# บทที่ 4

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ เป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 ซึ่งคัดเลือกได้จากการวิจัยของศยามล นองบุญนาก (2534) ในขั้นแรกเป็นการศึกษาในระดับขวดเขย่า เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการทดลองในระดับถังหมักต่อไป โดยปัจจัยแรกที่ทำการศึกษาคือ สารแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว (Hossian et.al., 1984; Shu and Johnson, 1948a, 1948b; Xu et.al., 1989) Xu และคณะ (1989) รายงานว่า ชนิดและความเข้มข้นของสารแหล่งคาร์บอนมีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger อย่างมาก สำหรับในงานวิจัยนี้ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นสารแหล่งคาร์บอนตามการวิจัยของศยามล นองบุญนาก(2534)โดยเริ่มการศึกษาผลของความแตกต่างของค่าสมมูลเดกซ์โทรส (D.E.) ต่อการผลิตกรดมะนาว และศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารแหล่งคาร์บอน จากผลการทดลองพบว่า แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยที่มีค่าสมมูลเดกซ์โทรสสูงจะให้ผลผลิตกรดมะนาวสูงกว่าแป้งที่ผ่านการย่อยที่มีค่าสมมมูลเดกซ์โทรสต่ำ และความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสม เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง 106.9 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 13 วัน คิดเป็นผลผลิต 61.2 เปอร์เซนต์เทียบกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ทั้งหมด สอดคล้องกับผลการทดลองของ Shu และ Johnson (1948, 1948b) ซึ่งรายงานว่า เมื่อใช้สารอาหารที่มีน้ำตาลเข้มข้น 14-22 เปอร์เซนต์ เชื้อรา A. niger สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงเช่นเดียวกับรายงานของ Xu และคณะ (1989) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เชื้อรา A. niger ต้องการสารแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูง เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดความไม่สมดุลย์ของสารเมตาบอไลท์ ทำให้เกิดการสังเคราะห์กรดขึ้นมา

การผลิตกรดมะนาวด้วยเชื้อรา A. niger มี 2 ระยะคือ ระยะการเจริญของเชื้อรา และระยะการผลิตกรดมะนาว ดังนั้นจึงต้องมีองค์ประกอบของสารอาหารที่สมดุลย์ เพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราและการผลิตกรดมะนาว โดยเฉพาะสารแหล่งไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และแร่ธาตุเสริม ซึ่งมีผลกระทบต่อผลผลิตกรดมะนาว

(Marison, 1988) สารแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในงานวิจัยคือ แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสารแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ ส่วนฟอสฟอรัสใช้ในรูปโพแทสเซียมไดฟอสเฟตและไดโพแทสเซียมฟอสเฟตอย่างละ 0.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งโดยทั่วไปใช้ฟอสเฟตที่มีความเข้มข้นสูง 0.1 - 0.2 เปอร์เซนต์เพื่อใช้ในการเจริญของเชื้อรา ส่วนแร่ธาตุเสริมที่ใช้ในการทดลองคือ แมกนีเซียมและทองแดง ใช้ในรูปแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร และคอปเพอร์ซัลเฟตที่มีไอออนของทองแดงเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า เชื้อรา A. niger A185 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง 108.8 กรัมต่อลิตร

หัวเชื้อ เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger ลักษณะของหัวเชื้อมีผลต่อการเจริญในระยะแรกของเชื้อราและมีผลต่ออัตราการผลิตกรดมะนาว หัวเชื้อที่เหมาะสมจะมีไมซีเลียมที่รวมเป็นกระจุกรูปทรงกลมคล้ายเม็ดสาคู(pellets) ขนาดเล็กมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-5 มิลลิเมตร พื้นผิวเรียบ แน่น และมีขนาดเท่าๆกัน (Gomez et.al., 1988) จากผลการทดลองพบว่า หัวเชื้ออายุ 48 ชั่วโมง ซึ่งมีลักษณะไมซีเลียมดังที่กล่าวมา เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง 111.6 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 11 วัน ขณะที่เชื้อราผลิตกรดมะนาวได้เพียง 108.0 กรัมต่อลิตร ในเวลา 14 วัน เมื่อใช้หัวเชื้ออายุ 72 ชั่วโมง ทำให้ลดระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดมะนาวจากเดิมถึง 2 วัน

นอกจากปัจจัยต่างๆที่กล่าวมาแล้ว การเติมสารเสริมอื่นเช่น สารไขมัน สารแอลกอฮอล์โมเลกุลต่ำ ก็มีผลในการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวได้เช่นกัน จากการทดลองพบว่า การเติมเมทิลแอลกอฮอล์ให้ได้ความเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ ทำให้เชื้อรา A. niger A185 สามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงขึ้นถึง 127.8 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 10 วัน คิดเป็นผลผลิต 83.2 เปอร์เซนต์ เทียบกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Manomani และ Sreekantiah(1987) Marison(1988) Moyer (1953a, 1953b)) Panda และคณะ(1984) และ Purohit และ Daginawala (1986) การเติมเมทิลแอลกอฮอล์มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อรามีความทนต่อไอออนของเหล็ก สังกะสี และแมงกานีสเพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยังมีรายงานว่า การเติมแอลกอฮอล์มีผลต่อองค์ประกอบของฟอสฟอไลปิดของผนังเซลล์ของเชื้อรา ทำให้เพิ่มความสามารถในการผ่านสารเข้าและออกจากเส้นใย ทำให้เชื้อราสามารถปล่อยกรดมะนาวออกมาได้มากขึ้น(Maddox et.al., 1986; Marison, 1988) ส่วนการเติมน้ำมันพืชชนิดต่างๆ พบว่า ไม่มีผลต่อ

การเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว ทำให้เชื้อรา A. niger A185 ผลิตกรดมะนาวได้ต่ำลง และใช้ระยะเวลานานขึ้น แตกต่างจากผลการทดลองของ Millis และคณะ (1963) ซึ่งรายงานว่า การเติมน้ำมันมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว

จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่า พบว่า องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger A185 คือ แป้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่มีสมมูลเดกซ์โทรสไม่ต่ำกว่า 94 เปอร์เซนต์ ซึ่งใช้ในรูปปริมาณของแข็งทั้งหมดเป็น 200 กรัมต่อลิตรใช้เป็นสารแหล่งคาร์บอน แอมโมเนียมซัลเฟต 2.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.4 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.3 กรัมต่อลิตร คอปเพอร์ซัลเฟตที่มีทองแดงไอออนเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมทิลแอลกอฮอล์ 30 มิลลิลิตรต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วของการเขย่า 250 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูง 125.6 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 10 วัน คิดเป็นผลผลิต 78.8 เปอร์เซนต์ เทียบกับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ทั้งหมด

จากนั้นจึงทำการศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยการศึกษาอัตราการกวน และการเติมสารในระหว่างการหมัก ซึ่งเป็นปัจจัยที่ไม่สามารถทดลองได้ในระดับขวดเขย่า และใช้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับในระดับขวดเขย่า จากผลการทดลอง จะเห็นว่า อัตราการกวนมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว โดยเชื้อราต้องการออกซิเจนสูงอย่างเพียงพอต่อการผลิตกรดมะนาว เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Dawson และคณะ (1988), Gomez และคณะ (1988), Wichian และคณะ (1985) และนิมล กิจขันธ์ (2532) โดยเมื่อใช้อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที ควบคุมอัตราการให้อากาศ 1.0 v.v.m. พบว่า เชื้อราผลิตกรดมะนาวได้ 115.3 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 204 ของการหมัก ซึ่งมีค่าต่ำกว่าที่ผลิตได้ในระดับขวดเขย่า

นอกจากนั้น ยังมีปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว คือ การเติมสารในระหว่างการหมัก จัดเป็นกระบวนการหมักแบบ fed-batch culture โดยสารที่ใช้เติมคือ สารแหล่งคาร์บอนและสารแหล่งไนโตรเจน ซึ่งใช้ในรูปของแป้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ และแอมโมเนียมซัลเฟต ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การหาอัตราการเติมที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว นับว่าเป็นปัญหาสำคัญที่สุดปัญหาหนึ่งในกระบวนการ

หมักแบบนี้ จึงทำการทดลองศึกษาอัตราการเติมแบบมีอัตราการเติมคงที่เปรียบเทียบกับแบบมีการแปรผันอัตราการเติม จะเห็นว่า การเติมสารแหล่งคาร์บอนแบบมีการแปรผันอัตราการเติม เหมาะสมต่อเชื้อราในการเพิ่มผลผลิตกรดมะนาว โดยพบว่า การเติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 1.92 กรัมต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 และเพิ่มอัตราการเติมเป็น 2.30 และ 2.88 กรัมต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 120 และ 144 ตามลำดับ เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงขึ้นถึง 135.8 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 204 ของการหมัก คิดเป็นผลผลิตทั้งหมด 76.2 เปอร์เซนต์เทียบกับน้ำตาลที่ใช้ทั้งหมด และมีกำลังการผลิตเป็น 0.666 กรัมกรดมะนาวต่อลิตรต่อชั่วโมง

Dawson และคณะ (1989) รายงานว่า ฟอสเฟตเป็นสารจำกัดการเจริญสำหรับเชื้อรา A. niger ในการผลิตกรดมะนาว และเสนอว่า ควรมีการจำกัดปริมาณสารฟอสเฟตในการผลิตกรดมะนาวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต จากการทดลองที่ผ่านมา พบว่า เชื้อรามีการใช้สารฟอสเฟตอย่างต่อเนื่องสอดคล้องกับการใช้สารแหล่งไนโตรเจน และไม่มีการใช้สารฟอสเฟตอีกต่อไปเมื่อสารแหล่งไนโตรเจนถูกใช้หมด และพบว่า เชื้อรามีการใช้สารฟอสเฟตเพียง 48.6 เปอร์เซนต์ ทำให้มีสารฟอสเฟตเหลืออยู่ในถังหมักถึง 255.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงทดลองลดสารฟอสเฟตเริ่มต้นลง 50 เปอร์เซนต์ เพื่อให้สอดคล้องกับปริมาณสารฟอสเฟตที่เชื้อรานำไปใช้ ผลการทดลองพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างจากการหมักกรดมะนาวแบบ fed-batch culture ที่มีปริมาณสารฟอสเฟตเริ่มต้นสูง โดยเชื้อรามีการเจริญค่อนข้างต่ำ มีการใช้สารฟอสเฟตเพียง 54 เปอร์เซนต์ และยังคงมีสารฟอสเฟตเหลืออยู่ในถังหมักถึง 113-115 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงว่าเชื้อราใช้ฟอสเฟตส่วนหนึ่งในการสร้างเซลล์ แต่ต้องมีปริมาณฟอสเฟตเหลืออยู่ในถังหมักพอที่จะรักษาค่าความเป็นกรดด่าง (เป็นบัฟเฟอร์) ถ้ามีฟอสเฟตในระดับต่ำ น้ำหมักจะมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำ เป็นผลให้ปริมาณกรดมะนาวต่ำลงด้วยเช่นกัน โดยจะเห็นได้ว่า ค่าความเป็นกรดด่างต่ำลงถึง 1.3-1.5 ดังนั้นเชื้อราจึงไม่สามารถรักษาแอคทิวิตีเดิมไว้ได้ จึงมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่า เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงขึ้นถึง 143.0 กรัมต่อลิตร แต่ใช้ระยะเวลาในการหมักนานขึ้นถึง 264 ชั่วโมง จึงไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาว

Kristiansen และ Sinclair (1978) รายงานว่า สารแหล่งไนโตรเจนเป็นสารจำกัดการเจริญสำหรับเชื้อรา Aspergillus sp. ในการผลิตกรดมะนาว ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตกรดมะนาว และรายงานว่า การผลิตกรดมะนาวเริ่มต้นเมื่อสารแหล่งไนโตรเจนถูกใช้เกือบหมด ส่วน Choe และ Yoo (1991) รายงานว่า

เชื้อราจะดูดซึมไนโตรเจนเข้าสู่เซลล์ในรูปของแอมโมเนียมไอออน จากนั้นแอมโมเนียมไอออนภายในเซลล์จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน เพื่อใช้สำหรับการเจริญของเชื้อรา และเป็นตัวควบคุมการสังเคราะห์กรดมะนาวอีกด้วย Kristiansen และ Sinclair (1979) รายงานว่า เชื้อรามีการเพิ่มน้ำหนักเซลล์แห้งขึ้นเรื่อยๆหลังจากไนโตรเจนถูกใช้เกือบหมด แสดงว่า เชื้อรายังคงมีเพิ่มน้ำหนักหลังจากไนโตรเจนถูกใช้หมด โดยในระยะแรกเชื้อรามีการเจริญในลักษณะปกติ มีการใช้คาร์บอนและไนโตรเจนจากน้ำหมัก ต่อมาเมื่อไนโตรเจนในน้ำหมักถูกจำกัด จะมีการเปลี่ยนแปลงโดยเซลล์เริ่มมีการสะสมคาร์บอน ซึ่งเห็นได้จากการเพิ่มน้ำหนักเซลล์แห้ง เซลล์สะสมคาร์บอน(carbon-storing cells) นี้เป็นเซลล์ที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดมะนาว ดังนั้น Kristiansen และ Sinclair (1979) จึงเสนอว่า การเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวจะต้องมีการเพิ่มเซลล์สะสมคาร์บอน จะเห็นได้ว่าการหมักแบบ fed-batch culture ซึ่งเป็นการหมักที่มีการเติมสารจำกัดการเจริญอย่างต่อเนื่องนั้น เหมาะสมสำหรับการทดลองดังกล่าว Dawson และคณะ (1988) รายงานว่าการผลิตกรดมะนาวโดยเชื้อรา A. niger ในการหมักแบบ fed-batch culture โดยมีการเติมสารแหล่งไนโตรเจนก่อนไนโตรเจนถูกใช้หมด พบว่า เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงกว่าการหมักแบบ batch culture ถึง 15 เปอร์เซนต์ สอดคล้องกับผลการทดลองของ Choe และ Yoo (1991) ซึ่งรายงานเพิ่มเติมว่า เชื้อราต้องการสารแหล่งไนโตรเจนปริมาณเล็กน้อยเพื่อใช้ในการรักษาแอคทิวิตีของเซลล์ และป้องกันการสร้างสปอร์ ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงทำการทดลองเติมสารแหล่งไนโตรเจน ในที่นี้ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.825 กรัมต่อลิตร โดยเติมในอัตรา 3.30 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งเป็นระยะที่สารแหล่งไนโตรเจนถูกใช้เกือบหมด และเพิ่มอัตราการเติมเป็น 4.12 และ 4.95 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168 ของการหมัก โดยการคำนวณเทียบกับรายงานของ Dawson และคณะ(1988) และยังคงมีการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 1.92 กรัมต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 และเพิ่มอัตราการเติมเป็น 2.30 และ 2.88 กรัมต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168 ผลการทดลองพบว่า เมื่อมีการเติมสารแหล่งไนโตรเจนและสารแหล่งคาร์บอนในระหว่างการหมัก เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้เพิ่มสูงขึ้นถึง 147.9 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 192 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตทั้งหมด 82.3 เปอร์เซนต์เทียบกับน้ำตาลที่ใช้ทั้งหมด และมีกำลังการผลิตเป็น 0.770 กรัมกรดมะนาวต่อลิตรต่อชั่วโมง

การหาอัตราการเติมสารที่เหมาะสม สำหรับการผลิตกรดมะนาวในกระบวนการหมักแบบ fed-batch culture ยังคงเป็นปัญหาสำคัญในการทดลอง ดังนั้นจึงทำการทดลองเพิ่มปริมาณและอัตราการเติมสารแหล่งคาร์บอน เพื่อให้เชื้อราสามารถใช้คาร์บอนและไนโตรเจนได้อย่างเต็มที่ โดยการเติมแป้งที่ผ่านการย่อยในอัตรา 2.30 กรัมต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 96 และเพิ่มอัตราการเติมเป็น 2.88 และ 3.07 กรัมต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168 และมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตรา 3.30 มิลลิกรัมต่อชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 และเพิ่มอัตราการเติมเป็น 4.12 และ 4.95 มิลลิกรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 และ 144 ตามลำดับ และหยุดการเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 168 ของการหมัก พบว่า การเพิ่มปริมาณและอัตราการเติมสารแหล่งคาร์บอน เชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงขึ้นถึง 156.5 กรัมต่อลิตร แต่ใช้เวลาในการหมักนานถึง 240 ชั่วโมง และยังมีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ในถังหมักมาก ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการผลิตกรดมะนาว

การเปรียบเทียบการหมักกรดมะนาวในระดับขวดเขย่ากับระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อพิจารณาลักษณะของไมซีเลียม พบว่า ลักษณะไมซีเลียมที่เกิดขึ้นในการผลิตกรดมะนาวในขวดเขย่ามีลักษณะเป็นเม็ดสาคู ทรงกลม ขนาด 2-5 มิลลิเมตร ส่วนในถังหมักที่มีใบพัดกวนผสมนั้น ในระยะ 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก ไมซีเลียมมีลักษณะเป็นเม็ดสาคูเช่นเดียวกับในขวดเขย่า หลังจากนั้นไมซีเลียมมีการเปลี่ยนแปลงเป็นแบบเส้นใย (filamentous) ซึ่งทำให้น้ำหมักมีความหนืด(viscosity) สูงขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ Heinrich และ Rehm (1982) และ Mitard และ Riba (1988) สำหรับลักษณะไมซีเลียมแบบเส้นใยเกิดจากสาเหตุหลายประการคือ แรงเฉือน (shear stress)ในการกวนผสม การถ่ายเทออกซิเจน (oxygen transfer) ลักษณะการเคลื่อนที่(rheology)ของน้ำหมัก อัตราการเจริญจำเพาะ และลักษณะของเชื้อรา (Mitard and Riba, 1988) ส่วน Heinrich และ Rehm(1982) รายงานว่า การเกิดไมซีเลียมแบบเส้นใยในการผลิตกรดมะนาวในถังหมักเนื่องมาจากมีแมงกานีสจากถังหมักส่วนที่เป็นเหล็กปลอดสนิม ซึ่งปนเปื้อนในน้ำหมักในระหว่างการฆ่าเชื้อ (sterilization) และในระหว่างการหมัก ซึ่ง Clark และคณะ (1966) รายงานว่า แมงกานีสมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญของไมซีเลียมแบบเส้นใย แทนที่แบบเม็ดสาคูในระหว่างการหมักกรดมะนาวด้วยเชื้อรา A. niger ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า การหมักกรดมะนาวในขวดเขย่าอยู่ในสภาวะการขาดแมงกานีส ส่วนในถังหมักจะอยู่ในสภาวะที่มีแมงกานีสจึงทำให้ลักษณะไมซีเลียมที่เกิดขึ้นแตกต่างกัน (Heinrich and Rehm, 1982) ซึ่ง

มีผลต่อการผลิตกรดมะนาว ทำให้การผลิตกรดมะนาวในถังหมักโดยใช้กระบวนการหมักแบบ batch culture มีปริมาณกรดมะนาวต่ำกว่าในระดับขวดเขย่า เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการหมักกรดมะนาวด้วยกระบวนการต่างๆ จะเห็นว่า การหมักแบบ fed-batch culture เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดมะนาวมากที่สุด โดยเชื้อราสามารถผลิตกรดมะนาวได้สูงสุดถึง 147.9 กรัมต่อลิตร สูงกว่าการหมักในขวดเขย่าและการหมักแบบ batch culture ถึง 17.8 และ 28.3 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และมีกำลังการผลิตกรดมะนาวทั้งหมดสูงกว่าการหมักในขวดเขย่าและการหมักแบบ batch culture ถึง 47.2 และ 15.6 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ