเมื่อปริมาณ ATP ลดลงแล้ว ทำให้ขาดกลไกการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ซิเตรตซินเทรส เพราะฉะนั้นการผลิตกรดมะนาวก็ยังคงดำเนินต่อไปได้[80] จากการทดลอง พบว่าทั้งปริมาณของสาร 2,4-ไดไนโตรฟีนอล ที่ใช้กับเวลาที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเติบโต และการผลิตกรดมะนาวทั้งสิ้น โดยที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมจะเท่ากับร้อยละ $1x10^{-3}$(น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยจะต้องเติมหลังการเลี้ยงเชื้อนาน 24 ชั่วโมง ปริมาณกรดมะนาวสูงสุดจะเท่ากับ 131.5 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 18 เมื่อความเข้มข้นของ 2,4-ไดไนโตรฟีนอล เพิ่มขึ้นมากกว่านี้ การเติบโตและการผลิตกรดมะนาวจะลดลง ซึ่งคงเป็นผลจากความเป็นพิษของตัวสารนั่นเอง จากรายงานการวิจัยของ H.Hustede et al.[24] พบว่า ปริมาณของ 2,4-ไดไนโตรฟีนอล ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวจะเท่ากับ $1x10^{-4}$ โมล[24] โดยเติมหลังการเลี้ยงเชื้อนาน 24 ชั่วโมงเช่นกัน เพื่อให้มีปริมาณเซลล์ที่มากพอสำหรับการผลิตกรดมะนาวก่อน เมื่อศึกษาถึงรูปแบบการเติบโตและการผลิตกรดมะนาวเมื่อมีการใช้ 2,4-ไดไนโตรฟีนอล (รูปที่ 32) พบว่า รูปแบบการผลิตกรดมะนาวและการเติบโตคล้ายคลึงกับผลการทดลองในรูปที่ 27(ไม่มีการเติม 2,4-ไดไนโตรฟีนอล) ยกเว้นเพียงแต่น้ำหนักเซลล์แห้งจะลดลงเหลือ 16.2 กรัมต่อลิตร และให้ปริมาณกรดมะนาวสิ้งสุดเท่ากับ 131.5 กรัมต่อลิตร หลังการเลี้ยงเชื้อนาน 6 วัน

จากการศึกษาสภาวะ และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อ Candida oleophila C-73 ได้สภาวะที่เหมาะสมต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น ทำให้ปริมาณกรดมะนาวเพิ่มขึ้นจากเดิมเริ่มต้น 29.5 กรัมต่อลิตร เป็น 131.5 กรัมต่อลิตร หลังการเลี้ยงเชื้อนาน 6 วันและเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการวิจัยและเอกสารสิทธิบัตรที่จดทะเบียนโดยบริษัทต่างๆดังแสดงใน ตารางที่ 19 พบว่า เชื้อ Candida oleophila C-73 เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่น่าจะนำไปใช้ในการศึกษาและพัฒนาสายพันธุ์ รวมทั้งการขยายส่วนของการผลิตให้ใหญ่ขึ้นต่อไป เนื่องจากผลผลิตกรดมะนาวที่ได้มีค่าใกล้เคียง หรือสูงกว่าที่ผลิตได้จากบางสายพันธุ์ โดยที่การวิจัยขั้นต่อๆไป น่าจะมุ่งเน้นถึงการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอ็นไซม์อะโคนิเตรสต่ำๆ หรือหาสายพันธุ์ที่มีความทนต่ออิออนโลหะหนักความเข้มข้นสูงๆ ซึ่งสามารถทำให้เราสามารถเลือกใช้วัตถุดิบตามธรรมชาติที่มีราคาถูกมาใช้ในการผลิตกรดมะนาวได้ เช่น กากน้ำตาล เป็นต้น โดยไม่ต้องคำนึงถึงปัญหาการปนเปื้อนของโลหะหนักในวัตถุดิบอีก

ตารางที่ 19 ผลผลิตกรดมะนาวจากนอร์มัล พาราฟฟินส์โดยยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ

ชื่อสายพันธุ์	ผลผลิตกรดมะนาว (กรัม/ลิตร)	เอกสารอ้างอิง
Candida lipolytica S-22	110.0	20,21
Candida lipolytica	130.0	2
Candida lipolytica IFP-29	135.0	62
Candida lipolytica 8661	120.0	63
Candida oleophila AC-7	128.0	29
Candida sp. H-22	112.0	18
Endomycopsis lipolytica D-1805	155.0	63